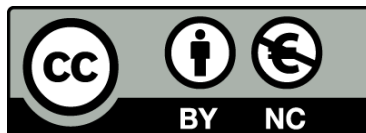




UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

## Utilidad y aplicación de diferentes técnicas (bioquímicas, proteómicas y moleculares) en la caracterización de *Leishmania*

Anna Fernández Arévalo



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

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

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



UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAD DE FARMACIA Y CIENCIAS DE LA ALIMENTACIÓN

(Dra. Montserrat Gállego y Dra. Carme Muñoz)

UTILIDAD Y APLICACIÓN DE DIFERENTES TÉCNICAS  
(BIOQUÍMICAS, PROTEÓMICAS Y MOLECULARES) EN  
LA CARACTERIZACIÓN DE *LEISHMANIA*

ANNA FERNÁNDEZ ARÉVALO, 2020



UNIVERSITAT DE BARCELONA  
FACULTAD DE FARMACIA Y CIENCIAS DE LA ALIMENTACIÓN  
Programa de Doctorado en Investigación, Desarrollo y Control de  
Medicamentos

UTILIDAD Y APLICACIÓN DE DIFERENTES TÉCNICAS  
(BIOQUÍMICAS, PROTEÓMICAS Y MOLECULARES) EN  
LA CARACTERIZACIÓN DE *LEISHMANIA*

Memoria presentada por Anna Fernández Arévalo para optar al título de doctor por  
la Universitat de Barcelona



Montserrat Gállego Culleré



Carme Muñoz Batet



Anna Fernández Arévalo

---

## Agradecimientos

Aun dudando si agradecer a “la Anna del pasado” el haberse colgado la mochila y haberse lanzado a andar por uno de los caminos más [*insertar adjetivo*] que encontré, aquí estoy –al fin– empezando la última etapa de este viaje. Antes de dar estos últimos pasos y de que, muy hábilmente, mi cerebro guarde este viaje como “esfuerzo que ha valido la pena”, pero difumine la parte “esfuerzo”, toca mirar atrás. Toca recordar que el trayecto se me ha hecho largo, que me he cuestionado varias veces si valía la pena seguir hasta el destino “esperado”, que a los premios y palmaditas en la espalda les han precedido ratos de desafíos, nervios, agobios, frustración o todo a la vez y que ha sido algo que, para bien o para mal, ha dejado huellas en todos los terrenos de mi vida, más allá de lo profesional y lo académico. También toca mirar los pies con los que ando a partir de hoy. A lo largo de este camino, he cambiado y mi equipaje también. En algún momento me salieron canas y cambié la mochila por un carro; un carro que va lleno de lo mejor que da un viaje como este: aprendizaje y personas. Como oí decir una vez al Dr. Coll, una tesis no es el trabajo de una sola persona –y menos mal–. En este recorrido, sois muchos los que, en algún momento y a vuestra manera, me habéis ayudado a andar y a tirar y, por eso, me gustaría dedicaros unas líneas en las que no escatimaré en gracias.

A mis directoras, la Dra. Gállego y la Dra. Muñoz. Carme i Montse, moltes gràcies per dirigir aquesta expedició i fer que haguem arribat al destí proposat. Gràcies pel vostre suport en l'àmbit acadèmic, professional, econòmic i sobretot en el personal. Gràcies per totes les oportunitats oferides, tant les que he agafat com les que no, i gràcies pels bons moments d'esbarjo i per les sobretaules plenes de riure per les vostres mil i una aventures.

A la gente de Marseille, donde hice mi primera estancia. Merci au Professeur Renaud Piarroux de m'avoir accueilli au Laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU La Timone et dans sa maison. Merci aussi à toute la famille Piarroux, pour son hospitalité, pour avoir aidé avec toutes les démarches et pour les excursions, sans vous j'aurais été bien perdu. Merci à Fakhri Jeedi de m'avoir appris, toujours avec un sourire, toutes les manipulations du MALDI-TOF et à Anne-Cécile Normand pour la partie informatique. Merci à Charles Mary, de m'avoir aidé avec la biologie moléculaire et pour ses cours improvisés, c'est un plaisir de vous écouter. Merci à Louise, Anne-So et Cécile pour avoir été mes guides à l'hôpital et pour les bons moments à l'extérieur. Je dois revenir.

A los de Montpellier, ciudad en la que ha transcurrido una parte importante del camino y que *m'a volé le cœur* (també gràcies per això, directores). Merci à Patrick Bastien, de m'avoir accueilli au Laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU Montpellier, pour les commentaires sur des sujets scientifiques et autres moments hors laboratoire. Merci à Laurence Lachaud pour sa proximité, pour le travail facile et agréable et pour avoir partagé avec moi la paternité de l'article sur le MALDI-TOF. Merci à Christophe Ravel pour sa grande disposition et implication, qui ont été la clé du travail de sur « les donovanis » ; aussi

---

pour toutes les discussions et conseils au-delà du domaine scientifique, certains je les ai bien mémorisé. Merci à Francine Pratlong, d'avoir pris du temps dans sa nouvelle vie et de m'avoir enseigné, avec tant de passion, les étapes à suivre pour une bonne interprétation des isoenzymes et comment préparer une délicieuse salade de carottes. Merci à Patrick Lami, de m'avoir enseigné la technique des isoenzymes, pour sa patience et sa bonne humeur. Merci à Fouad El Baidouri, pour sa collaboration et sa télé-assistance. Merci à Yves Balard, pour avoir apporté un coup de main dans le domaine informatique chaque fois que nécessaire et à Joelle, pour la force et la gentillesse qu'elle transmet. Enfin, merci à ma bien-aimée colocataire et, maintenant amie, Laeti de m'avoir fait sentir chez moi, d'avoir transformé mes séjours en vacances pleines de bons moments et d'avoir corrigé ces lignes. On se voit bientôt.

A la gente del Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Farmacia y a la del Servicio de Microbiología del Hospital de Sant Pau, mis segundas residencias durante este tiempo. Gràcies al Dr. Coll i al Dr. Navarro per haver-me permès compaginar la tesi amb la feina de l'hospital i, al igual que a tots els adjunts, gràcies pels comentaris i observacions sobre aquest treball. Gracias a Tere por echarme una mano con el MALDI y al resto de técnicos del servicio por vuestra ayuda siempre que la he necesitado. Gracias a mis queridos compañeros de batalla: Alba, Alba, Albert, Carla, Carme, Cris, Diana, Eli, Eva, Gonzalo, Jordana, Judith, Leire, Magda, Marc, Mary Cruz, Paula, Rita, Yaide y, muy especialmente, a Laura, a Montse y a Sílvia porque, al igual que al resto, me habéis salvado mil y una vez, porque siempre estáis dispuestas a ayudar aunque os retrase y porque lo hacéis de corazón. A todos, gracias por los momentos de risas, de desfogue, de compartir, de locura, de apoyo mutuo y también por vuestra colaboración en este trabajo. Lo mejor de que haya sido una codirección es que me llevo el doble de amigos.

A mi familia y demás amigos; abuelas, tías/os, primas/os, a los del Cine, los Biolokos, las Meninas y demás. Gracias por vuestro interés a modo de “¿cómo lo llevas?”, “¿cuánto te falta?”, “y la tesis ¿para cuándo?”, “¿todavía no la has acabado?”, “¿quieres acabarla de una vez?”, etc. Y por vuestro apoyo, ánimo y consuelo incondicional ante mis negativas. Gracias a Laura y a Mònica por revisarse el inglés. Gracias a mis abuelos, por motivarme a apuntar alto.

A Marina, David, Sandra y Marisol. Gracias por “resetearme” desde vuestras disciplinas cuando la salud se me desmarchaba.

A los de casa; Ma, Pa, Lorena y Toni. Gracias por aguantar(me), por consolarme, por ponerme las pilas, por arroparme, por haberle echado un vistazo a partes de este trabajo, por mantenerme, por apoyarme siempre y por una larga lista de etcéteras. Gracias por quererme tanto, como yo a vosotros.

Ha sido un placer compartir la caminata con todos vosotros, nos vemos en una próxima aventura. Si no os importa, pondré algo de música de fondo.

---

Una de las estancias realizadas fue financiada por una beca de movilidad de la Fundació Montcelimar en colaboración con la Universitat de Barcelona. Parte del equipo de investigación está financiado por la Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca (AGAUR) (2017 SGR 00924) y por la Red de Investigación Cooperativa en Enfermedades Tropicales (RICET) (RD12/0018/0010). ISGlobal, institución a la que están vinculados algunos colaboradores, es miembro del Programa Centres de Recerca de Catalunya (CERCA) de la Generalitat de Catalunya.

---

*Ábrelos, ábrelos, despacio.  
Di que ves, dime que ves, si hay algo...*





# Índice

Abreviaturas/Acronyms .....	iii
Resumen/Abstract.....	vii
1. Introducción.....	1
1.1. <i>Leishmania</i> , aspectos generales del parásito .....	2
1.2. Taxonomía y principales complejos del género <i>Leishmania</i> .....	5
1.3. Las leishmaniosis .....	10
1.3.1. Las leishmaniosis importadas .....	12
1.3.2. Las leishmaniosis en España .....	13
1.4. Diagnóstico de las leishmaniosis .....	14
1.5. Control de la infección y tratamiento .....	17
1.6. Identificación y caracterización de las leishmanias .....	18
1.6.1. Técnicas bioquímicas .....	18
1.6.2. Técnicas moleculares .....	20
1.6.3. Técnicas proteómicas .....	26
2. Hipótesis y Objetivos/Hypothesis and objectives .....	29
2.1. Hipótesis/Hypothesis .....	30
2.2. Objetivos/Objectives .....	30
3. Material y métodos .....	33
3.1. Cepas utilizadas .....	34
3.1.1. Cepas incluidas en el estudio sobre la aplicación del MALDI-TOF a la caracterización de las leishmanias (apartado 4.1) .....	34
3.1.2. Cepas incluidas en el estudio del complejo <i>Leishmania donovani</i> (apartado 4.2) .....	34
3.1.3. Cepas incluidas en el estudio de las cepas causantes de leishmaniosis tegumentaria en Cataluña (apartado 4.3).....	35
3.1.4. Cepas incluidas en el estudio isoenzimático y descripción de nuevos zimodemas causantes de leishmaniosis tegumentaria en América Latina (apartado 4.4) .....	35
3.2. Descongelación y cultivo de las leishmanias.....	35
3.3. Técnicas bioquímicas: electroforesis de enzimas multilocus e isoelectrofocalización .....	36
3.3.1. Obtención de extractos proteicos .....	36
3.3.2. Electroforesis de enzimas multilocus .....	36
3.3.3. Isoelectrofocalización .....	37
3.4. Técnicas moleculares: PCR-secuenciación .....	38

---

3.5. Técnicas proteómicas: espectrometría de masas MALDI-TOF.....	39
3.6. Análisis informático .....	40
3.6.1. Análisis de los zimodemas .....	40
3.6.2 Análisis de las secuencias .....	40
3.6.3. Análisis de los espectros .....	41
3.6.4. Otros análisis.....	42
4. Results and analysis.....	45
4.1. Identification of <i>Leishmania</i> 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 .....	46
4.1.1. Background .....	46
4.1.2. Results.....	46
4.1.3. Results analysis.....	51
4.2. The complex evolving scenario of the <i>Leishmania donovani</i> complex: a new insight into taxonomy.....	54
4.2.1. Background .....	54
4.2.2. Results.....	55
4.2.3. Results analysis.....	63
4.3. Autochthonous and imported tegumentary leishmaniasis in Catalonia (Spain): aetiological evolution in the last four decades and the usefulness of different typing approaches based on biochemical, molecular and proteomic markers .....	68
4.3.1. Background .....	68
4.3.2. Results.....	68
4.3.3. Results analysis.....	77
4.4. Non-autochthonous <i>Leishmania</i> species causing cutaneous leishmaniasis in Spain: description of new zymodemes in Latin-American strains isolated in Barcelona.....	83
4.4.1. Background .....	83
4.4.2. Results and analysis .....	83
5. Discusión general.....	87
5.1. Las técnicas de caracterización desde el punto de vista asistencial.....	88
5.2. Las técnicas de caracterización desde el punto de vista taxonómico.....	90
5.3. Las técnicas de caracterización desde el punto de vista epidemiológico.....	92
6. Conclusiones/Conclusions .....	95
7. Bibliografía.....	101
8. Anexos.....	139

## Abreviaturas/Acronyms

<b>7SL</b>	<i>7 spliced leader</i>
<b>A</b>	Adenina/ <i>Adenine</i>
<b>ADN/DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico/ <i>Deoxyribonucleic acid</i>
<b>ADNk/kDNA</b>	Ácido desoxirribonucleico del kinetoplasto/ <i>Kinetoplast deoxyribonucleic acid</i>
<b>AFLP</b>	Polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados/ <i>Amplified fragment length polymorphism</i>
<b>ANI</b>	Identidad nucleotídica media/ <i>Average nucleotide identity</i>
<b>ARN/RNA</b>	Ácido ribonucleico/ <i>Ribonucleic acid</i>
<b>ARNr/rRNA</b>	Ácido ribonucleico ribosomal/ <i>Ribosomal ribonucleic acid</i>
<b>BCN</b>	Código de cepa del criobanco/ <i>Cryobank stain code</i> Universitat de Barcelona
<b>C</b>	Citosina/ <i>Cytosine</i>
<b>CHU</b>	Centre Hospitalier Universitaire
<b>CRB-Leish</b>	Centre de Ressources Biologiques des <i>Leishmania</i>
<b>CYTB (cytb)</b>	Citocromo B (gen)/ <i>Cytochrome B (gene)</i>
<b>DIA</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido (NADH)-diaforasa/ <i>Nicotinamide adenine dinucleotide (NADH)-diaphorase</i>
<b>DDT</b>	Dicloro difenil tricloroetano/ <i>Dichlorodiphenyltrichloroethane</i>
<b>DOI</b>	Identificador de objeto digital/ <i>Digital object identifier</i>
<b>ELISA</b>	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas/ <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
<b>Ej./ e.g.</b>	Por ejemplo/ <i>exempli gratia</i>
<b>FFL</b>	Análisis fluorescente de la longitud de los fragmentos/ <i>Fluorescent fragment length analysis</i>
<b>FH (fh)</b>	Fumarato hidratasa (gen)/ <i>Fumarate hydratase enzyme (gene)</i>
<b>G</b>	Guanina/ <i>Guanine</i>
<b>G6PD</b>	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa/ <i>Glucose-6-phosphate dehydrogenase</i>
<b>GLUD</b>	Glutamato deshidrogenasa/ <i>Glutamate dehydrogenase</i>
<b>GOT (got)</b>	Glutamato-oxaloacetato transaminasa (gen)/ <i>Glutamate-oxaloacetate transaminase (gene)</i>
<b>GP63 (gp63), MSP</b>	Glicoproteína de 63 kDa (gen), proteasa mayor de superficie/ <i>Glycoprotein 63kDa (gene), major surface protease</i>
<b>GPI</b>	Glucosa fosfato isomerasa/ <i>Glucose phosphate isomerase</i>

---

<b>GTR+G+I</b>	<i>General time reversible + gamma distribution + proportion of invariable sites</i>
<b>H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub></b>	Ácido fosfórico/ <i>Phosphoric acid</i>
<b>HSP70 (hsp70)</b>	Proteína de choque térmico de 70 kDa (gen)/ <i>Heat shock protein 70kDa (gene)</i>
<b>ICD</b>	Isocitrato deshidrogenasa/ <i>Isocitrate dehydrogenase</i>
<i>i.e.</i>	Es decir/ <i>Id est</i>
<b>IEF</b>	Isoelectroenfoque/ <i>Isoelectric focusing</i>
<b>IOC</b>	Zimodemas/ <i>Zymodemes</i> Instituto Oswaldo Cruz
<b>ITS</b>	Espaciador transcribible interno/ <i>Internal transcribed spacer</i>
<b>IUPAC-IUB</b>	International Union of Pure and Applied Chemistry - International Union of Biochemistry
<b>K</b>	Nucleótido ambiguo guanina-timina/ <i>Ambiguous nucleotide guanine-thymine</i>
<b>LAMP</b>	Amplificación isotérmica mediada por bucle/ <i>Loop-mediated isothermal amplification</i>
<b>LC/CL</b>	Leishmaniosis cutánea/ <i>Cutaneous leishmaniasis</i>
<b>LCD/DCL</b>	Leishmaniosis cutánea difusa/ <i>Diffuse cutaneous leishmaniasis</i>
<b>LD/DL</b>	Leishmaniosis diseminada/ <i>Disseminated leishmaniasis</i>
<b>LEM</b>	Código de cepa del criobanco/ <i>Cryobank stain code</i> Centre de Ressources Biologiques des <i>Leishmania</i> Montpellier
<b>LMC/MCL</b>	Leishmaniosis mucocutánea/ <i>Mucocutaneous leishmaniasis</i>
<b>LON</b>	Zimodemas/ <i>Zymodemes</i> London School of Hygiene and Tropical Medicine
<b>LR</b>	Leishmaniosis recidivante/ <i>Leishmaniasis recidivans</i>
<b>LT/TL</b>	Leishmaniosis tegumentaria/ <i>Tegumentary leishmaniasis</i>
<b>LV/VL</b>	Leishmaniosis visceral/ <i>Visceral leishmaniasis</i>
<b>M</b>	Nucleótido ambiguo adenina-citosina/ <i>Ambiguous nucleotide adenine-cytosine</i>
<b>m/z</b>	Relación masa-ionización/ <i>Mass-ionization ratio</i>
<b>MALDI-TOF</b>	Desorción-ionización láser asistida por matriz –tiempo de vuelo/ <i>Matrix assisted laser desorption ionization–time of flight</i>
<b>MDH</b>	Malato deshidrogenasa/ <i>Malate dehydrogenase</i>
<b>ME</b>	Enzima málica/ <i>Malic enzyme</i>
<b>ML</b>	Máxima verosimilitud/ <i>Maximum likelihood</i>
<b>MLEE</b>	Electroforesis de enzimas multilocus/ <i>Multilocus enzyme electrophoresis</i>

<b>MLMT</b>	Tipificación multilocus de microsátelies/ <i>Multilocus microsatellite typing</i> ,
<b>MLSA</b>	Análisis de secuencias multilocus/ <i>Multilocus sequence analysis</i>
<b>MLST</b>	Tipificación multilocus de secuencias/ <i>Multilocus sequence typing</i>
<b>Mn</b>	Manganeso/ <i>Manganese</i>
<b>MON</b>	Zimodemas/Zymodemes Centre Hospitalier Universitaire Montpellier
<b>MPI (mpi)</b>	Manosa fosfato isomerasa (gen)/ <i>Mannose phosphate isomerase (gene)</i>
<b>MS</b>	Espectrometría de masas/ <i>Mass spectrometry</i>
<b>MSI</b>	Aplicación web/ <i>Web application</i> Mass Spectrometry Identification
<b>MSL</b>	Librería de espectros de masa/ <i>Mass spectra library</i>
<b>NaCl</b>	Cloruro sódico/ <i>Sodium chloride</i>
<b>NAD</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido/ <i>Nicotinamide adenine dinucleotide</i>
<b>NADP</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato/ <i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>
<b>NaOH</b>	Hidróxido de sodio/ <i>Sodium hydroxide</i>
<b>NASBA</b>	Amplificación basada en secuencia de ácido nucleico/ <i>Nucleic acid sequence-based amplification</i>
<b>NJ</b>	<i>Neighbour joining</i>
<b>NN</b>	<i>Neighbour-net</i>
<b>NNN</b>	Medio de cultivo/ <i>Culture medium</i> Novy-McNeal-Nicolle
<b>NP</b>	Purina nucleósido fosforilasa/ <i>Purine nucleoside phosphorylase</i>
<b>OMS/WHO</b>	Organización Mundial de la Salud/ <i>World Health Organization</i>
<b>PC</b>	Componente principal/ <i>Principal component</i>
<b>PCA</b>	Análisis de componentes principales/ <i>Principal component analysis</i>
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa/ <i>Polymerase chain reaction</i>
<b>PGD (pgd)</b>	Fosfogluconato deshidrogenasa (gen)/ <i>Phosphogluconate dehydrogenase (gene)</i>
<b>PKDL</b>	Leishmaniosis dérmica post-Kala-azar/ <i>Post-Kala-azar dermal leishmaniasis</i>
<b>PPV</b>	Valor predictivo positivo/ <i>Positive predictive value</i>
<b>R</b>	Nucleótido ambiguo guanina-adenina/ <i>Ambiguous nucleotide guanine-adenine</i>
<b>RAPD</b>	Amplificación aleatoria del ADN polimórfico/ <i>Random amplification of polymorphic DNA</i>
<b>RENAVE</b>	Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica

---

<b>RFLP</b>	Polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción/ <i>Restriction fragment length polymorphism</i>
<b>RPMI</b>	Medio de cultivo/ <i>Culture medium</i> Roswell Parck Memorial Institute
<b>RPOIILS</b> ( <i>rpoIILS</i> )	Subunidad mayor de la RNA polimerasa II (gen)/ <i>RNA polymerase II largest subunit (gene)</i>
<b>S</b>	Nucleótido ambiguo guanina-citosina/ <i>Ambiguous nucleotide guanine-cytosine</i>
<b>SBF</b>	Suero bovino fetal/ <i>Fetal bovine serum</i>
<b>SDM-79</b>	Medio de cultivo/ <i>Culture medium</i> Semi Defined Medium 79
<b>SH test</b>	Test Shimodaira-Hasegawa
<b>SSCP</b>	Polimorfismo de conformación de cadena simple/ <i>Single stranded conformational polymorphism</i>
<b>T</b>	Timina/ <i>Thymine</i>
<b>UB</b>	Universitat de Barcelona
<b>VIH/HIV</b>	Virus de la inmunodeficiencia humana/ <i>Human immunodeficiency virus</i>
<b>W</b>	Nucleótido ambiguo timina-adenina/ <i>Ambiguous nucleotide thymine-adenine</i>
<b>Y</b>	Nucleótido ambiguo timina-citosina/ <i>Ambiguous nucleotide thymine-cytosine</i>

## Resumen

Las leishmaniosis son un grupo de enfermedades ampliamente distribuidas que se presentan bajo diferentes formas clínicas y que están causadas por diversas especies del género *Leishmania*. Mientras que la clínica visceral se asocia principalmente al complejo *L. donovani*, la clínica tegumentaria –cutánea y mucocutánea– puede estar producida por cualquiera de las cerca de 20 especies que afectan al humano. En España, el agente etiológico autóctono, tanto de la leishmaniosis visceral como de la tegumentaria es *L. infantum*, especie incluida en el complejo *L. donovani*. Sin embargo, en las últimas décadas, y al igual que en otras regiones, se han reportado casos importados asociados a otras especies como consecuencia de la globalización. Dado que la evolución de la enfermedad puede verse influida por la especie causal, la identificación de la especie de *Leishmania* permite, en el ámbito asistencial, mejorar la prognosis y el manejo terapéutico. Hoy en día, existe un amplio abanico de técnicas con diferentes características en cuanto al poder de discriminación, la sencillez, el coste o la rapidez, entre otras. Pero, independientemente de la técnica de elección, la compleja taxonomía del género, junto a las discrepancias en cuanto a la validez de algunas especies, puede dificultar esta tarea. Con estos antecedentes, el objetivo de este trabajo ha sido la evaluación de distintas metodologías bioquímicas –electroforesis de enzimas multilocus (MLEE), en la que se basa la taxonomía actual–, moleculares –secuenciación de distintas regiones genéticas– y proteómicas –espectrometría de masas MALDI-TOF–, para abordar cuestiones como la controversia en torno a la taxonomía del complejo *L. donovani* y la etiología y la epidemiología de la leishmaniosis tegumentaria en nuestro entorno.

Para la identificación de las leishmanias mediante MALDI-TOF, se colaboró en la evaluación de una librería de espectros de referencia de *Leishmania* constituida por 121 cepas pertenecientes a 33 taxones y accesible a través de una aplicación web gratuita, mediante un panel de validación compuesto por 231 cepas pertenecientes a 22 taxones. Esta, resultó ser una herramienta rápida y sencilla para la identificación de las leishmanias a nivel de especie, a pesar de que se observó riesgo de identificación incorrecta en el seno de los complejos más controvertidos –*L. donovani*, *L. braziliensis* y *L. guyanensis*–.

Para profundizar en el estudio del complejo *L. donovani*, se analizó una representación de 56 cepas previamente caracterizadas por MLEE como *L. infantum* (31), *L. donovani* (20) y *L. archibaldi* (5). Estas cepas habían sido aisladas, tanto de humanos como de otros reservorios animales y vectores, en 20 países de África, Europa y Asia. Para el estudio se realizó la electroforesis de la enzima GOT, la secuenciación de los genes *hsp70* y *got* y el MALDI-TOF. Además, se utilizaron las secuencias de siete genes incluidos en un análisis de secuencias multilocus (MLSA), obtenidas en un trabajo realizado previamente con estas cepas, y la información completa del MLEE. Los resultados mostraron ciertas discrepancias entre los métodos basados en el estudio de la GOT y el resto. En cuanto a la estructura del



---

complejo, se observó poca variabilidad genética junto con indicios de intercambios genéticos frecuentes en un gradiente este-oeste a lo largo del área geográfica de distribución. A la vez, se detectó la dispersión a gran escala de genotipos concretos y la presencia de ecotipos. En su conjunto, los marcadores utilizados no mostraron evidencias genéticas suficientes para separar las dos especies actualmente consideradas dentro del complejo –*L. donovani* y *L. infantum*–.

Para la evaluación de la etiología y la epidemiología de la leishmaniosis tegumentaria en Cataluña, se estudiaron 56 cepas aisladas en los últimos 40 años en la región. Al mismo tiempo, se hizo una comparativa de la utilidad de metodologías como el MLEE, la secuenciación de los genes *hsp70*, *rpoHLS*, *fh* y de la región ITS2 y el MALDI-TOF para este propósito. Las identificaciones de todas las técnicas fueron coincidentes a nivel de complejo; sin embargo, no ofrecían el mismo poder de discriminación, variando en función de la técnica y de cada complejo. Se identificaron 29 tipos de cepas basados en el análisis de las regiones *hsp70*, ITS2 y en las isoenzimas. Todos los casos autóctonos fueron causados por *L. infantum*, existiendo una cepa tipo predominante (tipo C) y presente a lo largo del periodo. Los casos importados, en aumento en las últimas dos décadas, estaban causados por cinco especies originarias tanto del Nuevo Mundo –*L. braziliensis* (6), *L. guyanensis* (2), *L. panamensis* (1)– como del Viejo Mundo –*L. tropica* (1), *L. major* (10) –. Además, se identificaron cuatro zimodemas nuevos: *L. braziliensis* MON-328, *L. guyanensis* MON-327 y MON-330 y *L. panamensis* MON-329. Los resultados de este estudio enfatizan la importancia de la identificación de la especie causal, especialmente en inmigrantes o en aquellos casos con historial de viaje.

En conclusión, las técnicas de identificación aportan información relevante en contextos tan distintos como el asistencial, el taxonómico o el epidemiológico. No obstante, es imprescindible escoger, en función de las características de cada una de las metodologías, aquella que satisfaga las demandas de la cuestión a responder. Así, el MALDI-TOF y la secuenciación de los genes *rpoHLS* y *fh* serían las técnicas más adecuadas para la práctica clínica por su rapidez y sencillez, mientras que la secuenciación del gen *hsp70* y de la región ITS2, al ofrecer un poder de discriminación mayor, podrían constituir un tándem interesante para substituir al MLEE en los estudios epidemiológicos.

## Abstract

Leishmaniasis are widespread diseases with different clinical forms caused by the species within the *Leishmania* genus. While visceral symptoms are mainly associated with the *L. donovani* complex, tegumentary manifestations –cutaneous and mucocutaneous– can be produced by any of the around 20 species affecting humans. In Spain, the autochthonous aetiological agent of both visceral and tegumentary leishmaniasis is *L. infantum*, a species included in the *L. donovani* complex. However, in the last decades, imported cases associated with other species have been reported because of globalization. Given that the evolution of the disease can be influenced by the causal species, the identification of the *Leishmania* species allows a better prognosis and therapeutic management in the healthcare field. Nowadays, there is a wide range of techniques with different characteristics in terms of the discrimination power, simplicity, cost or speed, among others. Regardless of the technique of choice, the identification task is hampered by the complex taxonomy of the genus and the discrepancies regarding the validity of some species. With this background, the objective of this work was to evaluate different biochemical, molecular and proteomic methodologies, such as multilocus enzyme electrophoresis (MLEE) –on which the current taxonomy is based–, sequencing of different genomic regions and MALDI-TOF mass spectrometry, to address issues like the controversy surrounding the taxonomy of the *L. donovani* complex and the aetiology and epidemiology of tegumentary leishmaniasis in our region.

For the identification of *Leishmania* by MALDI-TOF, we collaborated in the evaluation of a *Leishmania* reference mass spectral library, consisting of 121 strains belonging to 33 taxa and accessible in a free web application, through a validation panel consisting of 231 strains belonging to 22 taxa. It turned out to be a fast and simple tool for *Leishmania* identification at the species level, even though a risk of misidentification within the most controversial complexes –*L. donovani*, *L. braziliensis* and *L. guyanensis*– was observed.

To delve in the study of the *L. donovani* complex, a representation of 56 strains was analysed. These had previously been characterized by MLEE as *L. infantum* (31), *L. donovani* (20) and *L. archibaldi* (5) and had been isolated from different sand fly species, dogs and humans in 20 countries in Africa, Europe and Asia. We performed the GOT enzyme electrophoresis, the sequencing of the *hsp70* and *got* genes and the MALDI-TOF technique. Additionally, we used the sequences of seven genes included in a multilocus sequence analysis (MLSA), obtained in a previous work with these strains, and the complete MLEE information. The results showed certain discrepancies between the methods based on the GOT study and the rest. Regarding the structure of the complex, low genetic variability was observed together with footprints of frequent genetic exchanges in an east-west gradient throughout the geographical distribution area. Besides, we detected the large-scale dispersion of specific genotypes and the presence of ecotypes. The markers used did not show enough genetic

---

evidence to separate the two species currently included within the *L. donovani* complex –*L. donovani* and *L. infantum*–.

Regarding the evaluation of the aetiology and epidemiology of tegumentary leishmaniasis in Catalonia, 56 strains isolated in the region in the last 40 years were studied. In parallel, the utility of methodologies such as MLEE, sequencing of the *hsp70*, *rpoHLS*, *fh* and ITS2 and the MALDI-TOF was compared. All techniques allowed and coincided in the identification at the complex level. However, they did not offer the same discriminative power. Variations were observed depending on the technique and the species complex. Twenty-nine strain types were identified based on the analysis of the *hsp70*, ITS2 and isoenzymes. All autochthonous cases were caused by *L. infantum* and one strain type (C) prevailed throughout the studied period. Imported cases, on the rise in the past two decades, were caused by five species from both the New World –*L. braziliensis* (6), *L. guyanensis* (2), *L. panamensis* (1)– and the Old World –*L. tropica* (1), *L. major* (10)–. In addition, four new zymodemes were identified: *L. braziliensis* MON-328, *L. guyanensis* MON-327 and MON-330 and *L. panamensis* MON-329. The results of this study emphasize the importance of identifying the causal species, especially in immigrants or in those cases reporting travel history.

In conclusion, identification techniques provide relevant information in contexts as different as healthcare, taxonomy or epidemiology. However, it is essential to choose that methodology whose characteristics meet the demands of the question to be answered. Thus, the MALDI-TOF and the sequencing of the *rpoHLS* and *fh* genes would be the most appropriate techniques for the clinical practice due to their speed and simplicity, while the sequencing of the *hsp70* gene and the ITS2 region, offering greater discrimination power, could constitute an interesting tandem to replace MLEE in the epidemiological field.

---

# 1. Introducción

*...Un manantial, breve y fugaz, entre las manos...*

---

# 1. Introducción

## 1.1. *Leishmania*, aspectos generales del parásito

En 1903, Ronald Ross describe el género *Leishmania* tras varios meses de controversia en relación a unos “cuerpos ovalados” encontrados, aquel mismo año, en muestras de bazo por William Boog Leishman y, también, por Charles Donovan (Ross, 1903, Steverding, 2017). Actualmente, el género *Leishmania* se sitúa taxonómicamente dentro de la clase Kinetoplastea Honigberg, 1963 y de la familia Trypanosomatidae Doflein, 1901 (Kostygov y Yurchenko, 2017, Espinosa *et al.*, 2018). A grandes rasgos, y al igual que los demás miembros de esta familia, estos organismos pueden describirse como eucariotas, unicelulares, uniflagelados, estrictamente parásitos y con la peculiaridad de presentar un orgánulo adicional con material genético denominado kinetoplasto (Lainson y Shaw, 1987, Kostygov y Yurchenko, 2017).

Estos protozoos son organismos muy primitivos, se cree que se originaron en el Mesozoico –hace de 252 a 66 millones de años–, antes de la separación de Gondwana (Thomaz-Soccol *et al.*, 1993, Steverding, 2017). El hallazgo más antiguo, del que se tiene constancia, es el de una leishmania identificada como *Paleoleishmania proterus* en una hembra del flebotómido *Palaeomyia burmitis* fosilizada en ámbar birmano que data del Cretáceo –hace 100 millones de años– (Poinar y Poinar, 2004a, 2004b). Desde entonces, el género *Leishmania* se ha ido diversificando enormemente y, en la actualidad, engloba a una cincuentena de especies (Akhoundi *et al.*, 2016, 2017). Pese a que generalmente se consideran como un conjunto, las distintas especies presentan numerosas peculiaridades, tanto desde el punto de vista clínico como epidemiológico, que serán desgranadas a lo largo de los siguientes puntos.

En referencia a la morfología, las diversas especies son muy similares (Garnham, 1971). Todas ellas pueden ser observadas en dos formas evolutivas principales, la promastigota y la amastigota, en función de la fase del ciclo biológico en la que se encuentre el parásito (Fig. 1). La forma promastigota se caracteriza por ser flagelar. En esta fase, las leishmanias miden aproximadamente de 10 a 20µm, en función del proceso de división, y presentan un aspecto fusiforme con un flagelo libre, fino y largo, tanto o incluso más que el cuerpo. Por el contrario, la forma amastigota no presenta flagelo. En este caso, la célula es más redondeada y de menor tamaño, de 3 a 5 µm. En ambas formas, los principales orgánulos apreciables por microscopía óptica –y que permiten la identificación de una leishmania– son el núcleo y el kinetoplasto, ambos con material genético (Lainson y Shaw, 1987, Gállego Berenguer, 2007, Sunter y Gull, 2017). El primero, situado en el centro de la célula, contiene el ácido desoxirribonucleico (ADN) nuclear organizado entre 34 y 36 cromosomas según las distintas especies (Wincker *et al.*, 1996, Britto *et al.*, 1998). El kinetoplasto, prenuclear y desplazado hacia el extremo anterior de la célula, está formado por ADN mitocondrial, denominado

ADN kinetoplástico (ADNk), organizado en estructuras circulares en red conocidas como maxi y mini círculos (Lukeš *et al.*, 2002, Liu *et al.*, 2005, Simpson *et al.*, 2006).

Al ser parásitos estrictos, las leishmanias se encuentran siempre dentro de un hospedador y no de forma libre en el ambiente. Su ciclo biológico es de tipo heteroxeno, precisando la intervención de un hospedador vertebrado y otro invertebrado (Lainson y Shaw, 1987, Akhoundi *et al.*, 2016).

El ciclo empieza cuando los promastigotes de *Leishmania* son inoculados a un hospedador vertebrado, normalmente durante una ingesta de sangre por parte de un vector invertebrado –flebotomos– (Fig. 2). Debido a la picadura, y ante la presencia de cuerpos extraños, el sistema inmune celular del hospedador se activa provocando, entre otros, la llegada de células polimorfonucleares y fagocíticas al punto de inoculación (Teixeira *et al.*, 2013, Séguin y Descoteaux, 2016). Estas células, especialmente los macrófagos, proceden a la fagocitación de los promastigotes, ya sea por acción propia o por inducción activa del parásito (Molyneux y Killick-Kendrick, 1987, Lauthier y Korenaga, 2018).

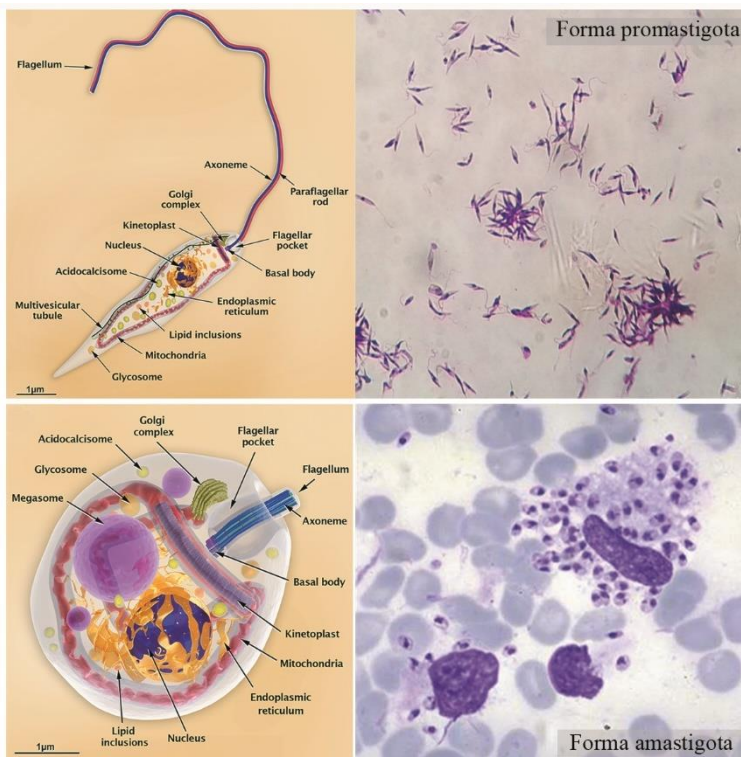


Fig 1. Formas celulares de *Leishmania*, la promastigota (parte superior) y la amastigota (parte inferior). En el lado izquierdo esquemas de ambas formas de Teixeira *et al.* (2013). En el lado derecho imágenes de microscopía óptica.

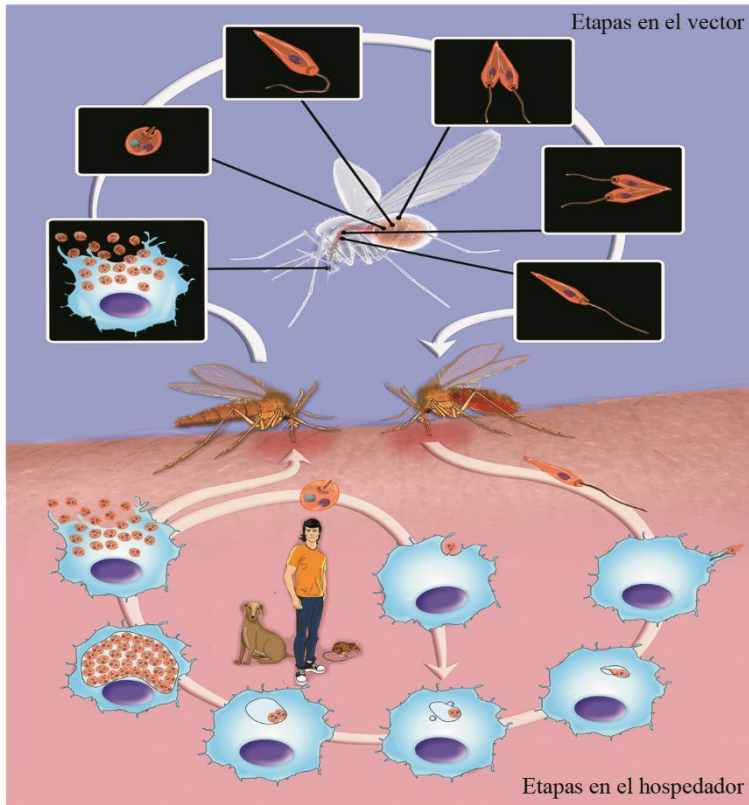


Fig 2. Ciclo biológico de *Leishmania*. Imagen modificada de Teixeira *et al.* (2013).

Algunos promastigotes resisten la fagocitosis quedando englobados en una vacuola parasitófora dentro de los macrófagos (Teixeira *et al.*, 2013, Séguin y Descoteaux, 2016). Allí se diferencian a formas amastigotas que se multiplican, por división binaria, hasta provocar la lisis de los macrófagos. Los amastigotes liberados son captados por otras células fagocíticas, donde se multiplican de nuevo hasta provocar su lisis y así sucesivamente (Molyneux y Killick-Kendrick, 1987, Teixeira *et al.*, 2013, Lauthier y Korenaga, 2018). Este proceso de infección puede quedar localizado en la zona de inoculación o diseminarse a otras zonas de la piel, mucosas u otros tejidos, a través del sistema circulatorio y/o linfático. Aquellos órganos y tejidos relacionados con el sistema fagocítico mononuclear –antiguo sistema reticuloendotelial– como el hígado, el bazo o la médula ósea, serán los más afectados (Barral *et al.*, 1992, Nicolas *et al.*, 2000, Reithinger *et al.*, 2007, McGwire y Satoskar, 2014, Séguin y Descoteaux, 2016).

Cuando un vector ingiere sangre de un hospedador vertebrado infectado, ingiere con ella células que contienen amastigotes de *Leishmania*. En el intestino medio o mesenterón del vector la ingesta queda englobada en una membrana peritrófica (Molyneux y Killick-Kendrick, 1987, Sacks y Kamhawi, 2001, Dvorak *et al.*, 2018). Allí los amastigotes se

diferencian a promastigotes y se multiplican por división binaria. En la fase final del proceso de digestión el saco se rompe y los promastigotes migran a diferentes regiones del tubo digestivo, según la especie en cuestión, y se anclan a las paredes (Molyneux y Killick-Kendrick, 1987, Dvorak *et al.*, 2018). Dependiendo del vector, el anclaje puede ser especie-específico o permisivo para distintas especies (Dvorak *et al.*, 2018). A continuación tiene lugar una nueva multiplicación, en ocasiones con intercambio genético, y migran al estomodeo (Dvorak *et al.*, 2018). Los promastigotes se acumulan en la válvula estomodeal, alterando su funcionamiento (Sacks y Kamhawi, 2001, Bates, 2007, Dvorak *et al.*, 2018). Cuando el vector vuelve a picar a un hospedador, los promastigotes migran a través de la probóscide o bien son regurgitados, inoculándose en el nuevo hospedador (Bates, 2007, Dvorak *et al.*, 2018).

Los vectores son principalmente dípteros flebotómidos, en su mayoría pertenecientes a los géneros *Phlebotomus* y *Lutzomyia*, habiendo más de 90 especies capaces o sospechosas de transmitir las leishmanias (Killick-Kendrick, 1999, World Health Organization, 2010, Maroli *et al.*, 2013). Por lo que se refiere al hospedador vertebrado, pueden infectarse especies muy diversas, generalmente mamíferos. Algunos de estos pueden actuar como reservorios asintomáticos, asegurando la perpetuación del ciclo (Ashford, 2000, Gramiccia y Gradoni, 2005, Roque y Jansen, 2014, Maia *et al.*, 2018).

Excepcionalmente, la transmisión de las leishmanias al hospedador vertebrado puede ser por una vía distinta a la vectorial. Las jeringuillas en usuarios de drogas por vía parenteral, las transfusiones y trasplantes de órganos y, de forma casi anecdótica, la vía sexual o la congénita son algunas de las otras formas de contagio que se han descrito (Symmers, 1960, Alvar *et al.*, 1996, Morillas-Márquez *et al.*, 2002, Pineda *et al.*, 2002, Figueiró-Filho *et al.*, 2004, Dey y Singh, 2006).

## 1.2. Taxonomía y principales complejos del género *Leishmania*

El género *Leishmania* se caracteriza por tener una taxonomía compleja. La principal dificultad reside en determinar qué debe considerarse una especie y establecer los límites entre grupos (Van der Auwera y Dujardin, 2015). Ello queda reflejado en la cantidad de especies descritas y en la falta de consenso general que ha habido acerca de su organización taxonómica desde el descubrimiento del género en 1903 (Akhoundi *et al.*, 2016).

Según las últimas publicaciones, el género *Leishmania* se compone de cuatro subgéneros: *L. (Leishmania)* Ross, 1903, *L. (Viannia)* Lainson y Shaw, 1987, *L. (Sauroleishmania)* Ranque, 1973 y *L. (Mundinia)* Shaw, Camargo y Teixeira, 2016 (Espinosa *et al.*, 2018, Kaufer *et al.*, 2020) (Fig. 3). Estos, a su vez, se dividen en complejos que agrupan las diversas especies. Los subgéneros *L. (Leishmania)* y *L. (Viannia)*, referidos también por algunos autores como la sección Euleishmania (Cupolillo *et al.*, 2000, Akhoundi *et al.*, 2016), es lo que clásicamente, y permanentemente, se ha considerado el género *Leishmania*, donde se agrupan



la veintena de especies mayoritariamente responsables de la infección en el humano (World Health Organization, 2010). Un rasgo distintivo general de estos dos subgéneros es su distribución geográfica. Mientras que las especies incluidas en el subgénero *Leishmania* se hallan, en su mayoría y a excepción del complejo *L. mexicana*, en el Viejo Mundo –Europa, Asia y África–, las incluidas en el subgénero *Viannia* se encuentran exclusivamente en el Nuevo Mundo –América– (Bañuls *et al.*, 2007, Akhouni *et al.*, 2016).

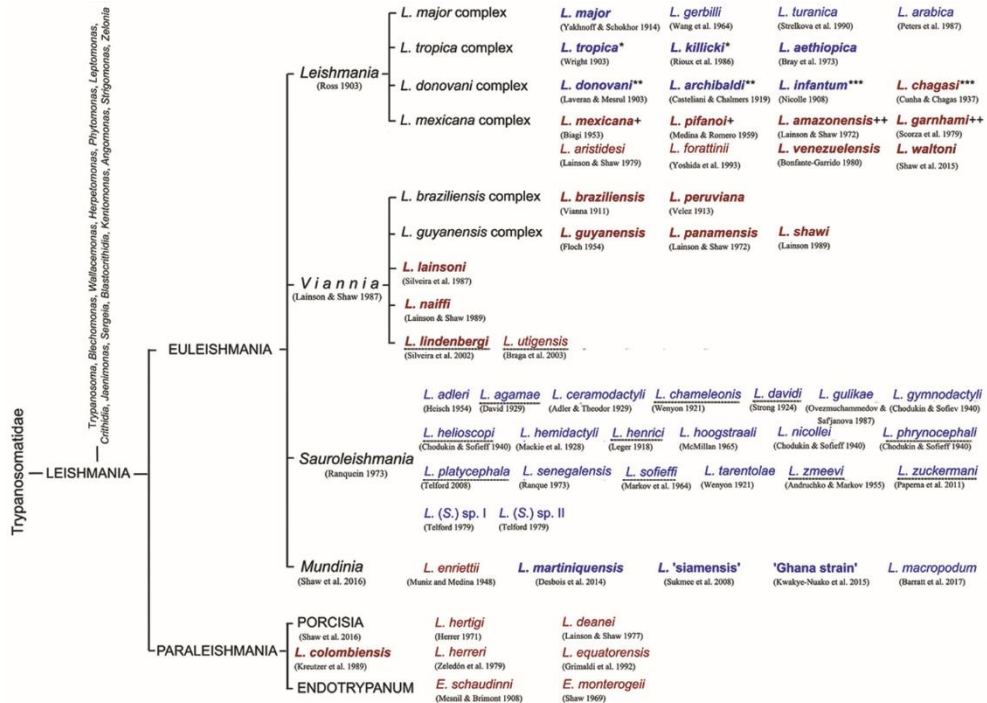


Fig 3. Esquema de la taxonomía de *Leishmania* publicado por Akhouni *et al.* (2017). En azul, las especies del Viejo Mundo y en rojo las del Nuevo Mundo. Las especies que comparten símbolos se consideran sinónimas.

A continuación, se detallan algunas de las características asociadas a los principales complejos y especies de mayor interés.

**Complejo *L. (L.) donovani*:** Hasta un total de cuatro especies han llegado a formar parte de este complejo: *L. donovani* Levan y Mensil, 1093, *L. infantum* Nicolle, 1908, *L. archibaldi* Castellani y Chalmers, 1919 y *L. chagasi* Cunha y Chagas, 1937. Actualmente está prácticamente aceptado por la comunidad científica que *L. chagasi* es una especie sinónima de *L. infantum* (Rioux *et al.*, 1990, Maurício *et al.*, 2000, Kuhls *et al.*, 2005). La validez de *L. archibaldi* también está en entredicho, siendo considerada por muchos autores como sinónima de *L. donovani* (Jamjoom *et al.*, 2004, Kuhls *et al.*, 2005, Maurício *et al.*, 2006, Lukes *et al.*, 2007). Aún y así, las dos especies restantes no quedan libres de

controversia, al ser muy cercanas desde un punto de vista genético (Schönian *et al.*, 2010, El Baidouri *et al.*, 2013, Maurício, 2018).

Este complejo se extiende desde el sudeste de Europa, por toda la cuenca mediterránea, norte y centro de África y Oriente Medio, hasta el subcontinente indio y China (Pratlong *et al.*, 2013). También está presente en América Central y Sudamérica (World Health Organization, 2010).

Más de 30 especies de flebotómidos se consideran vectores probados o sospechosos de las especies de este complejo, entre ellas *Phlebotomus perniciosus*, *P. ariasi*, *P. alexandri*, *P. argentipes*, *P. orientalis* o *Lutzomyia longipalpis* (Maroli *et al.*, 2013, Akhoundi *et al.*, 2016). Los principales hospedadores reservorios son el humano y el perro, aunque otros mamíferos podrían actuar como reservorios a nivel local (Dereure, 1999, Martín-Sánchez *et al.*, 2007, Molina *et al.*, 2012, Millán *et al.*, 2014, Kassahun *et al.*, 2015, Navea-Pérez *et al.*, 2015, Risueño *et al.*, 2018).

Las manifestaciones clínicas asociadas a este complejo son diversas. Dan lugar tanto a formas cutáneas como afectación visceral, siendo el principal complejo responsable de esta última presentación clínica (Burza *et al.*, 2018).

**Complejo *L. (L.) major*:** Las especies que componen este grupo son *L. major* Yakimoff y Schokhor, 1914, *L. turanica* Strelkova, Peters y Evans, 1990, *L. gerbilli* Wang, Qu y Guan, 1964 y *L. arabica* Peters, Elbihari y Evans, 1986. A diferencia de otros complejos, las especies que lo componen presentan una separación marcada, pero se agrupan conjuntamente ya que forman un grupo monofilético y los gerbílidos –*Meriones* spp.– son un reservorio en común (Maurício, 2018).

Su distribución pasa por el norte de África, Oriente Medio y subcontinente indio (World Health Organization, 2010).

Roedores como *Rhombomys opimus*, *Psammomys* spp., *Meriones* spp., *Arvicanthis* spp., *Tatera* spp. o *Mastomys* spp. son los principales reservorios (World Health Organization, 2010) y los flebotomos *P. papatasi* y *P. dubosqui* destacan entre las siete especies de vectores incriminados (Maroli *et al.*, 2013).

*L. major* es la única especie del complejo que infecta al ser humano de forma habitual. Suele dar lugar a lesiones cutáneas, en ocasiones múltiples, rápidamente ulcerativas y con gran inflamación, pero que suelen curar espontáneamente pasados unos meses (Burza *et al.*, 2018).

**Complejo *L. (L.) tropica*:** Hasta hace unos años, este complejo englobaba a *L. tropica* Wright, 1903, *L. aethiopica* Bray, Ashford y Bray, 1973 y *L. killicki* Rioux, Lanote y Pratlong en 1986. Sin embargo, actualmente *L. killicki* se considera como sinónima de *L. tropica*, tal y como indican algunos trabajos del mismo grupo que la describió (El Baidouri *et al.*, 2013, Chaara *et al.*, 2015). Por otro lado, la separación entre las otras dos especies no es siempre clara y, dependiendo de los marcadores utilizados, existen partidarios a considerarlas una

---

sola especie o mantenerlas separadas (Fraga *et al.*, 2010, El Baidouri *et al.*, 2013, Van der Auwera *et al.*, 2014, Maurício, 2018).

Geográficamente el complejo *L. tropica* se encuentra distribuido por la zona norte y centro de África, este del Mediterráneo, Oriente Medio, este de África y subcontinente indio.

Los reservorios de este complejo son fundamentalmente el ser humano y los damanes –*Procavia* spp., *Heterohyrax* spp. y *Dendrohyrax* spp.–, aunque también se ha descrito el perro como posible reservorio (Dereure *et al.*, 1991, World Health Organization, 2010). Se han descrito hasta diez especies de flebotomos como vectores transmisores, entre los que cabe destacar *P. sergenti*, por ser el que presenta una distribución geográfica más extensa y ser vector tanto de *L. tropica* como de *L. aethiopica* (Maroli *et al.*, 2013).

La clínica es principalmente cutánea, con formas autolimitadas –el conocido “botón de oriente”– o difusas, pero en ocasiones se han descrito casos viscerales (Burza *et al.*, 2018).

**Complejo *L. (L) mexicana*:** Se considera formado principalmente por *L. mexicana* Biagi, 1953 y *L. amazonensis* Lainson y Shaw, 1972. A estas especies se les asocia la sinonimia de *L. pifanoi* Medina y Romero, 1959 y *L. garnhami* Scorza *et al.*, 1979, respectivamente. Otras especies relacionadas con este complejo son *L. forattinii*, *L. venezuelensis* y *L. aristidesi* (Akhoundi *et al.*, 2016). Dado el bajo número de cepas de estas especies que suele incluirse en los estudios, la validez de la mayoría de las especies del complejo se ha puesto en entredicho en algún momento (Van der Auwera y Dujardin, 2015, Maurício, 2018).

La peculiaridad principal de este complejo es que es el único del subgénero *Leishmania* que se encuentra íntegramente en el continente americano. Se encuentra principalmente en Centroamérica, pero también en Sudamérica.

Son especies zoonóticas, siendo los roedores selváticos los principales reservorios –*Proechimys* spp., *Oryzomys* spp., *Nectomys* spp., *Dasyprocta* spp., *Heteromys* spp. y *Sigmodon* spp.–, aunque también se han encontrado parasitando otros animales (Roque y Jansen, 2014). Varias especies de *Lutzomyia* actúan como vectores, entre ellas *Lu. olmeca*, *Lu. ayacuchensis*, *Lu. flaviscutellata* y *Lu. longipalpis* (World Health Organization, 2010).

Producen clínica cutánea, ya sea simple, con lesiones autolimitadas únicas o múltiples, o bien difusa (Burza *et al.*, 2018). Regionalmente, las lesiones producidas por este complejo se conocen como “úlceras del chichlero”.

**Complejo *L. (V.) braziliensis*:** Hoy en día, las dos especies incluidas en este complejo son *L. braziliensis* Vianna, 1911 y *L. peruviana* Velez, 1913. El estatus de especie de esta última está cuestionado, sobre todo tras el hallazgo de poblaciones *L. braziliensis* consideradas “outlier”, más distintas del resto de *L. braziliensis* que *L. peruviana* respecto a *L. braziliensis* (Bañuls *et al.*, 2000, Odiwuor *et al.*, 2012, Van der Auwera y Dujardin, 2015, Lauthier *et al.*, 2020).

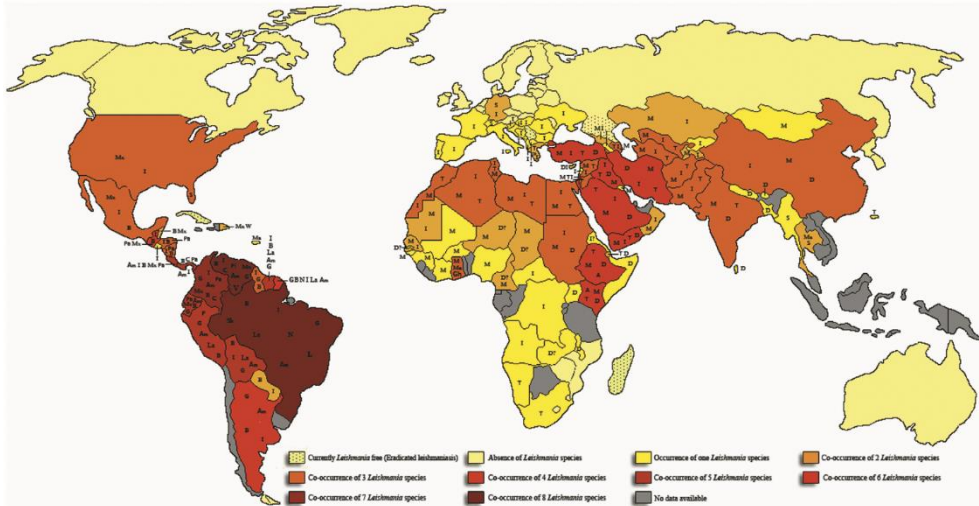


Fig. 4. Mapa de la distribución global de las especies de *Leishmania* patógenas para el humano. A: *L. aethiopica*; Am: *L. amazonensis*; B: *L. braziliensis*; C: *L. colombienseis*; D: *L. donovani*; G: *L. guyanensis*; Gh: “Ghana strain”; I: *L. infantum*; La: *L. lainsoni*; L: *L. lindenbergi*; M: *L. major*; Ma: *L. martiniquensis*; Mx: *L. mexicana*; N: *L. naiffi*; Pa: *L. panamensis*; P: *L. peruviana*; S: *L. “siamensis”*; Sh: *L. shawi*; T: *L. tropica*; V: *L. venezuelensis* y W: *L. waltoni*. “?”: Especies que han de ser confirmadas. Imagen de Akhoundi *et al.* (2017).

Es el complejo más extendido por Centro y Sudamérica. Varias especies de edentados, zarigüeyas, roedores y perros actúan como reservorio y varias especies de *Lutzomyia* spp. son vectores (World Health Organization, 2010, Roque y Jansen, 2014, Akhoundi *et al.*, 2016).

La clínica es cutánea, desde úlceras simples de curación espontánea –“uta” en Perú– a formas más graves y severas con afectación mucosa –“espundia”– o diseminadas (World Health Organization, 2010, Burza *et al.*, 2018).

**Complejo *L. (V.) guyanensis*:** Este complejo engloba, además de *L. guyanensis* Floch, 1954, a *L. panamensis* Lainson y Shaw, 1972 y *L. shawi* Lainson, Braga *et al.* 1989. Una vez más, la validez de las últimas ha sido cuestionada ya que se consideran variantes locales de *L. guyanensis* (Bañuls *et al.*, 1999, Boité *et al.*, 2012, Van der Auwera y Dujardin, 2015).

*L. panamensis* se localizaría entre el sur de Centroamérica y norte de Sudamérica, *L. shawi* en Brasil y, de forma más generalizada, *L. guyanensis* en toda Sudamérica.

Los reservorios principales de este complejo son los perezosos, pero también osos hormigueros, monos y coatíes, entre otros. Como vectores destacan *Lu. umbratilis*, *Lu. anduzei*, *Lu. trapidoi* y *Lu. whitmani* (World Health Organization, 2010, Roque y Jansen, 2014, Akhoundi *et al.*, 2016).

---

Producen úlceras cutáneas – “pian bois”– que pueden curar espontáneamente, diseminarse o dar lugar a afectación mucosa (World Health Organization, 2010, Burza *et al.*, 2018).

Otras especies del subgénero *Viannia* no incluidas en los complejos mencionados y que pueden dar clínica cutánea en humanos en Sudamérica son *L. (V.) lainsoni* Silveira *et al.*, 1987, *L. (V.) naiffi* Lainson y Shaw 1989 o *L. (V.) lindenbergi* Silveira *et al.* 2002 (World Health Organization, 2010).

### 1.3. Las leishmaniosis

Se conoce como leishmaniosis a todas aquellas manifestaciones clínicas producidas por las especies de *Leishmania*. Uno de los registros más antiguos que se asocian a la enfermedad se encuentra en una colección de documentos médicos egipcios que datan del 1500 a.C. Además, se ha detectado ADN de *Leishmania* en momias egipcias y precolombinas que datan de entre el 2050 y el 1650 a. C. y el 800 a. C., respectivamente (Steverding, 2017). En la actualidad, según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), la enfermedad es endémica en cerca de un centenar de países y su incidencia estimada va de los 700.000 al millón de casos. Sin embargo, está considerada como una de las enfermedades olvidadas (Ruiz-Postigo *et al.*, 2020, World Health Organization, 2020c, 2020d).

Sufrir la picadura de un flebotomo portador de *Leishmania* no implica necesariamente el desarrollo de la enfermedad. Se desconocen cifras exactas, pero varios estudios muestran la existencia de portadores asintomáticos, tanto en personas como en animales, cuyo número puede superar a los que presentan manifestaciones clínicas (Moral *et al.*, 2002, Alvar *et al.*, 2004, Riera *et al.*, 2008, Ostin *et al.*, 2011, Andrade-Narvaez *et al.*, 2016, Velez *et al.*, 2019).

El resultado final de la infección depende de un mecanismo complejo en el que entran en juego factores asociados al hospedador –factores socio-epidemiológicos, el estado nutricional, otras enfermedades de base, predisposición genética o el tipo de respuesta inmune que se desencadene–, factores asociados al parásito –tropismo de la especie, virulencia de la cepa, tipo de respuesta inmune que desencadena o presencia de virus de *Leishmania*– y factores asociados al vector –respuesta inmune causada por la picadura, efecto inmunomodulador de la saliva o regurgitación de ciertas moléculas– (Bañuls *et al.*, 2011, Singh *et al.*, 2014, Lauthier y Korenaga, 2018). Si la infección da lugar a sintomatología, las manifestaciones clínicas pueden ser diversas, pero estas se suelen englobar en tres grandes grupos, dentro de los que pueden hallarse algunas variaciones.

**Leishmaniosis cutánea (LC):** Es la forma más común, dado que todas las especies patógenas para los humanos pueden dar clínica cutánea. La sintomatología suele empezar por una picadura que persiste, un eritema que con el tiempo va aumentando de tamaño y forma un nódulo que se ulcera (Reithinger *et al.*, 2007). Al contrario de lo que pudiera parecer, las lesiones no son dolorosas ni purulentas y tampoco suele darse fiebre pero, en ocasiones, pueden presentarse adenopatías, nódulos subcutáneos o pápulas satélites

(Ashford, 2000, Burza *et al.*, 2018). La vida de las personas con LC no suele estar en juego ya que con frecuencia, y en un periodo de tiempo variable, las lesiones tienden a resolverse por sí solas (Reithinger *et al.*, 2007). Sin embargo, las cicatrices de las lesiones pueden llevar a la estigmatización de la persona afectada y tener efectos psicológicos (Bennis *et al.*, 2017). A pesar de estos rasgos generales, el tamaño y tipo de la lesión pueden variar en función del caso (Aronson *et al.*, 2016).

Algunas de las variaciones de la LC son la leishmaniosis cutánea difusa (LCD), la leishmaniosis diseminada (LD) y la leishmaniosis recidivante (LR). La LCD es una afectación rara asociada a algunas especies de los complejos *L. tropica* y *L. mexicana* y que se caracteriza por presencia de lesiones no ulceradas, muy diseminadas, que no curan espontáneamente y que suelen recidivar (World Health Organization, 2010, Burza *et al.*, 2018, Machado *et al.*, 2019). La LD está causada, principalmente, por *L. braziliensis* y se define por la presencia de al menos diez lesiones de distinta apariencia en al menos dos zonas no contiguas del cuerpo (Burza *et al.*, 2018, Machado *et al.*, 2019). La LR suele producirse tras una infección resuelta de *L. tropica*, presentándose lesiones cerca de la cicatriz de la antigua lesión que se expanden (Burza *et al.*, 2018).

Aproximadamente 90 países son endémicos. Estos se sitúan principalmente en América, la cuenca mediterránea, Oriente Medio y Asia Central. Se estima que se producen de 600.000 a 1 millón de casos nuevos de LC al año, siendo Afganistán, Argelia, Bolivia, Brasil, Colombia, Irán, Iraq, Pakistán, Siria y Túnez los principales países afectados (Ruiz-Postigo *et al.*, 2020, World Health Organization, 2020c, 2020d).

**Leishmaniosis mucocutánea (LMC):** Este tipo de leishmaniosis suele producirse cuando, tras una LC, se da una metástasis en la zona de la nasofaringe y la laringe, por vía linfática o hematogena (Reithinger *et al.*, 2007). Lo que se inicia como una inflamación de las mucosas, puede evolucionar hacia la ulceración y destrucción de estas y a la perforación del septo nasal. Como consecuencia, la persona afectada puede sufrir congestión nasal, sangrado, dolor, disfagia o disfonía, así como infecciones secundarias potencialmente mortales (Reithinger *et al.*, 2007, World Health Organization, 2010, Strazzulla *et al.*, 2013, Aronson *et al.*, 2016). Aunque otras especies también pueden llegar a dar este tipo de sintomatología, se asocia principalmente a *L. braziliensis* y *L. panamensis* (Reithinger *et al.*, 2007, Strazzulla *et al.*, 2013).

Pese a que no hay datos numéricos sobre su incidencia, se conoce que el 90% de los casos tienen lugar en Bolivia, Brasil, Etiopía y Perú (World Health Organization, 2020c).

**Leishmaniosis visceral (LV):** Al igual que el resto de las presentaciones, la LV, puede estar precedida por una lesión seca o ulcerada en el lugar de la picadura (Ashford, 2000). Sin embargo, semanas o incluso años después de la infección, se da un cuadro de fiebre intermitente que puede ir acompañado de pérdida de peso y de una serie de síntomas sistémicos entre los que destacan anemia, plaquetopenia, esplenomegalia o hepatomegalia

---

(Ashford, 2000, World Health Organization, 2010, Van Griensven y Diro, 2012, Burza *et al.*, 2018). Los casos descritos en Sudán suelen presentar, además, linfadenopatías (World Health Organization, 2010, Van Griensven y Diro, 2012), mientras que en la India suele darse un oscurecimiento de la piel –por lo que a la LV también se la conoce como *kala-azar*, “fiebre negra” en hindi– (World Health Organization, 2010, Van Griensven y Diro, 2012, Burza *et al.*, 2018). Cuando la enfermedad evoluciona de este modo, y sobre todo sin tratamiento, el resultado suele ser la muerte del paciente, muchas veces por anemia severa o infecciones concomitantes debido a la debilidad del sistema inmune (Ashford, 2000, Burza *et al.*, 2018). Las especies del complejo *L. donovani* son las principales causantes de la LV, pero se han descrito casos por otras especies como *L. tropica* (Sacks *et al.*, 1995, World Health Organization, 2010).

En algunos casos, generalmente tras una LV, aparecen lesiones cutáneas hipopigmentadas o eritematosas que se extienden por el cuerpo, a lo que se le conoce como leishmaniosis dérmica post-Kala-azar (PKDL) (World Health Organization, 2010, Van Griensven y Diro, 2012, Burza *et al.*, 2018).

Alrededor de 80 países son endémicos para esa forma de la enfermedad. Su distribución geográfica equivale a la del complejo *L. donovani*, pero las zonas más afectadas son el este de África, el subcontinente indio y Brasil. Se estima que anualmente se dan entre 50.000 y 90.000 casos nuevos, principalmente en Brasil, China, Etiopía, India, Iraq, Kenia, Nepal, Somalia, Sudán y Sudán del Sur (Alvar *et al.*, 2012, Ruiz-Postigo *et al.*, 2020, World Health Organization, 2020c).

### 1.3.1. Las leishmaniosis importadas

Los casos de leishmaniosis importada son aquellos en los que la infección se contrajo en un país distinto del que se diagnostica y, generalmente, están causados, por especies no autóctonas. En las últimas décadas, se ha producido un aumento global de este tipo de casos, afectando también a países en los que la leishmaniosis no es endémica (Stark *et al.*, 2008, Herremans *et al.*, 2010, Wall *et al.*, 2012, Bart *et al.*, 2013, Di Muccio *et al.*, 2015, Giavedoni *et al.*, 2015, Söbirk *et al.*, 2018). Este incremento es debido, principalmente, a un mayor número de viajes internacionales de diferente índole y a una mayor exposición a los vectores como consecuencia de determinadas actividades desempeñadas en estos viajes. Así pues, este tipo de casos se asocia principalmente a militares y otros viajeros por motivos profesionales –científicos, periodistas, trabajadores de la construcción, etc.–, turistas, inmigrantes y refugiados (Pavli y Maltezou, 2010, Mansueto *et al.*, 2014, Söbirk *et al.*, 2018, World Tourism Organization, 2020). La mayoría de casos importados son de LC, procedentes de América latina, Asia, África u otros países de Europa (Pavli y Maltezou, 2010, Wall *et al.*, 2012, Mansueto *et al.*, 2014, Di Muccio *et al.*, 2015). Los casos de LMC son raros y los de LV proceden, principalmente, del sur de Europa y del resto de la cuenca mediterránea (Pérez-

Ayala *et al.*, 2009, Herremans *et al.*, 2010, Pavli y Maltezou, 2010, Wall *et al.*, 2012, Mansueto *et al.*, 2014).

### 1.3.2. La leishmaniosis en España

En España, la leishmaniosis se considera endémica, conociéndose la existencia de la enfermedad desde 1912 (Pittaluga, 1912, Botet y Portús, 1993, World Health Organization, 2020b). Se dan casos tanto de LV como de LC, incluyendo formas atípica, y en ocasiones, con afectación mucosa (Portús *et al.*, 1989, Aliaga *et al.*, 2003, García-Almagro, 2005, Merino-Espinosa *et al.*, 2018, Fernández Martínez *et al.*, 2019). Está presente en la mayor parte del país y durante todo el año, aunque cabe destacar que en regiones como la Comunidad Valenciana, la Comunidad de Madrid, Catalunya, Baleares y Andalucía y en los periodos de enero, mayo-julio y agosto-noviembre se registran un mayor número de casos (Fernández Martínez *et al.*, 2019). Además, ocasionalmente se han producido brotes en distintos focos, siendo el más relevante el ocurrido en el municipio de Fuenlabrada (Madrid), aproximadamente de mediados de 2009 a 2015 (Dirección general de salud pública, Consejería de Sanidad de la Comunidad de Madrid, 2015, Roth-Damas *et al.*, 2017).

La población más afectada por la enfermedad ha ido variando a lo largo del tiempo, viéndose influida por diversos factores sociales. En la primera mitad del siglo XX, la enfermedad era principalmente pediátrica, asociada a pobreza y malnutrición (Botet y Portús, 1993). En cambio, a finales de la segunda mitad, tras una mejora en la situación económica del país y en plena epidemia de VIH, se dispararon los casos asociados a personas coinfectadas por *Leishmania* y VIH, afectando mayoritariamente a adultos jóvenes del sexo masculino (Alvar *et al.*, 1996, Portús *et al.*, 2007). Con la implementación en 1997 de la terapia antirretroviral, los casos de coinfecciones parecen ir a la baja; sin embargo, en las últimas décadas se ha observado un incremento de la enfermedad asociada a la inmunosupresión por tratamiento de otras patologías (Herrador *et al.*, 2015, Martín-Sánchez *et al.*, 2020). Actualmente, la población más afectada son los adultos inmunodeprimidos y los niños menores de 5 años, observándose un predominancia general en el sexo masculino (Riera *et al.*, 2016, Fernández Martínez *et al.*, 2019).

En 2018, se registraron 301 casos autóctonos en todo el estado, lo que supone una incidencia media de 0,64 casos cada 100.000 habitantes (Centro Nacional de Epidemiología, 2019). Los casos de leishmaniosis son de declaración obligatoria a la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica (RENAVE) en todo el estado desde 2015 (Orden SSI/445/2015, de 9 de marzo, por la que se modifican los anexos I, II y III del Real Decreto 2210/1995, de 28 de diciembre). Cabe mencionar que la leishmaniosis ya había sido considerada enfermedad de declaración obligatoria a nivel estatal de 1982 a 1995, pero en un cambio de legislación la clasificó como enfermedad endémica de ámbito regional (Real Decreto 2210/1995, de 28 de diciembre, por el que se crea la red nacional de vigilancia epidemiológica), siendo declarada, de 1995 a 2015, únicamente por aquellas comunidades autónomas consideradas endémicas



---

(Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias Sanitarias, 2012, Fernández Martínez *et al.*, 2019). Con los datos registrados, desde 2012 se observa una tendencia ascendente en el número de casos, aunque la falta de información por parte de algunas comunidades dificulta el estudio de la casuística (Fernández Martínez *et al.*, 2019). Además, se sospecha una subdeclaración de casos, que sería especialmente marcada para la LC al no requerir ingreso hospitalario (García-Almagro, 2005, Portús *et al.*, 2007, Gil-Prieto *et al.*, 2011, Alvar *et al.*, 2012, Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias Sanitarias, 2012, Martín-Sánchez *et al.*, 2020). Por otro lado, queda patente un baile de cifras cuando se consultan diferentes fuentes de información; por ejemplo, para 2017 la OMS reporta 105 casos autóctonos en España frente a los 340 que aparecen en el informe estatal o, para el mismo año, la RENAVE recoge 61 casos en Catalunya mientras que en el boletín epidemiológico autonómico aparecen notificados 92 (Centro Nacional de Epidemiología, 2017, Carmona *et al.*, 2018, World Health Organization, 2019).

Clásicamente, el agente causal de la leishmaniosis en España es *L. infantum*. En su ciclo biológico intervienen, principalmente, el perro como reservorio y los flebotomos *P. perniciosus* y *P. ariasi* como vectores. La transmisión se produce con más frecuencia en áreas urbanas y periurbanas, entre finales de verano y principios de otoño (Morillas Márquez *et al.*, 1983, Guilvard *et al.*, 1996, Gállego y Riera, 2000, Alvar Ezquerro, 2001, Miró Corrales y Molina Moreno, 2006, Gállego Berenguer, 2007, González *et al.*, 2017, Moreno, 2017). No obstante, se han descrito ciclos distintos a los de este modelo. El ciclo alternativo con más repercusión se dio en el brote de Fuenlabrada, en el que conejos y liebres actuaron como reservorios principales (Molina *et al.*, 2012). Además, son numerosas las descripciones de otros animales salvajes infectados por *L. infantum* en España, aunque actualmente todavía se desconoce el papel que juegan en el ciclo (Millán *et al.*, 2014, Navea-Pérez *et al.*, 2015, Risueño *et al.*, 2018). También se han descrito vectores alternativos, como es el caso de *P. langeroni* en un biotopo concreto del sur de la península (Sáez *et al.*, 2018). En lo referente al agente causal, a pesar de que durante gran parte del siglo XX algunos autores atribuyeron cuadros cutáneos autóctonos a *L. tropica* o casos viscerales en adultos a *L. donovani*, la única especie que ha sido confirmada mediante técnicas de identificación es *L. infantum* (Botet y Portús, 1993). En España no se conocen casos autóctonos producidos por otras especies de *Leishmania*, pero sí se han reportado casos de leishmaniosis importados de otras zonas endémicas (Pérez-Ayala *et al.*, 2009, Giavedoni *et al.*, 2015, Knöpfel *et al.*, 2018).

#### **1.4. Diagnóstico de las leishmaniosis**

A rasgos generales, el diagnóstico de las leishmaniosis puede resultar un proceso complejo, derivado de la variedad de síntomas, la heterogeneidad de muestras o la sensibilidad de las técnicas. Sin ir más lejos, uno de los primeros problemas se plantea en la consulta del clínico ya que, ante la gran variedad de síntomas producidos por las leishmaniosis, puede no llegar a considerar la leishmaniosis como posible causa del cuadro clínico (Aronson y Joya, 2019).

En caso de considerarse, se recomienda hacer un diagnóstico diferencial de otras enfermedades e infecciones con clínica compatible (Aronson *et al.*, 2016, Gradoni *et al.*, 2017).

El tipo de muestra para realizar dicho diagnóstico depende de la clínica y de la técnica a emplear. Ante la sospecha de LC se procede a la toma de muestra de la lesión mediante distintos protocolos. Los más clásicos son hacer una biopsia por punch, raspado o un aspirado, pero cada vez más se utilizan muestras menos invasivas como un frotis o, simplemente, presionar con papel de filtro o cinta adhesiva; con sensibilidades diversas. (Eroglu *et al.*, 2014, Saab *et al.*, 2015, Taslimi *et al.*, 2017, Aronson y Joya, 2019). Para el diagnóstico de la LV se utilizan aspirados de médula ósea, de ganglio linfático o bazo, biopsia de hígado, sangre total, la fracción leucocitaria y, en ocasiones, orina; observándose, la tendencia hacia las muestras menos invasivas (Aronson *et al.*, 2016, Sakkas *et al.*, 2016, Bezerra *et al.*, 2019, Sereno *et al.*, 2020).

El diagnóstico de la leishmaniosis puede llevarse a cabo con técnicas parasitológicas, moleculares o inmunológicas. El examen microscópico y el cultivo son las técnicas clásicamente englobadas dentro del estudio parasitológico, cuyo objetivo es la observación directa del parásito o su aislamiento (Sakkas *et al.*, 2016). En el primero, las improntas o extensiones de las muestras se fijan con metanol y se tiñen, tradicionalmente, con Giemsa. La observación de la presencia de formas amastigotas de *Leishmania* permite el diagnóstico definitivo (Gramiccia y Di Muccio, 2018, Aronson y Joya, 2019). Esta es la técnica de referencia para el diagnóstico por ser muy específica y económica. No obstante, la sensibilidad puede verse afectada por el tipo de clínica, los reactivos, la experiencia del observador y, sobre todo, el tipo de muestra (World Health Organization, 2010, Aronson *et al.*, 2016, Burza *et al.*, 2018). Así pues, se mencionan sensibilidades por encima del 90% en muestras de bazo, entre el 50-80% en médula ósea, alrededor del 50% en ganglio linfático y por debajo del 70% en muestra cutánea (Goto y Lindoso, 2010, World Health Organization, 2010, Srividya *et al.*, 2012). Para el cultivo, se siembran las muestras en condiciones estériles en medio bifásico, como el Novy-McNeal-Nicolle (NNN), o líquido, como el medio de Schneider's Insect suplementado con suero bovino fetal (SBF) (Sakkas *et al.*, 2016). En este caso las leishmanias se aíslan en la forma promastigota, ya que se recrean las condiciones del interior del vector. En general, los artículos de revisión la describen como una técnica con una elevada sensibilidad, pudiendo superar a la del examen microscópico (World Health Organization, 2010, Srividya *et al.*, 2012, Sakkas *et al.*, 2016). Sin embargo, los estudios comparativos muestran sensibilidades muy variables, entre el 40-80%, siendo, en algunas ocasiones, inferiores a las de la microscopía (Bensoussan *et al.*, 2006, Goto y Lindoso, 2010, Pourmohammadi *et al.*, 2010, Bart *et al.*, 2013, Rasti *et al.*, 2016). El hecho de que sea lento, costoso y requiera condiciones de esterilidad hacen que se lleve a cabo solo en centros especializados, pese a que con el tiempo se han propuesto variaciones para optimizar los métodos de cultivo (Allahverdiyev *et al.*, 2005, Boggild *et al.*, 2008, Srividya *et al.*, 2012,

---

Sakkas *et al.*, 2016, Gramiccia y Di Muccio, 2018). El cultivo es el punto de partida de muchas técnicas de tipificación (véase en el punto 1.6.) (Gramiccia y Di Muccio, 2018).

Las técnicas moleculares son aquellas que detectan el material genético de *Leishmania* entre el material genético del hospedador. La técnica de reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase chain reaction*, PCR) y sus variantes –anidada, semianidada o cuantitativa a tiempo real–, supusieron una revolución en el diagnóstico al ser rápidas, específicas pero, sobre todo, tan sensibles que pueden ser aplicadas en muestras poco invasivas (Sakkas *et al.*, 2016, Gramiccia y Di Muccio, 2018). Hasta el momento no existe una técnica consenso de PCR. En cada laboratorio se utilizan protocolos distintos, sobre muestras distintas y con dianas distintas, por lo que los valores de sensibilidad y especificidad pueden variar considerablemente entre 50-100% y 30-100%, respectivamente (De Paiva-Cavalcanti *et al.*, 2015). En general, se utilizan dianas conservadas o con un elevado número de copias en el genoma que aportan una gran sensibilidad, aunque no suelen discriminar entre especies (Aronson *et al.*, 2016, Gramiccia y Di Muccio, 2018). Más recientemente, también se han desarrollado técnicas de amplificación isotérmica como el *Loop-mediated isothermal amplification* (LAMP) o *Nucleic acid sequence-based amplification* (NASBA) para facilitar el acceso a las técnicas moleculares en los estudios de campo en zonas endémicas o en centros en los que no se dispone de suficiente infraestructura (Van der Meide *et al.*, 2005, Takagi *et al.*, 2009). Estas últimas suelen presentar una sensibilidad superior al 80% (De Paiva-Cavalcanti *et al.*, 2015, Sakkas *et al.*, 2016).

Las técnicas inmunológicas se dividen en aquellas que detectan antígenos del parásito y aquellas que detectan los anticuerpos anti-*Leishmania*, las serológicas. Algunos ejemplos de detección de antígeno son las pruebas de aglutinación en látex y las variantes del *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) en muestras de orina –útiles en el diagnóstico de la LV y con sensibilidades del 60-100%, 80-100%, respectivamente– o el test diagnóstico en tiras inmunocromatográficas para casos de LC con lesiones ulceradas, con sensibilidades del 36% (Attar *et al.*, 2001, Vallur *et al.*, 2015, De Silva *et al.*, 2017). En cuanto a las técnicas serológicas, hay descritas un amplio abanico de opciones –comercializadas e *in-house*– como ELISA, inmunocromatografía, inmunofluorescencia indirecta, western blot, hemoaglutinación indirecta o aglutinación directa, en los que los antígenos más habituales son promastigotes cultivados o el antígeno recombinante rK39 (Sakkas *et al.*, 2016, Gramiccia y Di Muccio, 2018). Las técnicas serológicas presentan poco valor diagnóstico para la LC por su baja sensibilidad. Pese a ser útiles en el diagnóstico de la LV, se ha de tener presente la posibilidad de obtener resultados positivos en personas que han superado la enfermedad, al igual que en personas infectadas asintomáticas (World Health Organization, 2010). Además, su sensibilidad se ve influida por el antígeno utilizado (De Paiva-Cavalcanti *et al.*, 2015, Aronson *et al.*, 2016, Sakkas *et al.*, 2016).

## 1.5. Control de la infección y tratamiento

Confirmada la infección sintomática, el procedimiento a seguir varía en función de cada caso tras un análisis riesgo-beneficio. Serán necesarias consideraciones especiales cuando se trate de pacientes inmunodeprimidos o mujeres embarazadas (Gradoni *et al.*, 2017).

A los pacientes con LV se les administra tratamiento sistémico y se considera la hospitalización. En Europa, el tratamiento de elección es la anfotericina B liposomal, de menor toxicidad que otras presentaciones, como el desoxicolato o complejo lipídico, pero de mayor coste. Otras opciones de segunda línea son los antimoniales pentavalentes, a los que se les asocia una elevada toxicidad y efectos adversos (Gradoni *et al.*, 2017, Burza *et al.*, 2018, Monge-Maillo y López-Vélez, 2018). Las resistencias a estos fármacos son raras en Europa; sin embargo, en el subcontinente indio las tasas de resistencia a los antimoniales pentavalentes pueden alcanzar el 60% de los casos (Sundar *et al.*, 2000, Gradoni *et al.*, 2017). Existen fármacos alternativos como la paromomicina o la miltefosina, de la que no se dispone de demasiada experiencia pero que su formulación oral la hace muy atractiva (Gradoni *et al.*, 2017, Monge-Maillo y López-Vélez, 2018). Para los casos de resistencia al tratamiento, la combinación de fármacos puede ser una buena opción (Monge-Maillo y López-Vélez, 2013b, 2018).

En la LC, el protocolo a seguir podrá variar en función del número de lesiones y del tamaño de estas, su localización, el tiempo de evolución, la existencia de otros factores de riesgo y de la especie causal (Gradoni *et al.*, 2017, Blum *et al.*, 2018, Burza *et al.*, 2018, Chakravarty y Sundar, 2019). En los casos más leves, con pocas lesiones, no desfigurantes y producidas por especies del subgénero *Leishmania*, el cuidado y/o control de las lesiones puede ser suficiente, sin necesidad de tratamiento farmacológico (Mansueto *et al.*, 2014, Gradoni *et al.*, 2017, Blum *et al.*, 2018). Si se quiere acelerar la curación o existe riesgo de que esas pequeñas lesiones puedan causar algún tipo de desfiguración, se recomienda tratamiento tópico mediante inyecciones intralesionales de antimoniales en combinación, o no, de crioterapia (Mansueto *et al.*, 2014, Giavedoni *et al.*, 2015, Gradoni *et al.*, 2017, Blum *et al.*, 2018, Burza *et al.*, 2018). Será preferible el tratamiento sistémico cuando los casos de LC estén causados por especies del subgénero *Viannia*, especialmente aquellas con alto riesgo de derivación a formas mucocutáneas o, independientemente de la especie causal, cuando se dé alguna de las siguientes circunstancias: lesiones múltiples o de gran tamaño, lesiones localizadas en zonas sensibles de la cara, dedos o cerca de articulaciones, falla terapéutica al tratamiento local, diseminación linfática o existencia de factores de riesgo o inmunosupresión (Mansueto *et al.*, 2014, Giavedoni *et al.*, 2015, Gradoni *et al.*, 2017, Blum *et al.*, 2018, Burza *et al.*, 2018). En estas situaciones, el tratamiento sistémico puede ser por vía oral, con miltefosina, o por vía parenteral, con anfotericina B liposomal, antimoniales pentavalentes o pentamidina. También pueden utilizarse algunos azoles (Monge-Maillo y López-Vélez, 2013a, Mansueto *et al.*, 2014, Gradoni *et al.*, 2017, Blum *et al.*, 2018, Burza *et al.*, 2018, Mensa *et al.*, 2020). Los antimoniales pentavalentes parecen ser el fármaco más efectivo contra el complejo *L.*

---

*braziliensis*, sin embargo, estos han mostrado menor efectividad contra *L. guyanensis* o *L. mexicana* en zonas geográficas concretas (Pérez-Ayala *et al.*, 2009, World Health Organization, 2010, Monge-Maillo y López-Vélez, 2013a, Blum *et al.*, 2018, Chakravarty y Sundar, 2019).

## **1.6. Identificación y caracterización de las leishmanias**

El interés de la distinción de las especies es múltiple. Tal vez, el principal reside en la vertiente clínica, al ser una buena herramienta para el manejo de los casos de leishmaniosis (World Health Organization, 2010). Sin embargo, también es un punto esencial en los estudios filogenéticos o epidemiológicos (Kuhls y Maurício, 2019, Domagalska y Dujardin, 2020).

Las especies no presentan ninguna característica morfológica que permita su diferenciación. Por este motivo, con las primeras descripciones de especies llegaron también los primeros criterios para clasificarlas: comportamiento en el cultivo, en el hospedador vertebrado o en el invertebrado, reacciones serológicas, reacción a fármacos, etc. (Garnham, 1971, Lainson y Shaw, 1987). Con el tiempo, esos criterios “extrínsecos” fueron remplazados por características inherentes al parásito. En la actualidad, se dispone de una gran variedad de técnicas basadas en diferencias bioquímicas, genéticas o proteómicas. Cada laboratorio utiliza aquellas que le funcionan mejor según el objetivo del estudio, la variedad de especies circulantes en la zona o la infraestructura disponible (Van der Auwera y Dujardin, 2015).

### **1.6.1. Técnicas bioquímicas**

Se basan en el estudio de las reacciones químicas metabólicas o en la composición química de moléculas diferentes a los ácidos nucleicos. Por tanto, las relaciones entre las cepas se establecen a partir de rasgos fenotípicos iguales o distintos.

Algunos ejemplos de técnicas bioquímicas son los estudios de radiorespirometría en cultivos de promastigotes (Decker *et al.*, 1977) o el estudio de glúcidos de superficie mediante aglutinación por lectinas (Jacobson *et al.*, 1982). Sin embargo, las técnicas bioquímicas por excelencia aplicadas a la identificación y caracterización de cepas de *Leishmania* son aquellas que se centran en el estudio de las variantes alélicas de ciertas enzimas metabólicas –isoenzimas– a través de una electroforesis (Rioux *et al.*, 1990).

Uno de los primeros trabajos en los que se aplicó el estudio de isoenzimas es el Gardener y colaboradores que, en 1974, adaptaron la técnica utilizada en otros protozoos para el estudio de las isoformas del enzima malato deshidrogenasa (MDH) de *Leishmania* (Gardener *et al.*, 1974). Rápidamente, la técnica se fue desarrollando ampliando el estudio a otros enzimas y analizándolos de forma combinada, estableciéndose, así, sistemas enzimáticos que conseguían discriminar las especies descritas (Al-Taqi y Evans, 1978, Maazoun *et al.*, 1981). Algunos sistemas más utilizados son el del grupo del Centre Hospitalier Universitaire (CHU)

Montpellier (MON) (Maazoun *et al.*, 1981, Rioux *et al.*, 1990, Thomaz-Soccol *et al.*, 1993), el del London School of Hygiene and Tropical Medicine (LON) (Le Blancq *et al.*, 1986) o el del Instituto Oswaldo Cruz (IOC) (Cupolillo *et al.*, 1994).

El análisis isoenzimático, llamado también electroforesis de enzimas multilocus (*Multilocus enzyme electrophoresis*, MLEE), parte de la premisa de que, generalmente, las distintas isoformas de los enzimas están codificadas en un mismo gen (Rioux *et al.*, 1990). La presencia de polimorfismos se traduce en cambios a nivel de la proteína que alteran su velocidad de migración electroforética. Así pues, de forma simplificada, la técnica consiste en una electroforesis, a un pH determinado y constante, de extractos proteicos de cepas de *Leishmania* en geles de almidón, poliacrilamida o acetato de celulosa, sobre el que luego se revelan los enzimas seleccionados (Maazoun *et al.*, 1981, Rioux *et al.*, 1990, Dujardin *et al.*, 1995). A las distintas distancias de migración observadas, en referencia a las de una cepa control, se les asigna un valor numérico, un electromorfo. El conjunto de electromorfos obtenidos para la totalidad de enzimas incluidos dará el perfil enzimático de la cepa y permitirá englobarla, junto a otras cepas que presenten el mismo perfil, dentro de un zimodema (Rioux *et al.*, 1990).

Una técnica variante y complementaria del MLEE, con mayor poder discriminativo, es la técnica del isoelectroenfoque (IEF). La principal diferencia reside en que a los geles, en este caso de acrilamida, se les aplica potencial eléctrico, previamente a la electroforesis de los extractos proteicos, para crear un gradiente de pH con la ayuda de anfólitos. Las proteínas migran hacia el ánodo o cátodo en función de su carga global y paran en el punto en el que el pH es igual a su punto isoelectrónico (Trouvé, 1989, Piarroux *et al.*, 1994).

Las isoenzimas supusieron una revolución para la caracterización de cepas de *Leishmania* y sus aplicaciones. Por un lado, permitieron conocer mejor la epidemiología en regiones endémicas, incluyendo los zimodemas circulantes, los reservorios y los vectores que intervenían (Dereure *et al.*, 1991, Jiménez *et al.*, 1995, Guilvard *et al.*, 1996, Gállego *et al.*, 2001, Gramiccia, 2003, Martín-Sánchez, Gramiccia, *et al.*, 2004, Pralong *et al.*, 2004, Campino *et al.*, 2006). Por otro, ofrecieron la posibilidad de aplicar la cladística numérica para establecer relaciones entre grupos de cepas, evaluar los taxones descritos hasta el momento y proponer una organización taxonómica del género (Lanotte *et al.*, 1981, 1984, Rioux *et al.*, 1990, Cupolillo *et al.*, 1994). El estudio de los isoenzimas continúa siendo la base de la taxonomía actual y, sumado al hecho de que es la única técnica que se ha utilizado para estudiar la mayoría de las especies descritas, hace que el MLEE continúe siendo la técnica de referencia para la caracterización de cepas (World Health Organization, 2010). No obstante, es una técnica muy laboriosa, casera, manual, cara, lenta, de difícil interpretación y dependiente de cultivos en masa de las cepas a analizar y de otras cepas marcadoras (Van der Auwera y Dujardin, 2015, Kuhls y Maurício, 2019). Estas desventajas, y la demostración de que la relación entre fenotipo y genotipo no es tan directa como se creía (Maurício *et al.*,

---

2006, Zemanová *et al.*, 2007), han hecho que actualmente esté siendo sustituida por técnicas más modernas.

### 1.6.2. Técnicas moleculares

Las técnicas moleculares se centran en estudio del material genético y permiten analizar las diferencias en las secuencias nucleotídicas de las leishmanias (Pratlong y Lanotte, 1999). La primera técnica de este tipo fue la evaluación de la flotabilidad de las moléculas de ADN en gradientes de cloruro de cesio, dependiente de las bases nucleotídicas que lo compusieran (Chance *et al.*, 1974). A esta le siguieron técnicas de hibridación por sondas (Barker y Butcher, 1983) o el estudio del cariotipo mediante campo pulsado (Pagès *et al.*, 1989) pero, sin duda, las técnicas moleculares más utilizadas son aquellas que se basan en la amplificación del ADN. Mediante PCR convencional o PCR a tiempo real se aumenta de manera exponencial el número de copias de la secuencia diana y, a continuación, se logra la distinción de las especies aplicando diversas estrategias (Gramiccia y Di Muccio, 2018).

Uno de los métodos más accesibles y aplicados a nivel mundial es la digestión del producto de PCR convencional mediante enzimas de restricción (*Restriction fragment length polymorphism*, RFLP) (Van der Auwera y Dujardin, 2015). Las cepas se distinguen al presentar diferentes patrones de bandas cuando se visualizan los productos de digestión en geles de agarosa. El número y el tamaño de los fragmentos resultantes es dependiente de la cantidad y la posición de regiones de corte para la enzima usada que presenta la secuencia analizada (Akhoundi *et al.*, 2017). Algunas variantes de esta técnica son el análisis del tamaño de los fragmentos por fluorescencia (*Fluorescent fragment length analysis*, FFL) en el que se utiliza un secuenciador automático, en lugar del gel de agarosa (Schönian *et al.*, 2011, Tomás-Pérez *et al.*, 2013), o el análisis de polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (*Amplified fragment length polymorphism*, AFLP), en el que se hace la restricción del ADN genómico previamente a una amplificación con iniciadores aleatorios (Van der Auwera y Dujardin, 2015). Existen otros métodos no basados en enzimas de restricción, pero en los que también se analizan patrones de bandas. En la amplificación aleatoria del ADN polimórfico (*Random amplification of polymorphic DNA*, RAPD) se obtienen fragmentos de ADN de distinto tamaño en función de los lugares de unión de los iniciadores (Van der Auwera y Dujardin, 2015, Akhoundi *et al.*, 2017). En la detección de polimorfismos en función de conformaciones de cadena sencilla (*Single stranded conformational polymorphism*, SSCP), los amplificados de una región concreta son desnaturalizados y, posteriormente, al dejarlos renaturalizar, algunas hebras de ADN monocatenario hibridan consigo mismas, adoptando una conformación distinta según su secuencia y alterando el patrón de corrida en el gel (El Tai *et al.*, 2000).

Con estas técnicas, los cambios nucleotídicos que no afectan a las zonas de restricción de las enzimas, a las zonas de unión de los iniciadores o a la estructura secundaria de la cadena, pasan desapercibidos. Este inconveniente queda solventado al secuenciar por el método

Sanger los productos amplificados, ya que permite conocer la secuencia nucleotídica mayoritaria (Sanger *et al.*, 1977). De este modo, la identificación de las especies se obtiene por la detección de polimorfismos, al comparar las secuencias obtenidas con las de cepas de referencia disponibles en bases de datos de secuencias y/o construyendo dendrogramas. A pesar de que es necesario un equipamiento más sofisticado que el de RFLP, es un método ampliamente utilizado al ser más informativo (Van der Auwera y Dujardin, 2015). Para abarcar un mayor número de posiciones informativas y obtener una mayor resolución, se puede amplificar y secuenciar en paralelo múltiples genes únicos (*Multilocus sequence typing*, MLST) o bien múltiples regiones microsatélites –secuencias cortas altamente repetidas– (*Multilocus microsatellite typing*, MLMT) (Schönian *et al.*, 2011, Van der Auwera y Dujardin, 2015). En esta línea, la secuenciación masiva o secuenciación de segunda generación, ha supuesto un importante salto cualitativo en los últimos años, al permitir la exploración del genoma completo. La secuenciación del genoma de las principales especies ha abierto la puerta a trabajos de índole diversa como estudios de patogenicidad, resistencia o sobre la biología de *Leishmania* (Rogers *et al.*, 2011, Ghouila *et al.*, 2017, González-De La Fuente *et al.*, 2017, Bussotti *et al.*, 2018, Rastrojo *et al.*, 2018, Yasur-Landau *et al.*, 2018, Urrea *et al.*, 2019). Por el momento, en lo referente a la tipificación de cepas, los estudios epidemiológicos y taxonómicos se centran, principalmente, en el estudio del ADN nuclear de poblaciones concretas, existiendo también algún trabajo sobre el ADNk de varias especies (Downing *et al.*, 2011, Teixeira *et al.*, 2017, Kocher *et al.*, 2018, Zackay *et al.*, 2018, Camacho *et al.*, 2019, Figueiredo de Sá *et al.*, 2019, Franssen *et al.*, 2020). Sin embargo, se espera que la secuenciación masiva sea un herramienta clave para resolver muchos de los conflictos taxonómicos del género, para el seguimiento epidemiológico e, incluso, para la práctica clínica (Kuhls y Maurício, 2019, Domagalska y Dujardin, 2020).

También recientemente, y con el propósito de encadenar la identificación al diagnóstico, se han realizado distintos estudios basados en el análisis de la temperatura de fusión de los amplificados por PCR a tiempo real (Tsukayama *et al.*, 2013, Nath-Chowdhury *et al.*, 2016, Silva de Morais *et al.*, 2016). Se trata de detectar, justo después de la amplificación y sin necesidad de manipular los productos de PCR, la temperatura a la que las hebras de los amplificados bicatenarios se separan mediante cambios de fluorescencia (Nasereddin y Jaffe, 2010). La presencia de cambios nucleotídicos, especialmente aquellos que alteran el contenido de guaninas y citosinas, hacen variar la temperatura de fusión, permitiendo discriminar entre taxones (Zampieri *et al.*, 2016).

En la identificación y la caracterización de las leishmanias se prioriza la especificidad y el poder discriminatorio de las técnicas por encima de la sensibilidad. Por ello, la mayoría parten de un cultivo de promastigotes. No obstante, cada vez más, se busca un incremento de la sensibilidad para poderlas aplicar directamente en muestras clínicas, donde las concentraciones de parásito pueden ser bajas (Van der Auwera y Dujardin, 2015, Domagalska y Dujardin, 2020). Muchos de los métodos moleculares anteriormente descritos



---

son potencialmente útiles para alcanzar estos objetivos, pero, salvo para la secuenciación del genoma completo, uno de los factores limitantes son las dianas que se escogen para llevarlos a cabo. Para la identificación de especies se suelen utilizar dianas específicas, con secuencias variables entre especies, pero para las que se precisan concentraciones relativamente elevadas de parásitos (Gramiccia y Di Muccio, 2018). La falta de una metodología universal estandarizada ha llevado a que se hayan ensayado una gran variedad de secuencias génicas. A continuación, se detallan algunas de las más utilizadas con este fin:

***hsp70***: Las proteínas de choque térmico de 70 kDa (*heat-shock protein 70*, HSP70) se consideran esenciales en gran cantidad de procesos celulares (Mayer y Bukau, 2005, Folgueira y Requena, 2007). De entre las distintas regiones del genoma que codifican para miembros de esta familia de proteínas (Drini *et al.*, 2016), el locus *hsp70* del cromosoma 28 resulta útil en la tipificación de las leishmanias (Van der Auwera *et al.*, 2014). Las distintas especies de *Leishmania* presentan un número variable de copias del gen organizadas en tándem, habiendo únicamente ligeras diferencias en la última copia –conocida como *hsp70-II*– (Folgueira *et al.*, 2007, Ramírez *et al.*, 2011).

Se han utilizado varios fragmentos del gen para la identificación de leishmanias mediante RFLP (García *et al.*, 2004, Da Silva *et al.*, 2010, Montalvo *et al.*, 2012, 2017), secuenciación (Fraga *et al.*, 2010, Van der Auwera *et al.*, 2013) o análisis de temperatura de fusión (Hernández *et al.*, 2014, Zampieri *et al.*, 2016, Salvioni *et al.*, 2019). Según se describe en la bibliografía, los estudios de temperatura de fusión no consiguen diferenciar entre algunas especies (Zampieri *et al.*, 2016) y por RFLP solo se consigue la distinción de la mayoría de las especies ensayadas cuando se combinan distintos enzimas de restricción (Da Silva *et al.*, 2010, Montalvo *et al.*, 2012, Fraga *et al.*, 2013). La secuenciación parcial del gen ofrece mayor poder de discriminación que los métodos anteriores ya que, pese a que la diversidad polimórfica no es muy elevada, sí permite identificar las principales especies del género y otros tripanosomátidos cercanos; aunque algunas especies como *L. infantum*, *L. panamensis* y *L. peruviana* aparecen como subgrupos poco robustos dentro de sus respectivos complejos (Da Silva *et al.*, 2010, Van der Auwera *et al.*, 2013, Espinosa *et al.*, 2018). En estudios comparativos con otros genes, el *hsp70* es de los más resolutivos (Van der Auwera *et al.*, 2014) y, además, suficientemente sensible para trabajar directamente a partir de muestra clínica (García *et al.*, 2004, Montalvo *et al.*, 2012, 2017).

**ITS**: Los espaciadores transcribibles internos (*internal transcribed spacer*, ITS) son regiones no codificantes que se sitúan entre los genes del ácido ribonucleico ribosomal (ARNr). Se conoce como ITS1 a la región espaciadora ente la subunidad pequeña del ARNr y el ARN 5.8S y como ITS2 a la región entre el ARN 5.8S y la subunidad mayor del ARNr (Cupolillo *et al.*, 1995). El conjunto de genes y regiones espaciadoras internas se encuentran repetidas en tándem, en el cromosoma 27, entre 20 y 40 veces en un genoma diploide de *Leishmania* (Inga *et al.*, 1998, Yan *et al.*, 1999, Martínez-Calvillo *et al.*, 2001). Esta característica les aporta gran sensibilidad y hace a los ITS atractivos para la caracterización

desde muestra directa (Schönian *et al.*, 2003), pero se ha observado que el poder de resolución de los ITS varía en función de la técnica, la región analizada y las cepas a tipificar (Van der Auwera y Dujardin, 2015).

El ITS1 ha sido utilizado en RFLP (Schönian *et al.*, 2003), PCR especie-específicas (Odiwuor *et al.*, 2011), SSCP (Chargui *et al.*, 2012), FFL (Tomás-Pérez *et al.*, 2013), secuenciación (Van der Auwera *et al.*, 2014) y análisis de la temperatura de fusión (Talmi-Frank *et al.*, 2010, Hernández *et al.*, 2014, De Almeida *et al.*, 2017); en ocasiones a partir de muestra clínica (Bousslimi *et al.*, 2012, Chargui *et al.*, 2012, Shaheen *et al.*, 2020). En general, permite discriminar entre las especies del subgénero *Leishmania*, pero presenta una resolución menor para el subgénero *Viannia*, viéndose agravado al utilizar RFLP (Schönian *et al.*, 2003, Van der Auwera *et al.*, 2014, Van der Auwera y Dujardin, 2015).

El ITS2 se ha utilizado de forma exclusiva en pocos estudios, pero por secuenciación permitiría la separación de las principales especies (De Almeida *et al.*, 2011). Cuando ambas regiones se utilizan conjuntamente, se consigue separar las principales especies y se observa diversidad intraespecífica dentro de algunas de ellas (Cupolillo *et al.*, 1995, El Tai *et al.*, 2000, 2001, Kuhls *et al.*, 2005). El ITS2 podría complementar al ITS1 en la identificación del subgénero *Viannia* (Van der Auwera y Dujardin, 2015). Estudios llevados a cabo con cepas del complejo *L. donovani* revelan mayor variabilidad en el ITS1, pero los distintos tipos de ITS2 se corresponden con el origen geográfico de las cepas (El Tai *et al.*, 2000, 2001).

La variabilidad de los ITS reside principalmente en las regiones microsatélites que presentan y en la inserción y delección desigual de los bloques de repetición de estas (El Tai *et al.*, 2000, De Almeida *et al.*, 2011). Paradójicamente, en ocasiones, esta variabilidad es una de las principales desventajas de esta diana. Por secuenciación, las regiones microsatélites entorpecen la lectura de las secuencias obtenidas, mientras que las variaciones de tamaño complican el análisis comparativo (De Almeida *et al.*, 2011, Van der Auwera *et al.*, 2014). Además, el hecho de que se observe gran variabilidad entre las cepas de las distintas especies dificulta definir las separaciones entre especies (Van der Auwera y Dujardin, 2015).

**Miniexón:** El miniexón, en inglés *spliced leader*, es una secuencia de nucleótidos que interviene en el empalme en trans (*trans-splicing*) del ARN mensajero. Un genoma haploide de *leishmania* contiene, en tándems repartidos en varios cromosomas, entre 100 y 200 copias del gen estructuradas de la siguiente manera: un exón de unos 39 pb altamente conservados, un intrón de medida variable medianamente conservado y una región intergénica de tamaño muy variable (Marfurt *et al.*, 2003a, 2003b, Kuhls y Maurício, 2019). Utilizando las tres regiones como diana para RFLP se consiguen separar las principales especies, incluso a partir de muestra directa (Marfurt *et al.*, 2003a, 2003b, Serin *et al.*, 2007). Roelfsema *et al.* (2011) encuentran poco manejable el RFLP y describen la secuenciación como técnica más práctica para distinguir especies de los subgéneros *Leishmania* y *Viannia*. Sin embargo, al igual que

---

con el ITS, la secuenciación del miniexón también presenta complicaciones derivadas de la gran variabilidad de tamaños entre cepas e incluso entre copias de un mismo individuo (Van der Auwera *et al.*, 2014, Kuhls y Maurício, 2019). Pese a esto, el miniexón tiene un poder de resolución cercano al del gen *hsp70*, con la ventaja de que, al ser un fragmento más pequeño y repetido, es útil para muestras con baja carga parasitaria (Van der Auwera *et al.*, 2014).

**Enzimas metabólicas:** Teniendo como base el MLEE, prácticamente todos los genes que codifican para las enzimas incluidas en el MLEE han sido ensayados como marcadores para la discriminación de especies. La mayoría de los estudios están realizados sobre complejos concretos y mediante PCR específicas o secuenciación de los genes de manera aislada (Greenblatt *et al.*, 2002, Castilho *et al.*, 2003, Zhang *et al.*, 2006, Siriwardana *et al.*, 2007) o formando parte de esquemas MLST (Maurício *et al.*, 2006, Zemanová *et al.*, 2007, Tsukayama *et al.*, 2009, Boité *et al.*, 2012, Herrera *et al.*, 2017, Lauthier *et al.*, 2020). Estos estudios describen diferentes grados de discriminación entre los genes, pero los de la fumarato hidratasa (*fh*), manosa fosfato isomerasa (*mpi*) y 6-fosfogluconato deshidrogenasa (*pgd*) han sido destacados por algunos autores como marcadores prometedores (Zemanová *et al.*, 2007, Tsukayama *et al.*, 2009, Lauthier *et al.*, 2020). A pesar de que son genes con una única o pocas copias, también han sido utilizados para la detección y caracterización a partir muestra clínica (Wortmann *et al.*, 2005, Shaw *et al.*, 2008, Tsukayama *et al.*, 2013).

***rpoHLS*:** El gen que codifica para la subunidad mayor de la ARN polimerasa II (*RNA polymerase II largest subunit*, RPOHLS) se encuentra en copia única en el cromosoma 31, o en el 30 en el caso de *L. mexicana* (El Baidouri *et al.*, 2013, Kuhls y Maurício, 2019). Evaluado siempre por secuenciación, tanto de manera aislada como complementando a otros genes, el *rpoHLS* se ha utilizado principalmente en estudios filogenéticos y evolutivos, que abarcaban desde complejos concretos hasta el género *Leishmania* (Croan y Ellis, 1996, Croan *et al.*, 1997, Noyes *et al.*, 2002, Ravel *et al.*, 2006, Lukes *et al.*, 2007, El Baidouri *et al.*, 2013, Kwakye-Nuako *et al.*, 2015). Aunque es posible la secuenciación de este gen a partir muestra clínica, en los distintos trabajos se suelen utilizar cultivos, algo habitual en los estudios filogenéticos (Kuhls y Maurício, 2019).

**ARN 7SL:** EL 7 *spliced leader* (7SL) es una molécula de ARN que participa en la translocación de proteínas a través del retículo endoplasmático (Van der Auwera y Dujardin, 2015). Zelazny *et al.* (2005) utilizaron un fragmento de 137-139 pb del gen, situado en el cromosoma 5, para identificar especies de *Leishmania* por secuenciación. Permitió distinguir muy bien entre ambos subgéneros y también entre complejos, pero con poca variabilidad dentro de ellos. Estos resultados fueron confirmados, entre otros autores, por Van der Auwera *et al.* (2014) quienes observaron, en un estudio comparativo entre varios genes, que el 7SL era el que presentaba una menor resolución. Stevenson *et al.* (2010) consiguieron diferenciar la mayoría de las especies incluidas, de los dos principales subgéneros, aumentando el tamaño del fragmento amplificado. Por debajo de ese nivel taxonómico, las cepas presentaban secuencias muy conservadas. En estudios sobre muestra clínica, el 7SL presenta

buena sensibilidad y discriminación suficiente entre los complejos del Viejo Mundo cuando es utilizado en PCR-FFL (Tomás-Pérez *et al.*, 2013) y análisis de temperatura de fusión (Nasereddin y Jaffe, 2010), pero distingue peor entre los del Nuevo Mundo (Tomás-Pérez *et al.*, 2013).

**Minicírculos del ADNk:** Como se ha mencionado anteriormente, los minicírculos son uno de los dos tipos de moléculas que conforman el ADNk. Tienen un tamaño aproximado de 1000 pb, de los que 12 pb son conservados entre todos los tripanosomátidos. Una leishmania presenta miles de minicírculos, que son de distintas clases en función de su región variable (Lukeš *et al.*, 2002, Simpson *et al.*, 2006). Conocida su gran utilidad en el diagnóstico, se han empleado diversas técnicas para determinar su poder de discriminación: diferenciación por tamaño (Anders *et al.*, 2002, Mahboudi *et al.*, 2002), RFLP (Noyes *et al.*, 1998, Volpini *et al.*, 2004, Bhattarai *et al.*, 2010, Rocha *et al.*, 2010), hibridación (Wirth y McMahon Pratt, 1982, Brenière *et al.*, 1999), PCR específicas (Lopez *et al.*, 1993, Salotra *et al.*, 2001, Rocha *et al.*, 2010), secuenciación (Aransay *et al.*, 2000), análisis de temperatura de fusión (Nicolas *et al.*, 2002, Pita-Pereira *et al.*, 2012, Ceccarelli *et al.*, 2014, Silva de Morais *et al.*, 2016) y secuenciación masiva del ADNk (Kocher *et al.*, 2018). Exceptuando los estudios centrados únicamente en una sola especie, en ninguno de los trabajos citados se consigue la separación clara de todas las especies incluidas. En general, se llegan a distinguir los dos subgéneros. Únicamente Kocher *et al.* (2017) consiguieron llegar a nivel de especie, pero con dificultades para distinguir *L. braziliensis* de *L. guyanensis*. Además, la gran variabilidad existente incluso dentro de una misma especie dificulta la correcta interpretación de los resultados, requiriéndose protocolos de manipulación muy estrictos (Botilde *et al.*, 2006). Sea por exceso de variabilidad o por falta de una adecuada validación del método, el ADNk ofrece poco poder de resolución y queda limitado a la separación de subgéneros o a la aplicación en áreas geográficas concretas (Van der Auwera y Dujardin, 2015).

**gp63:** La glicoproteína de 63 kDa (GP63), conocida también como proteasa mayor de superficie (*major surface protase*, MSP) o leishmaniosina, es una metaloproteasa dependiente de zinc con múltiples funciones, algunas de ellas relacionadas con la infección del hospedador vertebrado. Está codificada principalmente en el cromosoma 10, aunque también se le han asociado genes de los cromosomas 28 y 31. El locus del cromosoma 10 está constituido por distintos tipos de genes organizados en tándem y repetidos diversas veces en función de la especie de *Leishmania* (Maurício *et al.*, 2007, Castro Neto *et al.*, 2019). Para tipificación, los genes *gp63* se han utilizado mayoritariamente en RFLP a partir de cultivo (Victoir *et al.*, 1998, Guerboj *et al.*, 2001, Maurício *et al.*, 2001, Elamin *et al.*, 2005) y en menos ocasiones de muestra clínica (Victoir *et al.*, 2003, Seridi *et al.*, 2008). En muy pocos estudios se ha llevado a cabo la secuenciación (Maurício *et al.*, 1999), seguramente debido a la dificultad de interpretar y comparar los resultados por la elevada variabilidad genética (Van der Auwera y Dujardin, 2015, Kuhls y Maurício, 2019). Recientemente, se ha utilizado para análisis de temperatura de fusión en muestras de suero (Hosseini-Safa *et al.*, 2018). Aunque

---

en los trabajos citados incluyen únicamente especies de un complejo o un subgénero, todos ellos coinciden en que permite una buena discriminación a nivel de especie. Algunos consiguen, incluso, la diferenciación entre *L. braziliensis* y *L. peruviana* y entre *L. donovani* y *L. infantum*, dentro de las que, además, encuentran variaciones infraespecíficas relacionadas con el origen geográfico (Victoir *et al.*, 1998, Maurício *et al.*, 1999, 2001, Guerbouj *et al.*, 2001, Seridi *et al.*, 2008).

**cytb**: El citocromo b (CYTB) es un componente de la cadena respiratoria mitocondrial y se encuentra codificado en los maxicírculos del ADNk, de los que una leishmania tiene de 20 a 50 copias (Yatawara *et al.*, 2008, Van der Auwera y Dujardin, 2015, Mohammadpour *et al.*, 2019). Se han utilizado diferentes juegos de iniciadores para la identificación de las leishmanias (Luyo-Acero *et al.*, 2004, Foulet *et al.*, 2007, Asato *et al.*, 2009, Lopes *et al.*, 2016). Tanto por secuenciación como por RFLP, los diferentes estudios realizados muestran una buena capacidad para discriminar entre las distintas especies del género, observándose, también, variabilidad infraespecífica (Luyo-Acero *et al.*, 2004, Foulet *et al.*, 2007, Asato *et al.*, 2009, Gebhardt *et al.*, 2015, Lopes *et al.*, 2016, Motalleb *et al.*, 2017, Mohammadpour *et al.*, 2019). Muchos de ellos han destacado su utilidad para estudios filogenéticos y, en la misma línea, estudios de secuenciación masiva apuntan al maxicírculo completo como un buen marcador (Camacho *et al.*, 2019, Kaufer *et al.*, 2019). Además, parece ser suficientemente sensible como para caracterizar desde muestra clínica, incluyendo preparaciones teñidas, muestras en papel de filtro o embebidas en parafina (Foulet *et al.*, 2007, Myint *et al.*, 2008, Kato *et al.*, 2010, 2019, Gebhardt *et al.*, 2015, Mirahmadi *et al.*, 2018).

### 1.6.3. Técnicas proteómicas

Las técnicas proteómicas, basadas en el estudio de las proteínas, se han incorporado recientemente a la identificación de las leishmanias. Concretamente, el método que se utiliza es la espectrometría de masas mediante desorción/ionización láser asistida por matriz (*Matrix-assisted laser desorption/ionization- time of flight*, MALDI-TOF). Los promastigotes de *Leishmania* se cristalizan en una matriz sobre la que se hace incidir un rayo láser. La matriz absorbe la energía del láser, provocando su sublimación y la ionización de las proteínas de la muestra. Estos iones son acelerados por un campo electrostático y lanzados a través de un tubo de vacío ascendente. En el extremo del tubo, un detector determina con gran precisión el tiempo de vuelo, lo que han tardado las partículas en hacer el recorrido. El tiempo de vuelo depende de la relación entre la masa de la molécula y el grado de ionización de esta (relación m/z). Con esta información, se recogen los datos del conjunto de la muestra y se dibuja un espectro de picos en función de la cantidad de iones detectados –intensidad– para cada valor de m/z (Croxatto *et al.*, 2012, Singhal *et al.*, 2016, Maldonado *et al.*, 2017).

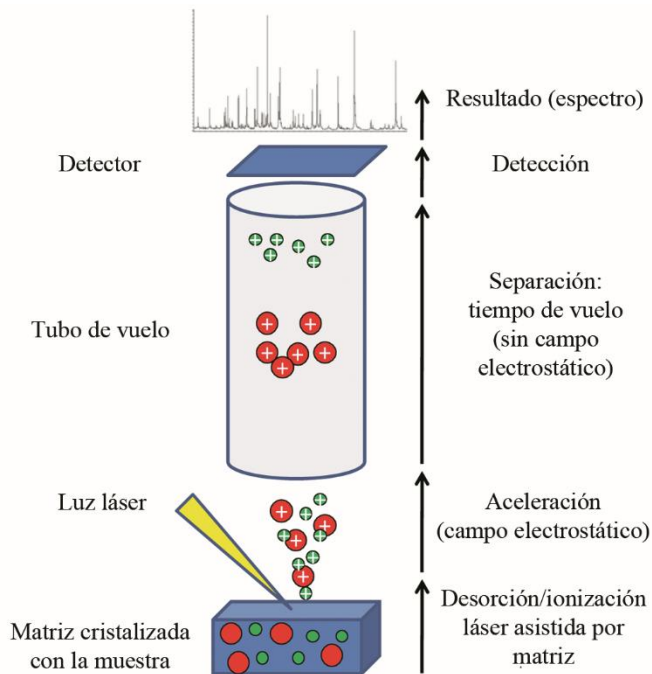


Fig 5. Esquema sobre el funcionamiento de la espectrometría de masas MALDI-TOF. Imagen modificada de Croxatto *et al.* (2012).

Una vez obtenido el espectro de las cepas, los distintos estudios han conseguido la identificación de especies o complejos siguiendo dos estrategias: o bien identificando picos específicos (Mouri *et al.*, 2014, Evers *et al.*, 2018) o bien comparando el espectro completo con los de cepas de referencia (Cassagne *et al.*, 2014, Culha *et al.*, 2014). Los estudios citados muestran resultados prometedores en cuanto al poder de identificación de la técnica, cuya aplicación estaría más dirigida hacia la vertiente clínica (Culha *et al.*, 2014, Mouri *et al.*, 2014).

La principal ventaja del MALDI-TOF sobre otro tipo de técnicas es la rapidez en la que se obtienen los resultados. Entre las desventajas, la necesidad de partir de un cultivo, que los resultados obtenidos se basan sobre un número limitado de cepas para algunas especies y la falta de librerías de espectros (Van der Auwera y Dujardin, 2015, Singhal *et al.*, 2016).

Una aproximación muy distinta, desarrollada recientemente, es la utilizada por Luque-González *et al.* (2018). En su estudio amplifican una región del ARNr 28S, la analizan mediante química dinámica y hacen la lectura de la masa de los productos resultantes por MALDI-TOF. Esta varía en función de las diferencias nucleotídicas, consiguiendo diferenciar entre *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei* y *Leishmania* spp.



---

## 2. Hipótesis y objetivos/ Hypothesis and objectives

*... Toca afinar, definir de un trazo...*



---

## 2. Hipótesis y objetivos/Hypothesis and objectives

### 2.1. Hipótesis

La taxonomía de las leishmanias es compleja y cambiante en función de los criterios utilizados en cada momento para su clasificación, evidenciándose una falta de consenso por parte de la comunidad científica en los niveles más elementales. Esto tiene implicaciones en aquellos ámbitos de estudio donde la identificación y caracterización de las cepas es esencial y se ve agravado por la globalización actual y la presencia de casos de leishmaniosis importados. La aplicación de distintas metodologías que consideren características bioquímicas, moleculares y proteómicas podría resolver algunas de las controversias que han surgido en la taxonomía, así como cuestiones más aplicadas en cuanto a la etiología y la epidemiología de la enfermedad.

### Hypothesis

The taxonomy of the *Leishmania* genus is complex and variable depending on the classification criteria used. This gives rise to discrepancies among the scientific community regarding the most elementary levels of the classification, especially affecting those areas where species identification is fundamental. In addition, globalization worsens the situation due to the presence of imported leishmaniasis cases. The use of diverse methodologies considering biochemical, molecular and proteomic markers could help to solve some of the controversial issues related to the taxonomy, as well as contribute to improving knowledge around the disease's aetiology and epidemiology.

### 2.2. Objetivos

El objetivo general de este trabajo es evaluar la utilidad de diferentes técnicas en la caracterización de cepas de *Leishmania* para poder abordar cuestiones taxonómicas y epidemiológicas.

Los objetivos específicos que se han planteado son los siguientes:

- Evaluar la utilidad de la espectrometría de masas (MALDI-TOF) en la identificación de cepas de *Leishmania*.
- Estudiar y comparar la utilidad de distintas técnicas bioquímicas, moleculares y proteómicas para la caracterización de las leishmanias.
- Profundizar en el estudio del complejo *Leishmania donovani*.
- Caracterizar las cepas causantes de leishmaniosis tegumentaria en la población autóctona e inmigrante en Cataluña.
- Analizar la evolución de la leishmaniosis tegumentaria en Cataluña.

## Objectives

The main objective of this work is to evaluate the usefulness of different techniques in *Leishmania* strains characterization in order to address taxonomic and epidemiological issues.

The specific objectives proposed are the following:

- To assess the usefulness of mass spectrometry (MALDI-TOF) in the identification of *Leishmania* strains.
- To study and compare the value of different biochemical, molecular and proteomic techniques for *Leishmania* characterization.
- To delve into the study of the *Leishmania donovani* complex.
- To characterize the strains causing tegumentary leishmaniasis in the native and immigrant population in Catalonia.
- To analyse the evolution of tegumentary leishmaniasis in Catalonia.



---

### 3. Material y métodos

*...Sintonizar, reagrupar pedazos en mi colección de medallas y de arañazos...*

---

## 3. Material y métodos

### 3.1. Cepas utilizadas

El material de partida para todos los estudios incluidos en esta tesis son cepas de *Leishmania* criopreservadas en nitrógeno líquido. El conjunto de cepas utilizadas es variado en lo referente a la especie, el origen geográfico, la fecha de aislamiento, el hospedador o la clínica que causaban. A continuación, se describen, en conjunto, las cepas incluidas en cada apartado del capítulo de resultados, seleccionadas en función de los objetivos de cada uno.

#### 3.1.1. Cepas incluidas en el estudio sobre la aplicación del MALDI-TOF a la caracterización de las leishmanias (apartado 4.1)

Para este estudio se utilizaron dos conjuntos de cepas. El primero estaba formado por 121 cepas cedidas y procesadas enteramente por el criobanco del Centre de Ressources Biologiques des *Leishmania* (CRB-Leish) en el Laboratoire de Parasitologie-Mycologie del CHU Montpellier (Anexo 1, Tabla A1). Estas cepas fueron utilizadas para crear una base de datos o librería de espectros de MALDI-TOF (*mass spectra library*, MSL). Las cepas habían sido previamente caracterizadas por MLEE y/o MLST y pertenecían a 33 taxones distintos.

El segundo conjunto, constituido por 231 cepas de *Leishmania*, se utilizó para elaborar el panel para testar la base de datos. En este caso, los espectros de las cepas fueron aportados por cada uno de los centros colaboradores: el Laboratoire de Parasitologie-Mycologie del CHU Montpellier (Francia) (n=98), el Laboratoire de Parasitologie-Mycologie del CHU La Timone-Marseille (Francia) en colaboración con el Institute Pasteur de Tunis (Túnez) y el Institute Pasteur d'Alger (Argelia) (n=64), el Laboratoire de Parasitologie-Mycologie del CHU Cayenne (Francia) (n=22) y el grupo de Patología Importada y Enfermedades Emergentes y Re-emergentes ubicado en la Sección de Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universitat de Barcelona en colaboración con el Servicio de Microbiología del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona (n=47, Anexo 1, Tabla A2). Las cepas, previamente identificadas según los métodos de referencia de cada centro –MLEE, RFLP, secuenciación de los genes *hsp70* o *rpoHLS*–, representaban 22 de los taxones.

#### 3.1.2. Cepas incluidas en el estudio del complejo *Leishmania donovani* (apartado 4.2)

Para este trabajo se seleccionaron, inicialmente, 64 cepas pertenecientes al complejo *L. donovani*, representantes de cada uno de los secuenciotipos identificados en el estudio de El Baidouri *et al.* (2013), del CRB-Leish del Laboratoire de Parasitologie-Mycologie del CHU de Montpellier. Seis de estas cepas no estaban disponibles, por lo que se empezó el estudio con 58 aislados. El Laboratoire de Parasitologie-Mycologie del CHU de Montpellier facilitó, al mismo tiempo, información relevante sobre las cepas, entre la que se incluía su identificación por MLEE. Dos cepas fueron eliminadas al obtener resultados discordantes

entre el análisis isoenzimático de la enzima GOT y el MLEE previo. Por lo tanto, este trabajo se elaboró finalmente con 56 cepas (Anexo 1, Tabla A3), clasificadas previamente por MLEE como *L. infantum* (n=31), *L. donovani* (n=20) y *L. archibaldi* (n=5) y pertenecientes a 37 zimodemas distintos. Estas cepas habían sido aisladas tanto de humanos como de otros reservorios animales y vectores, en 20 países de África, Europa y Asia.

### 3.1.3. Cepas incluidas en el estudio de las cepas causantes de leishmaniosis tegumentaria en Cataluña (apartado 4.3)

En este estudio se incluyeron todas las cepas disponibles en el Criobanco de Tripanosomátidos de la Universitat de Barcelona, ubicado en la Facultad de Farmacia y Ciencias de la Alimentación, que cumplieran con los requisitos de ser causantes de LC humana y aisladas en diversos hospitales de Cataluña hasta 2018. Se dispuso de 56 cepas aisladas entre 1981 y 2018 (Anexo 1, Tabla A4).

### 3.1.4. Cepas incluidas en estudio isoenzimático y descripción de nuevos zimodemas causantes de leishmaniosis tegumentaria en América Latina (apartado 4.4)

Cuatro de las cepas incluidas en el estudio de las leishmaniosis tegumentarias fueron descritas de manera aislada en este apartado al presentar perfiles isoenzimáticos distintos a los descritos hasta el momento (Anexo 1, Tabla A5). Todas las cepas habían sido aisladas de pacientes que reportaban haber estado en América Latina.

## 3.2. Descongelación y cultivo de las leishmanias

El proceso de descongelación de las cepas se llevó a cabo en condiciones estériles en una cabina de flujo laminar. Los viales conservados en nitrógeno se descongelaron rápidamente a 37 °C al baño maría. Seguidamente, se les añadió 1 ml de solución salina (NaCl) 9 ‰ para diluir el crioprotector, glicerina, previamente a la realización del cultivo. Tras homogeneizar el diluido con la ayuda de una pipeta Pasteur estéril, se traspasó todo el contenido a un frasco de cultivo de 50 ml, en el que previamente se habían vertido 5 ml de medio Schneider's Insect (Sigma-Aldrich) con gentamicina (Sigma), a la concentración de 50 mg/ml y suplementado SBF (Life Science Production) al 20 % y orina humana al 1 % esterilizada mediante filtración. Los cultivos se incubaron en cámara oscura a 24-26 °C para propiciar el crecimiento de las leishmanias. Dos veces por semana, fueron revisados bajo el microscopio invertido y resembrados si el crecimiento del cultivo y el aspecto de las leishmanias así lo requería. Cuando los cultivos estaban suficientemente crecidos y en fase exponencial de crecimiento se pasaba un volumen variable del cultivo, en función del crecimiento observado, a un nuevo frasco de cultivo que contenía 10 ml de medio suplementado con SBF y orina. Este proceso se llevó a cabo hasta obtener un cultivo con una concentración mínima de 10<sup>6</sup> promastigotes/ml en fase exponencial de crecimiento.

---

### 3.3. Técnicas bioquímicas: electroforesis de enzimas multilocus e isoelectrofocalización

#### 3.3.1. Obtención de extractos proteicos

Para realizar ambas técnicas fue necesaria la obtención de extractos proteicos de las cepas, proceso que requiere de una elevada concentración de promastigotes. Para ello, se realizaron pases de cultivos de promastigotes con crecimiento abundante a frascos de cultivo en masa de 250 ml, con aproximadamente 50 ml de medio Schneider, suplementado con SBF y orina estéril, y se sembró hasta obtener la concentración adecuada.

Para la extracción de proteínas se utilizó el protocolo descrito por Piarroux *et al.* (1994). Para ello, se centrifugaron los cultivos a 3.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. Seguidamente, se decantó el sobrenadante y se realizaron dos lavados del sedimento con solución salina 9 ‰ –añadiendo 15 ml, centrifugando a 3.000 rpm 10 minutos a 4 °C y decantando el sobrenadante– y un tercer lavado con solución salina al 3 ‰, en las mismas condiciones. Tras el último lavado, se recuperó el sedimento resuspendiéndolo en unas gotas de solución salina 3‰, se colocó en crioviales, se centrifugó de nuevo en las mismas condiciones y se eliminó el sobrenadante. Los sedimentos obtenidos se congelaron en nitrógeno líquido y se dejaron descongelar a temperatura ambiente. Una vez descongelados, se centrifugaron a 14.000 rpm durante 20 minutos a 4 °C. El sobrenadante obtenido se pipeteó a razón de 25 µl y se vertió sobre nitrógeno líquido, colocado en cubiteras, formándose así pequeñas “perlas” que fueron preservadas en nitrógeno líquido hasta su utilización.

#### 3.3.2. Electroforesis de enzimas multilocus

El MLEE se realizó siguiendo el protocolo descrito por Rioux *et al.* (1990). Se utilizaron 12 o 15 sistemas enzimáticos en función del origen de las cepas. Para las cepas del Viejo Mundo se analizaron las 15 enzimas: malato deshidrogenasa (MDH) E.C 1.1.1.37, enzima málica (ME) EC 1.1.1.40, isocitrato deshidrogenasa (ICD) EC 1.1.1.42, fosfogluconato deshidrogenasa (PGD) EC 1.1.1.44, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) EC 1.1.1.49, glutamato deshidrogenasa (GLUD) EC 1.4.1.3, NADH-diaforasa (DIA) EC 1.6.2.2, purina nucleósido fosforilasa (NP) –1 y 2– EC 2.4.2.1, glutamato oxaloacetato transaminasa (GOT) –1 y 2– EC 2.6.1.1, fosfoglucomutasa (PGM) EC 2.7.5.1, fumarato hidratasa (FH) 4.2.1.2, manosa fosfato isomerasa (MPI) EC 5.3.1.8 y glucosa fosfato isomerasa (GPI) EC 5.3.1.9. Para las cepas del Nuevo Mundo las enzimas MDH, ICD y GLUD fueron excluidas, ya que a menudo no se revelan (Thomaz-Soccol *et al.*, 1993, Chouicha *et al.*, 1997). Para el estudio del complejo *L. donovani* únicamente se analizó la enzima GOT. A continuación, se describe el procedimiento general, las condiciones específicas para cada enzima se detallan en el Anexo 2.

En primer lugar, se fabricaron los geles de almidón al 12%, ajustando su pH (7,4, 8,6 o 9,4) y añadiendo o no coenzima (NAD, NADP o Mn) en función de las enzimas a revelar, y se dejaron solidificar durante toda la noche o un mínimo de 7 horas. A continuación, se colocó

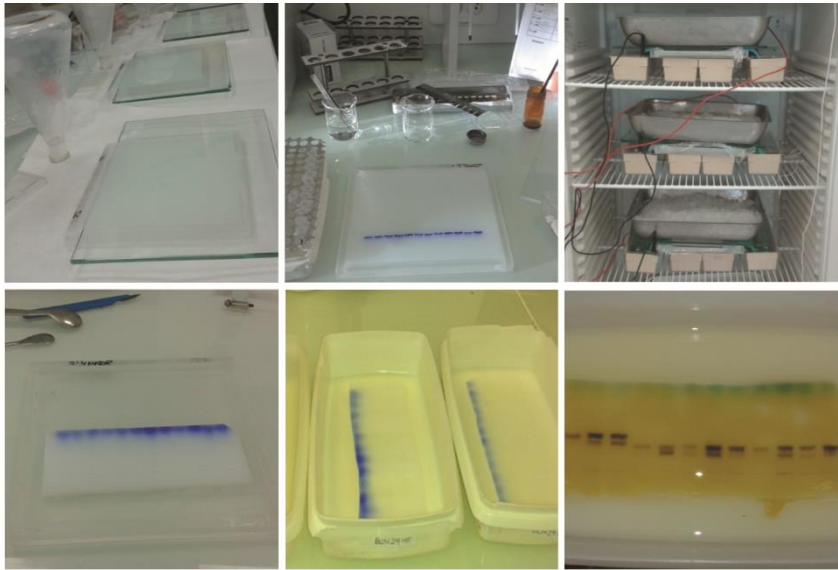


Fig 6. Fotografías de diferentes pasos durante la metodología MLEE. En la parte superior: preparación de los gels, carga y electroforesis; en la inferior: corte de los gels y revelado.

un peine impregnado con azul de bromofenol (0,5 %) en el extremo inferior del gel confeccionando así los pocillos de siembra. En ellos se insirieron trozos de papel Whatman, cortados a medida, embebidos con los extractos proteicos. Para la electroforesis, los gels se dejaron correr unos 7 cm a 90 V, excepto la MDH (40-50V). Este proceso puede durar entre 7 h y 10 h aproximadamente, por lo que se realizó a 4 °C en nevera. Una vez alcanzada la distancia deseada, los gels se cortaron a láminas. A cada una de las láminas se le aplicó la solución de revelación adecuada para observar las bandas correspondientes a una de las enzimas evaluadas. Las distancias de migración obtenidas se compararon a las de cepas marcadoras para asignar el electromorfo correcto –valor numérico correspondiente a una distancia de migración– para cada una de las enzimas. El conjunto de electromorfos obtenidos permitió asignar a cada cepa un zimodema –valor numérico correspondiente a un perfil isoenzimático–.

### 3.3.3. Isoelectrofocalización

En determinadas ocasiones fue necesario conseguir una mayor resolución para valorar los resultados obtenidos para las enzimas GOT, GPI y NP<sub>1</sub>. Para ello, se utilizó la técnica de IEF, tal y como describen Piarroux *et al.* (1994). Los gels de IEF se fabricaron con poliacrilamida al 5%, a los que se le añadieron diferentes anfólitos en función del pH de trabajo de cada enzima (pH 3-10 para GOT y pH 5-8 para GPI y NP<sub>1</sub>). Una vez solidificados, se colocaron en una placa de electrofocalización durante 20 minutos a 15 mA, junto a dos mechas embebidas con NaOH y H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, para crear un gradiente de pH en los gels. Seguidamente,



---

se sembraron los extractos proteicos y se dejaron correr 15 minutos a 25 W seguidos de 15 minutos a 40 W para la GOT y 30 minutos a 25W seguidos de 15 minutos a 30 W para la NP<sub>1</sub> y la GPI. Finalmente, se aplicó la solución de revelación para observar los patrones de bandas presentados por cada cepa. Los patrones de las cepas de estudio se compararon con los de las cepas marcadoras para asignar un electromorfo.

### 3.4. Técnicas moleculares: PCR-secuenciación

Los genes analizados por secuenciación fueron el *hsp70* (1245 pb), *got* (1239 pb), *rpoIILS* (529 pb), *fh* (615 pb) y la región ITS2 (entre 524 y 683 pb). Además, para el estudio del complejo *L. donovani* (apartado 4.2) se utilizaron las secuencias de los siete genes incluidos en el MLSA de El Baidouri *et al.* (2013), disponibles en GenBank (Anexo 3, Tabla A7). A continuación, se describe el procedimiento genérico. Los cebadores y las condiciones concretas utilizadas para cada uno de los genes se detallan en el Anexo 4.

La extracción del ADN de las cepas de leishmania se realizó a partir de 200 µl de cultivo de promastigotes utilizando el kit Qiamp DNA Mini kit (Qiagen) siguiendo el protocolo indicado por el fabricante. Seguidamente se procedió a la amplificación individual de cada uno de los fragmentos de ADN, por PCR convencional, para cada una de las cepas de estudio. Las reacciones de amplificación se prepararon añadiendo 1 µl de los cebadores (10 µM) y 1,5 µl de ADN –los específicos en cada caso– a 12,5 µl de la mezcla comercial DreamTaq Green PCR Master Mix (2X) (ThermoScientific), completando con agua destilada hasta obtener un volumen final de 25 µl. Posteriormente, se sometieron al protocolo de ciclado térmico adecuado (Anexo 4). Las amplificaciones fueron verificadas mediante electroforesis en geles de agarosa al 1 % teñidos con 5 µl de bromuro de etidio o 10 µl del colorante GreenSafe Premium (NZYtech). Los amplicones fueron purificados enzimáticamente con EXOSAP-IT (Affymetrix USB) siguiendo las instrucciones descritas por el fabricante. Finalmente, se prepararon dos mezclas por muestra que contenían 3 µl del producto purificado más 1 µl de uno de los iniciadores (5 µM) –*forward* y *reverse* por separado– y se entregaron al servicio de genómica de los Centres Científics i Tecnològics de la Universitat de Barcelona para la secuenciación, por el método Sanger, de ambas cadenas de los productos purificados. Las secuencias resultantes se revisaron y editaron en los programas MEGA-X (Kumar *et al.*, 2018) y Bionumerics versión 7.6.3 (Applied Maths). Todas ellas están disponibles en GenBank asociadas a los siguientes números de acceso: MN728685 - MN728796, las obtenidas para el estudio del complejo *L. donovani* (apartado 4.2) y MT497923 - MT497978, MT498854 - MT499021 y MN688566 -MN688569, las obtenidas para el estudio de las cepas tegumentarias en Cataluña (apartados 4.3 y 4.4). Adicionalmente, en el estudio de las cepas tegumentarias en Cataluña (apartados 4.3 y 4.4), se compararon las secuencias obtenidas con otras secuencias publicadas en GenBank, mediante BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), con la intención de extraer datos epidemiológicos sobre los secuenciotipos encontrados.

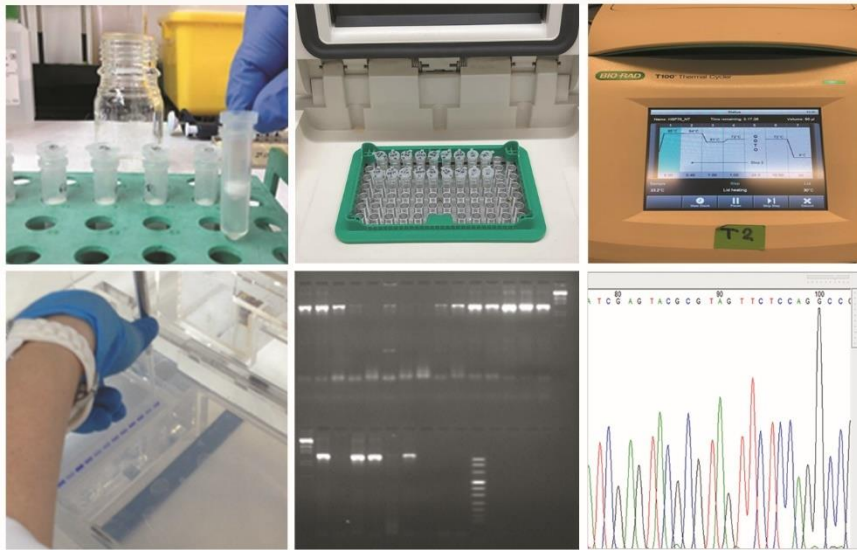


Fig. 7. Fotografías de diferentes pasos durante la metodología PCR-secuenciación. En la parte superior: extracción de ADN, tubos con la reacción de amplificación y termociclador realizando la PCR; en la inferior: carga del gel de electroforesis y visualización y electroferograma de una secuencia de ADN.

### 3.5. Técnicas proteómicas: espectrometría de masas MALDI-TOF

Entre 3 y 5 ml de cultivo en fase exponencial, conteniendo una concentración aproximada de  $3 \cdot 10^6$  parásitos/ml, fueron centrifugados durante 10 minutos a 3000 rpm y lavados tres veces con 10 ml de solución salina 9 % con las mismas condiciones de centrifugado. Tras el último lavado, los promastigotes sedimentados fueron resuspendidos en una gota, aproximadamente 20  $\mu$ l, de solución salina 9 %. A continuación, se depositó 1  $\mu$ l de la suspensión sobre los pocillos de la placa de acero del MALDI-TOF. Una vez secos, se cubrieron con 1  $\mu$ l de matriz, ácido  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnámico (Sigma-Aldrich), y se dejaron secar de nuevo. El número de réplicas realizado varió dependiendo del estudio. Para la puesta a punto de la técnica MALDI-TOF (apartado 4.1) se hicieron 10 réplicas para las cepas incluidas en la librería de espectros y 4 réplicas para las cepas del panel de validación. Para el estudio de las cepas causantes de leishmaniosis tegumentaria (apartado 4.3) se hicieron 6 réplicas y para el estudio del complejo *L. donovani* (apartado 4.2), 10 réplicas. Los espectros fueron adquiridos con el instrumento Autoflex II TOF-TOF (Bruker Daltonics) mediante el programa Flex Control versión 3.4 (Bruker Daltonics) en los parámetros por defecto. En el estudio del MALDI-TOF (apartado 4.1), los tres centros franceses utilizaron el instrumento Microflex LT (Bruker Daltonics).

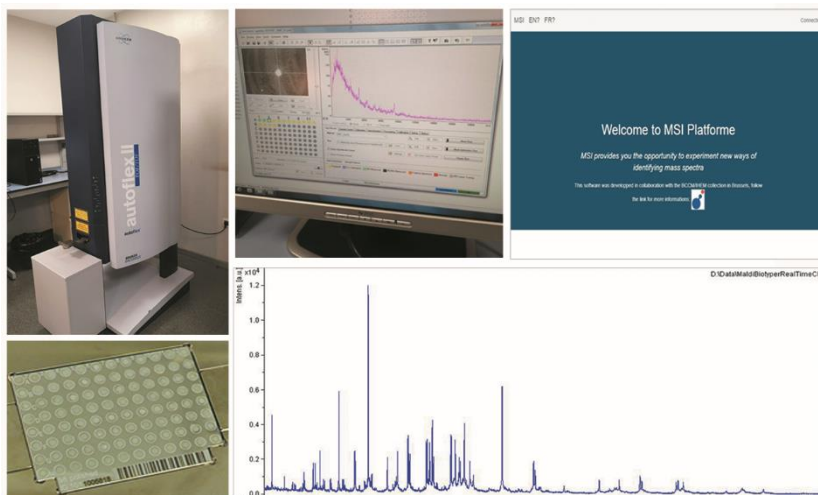


Fig 8. Fotografías de la metodología MALDI-TOF. En la parte superior: espectrómetro de masas MALDI-TOF, pantalla del programa Flex Control durante la adquisición de los espectros y pantalla de inicio de la aplicación web MSI. En la parte inferior: placa de acero con muestras y matriz depositadas y espectro proteico de una cepa de *Leishmania*.

### 3.6. Análisis informático

#### 3.6.1. Análisis de los zimodemas

En los estudios de isoenzimas (apartados 4.2 y 4.4), se evaluaron las relaciones entre las distintas cepas y zimodemas mediante la construcción de árboles de tipo *neighbour joining* (NJ) en el programa MEGA-X, utilizando el método *p-distance* y un *bootstrap* de 1000 réplicas. Para ello, previamente se elaboró una matriz basada en la presencia o ausencia de las diversas movilidades de los enzimas.

#### 3.6.2 Análisis de las secuencias

Para los análisis filogenéticos o de tipo *clustering*, los nucleótidos de todas las secuencias fueron duplicados para evitar la pérdida de información derivada de los caracteres ambiguos, generalmente posiciones heterocigotas –ej. A pasó a ser AA y R a AG–. Los árboles NJ de todos los estudios se construyeron con el programa MEGA-X utilizando el método *p-distance* y un *bootstrap* de 1000 réplicas.

En el estudio del complejo *L. donovani* (apartado 4.2), además, se construyeron redes *neighbour-net* (NN) con el programa Splitstree versión 4.14.8 (Huson y Bryant, 2006), utilizando el método *uncorrected-p*. Para elaborar estas redes se añadieron secuencias de GenBank de cepas pertenecientes a los complejos *L. major* y *L. tropica* (Anexo 3, Tablas A8, A9 y A10).

El aislamiento genético por distancia fue calculado mediante un test de Mantel utilizando el paquete *ade4* del programa R versión 3.6.0 (R Core Team, 2019). Se comparó una matriz de distancia genética, previamente calculada con el programa MEGA-X utilizando el método *p-distance*, con una matriz de distancia geográfica, obtenida con la aplicación web Geographic Distance Matrix Generator versión 1.2.3 (Ersts, 2019). Los valores obtenidos en el test pueden variar entre -1 –indicando correlación negativa–, 0 –no correlación– y 1 –correlación positiva–. Los datos crudos, matrices y comandos utilizados están disponibles en MendeleyData asociados al DOI 10.17632/jdyxs9nzg2.1.

### 3.6.3. Análisis de los espectros

#### 3.6.3.1. Identificación de espectros mediante la aplicación web

La librería de espectros construida en el estudio de la puesta a punto del MALDI-TOF (apartado 4.1), fue implementada en una aplicación web diseñada para la identificación de microorganismos por espectrometría de masas (*mass spectrometry identification* (MSI) *application*) disponible en <https://biological-mass-spectrometry-identification.com/msi/>.

Para proceder a la identificación mediante la aplicación MSI, se comprimieron los espectros en un archivo “.zip” y se cargaron a la aplicación. Tras diversas operaciones matemáticas para eliminar el ruido de fondo de los espectros, suavizar los valores de intensidad e identificar picos relevantes, la aplicación compara los valores de los picos obtenidos con los de las cepas de referencia, utilizando algoritmos propios. A continuación, devuelve los valores de similitud entre el espectro problema y 1) el espectro más similar de la librería (resultado A), 2) el espectro más similar perteneciente a otra especie incluida en el mismo complejo taxonómico que el primer espectro (resultado B) y 3) el espectro más similar para otra especie no incluida en ese complejo (resultado C). Los valores de similitud tienen un rango de 0 a 100, indicando este último valor coincidencia perfecta.

Para la interpretación de resultados, se evaluaron hasta tres criterios: 1) la especie identificada en la réplica con el valor de similitud más elevado: criterio *best score*, 2) la especie más identificada entre las réplicas: criterio *best agreement* y 3) la especie más identificada entre las réplicas, pero en caso de empate se toma la especie con el mayor valor de similitud: criterio *intermediate*.

#### 3.6.3.2. Análisis de espectros independiente de la aplicación web

Una vez obtenidos los espectros para el estudio del complejo *L. donovani* (apartado 4.2), estos fueron convertidos a formato mxML utilizando la herramienta MSConvert (ProteoWizard (Chambers *et al.*, 2012)) y procesados con el programa Bionumerics. En primer lugar, se procesaron cada uno de los espectros réplicas. El ruido de fondo basal de los espectros fue eliminado utilizando la herramienta *rolling disk* en un tamaño de 100 puntos. Se suavizaron las curvas de los espectros con el operador *kaiser window*, estableciendo el

---

tamaño de la ventana a 20 puntos y una beta de 10. El ruido de fondo fue eliminado nuevamente con un segundo *rolling disk* de 200 puntos de tamaño, después de calcular el ruido restante con el algoritmo *continuous wavelet transformation* en los parámetros escala 1, percentil de ruido a 50, tamaño de ventana de 501 puntos y porcentaje mínimo de ruido a 0,2 %. Finalmente, se hizo una primera detección de picos fijando el punto de corte en una ratio señal/ruido de 5. Tras este proceso, se obtuvo un espectro promedio de las diez réplicas de cada cepa utilizando la opción *technical replicate* del programa y se revisaron manualmente. A continuación, se emparejaron los picos de todas las cepas con una tolerancia constante de 5 y una tolerancia lineal de 200. Los picos presentes en al menos el 10 % de las cepas fueron seleccionados para el análisis comparativo. Para estudiar los posibles grupos de cepas y la relación entre estas, se realizó un análisis de componentes principales (*principal component analysis*, PCA) basado en valores cuantitativos y se construyó un árbol NJ usando el coeficiente de similitud de Dice.

Por otro lado, se estimó la correlación entre la semejanza de los espectros y la distancia geográfica entre las cepas mediante el test de Mantel utilizando el programa *ade4* de R. La matriz de distancia entre los espectros, fue calculada por el mismo programa a partir de datos de presencia o ausencia de los picos, utilizando el coeficiente de Jaccard. Los datos crudos, ambas matrices y los comandos se encuentran disponibles en MendeleyData asociados al DOI 10.17632/jdyxs9nzg2.1.

### 3.6.4. Otros análisis

#### 3.6.4.1. Test de Shimodaira-Hasegawa

En el estudio del complejo *L. donovani* (apartado 4.2), se utilizó el test de Shimodaira-Hasegawa (SH) para evaluar la congruencia entre las señales filogenéticas de las diferentes técnicas –MLEE, secuenciación y MALDI-TOF– calculando y comparando estadísticamente la similitud entre la topología de los árboles. En primer lugar, se construyeron árboles de tipo *maximum likelihood* (ML) a partir de los datos genéticos, usando el modelo GTR+I+G y un *bootstrap* de 100 réplicas con el programa PhyML versión 3.1 (Guindon *et al.*, 2010). A continuación, en el programa PAUP\* versión 4.0a165 (Swofford, 2003), se realizó el test SH para comparar cada uno los árboles ML contra todos los árboles; es decir, todos los árboles ML, los obtenidos para las otras técnicas y 100 árboles aleatorios creados adicionalmente para evitar sesgos en los resultados. Los valores obtenidos son p-valores para la hipótesis nula de no diferencia entre la topología de los árboles. Aquellos p-valores no significativos, superiores a 0,05, indicaban no diferencia entre los árboles, es decir congruencia. Los datos y árboles utilizados, en formato newick, así como una breve descripción del proceso están disponibles en MendeleyData bajo el DOI 10.17632/jdyxs9nzg2.1.

#### 3.6.4.2. Cálculo de la identidad nucleotídica media

También para el estudio del complejo *L. donovani* (apartado 4.2), se calculó la identidad nucleotídica media (*average nucleotide identity*, ANI) entre diversos genomas –aquellos disponibles en GenBank y de características comparables– pertenecientes a los complejos *L. donovani*, *L. major* y *L. tropica* (Anexo 3, Tabla 11). Se realizaron comparaciones por pares entre los genomas de un mismo complejo, utilizando la herramienta MuMmer de la aplicación web JSpeciesWS versión 3.0.20 (Ribocon GmbH) (Richter *et al.*, 2016).



---

## 4. Results and analysis

*Ya está aquí, ¿quién lo vio?  
Baila como un lazo en un ventilador  
¿Quién iba a decir que sin carbón no hay Reyes Magos?*



---

## 4. Results and analysis

### 4.1. 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

#### 4.1.1. Background

During the last decade, mass spectrometry (MS) has been adapted to microorganism identification. Nowadays, MALDI-TOF MS is integrated into the workflow of many routine laboratories, thus greatly simplifying pathogen identification and improving patient care (Clark *et al.*, 2013). A few studies support the proof-of-concept for *Leishmania* species identification with this method (Cassagne *et al.*, 2014, Culha *et al.*, 2014, Mouri *et al.*, 2014). However, those studies were done by using in-house databases that are not available to other people working on leishmaniasis. As no reference mass-spectral library for *Leishmania* is commercially available, the aim of this study was to construct and test the reliability of a reference MSL using samples from an international collection of *Leishmania* isolates.

#### 4.1.2. Results

##### 4.1.2.1. Construction and testing of the mass-spectral reference database

The *Leishmania* MSL was built by using the mass spectra of 121 well-characterized *Leishmania* strains from the collection (Annex 1, Table A1). The MSL was implemented in a specific web-based application designed for mass-spectral identification (MSI application; <https://biological-mass-spectrometry-identification.com/msi/>) and then tested with an independent panel of 268 samples (231 *Leishmania* isolates and 37 outgroup controls) from four different laboratories (see Table 1 for a complete description of these samples). In each laboratory, the MS spectra of the allotted samples –four replicates for each sample– from the panel were used for sample identification with the MSI application and the reference MSL. For each submitted spectrum, the application gave a similarity score that includes three subscores –identification to the species level (score A), identification to the complex level (score B), and identification in a different complex (score C)–. Each subscore ranged from 0 to 100 –100 indicates a perfect match between the compared spectra– (Fig. 9). For the 37 outgroup controls –*Herpetomonas*, *Crithidia*, *Endotrypanum*, bacteria, and fungi–, no match with *Leishmania* was obtained, and the similarity score was systematically <17.

The MSI application results were then compared with those obtained with the reference identification method used in that laboratory (Table 1). Overall, there was good concordance between methods; however, weakness in species differentiation, particularly within the *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, and *L. donovani* complexes, was observed (Fig. 10).

Table 1. List of *Leishmania* species tested by the 4 centres and the gold-standard method used.

Panel description	No. of isolates tested (method)				
	Montpellier	Cayenne	Barcelona	Marseille	Total
<i>L. adleri</i>	1 (MLEE)	-	-	-	1
<i>L. aethiopica</i>	2 (MLEE)	-	-	-	2
<i>L. amazonensis</i>	-	1 (RFLP)	1 ( <i>hsp70</i> and <i>rpoHLS</i> )	-	2
<i>L. archibaldi</i>	1 (MLEE)	-	-	-	1
<i>L. braziliensis</i>	6 (MLEE), 2 ( <i>rpoHLS</i> )	4 ( <i>rpoHLS</i> )	7 ( <i>hsp70</i> and <i>rpoHLS</i> )	1 (MLEE)	20
<i>L. deanei</i>	1 (MLEE)	-	-	-	1
<i>L. donovani</i>	3 (MLEE)	-	4 ( <i>hsp70</i> and <i>rpoHLS</i> )	-	7
<i>L. enriettii</i>	1 (MLEE)	-	-	-	1
<i>L. gerbilli</i>	1 (MLEE)	-	-	-	1
<i>L. guyanensis</i>	3 (MLEE), 51 ( <i>rpoHLS</i> )	15 ( <i>rpoHLS</i> ) 1 (RFLP)	1 ( <i>hsp70</i> and <i>rpoHLS</i> )	1 (MLEE)	72
<i>L. gymnodactyli</i>	1 ( <i>rpoHLS</i> )	-	-	-	1
<i>L. infantum</i>	1 (MLEE)	-	26 ( <i>hsp70</i> and <i>rpoHLS</i> )	47 (MLEE)	74
<i>L. killicki</i>	-	-	-	3 (MLEE)	3
<i>L. lainsoni</i>	3 (MLEE), 1 ( <i>rpoHLS</i> )	-	-	-	4
<i>L. major</i>	3 (MLEE), 3 ( <i>rpoHLS</i> )	-	4 ( <i>hsp70</i> and <i>rpoHLS</i> )	7 (MLEE)	17
<i>L. mexicana</i>	4 (MLEE)	-	1 ( <i>hsp70</i> and <i>rpoHLS</i> )	-	5
<i>L. naiffi</i>	1 ( <i>rpoHLS</i> )	1 (RFLP)	-	-	2
<i>L. panamensis</i>	-	-	1 ( <i>hsp70</i> and <i>rpoHLS</i> )	1 (MLEE)	2
<i>L. peruviana</i>	4 (MLEE)	-	-	1 (MLEE)	5
<i>L. pifanoi</i>	1 (MLEE)	-	-	1 (MLEE)	2
<i>L. tropica</i>	2 (MLEE), 1 ( <i>rpoHLS</i> )	-	2 ( <i>hsp70</i> and <i>rpoHLS</i> )	1 (MLEE)	6
<i>L. turanica</i>	1 (MLEE)	-	-	1 (MLEE)	2
<i>Trypanosoma brucei</i>	2	-	-	-	2
<i>Herpetomonas Crithidia</i>	2	-	-	-	2
<i>Endotrypanum</i>	1	-	-	-	1
Bacteria	10 (16S rRNA)	-	-	-	10
Fungi	20 (ITS2)	-	-	-	20
<b>Total</b>	<b>135</b>	<b>22</b>	<b>47</b>	<b>64</b>	<b>268</b>

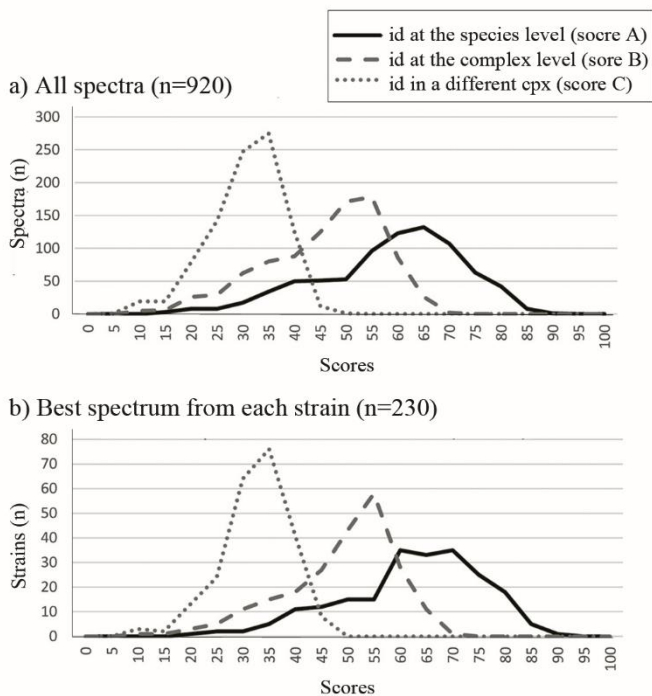


Fig. 9. Distribution of the three similarity subscores for all spectra –four replicates for each isolate– and for the spectrum with the best score for each isolate (b). id, identification; cpx, complex. The validation panel included 231 *Leishmania* isolates, but only 230 were identified by the MSI application.

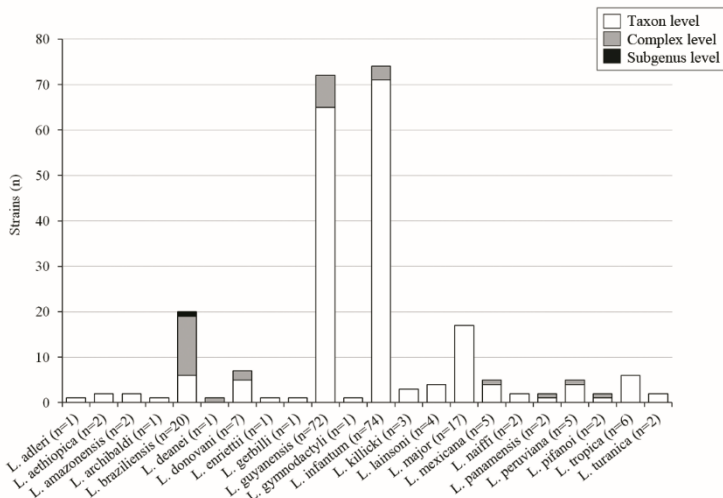


Fig 10. MALDI-TOF identification results according to reference identification.

Specifically, only 6 (32%) of the 20 *L. braziliensis* isolates were well classified. However, among the 31 misidentified samples, only one was a wrong identification at the complex level and corresponded to a *L. braziliensis* isolate that was identified as *L. guyanensis* (Table 2).

Table 2. List of the 31 misidentifications by MALDI-TOF MS and MS scores obtained.

Identification by reference method (no. of isolates)	Identification by MALDI-TOF MS	MS scores
<i>L. braziliensis</i> (13)	<i>L. peruviana</i>	32.45, 35.17, 36.45, 38.42, 38.71, 43.49, 47.94, 48.44, 54.44, 56.24, 59.96, 65.8, 66.63
<i>L. braziliensis</i> (1)	<i>L. guyanensis</i>	36.48
<i>L. peruviana</i> (1)	<i>L. braziliensis</i>	63.83
<i>L. guyanensis</i> (7)	<i>L. panamensis</i>	41.08, 41.66, 41.95, 42.78, 43.14, 51.73, 60.21
<i>L. panamensis</i> (1)	<i>L. guyanensis</i>	55.8
<i>L. mexicana</i> (1)	<i>L. pifanoi</i>	69.57
<i>L. pifanoi</i> (1)	<i>L. mexicana</i>	55.79
<i>L. deanei</i> (1)	<i>L. hertigi</i>	43.84
<i>L. donovani</i> (2)	<i>L. archibaldi</i>	45.04, 53.57
<i>L. infantum</i> (3)	<i>L. archibaldi</i>	40.49, 47.22, 52.78

#### 4.1.2.2. Score threshold assessment

Analysis of the three similarity subscores for each sample (Fig. 9) relative to the results obtained with the reference methods indicated that most scores corresponding to a correct identification to the species or complex level were  $>35$ . However, the distinction between correct species identification and correct complex identification was more difficult to determine, because there was a clear overlap of the two score distributions (Fig. 9). Therefore, 15 different similarity score thresholds were tested and positive predictive values (PPVs) –the proportion of true-positive results– were calculated for each threshold by taking into account only the highest similarity score among the four replicates for each sample (Table 3). The PPV for complex identification was always above 0.99, regardless of the considered threshold. Conversely, it was more difficult to distinguish between species belonging to the same complex, as shown by the PPV results at the species level. The number of misidentifications, particularly at the species level, decreased with higher threshold scores, whereas the number of unidentified strains –with similarity scores below the threshold– increased (Table 3). For instance, with a threshold of 40, all samples were correctly identified to the complex level (PPV = 1), but 13 isolates remained unidentified. These samples corresponded to five correct species identifications, seven correct complex identifications and one wrong identification.

Table 3. Identification capacities with the various tested score thresholds.

<b>Score threshold</b>	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	
<b>Correctly identified at taxon level (n)</b>	200	198	198	197	193	184	171	159	138	100	63	34	13	2	0	
<b>Correctly identified at complex or species level (n)</b>	30	30	30	29	25	17	13	9	5	3	0	0	0	0	0	
<b>Incorrect identification (n)</b>	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<b>Threshold not reached (n)</b>	0	2	2	4	13	30	47	63	88	128	168	197	218	229	231	
<b>PPV</b>	<b>Taxon level</b>	0.86	0.86	0.86	0.86	0.89	0.91	0.92	0.94	0.96	0.97	1	1	1	1	-
	<b>Complex level</b>	0.99	0.99	0.99	0.99	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-

n: number of strains; PPV: Positive predictive value.

#### 4.1.2.3. Culture conditions and testing of parasite concentrations

To identify the best conditions for MALDI-TOF analysis, three strains from the CRB-Leish collection were used for comparing different culture media, parasite concentrations and culture durations. Species identification for all three strains was obtained with all tested culture media –RPMI, SDM-79 and Schneider media–. The best identification scores were obtained when MALDI-TOF analysis was performed with cultures of  $3 \cdot 10^6$  *Leishmania* parasites/ml in the exponential phase of culture growth, regardless of the time required to obtain this concentration.

#### 4.1.2.4. MS data acquisition

In terms of identification performance, no difference was observed when mass spectra were acquired by using the Microflex or Autoflex instrument (Bruker Daltonics).

#### 4.1.2.5. Online accessibility

The four participating centres tested the online accessibility of the MSI application. The delay between the query submission and the Excel report acquisition for inputs containing up to 96 spectra was <1 min for all centres. Performances were equivalent with the Mac and Windows operating systems using any of the most used Web browsers (Google Chrome, Mozilla Firefox, Safari, and Internet Explorer).

### 4.1.3. Results analysis

The purpose of this study was to create and test the reliability of a database for *Leishmania* identification by MALDI-TOF MS using a free Web-based application to meet researchers' and public health needs. The database included spectra from 10 *Leishmania* complexes representing 33 species, thus covering the main diversity of this genus. Access to the MSI application requires an account and acceptance of a policy agreement. The account is password protected, and access codes are delivered for free after a discussion of the nature of the project, with the aim of ensuring that users are using the application for public health or scientific purposes.

Our results show that neither the medium used nor the time spent to reach the appropriate promastigote concentration significantly influenced the quality of spectra and, thus, the identification. The important point is to obtain a promastigote concentration of  $3 \cdot 10^6$  parasites/ml from an exponential-phase culture. Once the sample is prepared, at least four replicates per strain are required, as previously recommended by Cassagne *et al.* (2014). As already observed in many studies, the interpretation of results depends on the chosen score threshold (Biswas and Rolain, 2013, Fernandes Santos *et al.*, 2013). In this study, the lower threshold considered was 20 because our experience with other organisms, such as fungi, indicates that nonspecific identifications are frequent below this threshold (Normand *et al.*,

---

2017). With this threshold, 230 of the 231 *Leishmania* strains were correctly identified at least to the complex level. By increasing the threshold up to 40, the frequency of misidentification at the species level was greatly reduced; however, the number of samples that did not reach the threshold increased, despite these samples being correctly identified in most cases. In real life, the threshold choice can be influenced by many factors and each user will have to weigh the advantages and disadvantages of each threshold, depending on the required level of accuracy of identification. Nevertheless, the MSI application allows obtaining reliable *Leishmania* identifications by MALDI-TOF MS in most cases. Moreover, as already seen with other databases, its reliability should increase progressively with the addition of new references (Normand *et al.*, 2013).

Considering the complexes frequently involved in CL, we observed that *L. major* and *L. tropica* identifications were 100% correct. Moreover, our identification system performed well in differentiating *L. killicki* from *L. tropica* strains, although it was recently proposed that they could be considered synonymous (Chaara *et al.*, 2015). Conversely, many more incorrect species identifications were obtained for the *L. braziliensis* complex, which is composed of *L. braziliensis* and *L. peruviana*. According to the literature and our experience, very few differences are observed between these species using MLEE or molecular methods (Bañuls *et al.*, 2000, 2002, Odiwuor *et al.*, 2012, Van der Auwera *et al.*, 2014). As the epidemiological data, clinical presentations, and treatments of CL caused by these two species are quite similar, identification to the complex level remains adequate. When considering a threshold value below 40, one *L. braziliensis* isolate was misidentified by the MSI application as *L. guyanensis*, a species belonging to the same subgenus but to a different complex. It is known that the *L. braziliensis* complex is very polymorphic, with a high recombination level, and is closely related to the *L. guyanensis* complex (Boité *et al.*, 2012). Only one spectrum –although it obtained the highest similarity score– pointed to an identification of *L. guyanensis* (score of 36.48), while the other three replicates identified *L. braziliensis* (scores of 31.22 and 31.46) and *L. panamensis* (score of 31.98). Thus, in some cases, a general view of the results of the four scores could provide a better approach. For the *L. guyanensis* complex, which includes the species *L. guyanensis*, *L. panamensis*, and *L. shawi*, 100% and 90.4% of the identifications were correct at the complex and species levels, respectively. As for *L. braziliensis* and *L. peruviana*, *L. shawi* and *L. panamensis* are considered to be two clusters inside the *L. guyanensis* complex rather than two different species (Bañuls *et al.*, 1999, 2002, Fraga *et al.*, 2010, Boité *et al.*, 2012).

As CL is a heterogeneous entity, and no therapeutic option is currently effective for all clinical forms, the species involved and the geographic area of contamination guide treatment decisions. Indeed, metastatic extension to the mucosa occurs in 1 to 3% of patients for some species. Fortunately, complex identification is sufficient to guide treatment management (Blum *et al.*, 2014, Aronson *et al.*, 2016). Therefore, MALDI-TOF MS is adequate for the first-line identification of strains involved in CL or mucocutaneous leishmaniasis. Some

misidentifications also occurred within the *L. donovani* complex. In our study, it was possible to identify 96% of *L. infantum*, 71% of *L. donovani*, and all *L. archibaldi* strains to the species level. All misidentified *L. donovani* isolates were identified as *L. archibaldi*. According to MLEE, the species *L. archibaldi* is characterized by a single enzyme and some molecular studies suggest that the *L. donovani* complex is more likely to be a continuum in which *L. archibaldi* stands between the two other species (El Baidouri *et al.*, 2013). Therefore, some authors attribute the category of subspecies to *L. infantum* and *L. donovani* (Fraga *et al.*, 2013), and it is widely accepted that *L. archibaldi* should not be considered a real species (Jamjoom *et al.*, 2004, Maurício *et al.*, 2004, Kuhls *et al.*, 2005, Lukes *et al.*, 2007). Anyway, there is no impact on therapeutic management because this complex is responsible for visceral forms of leishmaniasis, for which treatment does not depend on the species but on the therapeutic agents available in that country.

Although work is in progress to improve the sensitivity of the MSI application for the *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, and *L. donovani* complexes, the clinical context and epidemiological data also need to be considered to confirm *Leishmania* identification. Therefore, the medical biologist should remain completely responsible for the diagnostic procedure.

Overall, the MSI application proved to be a solid identification tool, leading to identification results comparable to those obtained with reference techniques but faster. As shown by the large experience acquired with other microorganisms, the addition of new references will improve current performances. Therefore, this identification tool will be further developed with the user community's help. The database could be regularly enriched and updated by users, by adding spectra representing new or rare species. Sharing access to a database, as we propose, should facilitate the implementation of studies requiring the identification of various organisms, by making available a common identification tool. Moreover, it provides an opportunity to implement collaborative research between groups working on related topics. Beyond the specific problem of identifying *Leishmania*, the approach presented here has also been applied to other organisms such as fungi (Normand *et al.*, 2017) and we hope that similar initiatives will be implemented to build other identification systems, based on the collective construction of databases by scientific teams.

*\*This study has been published in the Journal of Clinical Microbiology and is available in article format in Annex 5.*

*Este estudio fue publicado en la revista Journal of Clinical Microbiology, disponible en el Anexo 5 en formato artículo.*



---

## 4.2. The complex evolving scenario of the *Leishmania donovani* complex: a new insight into taxonomy

### 4.2.1. Background

The *Leishmania donovani* complex includes the exclusive causative agents of systemic and fatal VL (World Health Organization, 2010), and it has consequently been the focus of considerable research. However, from the taxonomic standpoint, the complex remains controversial and there are still doubts about its substructure and how clinical and epidemiological data should be linked to these taxa (Maurício, 2018).

From a historical perspective, the aetiological agent of kala-azar disease (VL) in India was definitively named, in 1903, as *Leishmania donovani* Laveran & Mensil, 1903 (Ross, 1903). Five years later, based on epidemiological and clinical criteria, Nicolle described a new species causing the disease in the Mediterranean region, mainly in children, and named it *Leishmania infantum* Nicolle, 1908 (Nicolle, 1908). In 1919, Castellani and Chalmers described a variant of *L. donovani* in Sudan, *Leishmania* var. *archibaldi* Castellani & Chalmers, 1919 (Castellani and Chalmers, 1919), and later Cunha and Chagas proposed a new species, *Leishmania chagasi* Cunha & Chagas, 1937, responsible for VL in South America (Cunha and Chagas, 1937). In the following years, the taxonomic status of the different species was questioned many times (Brumpt, 1936; Da Cunha, 1938; Nicoli, 1963; Lainson and Shaw, 1987) and in the 1970s, *L. donovani*, *L. infantum*, *L. archibaldi* and *L. chagasi* were merged into the *Leishmania donovani* species complex (Lainson and Shaw, 1987). The development of biochemical taxonomic tools in the 1980s –i.e. MLEE– revived discussions on the *Leishmania* taxonomy. A distinction between *L. donovani*, *L. infantum* and *L. archibaldi* was proposed based on the differential electrophoretic mobility of a single isoenzyme, the glutamate-oxaloacetate transaminase (GOT) –mobility values of 113, 100 and 110, respectively– (Rioux *et al.*, 1990). However, the relationship between the previously defined taxa and the biochemical characters was not straightforward and some discrepancies were identified. For instance, no enzymatic differences were observed between *L. chagasi* and *L. infantum*, being the first considered a synonymous species of *L. infantum* (Rioux *et al.*, 1990). Furthermore, all GOT<sup>110</sup> strains were considered as *L. archibaldi*, a term originally associated with geographical distribution, regardless of further evidences. Although the taxonomic position of this group was not clear, it was included as a sub-group of *L. donovani* (Rioux *et al.*, 1990, Pratlong *et al.*, 2001, Jamjoom *et al.*, 2004). Later, it was observed that the intermediate mobility of the *L. archibaldi* strains was produced by a heterozygous pattern (Piarroux *et al.*, 1994).

Examples of both synonymous mutations on isoenzyme-coding genes showing identical mobilities and post-translational modifications altering the migration of the enzymes were spotted, jeopardising the phylogenetic value of these markers in the *Leishmania* genus (Maurício *et al.*, 2006). Lastly, genetics-based studies have shown that the genetic clusters

within the *L. donovani* complex do not fully correlate with the taxa defined by isoenzyme criteria (Jamjoom *et al.*, 2004, Kuhls *et al.*, 2005, Lukes *et al.*, 2007, El Baidouri *et al.*, 2013). Nowadays the synonymy of *L. chagasi* and *L. archibaldi* with *L. infantum* and *L. donovani*, respectively, is practically accepted by the scientific community, but the correct taxonomic relationship between the two main species, *L. donovani* and *L. infantum*, is subject to debate.

With the aim of clarifying these taxonomic issues and establishing a more functional taxonomy for this important and controversial group of species, we analysed different *Leishmania* strains reflecting the geographical and clinical diversity of the *L. donovani* complex. Firstly, isoenzyme data underlying the current taxonomy –*i.e.* GOT– were freshly evaluated by MLEE and systematic sequencing of the gene to check for post-translational modifications. Secondly, a global genetic analysis was performed to evaluate the structure of the complex and alleles distribution associating the data from *got* gene to the previous genetic analysis performed by El Baidouri *et al.* (2013), where no structure was observed for the *L. donovani* complex using MLSA, and the *hsp70* gene, the most widely validated species typing marker. Finally, the cultured strains were submitted to mass spectrometry –MALDI-TOF– analysis as an additional approach to achieve a broader perspective on the complex.

#### 4.2.2. Results

##### 4.2.2.1. Systematic glutamate-oxaloacetate transaminase gene sequencing: full correlation with isoenzyme criteria

For the 56 strains finally included in the study, isoenzymatic analysis of the GOT enzyme confirmed previous results: 31 *L. infantum* (GOT<sup>100</sup>), 20 *L. donovani* (GOT<sup>113</sup>) and *L. archibaldi* (GOT<sup>110</sup>).

*got* sequence analysis revealed 11 different genotypes due to nine polymorphic positions along the 1239pb fragment of the full open reading frame. Three of the polymorphic positions implied non-synonymous substitutions –*i.e.* pos. 352, 419 and 823, see Annex 6 Table A13–. Only the change from aspartic acid to tyrosine, determined by a variation at position 823, was associated with a shift in the electric charge, which altered the protein electrophoretic migration. At that position, there was a full correlation between the nucleotide sequence and the electrophoretic mobility. No post-translational modification was detected. Therefore, strains with GOT<sup>113</sup> and GOT<sup>100</sup> mobilities were systematically associated with alleles 823G and 823T, respectively. GOT<sup>110</sup> was systematically associated with heterozygosity at position 823, where both G and T alleles were present –noted as K according to the IUPAC-IUB code–. Consequently, clusters defined by alleles 823T, 823G and 823K were considered as reference groups in the present work.

#### 4.2.2.2. MALDI-TOF analysis of the *L. donovani* complex: no evident substructure

MALDI-TOF spectra ranged from 2,000 to 13,000 m/z. Ninety-eight peak classes, mainly found in the zones of 3,000-4,000, 5,000-6,000 and 10,000-11,000 m/z, were considered for strain comparison, with average of 45 analysed peaks per strain. Most of the peak classes (63) were present in the spectra of less than the 50% of the strains and only ten peaks were present in the 100%. PCA, where the three strongest components explained 89.5% of variance in the input data –76.6% PC1(x), 7.08% PC2(y) and 5.9% PC3(z)– showed a continuous distribution of the strains, with no evident substructure grouping (Fig. 11). The Mantel test gave a positive correlation between distances among strains, based on the presence/absence of the peaks, and geographical distances ( $r=0.308$ ,  $p=0.001$ ).

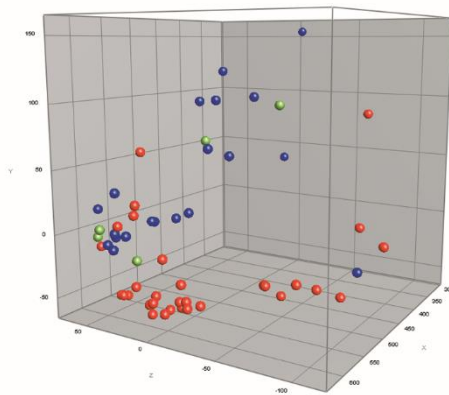


Fig. 11. Principal component analysis of MALDI-TOF data. PCA is colour-coded according to the allele 823 variations of the glutamate-oxaloacetate transaminase gene (823T red, 823G blue and 823K green).

#### 4.2.2.3. Comparative evaluation of genetic distances within different *Leishmania* complexes: low genetic variability of the *L. donovani* complex

*L. donovani* complex genetic distances were assessed relative to other *Leishmania* complexes, *i.e.* those of *L. major* and *L. tropica*, by both NN analysis and systematic pairwise comparison of whole-genome sequences. Whatever the dataset used –*i.e.* an MLSA scheme based on seven genes, partial *hsp70* gene or complete *got* gene sequence–, the three NN networks showed comparable structures, with the three complexes clearly separated (Fig. 12). When complex structures were compared, those of *L. major* and *L. tropica* were clearly more diversified –long branches– and structured –less boxes– compared to the *L. donovani* complex. Low genetic variability in the *L. donovani* complex did not appear to be related to the number of strains analysed. The total ratios of genotype number to sequence number were 84% (48/57), 77% (51/66) and 48% (81/168) for *L. tropica*, *L. major* and *L. donovani* complexes, respectively.

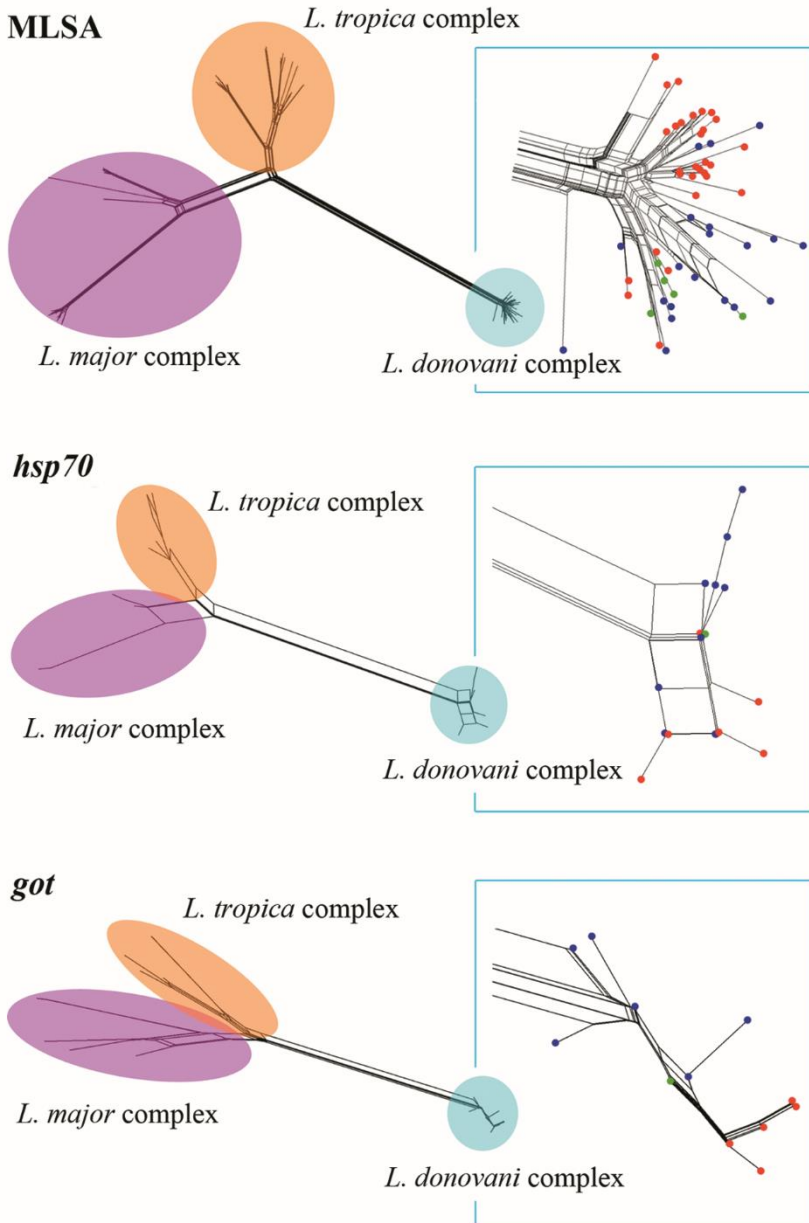


Fig. 12. Genetic distance evaluation of *MLSA*, *hsp70* and *got* by Neighbour-Nets in three different *Leishmania* complexes. *L. major*, *L. tropica* and *L. donovani* complexes are colour-coded in purple, orange and light blue, respectively. The *L. major* complex gathers *L. major*, *L. turanica*, *L. arabica* and *L. gerbilli* taxa. The *L. tropica* complex gathers *L. tropica*, *L. killicki* and *L. aethiopica* taxa. The *L. donovani* complex gathers *L. donovani*, *L. infantum* and *L. archibaldi* taxa. At the right side of each neighbour-net, a box shows an amplification of the net regions concerning the *L. donovani* complex. The nodes of the amplification are colour-coded according to the allele 823 variations of the glutamate-oxaloacetate transaminase gene (823T red, 823G blue and 823K green).

For a broader view of the genetic diversity, a pairwise alignment of full-length genomes belonging to *L. donovani*, *L. major* and *L. tropica* complexes was performed (Table 4). The intra-complex ANI were different between complexes. The high *L. donovani* identity value at the complex level ( $99.42 \pm 0.56$ ) was comparable to values observed for *L. tropica* or *L. major* at the intraspecific level (*L. major*  $99.38 \pm 0.13$ , *L. tropica*  $98.92 \pm 0.24$ ).

Table 4. Comparison of whole genome variability between different complexes and taxa.

Taxa	Genomes	ANI (%)
<i>L. donovani</i> complex	n = 12	$99.42 \pm 0.56$
<i>L. tropica</i> complex	n = 5	$97.55 \pm 1.62$
<i>L. major</i> complex	n = 6	$96.50 \pm 3.02$
<i>L. donovani</i>	n = 8	$99.57 \pm 0.42$
<i>L. infantum</i>	n = 4	$99.80 \pm 0.17$
<i>L. tropica</i>	n = 3	$98.92 \pm 0.24$
<i>L. aethiopica</i>	n = 2	99.12
<i>L. major</i>	n = 3	$99.38 \pm 0.13$
<i>L. turanica</i>	n = 1	NA
<i>L. arabica</i>	n = 1	NA
<i>L. gerbilli</i>	n = 1	NA

NA: not applicable.

#### 4.2.2.4. Comparison of isoenzyme-based taxonomic groups with non-isoenzyme-based clustering: partial concordance between approaches

As described above, isoenzyme-based taxonomic groups inside the *L. donovani* complex were correlated with a single nucleotide variation at the *got* gene position 823. In order to evaluate the conservation of the three allelic groups defined by other approaches, we compared topologies of NJ phylogenetic trees constructed from isoenzymatic, mass spectrometry and genetic data (Fig. 13). A preliminary visual comparison revealed that the trees obtained using approaches directly related to the allelic position 823 –i.e. *got* and MLEE– were quite similar and supported by moderate bootstrap values (5 out of 9 were higher than 50%). Conversely, in trees obtained by approaches non-directly related with allelic position 823 –i.e. MLSA, *hsp70* and MALDI-TOF– multiple strains were reshuffled, and the result was correlated with lower bootstrap values (all under 50%).

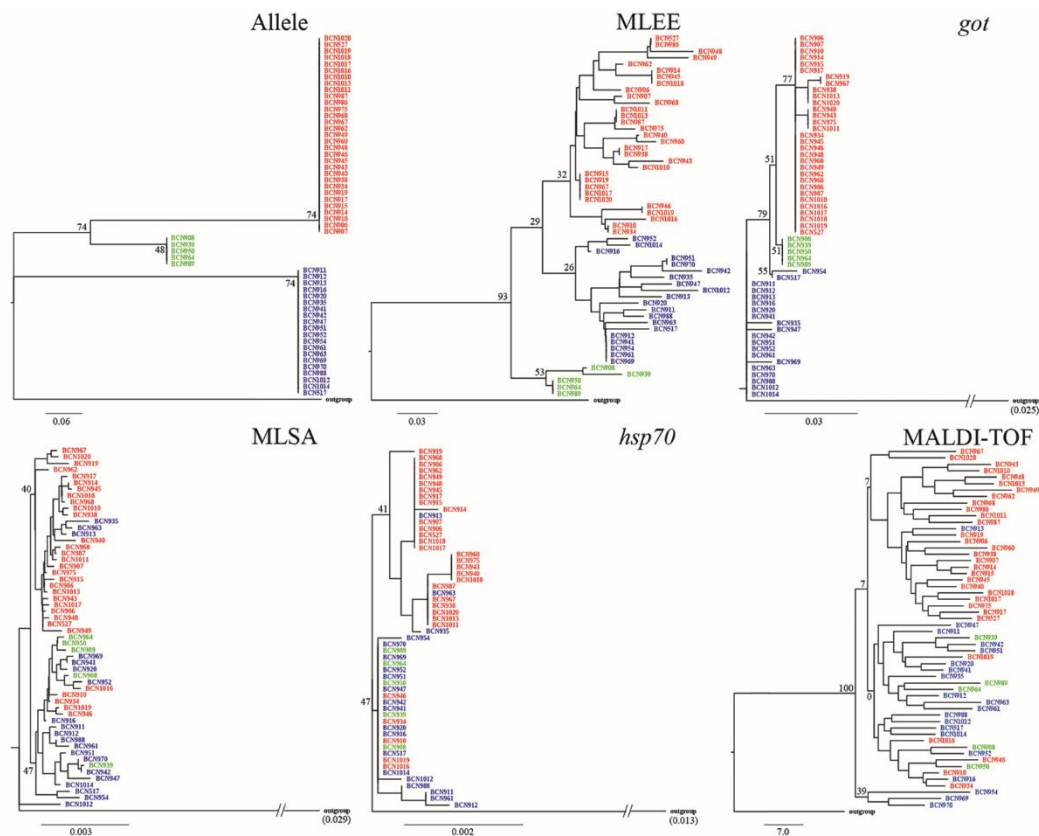


Fig. 13. Tree topology comparison among different approaches. NJ trees based on genetic data, MLEE and MALDI-TOF were analysed. Colour-coding based on allele 823 variations of the glutamate-oxaloacetate transaminase gene (823T red, 823G blue and 823K green). Bootstrap value was added for remarkable nodes. Distance values for truncated outgroup branches appear bracketed.

Similarly, the SH test applied to assess tree topology congruence revealed low non-significant values ( $p > 0.05$ ), indicating topological differences between trees (Table 5). Only the *got* tree was congruent with allele 823 and MLEE trees (SH value = 0.22 and SH value = 0.21, respectively). When position 823 was removed from the analysis, congruence between *got* and MLEE dropped to 0.02.

Table 5. Shimodaira-Hasegawa test for tree congruence.

Tree topology	got		got w/o 823		MLSA		<i>hsp70</i>	
	Diff -ln L	SH-test p-values	Diff -ln L	SH-test p-values	Diff -ln L	SH-test p-values	Diff -ln L	SH-test p-values
Allele got-823	57.0450	0.22	61.9450	0.02	824.4488	0.00	93.4464	0.00
MLEE	55.0232	0.21	58.6352	0.02	543.4564	0.00	61.9529	0.02
<i>got</i>	Best	NA	8.1739	0.62	765.0142	0.00	78.6692	0.00
<i>got</i> w/o 823	20.6977	0.55	Best	NA	857.5685	0.00	83.1619	0.00
MLSA	142.3409	0.00	90.1543	0.01	Best	NA	55.0976	0.07
<i>hsp70</i>	166.5193	0.00	106.4447	0.00	706.1710	0.00	Best	NA
MALDI	142.8053	0.00	100.8120	0.00	642.4023	0.00	68.0326	0.00

Pairwise likelihood-score differences (Diff -ln L) between topologies of the trees listed in the first column and the *got* gene, *got* gene without position 823 (*got* w/o 823), MLSA *-i.e.* concatenation of seven loci 03.0980-31.2610- and *hsp70* trees. SH *p*-values were considered significant when  $< 0.05$ . In bold, non-significant values indicate no significant difference between trees, *i.e.* congruence. NA: not applicable.

#### 4.2.2.5. Evaluation of allele distribution within the *L. donovani* complex: large-scale allele exchanges

A total of 7161 bp were analysed from the concatenation of seven coding DNA sequences included in an MLSA scheme and *hsp70* and *got* genes. Eighty-four polymorphic positions were detected (65, 10 and 9 for MLSA, *hsp70* and *got*, respectively). Being non-contributory for genetic exchange analysis, 48 singletons were hidden. Allele distribution was evaluated at the 36 remaining positions, and the genotype of BCN 527 strain (MHOM/FR/78/LEM75), a classical reference strain for isoenzyme analysis, was arbitrarily selected as a reference (Fig. 14). This analysis revealed a striking reshuffling of most of the alleles and no substructure was identifiable. Furthermore, when taxonomic position *got* 823 was considered (Annex 6, Fig. A1), there were no signs of co-segregation with the other evaluated loci except for *got* position 522. Nearly all genotypes were unique and only four identical genotypes were shared by at least two and up to four strains. In addition, heterozygous alleles were observed in at least one strain at 24 out of the 36 evaluated positions (67%). It should be highlighted that both parental alleles were systematically found in the studied population except at five positions. Thirty-five of the 56 strains had at least one heterozygous position and 10 strains had more than 10% and up to 19% heterozygosity.

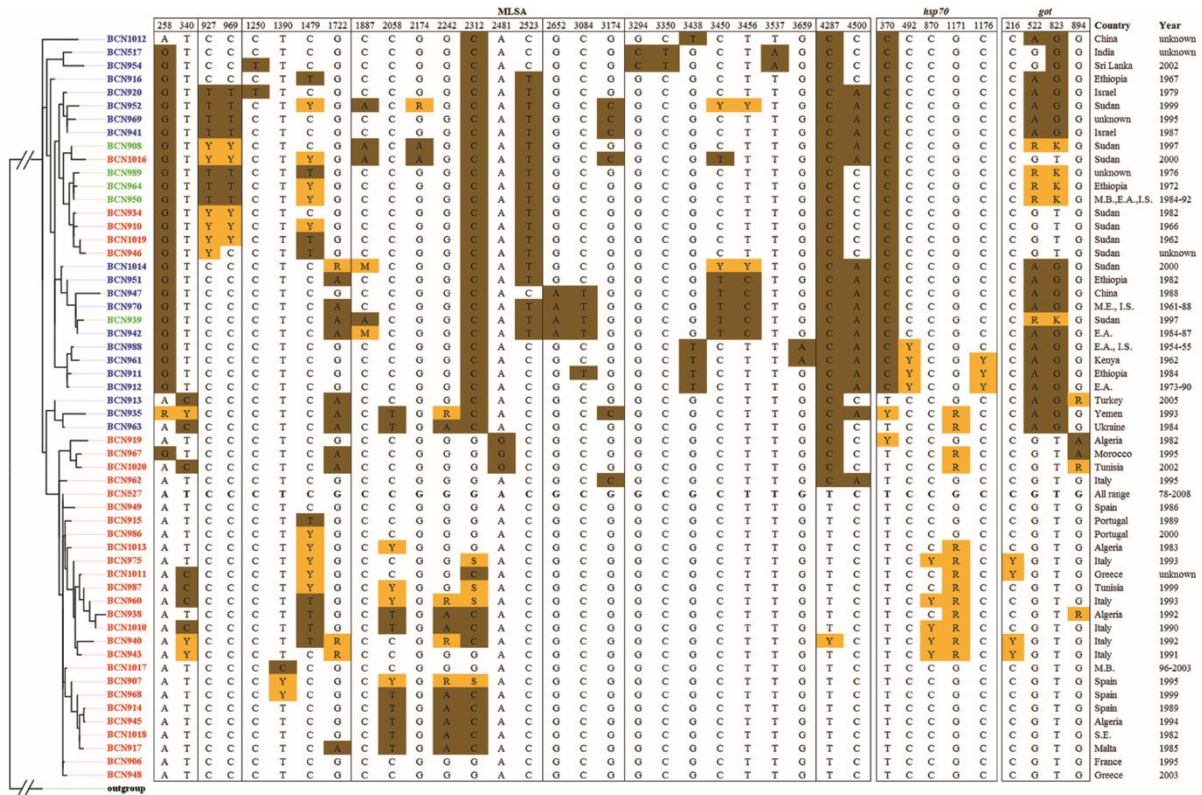


Fig. 14. Allele sharing between genotypes. Genotypes –singletons not included– were compared and ordered according to a NJ tree analysis –represented on the left side and colour-coded according to allele 823 variations of the glutamate-oxaloacetate transaminase gene: 823T red, 823G blue and 823K green–. Country and year of isolation are indicated on the right side. Genotypes are colour-coded considering BCN 527 (MHOM/FR/78/LEM75) alleles (bolded) as a reference (white: identical, brown: different, yellow: heterozygous positions). M.B.: Mediterranean Basin; E.A.: East Africa; I.S.: Indian subcontinent; M.E.: Middle East and S.E.: South Europe.





Fig. 15. Geographical allele distribution. Allelic frequencies of each strain using BCN 527 (MHOM/FR/78/LEM75) as reference were represented by pie charts. Genotypes are colour-coded considering BCN 527 alleles (white: identical, brown: different, yellow: heterozygous positions). Strains without geographical information (*i.e.* BCN 969 and BCN 989) were not represented. Stars indicate added strains analysed in El Baidouri *et al.* (2013). Map from the NASA Worldview Snapshots application.

The existence of isolation by distance was evaluated in the aforementioned 56 strains plus 23 additional strains described in El Baidouri *et al.* (2013) to prevent underrepresentation of identical genotypes from different countries. The Mantel test showed significant positive correlation between geographical and genetic distance matrices ( $r=0.393$ ,  $p\text{-value}=0.001$ ). Similarly, it was possible to observe an east-west gradient across the allelic prevalence map (Fig. 15). Additionally, seven genotypes were present in at least two countries and up to 16 different countries from East Europe, Africa, Middle East and Asia. If the most ubiquitous genotype (BCN 527) was removed from the Mantel test analysis, the correlation coefficient increased up to 0.557 ( $p\text{-value}=0.001$ ).

#### 4.2.3. Results analysis

Clinical, geographical and epidemiological criteria have been used for decades to classify *Leishmania* species responsible for leishmaniasis. Over time, the *L. donovani* complex was split into different species, most of which have subsequently been considered as synonymous and dropped, with only two taxa, *L. donovani* and *L. infantum*, currently remaining (Akhoundi *et al.*, 2016). Broadly, the former includes human-hosted strains that potentially cause PKDL and the latter includes canid-hosted strains found in the Mediterranean basin (Pratlong *et al.*, 2013). The purpose of this taxonomy is to define pragmatic boxes based on clinical and epidemiological criteria (Maurício, 2018). The isoenzymatic phenotype of the *got* gene is the sole intrinsic criterium apparently consistent with this division (Pratlong *et al.*, 2001).

Meanwhile, many exceptions to these clinical, epidemiological and geographical criteria have been described. PKDL cases associated with *L. infantum* have been reported, mostly in HIV-infected subjects (Scaglia *et al.*, 1996; Dereure *et al.*, 2003; Calza *et al.*, 2004; Catorze *et al.*, 2006; Celesia *et al.*, 2014) and vice versa, *L. donovani* strains have been isolated from patients suffering cutaneous leishmaniasis, previously considered typical of *L. infantum* infection (Pratlong *et al.*, 1995; Karunaweera *et al.*, 2003; Antoniou *et al.*, 2008; Elamin *et al.*, 2008), and also from animals (Dereure *et al.*, 2003; Mohebbi *et al.*, 2004). Several authors have reported PCR-positivity or seropositivity in dogs in *L. donovani* foci, including in Bangladesh, Sri Lanka, India, Sudan and Ethiopia, suggesting dogs act as *L. donovani* reservoirs (Rohousova *et al.*, 2015). In turn, non-canid reservoirs have been described for *L. infantum*, including mustelids and felids and more recently rodents and lagomorphs (Martín-Sánchez *et al.*, 2007; Molina *et al.*, 2012; Jiménez *et al.*, 2014; Millán *et al.*, 2014; Risueño *et al.*, 2018; Galán-Puchades *et al.*, 2019). Contrary to the widely held view, transmission of the different *Leishmania* species may only be partially dependent on phlebotomine sand flies (Antoniou *et al.*, 2013; Seblova *et al.*, 2015). Furthermore, there is no indication that sand fly species known to transmit *L. infantum* are not able to transmit *L. donovani* under natural conditions and vice versa. The experimental study by Seblova *et al.* on *Phlebotomus perniciosus* showed a comparable susceptibility of the vector for both *L. donovani* and *L.*

---

*infantum* (Seblova *et al.*, 2015). In the field, although still to be confirmed, *Phlebotomus alexandri* is suspected to transmit *L. donovani* in Iran, Iraq and Oman, and is a reported vector of *L. infantum* in China (Azizi *et al.*, 2006, Maroli *et al.*, 2013). From a geographical point of view, *L. infantum* and *L. donovani* overlap in at least China, Cyprus, Israel, Iraq, Sudan and Yemen (Dereure *et al.*, 2003, Mazeris *et al.*, 2010, Pratlong *et al.*, 2013). Hence, the number of exceptions to the classical taxonomy based on clinical, epidemiological and biochemical criteria is growing and they are likely to be underreported due to potential circular reasoning.

To date, with a few exceptions, taxonomic studies of the *L. donovani* complex have generally been based on the analysis of a low number of strains, often from concrete geographical areas, or discriminatory genetic markers, producing unrepresentative and contradictory results (Jamjoom *et al.*, 2004, Maurício *et al.*, 2006, Lukes *et al.*, 2007, Zemanová *et al.*, 2007, Kuhls *et al.*, 2008, Gouzelou *et al.*, 2013, Baleela *et al.*, 2014, Banu *et al.*, 2019). As we show in this work, the resolving power of genetic analysis of the *L. donovani* complex is hampered by very low genetic diversity compared with other complexes, and especially by the strong genetic flow across its range.

Today, population structure and changes over time are assessed by whole genome analysis (Imamura *et al.*, 2016, Rai *et al.*, 2017). Depending on the studied foci and the geographical scale, various competing scenarios have been proposed. For example, in the Indian subcontinent, Imamura *et al.* reported an extremely low level of overall genetic diversity in a study of 204 parasite isolates obtained from confirmed VL patients (Imamura *et al.*, 2016). The six closely related monophyletic groups detected by whole genome analysis were present throughout the sampling window –from 2002 to 2011– and area –both India and Nepal–, indicating the weak genetic structure of the population across this large distribution area –8 out of the 204 samples were clearly hybrid strains and no recombination was detected elsewhere–.

A different scenario was described in a smaller focus in Ethiopia, where differences in ecology and sand fly vectors had been reported (Zackay *et al.*, 2018). A genome-wide comparison of *L. donovani* strains revealed two distinct genetic clusters. The correlation between genotypes and geographical origin –North vs. South Ethiopia– was almost perfect (for 38/41 isolates), demonstrating that the populations are delineated by geography/ecology rather than clinical presentations. A third interesting example of *L. donovani* complex genetic structuration was described by Rogers *et al.* in southeast Turkey (Rogers *et al.*, 2014). In this focus, *Leishmania* strains were hybrids descended from a single outcrossing between a parent similar to *L. infantum* strains described in Spain and another related to *L. donovani* strains, producing a genome-wide mosaic of ancestry from the two parents. As pointed out by Rogers *et al.*, the cross was probably detected because the genetic backgrounds were sufficiently divergent.

The different scenarios and population genetic structures described above are not mutually exclusive and are compatible with our data. As shown in Figures 14 and 15, and by the high Mantel test values, allele frequency was roughly correlated with the geographic distance along an east-west gradient –*e.g.* allelic positions 258 and 4287 in the MLSA analysis or position 370 in *hsp70*–. However, the most striking fact revealed by these data is a genetic mixing at most of the allelic positions. For example, allele C at position 1479 was present in strains isolated from China, India, Israel, Yemen, Turkey, Ukraine, East Africa and countries around the Mediterranean basin, whereas allele T was present in East Africa and countries around the Mediterranean basin. In addition, heterozygous alleles (*i.e.* C/T) were detected in strains from the Mediterranean basin and East Africa. Similarly, differences in the spectra obtained by MALDI-TOF analysis were correlated with geographic distances; however, no isolated groups of strains were identifiable.

Although no convincing chronology for the evolution is available, this genetic patchwork is probably the result of intensive genetic exchange over time. In our data, more than two thirds of the allelic positions analysed were heterozygous in at least one strain, and remarkably both parental alleles were almost systematically found in the studied population. In addition, 62% of the strains had at least one heterozygous position and heterozygosity in ten strains was higher than 10% and up to 19%. The high prevalence of heterozygous strains throughout the geographical range is congruent with the hypothesis of frequent allelic exchanges and genetic hybridization events within the population. It may also indicate that the heterozygous positions are stable over time, possibly selected for a functional role.

A key additional observation is the presence of identical or near-identical genotypes spread across the geographical range. For example, closely related genotypes BCN 527, 948 and 906 (equivalent to genotypes LST0001, LST0092 and LST0135 from El Baidouri *et al.* (2013)) were isolated not only all around the Mediterranean basin but also in Central Asia, the Middle East, East and Central Africa, Arabia and China. This result is supported by biochemical analysis of the ubiquitous distribution of zymodeme MON-1 (Kuhls *et al.*, 2008, Pralong *et al.*, 2013). Furthermore, although strains from America were not included in our study, previous research has proved the presence of that ubiquitous genotypes in the continent. The low diversity found among American strains from the *L. donovani* complex together with a full similarity with Southwest European strains lead Kuhls *et al.* to conclude that a recent importation had occurred (Kuhls *et al.*, 2011).

These widespread genotypes have adapted to various ecological conditions, and the mobility of the reservoirs –*i.e.* humans and dogs– is probably a contributing factor. However, it is difficult to make a convincing hypothesis to explain this pattern over several decades (see below).

Overall, the description of the *L. donovani* complex genetic structure involves heterogeneous and interlinked scenarios. There is 1) a continuum of the different genotypes across the

---

geographical range of the population; 2) a roughly east-west allele frequency gradient; 3) a large amount of genetic exchange footprints; 4) the existence of ecotypes –*i.e.* distinct geographic varieties genotypically adapted to specific environmental conditions– and local sub-structuring, and 5) a large-scale geographical spreading of a few genotypes.

Another question concerns the evolution over time. Thanks to phylogenetic models, evolutionary histories of the *L. donovani* complex over 150 years have been proposed. For example, Imamura *et al.* reported a divergence of the Indian population in the mid-19<sup>th</sup> century, which matches historical large-scale outbreaks, while another divergence coincides with the end of the DDT spraying campaign in the 1960s (Imamura *et al.*, 2016). However, on a shorter time-scale, the detection of rapid population change might be more challenging. Baleela *et al.* (2014) analysed 124 *Leishmania* strains isolated between 1954 and 2006 in Sudan and their dataset revealed multiple examples of temporally separated strains closely related genetically, at least on a time-scale of a few dozen years. As noted above, in our data there are no signs of a recent evolution of the population structure pattern across the *L. donovani* complex geographical range. In addition, from a temporal point of view, the analysed strains were isolated over a 50-year period (1955 to 2005) and there is no evidence for a fast or recent modification of the genotypes. For example, closely related genotypes BCN 988 and BCN 912 –two allelic divergences among 7170 allelic positions analysed– were isolated in 1955 in Kenya and in 1990 in Ethiopia, respectively, and other similar examples are included in Fig. 15.

In conclusion, although there are obvious differences between foci, including in clinical presentations, reservoirs, vectors, etc., according to our data there is no genetic evidence for separating the two species within the *L. donovani* complex –at least if using the phylogenetic definition of species (Staley, 2009; Maurício, 2018)–. The term “sub-species” is too vague to take into account the network of genetic exchanges and introgressions between them. The term “ecotype”, which refers to a genetically distinct geographic population within a species adapted to specific environmental conditions, should be rejected for the same reason. Due to this absence of relevant terminology in existing classes, it would probably be more useful to analyse *L. donovani* as a single entity, as recently proposed by Maurício (2018).

Although the speciation process within the *L. donovani* complex can create reproductive isolation barriers between diverging populations, this may be countered by the increasing mobility of the reservoirs –*i.e.* humans and dogs–. In addition, advanced sequencing technologies have shed light on genome-wide divergence between closely related species, revealing heterogeneous divergence patterns between entities during the speciation process, including in genomic regions resistant to introgression (Cruickshank and Hahn, 2014). Work on these islands of differentiation could help to develop a better understanding of the *L. donovani* complex structure and evolution.

*\*This study was accepted for publication in the International Journal for Parasitology on 11<sup>th</sup> June 2020. A copy of the acceptance letter is available in Annex 7.*

*Este estudio fue aceptado para ser publicado en la revista International Journal for Parasitology el 11 de junio de 2020. En el Anexo 7 se encuentra una copia de la carta de aceptación.*

---

### 4.3. Autochthonous and imported tegumentary leishmaniasis in Catalonia (Spain): aetiological evolution in the last four decades and the usefulness of different typing approaches based on biochemical, molecular and proteomic markers

#### 4.3.1. Background

The main causative agents of CL in the Old World belong to the species complexes *L. donovani*, *L. tropica* and *L. major*, and in Latin America to *L. braziliensis*, *L. guyanensis* and *L. mexicana* (World Health Organization, 2010, Akhoundi *et al.*, 2017). In Catalonia, as in the rest of Spain, the only autochthonous species involved in a zoonotic epidemiological cycle is *L. infantum* –included in the *L. donovani* complex and whose validity is subject of debate (section 4.2, Fernández-Arévalo *et al.*, 2020)– (Jiménez *et al.*, 1995, Gállego *et al.*, 2001, Martín-Sánchez, Gramiccia, *et al.*, 2004). At least 82 cases were reported in the region in 2018 (Carmona *et al.*, 2018)

In the last decades, globalization and migration have altered the classical geographical distribution of *Leishmania* species and imported cases are becoming increasingly common (Pérez-Ayala *et al.*, 2009, Giavedoni *et al.*, 2015). Lesion evolution and treatment effectiveness vary in each particular case, being mainly influenced by the immunological response of the patient as well as the species involved (World Health Organization, 2010, Bañuls *et al.*, 2011). As microscopical examination does not allow discrimination between *Leishmania* species, various techniques based on biochemical, molecular or proteomic markers have been developed as identification tools (Van der Auwera and Dujardin, 2015, Akhoundi *et al.*, 2017). The aim of this study was to evaluate the utility of different techniques and markers –MLEE, sequencing of *hsp70*, *rpoHLS*, *fh* and ITS2 and MALDI-TOF– for the identification of 56 *Leishmania* strains stored in the Trypanosomatid Cryobank of the Universitat de Barcelona (UB), which have caused TL in Catalonia and to analyse the aetiological evolution of TL.

#### 4.3.2. Results

##### 4.3.2.1. Strain identification

The four genomic regions were sequenced in all the strains, whereas MLEE and MALDI-TOF analyses were only performed in 53 of the 56 selected strains due to culture issues. For three *L. major* strains, the ITS2 sequences had zones of poor quality; however, discriminative regions were sufficiently clear to be included in the analysis. All the methodologies coincided 100% in the identification at the species complex level (Fig. 16), but below that, there were variations depending on the discrimination power of each technique. Thus, by consensus identification, the studied strains belonged to six different taxa: *L. infantum* (n=36), *L. major* (n=10), *L. tropica* (n=1), *L. braziliensis* (n=6), *L. guyanensis* (n=2), and *L. panamensis* (n=1)

(Fig. 16). All the complexes were represented by one species except *L. guyanensis* (*L. guyanensis* and *L. panamensis*).

MLEE grouped strains in a total of 17 zymodemes, 11 of which belonged to the *Leishmania* subgenus and 6 to the *Viannia* subgenus (Fig. 17). Intra-complex variability was due to different mobilities of between three and five enzymes. Four *L.* (*Viannia*) strains (one *L. braziliensis*, two *L. guyanensis* and *L. panamensis*) presented new zymodemes (detailed in section 4.4).

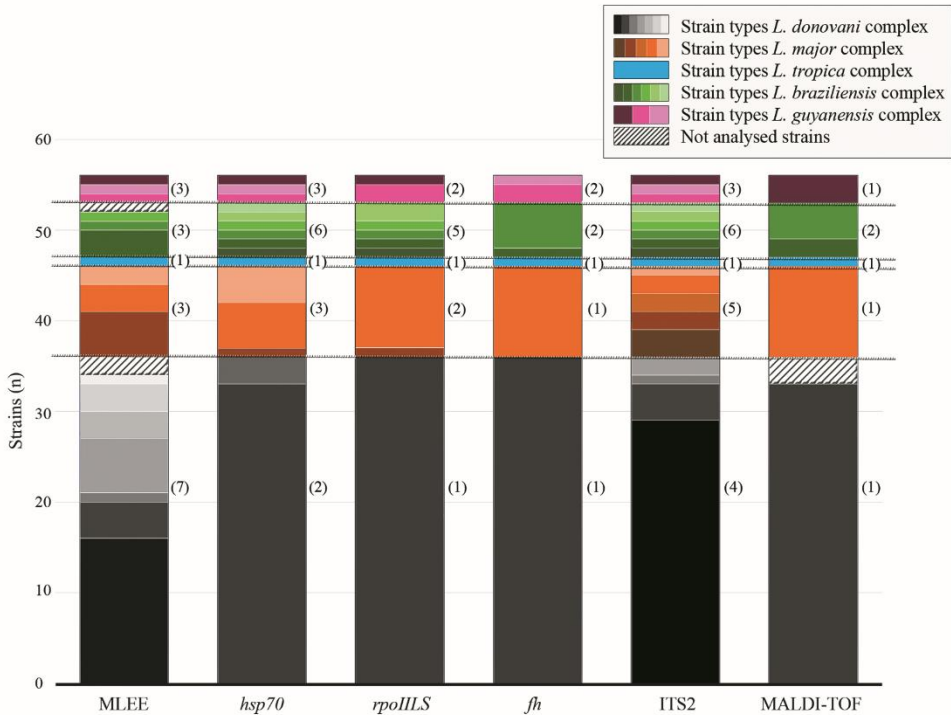


Fig. 16. *Leishmania* complex identification by MLEE, PCR-sequencing, and MALDI-TOF. Different tonalities indicate different types within each complex. The number of types per complex are bracketed.

Molecular techniques showed nineteen, fifteen, eleven and seven different sequence types for ITS2, *hsp70*, *rpoHLS* and *fh*, respectively (Fig. 16). Although nucleotide transitions and transversions between different complexes were observed, interspecific variation was mainly due to the presence of heterozygous alleles or in the case of ITS2, diverse repetition of the microsatellite regions (Table 6). The latter resulted in different lengths for the ITS2 amplicons among the different complexes, but also among strains of the same taxa.



Table 6. Detailed intra-complex variability for *hsp70*, *rpoHLS*, *fh* and ITS2 sequences.

Complex	<i>hsp70</i>			<i>rpoHLS</i>			<i>fh</i>			ITS2			
	Size (pb)	Types	Variable positions	Size (pb)	Types	Variable positions	Size (pb)	Types	Variable positions	Size (pb)	Types	Variable positions	Variable regions
<i>L. donovani</i> (n=36)	1245	2	504G>R	529	1	-	615	1	-	610-614	4	-	36(AT)5-6, 62(TA)4-5, 320(G)5-9
<i>L. major</i> (n=10)	1245	3	102C>Y, 954C>Y	529	2	9T>A	615	1	-	669-683	5	490A>G, 515T>G	106(AT)8-9, 478(TA)6-11, 605(AT)4-5
<i>L. tropica</i> (n=1)	1245	1	NA	529	1	NA	615	1	NA	540	1	NA	NA
<i>L. braziliensis</i> (n=6)	1245	6	51G>R, 264G>A, 561G>A/R, 1213T>A, 1237G>A/R	529	5	57G>K, 129G>K, 175G>K, 204A>R, 213A>R, 324G>R, 333C>Y, 375G>R, 387G>S	615	2	89G>R, 114C>Y, 414G>R	529-537	6	46A>T, 204G>C, 280G>A, 527G>A	45(TA)4-5, 94(TA)6-11, 413(CT)4-5, 452(TA)4-8, 460_463dupCATA, 503(G)4-6, 519(G)7-8
<i>L. guyanensis</i> (n=3)	1245	3	13C>Y, 564G>R, 1078T>G, 1017C>T, 1102A>G, 1181A>R, 1213A>G, 1236C>G	529	2	396C>A	615	2	9A>G	524-536	3	449T>C	95(TA)4-9, 221(TCCTCTC)2-3, 247_253delITCTCTTC, 254_257delITCC, 270(G)5-6, 309(G)7-9, 516(G)7-8

Sequence variants were noted according to Den Dunnen *et al.* (2016) and the International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) nomenclature. n: number of strains, NA: not applicable.

Complexes of the *Leishmania* subgenus showed more intra-complex nucleotide differences compared to the *Viannia* subgenus. Below the complex level, species of the subgenus *Viannia* had more inter-strain variability in nucleotide positions or regions than the species of the *Leishmania* subgenus. Consequently, in the NJ tree produced from the concatenation of the *hsp70*, *rpoHLS* and *fh* gene, greater distances were observed between the complexes of the *Leishmania* subgenus, whereas the *L. (Viannia)* complexes appeared more diversified (Fig. 17).

Based on MALDI-TOF, the strains were confidently associated with five complexes (Fig. 16). At the species level, the agreement between MALDI-TOF and the consensus identification by the other techniques varied from 87 to 89 to 92%, depending on the interpretation criteria, if the results for synonymous taxa were presumed equivalent –i.e. if *L. killicki* was considered the same as *L. tropica* and if the three taxa from the *L. donovani* complex (*L. donovani*, *L. infantum* and *L. archibaldi*) a single entity (see Chaara *et al.* 2015 and section 4.2, Fernández-Arévalo *et al.* 2020)– (Table 7). The intermediate criterium is reflected in Figure 16. The MSI application did not allow any further distinction below the species level.

Table 7. MALDI-TOF results according to three criteria: best score, best agreement and intermediate –in the case of a tie, the identification with the best score was chosen–.

Consensus ID	Best score	Best agreement	Intermediate
<i>L. donovani</i> complex ( <i>L. infantum</i> , n=33)	<i>L. infantum</i> (n=28) <i>L. donovani</i> (n=1) <i>L. archibaldi</i> (n=4)	<i>L. infantum</i> (n=32) <i>L. infantum/L.</i> <i>archibaldi</i> (n=1)	<i>L. infantum</i> (n=33)
<i>L. major</i> complex ( <i>L. major</i> , n=10)	<i>L. major</i> (n=10)	<i>L. major</i> (n=10)	<i>L. major</i> (n=10)
<i>L. tropica</i> complex ( <i>L. tropica</i> , n=1)	<i>L. killicki</i> (n=1)	<i>L. killicki</i> (n=1)	<i>L. killicki</i> (n=1)
<i>L. braziliensis</i> complex ( <i>L. braziliensis</i> , n=6)	<i>L. braziliensis</i> (n=3) <i>L. peruviana</i> (n=3)	<i>L. braziliensis</i> (n=1) <i>L. peruviana</i> (n=4) <i>L. braziliensis/L.</i> <i>peruviana</i> (n= 1)	<i>L. braziliensis</i> (n=2) <i>L. peruviana</i> (n=4)
<i>L. guyanensis</i> complex ( <i>L. guyanensis</i> , n=2; <i>L.</i> <i>panamensis</i> , n=1)	<i>L. guyanensis</i> (n=1) <i>L. panamensis</i> (n=2)	<i>L. panamensis</i> (n=3)	<i>L. panamensis</i> (n=3)
<b>Correct species ID</b>	43 strains (81%)	44 strains (83%)	46 strains (87%)
<b>Synonymous species ID</b>	6 strains (11%)	2 strains (4%)	1 strain (2%)
<b>Correct complex ID</b>	4 strains (8%)	7 strains (13%)	6 strains (11%)

Consensus ID refers to the identification obtained with MLEE and molecular techniques. Synonymous species ID was included when *L. tropica* was identified as *L. killicki* or when *L. infantum* strains were identified as *L. donovani* or *L. archibaldi*. ID: identification.

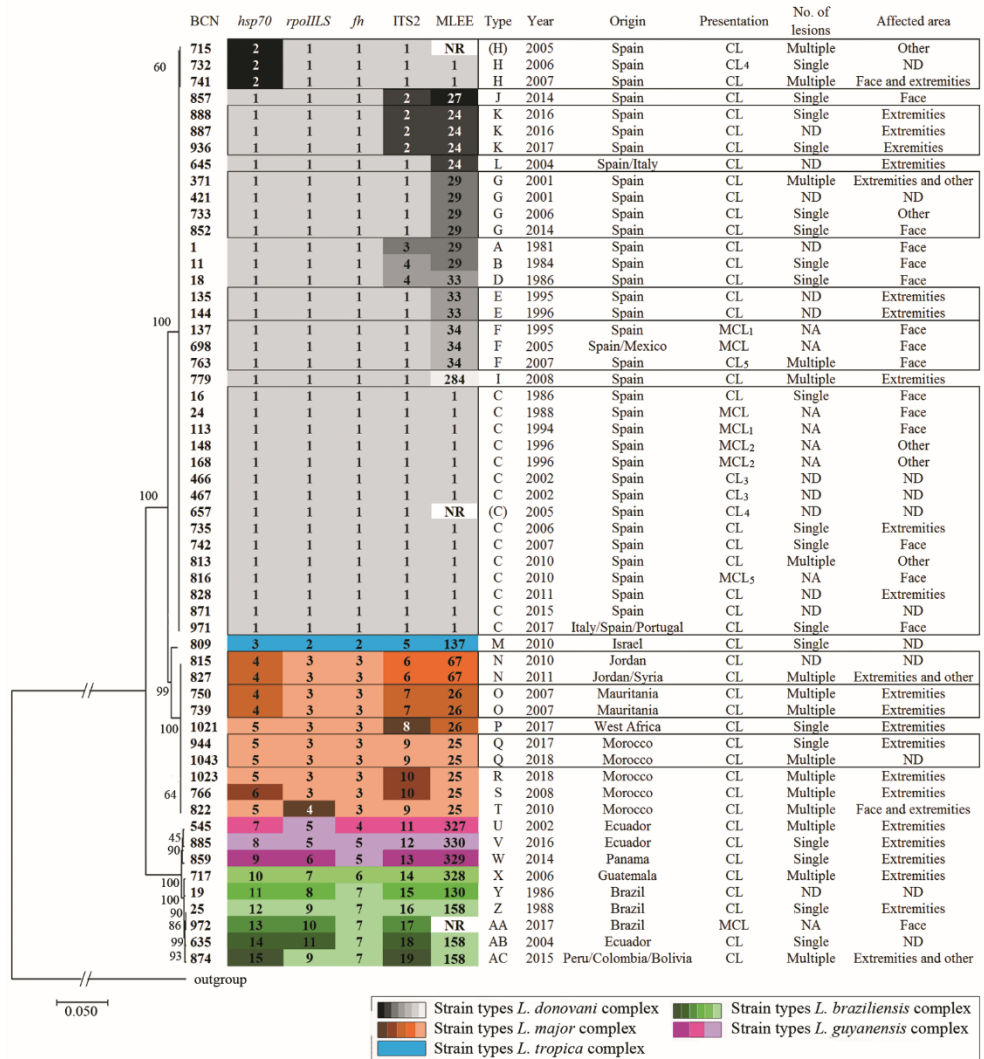


Fig. 17. Characterization of all the strains and association with epidemiological and clinical data. From left to right: NJ tree constructed from concatenated sequences of *hsp70*, *rpoHLS* and *fh*; typing results –i.e. sequence types for the different loci and zymodemes (each one of the same species complex colour-coded in different tonalities of the same colour) and global strain type– and epidemiological and clinical data. Strains from the same type are boxed. Strains from the same patient are indicated with the same sub-index number next to the clinical presentation. NR: no results; ND: no data; NA: not applicable; CL: cutaneous leishmaniasis and MCL: mucocutaneous leishmaniasis.

The discrimination power of the techniques varied, depending on the complex analysed: the highest diversity in *L. donovani* was revealed by MLEE, in *L. major* by ITS2, in *L. braziliensis* by both ITS2 and *hsp70* and in *L. guyanensis* by all three markers. When the results from molecular and enzymatic data were combined, the strains were classified into 29 types (A to AC) (Fig. 17). The greatest diversity was observed in the species of the *Viannia* subgenus. Only among *L. infantum* and *L. major* strains was it possible to observe clusters sharing identical features with all the techniques used. For strains without MLEE results, the most prevalent MLEE type was assumed.

#### 4.3.2.2. Analysis of typing results considering epidemiological and clinical data of the sample

The 56 strains analysed were isolated in a 37-year period (from 1981 to 2018), 46% of them in the decade from 2001 to 2010 (Fig. 17). They belonged to 51 patients aged between 8 and 76 years (average age of 43 years). Patients were 73% male and 25% female (gender was unknown for the remaining 2%) (Fig. 18), and 24% were immunocompromised. Skin involvement was more abundant than mucocutaneous forms (45 vs 5 patients and one patient having both clinical forms) (Fig. 17). Although there was a high percentage of undescribed cutaneous lesions (20%, 9/46), those reported were mainly located on extremities (25 patients, 13 with lesions on upper members and 13 on lower members) or the face (11 patients); other locations were neck, lumbar area, back, buttocks, each in one patient as either a single or multiple lesions (in 27 and 16 patients, respectively). Mucocutaneous lesions affected the nose (2 patients), palate, tongue and rectum (1 patient each).

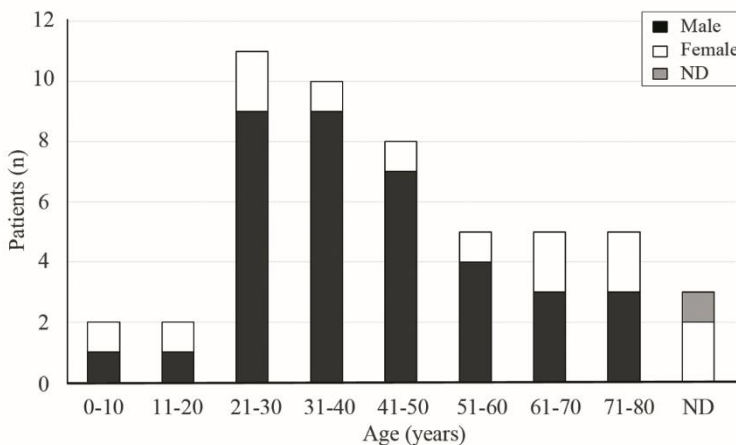


Fig. 18. Age and sex distribution of the patients. For patients with more than one isolate, age data refer to the first isolate. ND: no data.

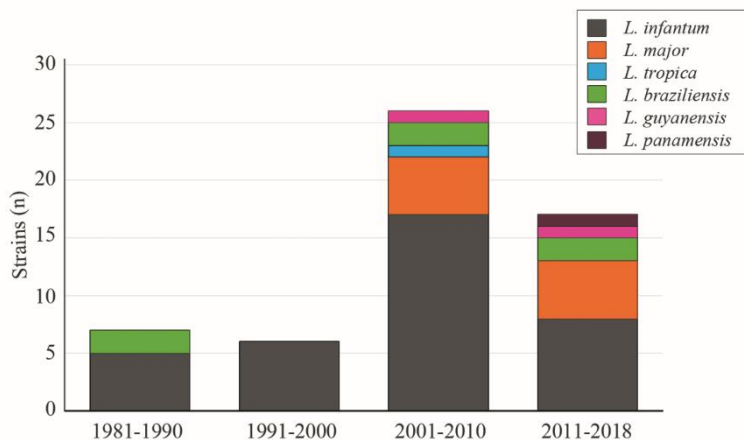


Fig. 19. Species identification variability for each studied decade.

Among the patients, 55% represented autochthonous cases, whereas 39% were imported, and three cases could not be identified as either. Between 2011 and 2018, imported cases were more numerous than autochthonous ones (nine versus seven, respectively, and one undetermined). The greatest taxonomic diversity was found in strains isolated in the last two decades (2001-2018) (Fig. 19).

Cases considered as undoubtedly autochthonous (28 patients and 33 strains) were all caused by *L. infantum* strains. Among these, the predominant patient profile was a male aged between 30 and 40 years, although the overall average age in the study was 48 years. Cutaneous lesions, frequently single (in at least 17 patients), were usually found on the face or extremities (9 and 10 patients, respectively). Five patients had MCL (Fig. 17), two being HIV+.

In five patients, four documented as immunocompromised and two previously diagnosed with VL, two different isolates of *L. infantum* were obtained (Table 8). In two cases (patients 2 and 3), the two strains were identified as identical by all the analytical techniques used. In two other cases (patients 1 and 5), the two strains were different according to MLEE, the results being MON-1 and MON-34 in both patients. In patient 4, the strains differed in at least the *hsp70* type –MLEE was not performed in one of the strains–.

After combining the molecular and enzymatic data, the 33 autochthonous strains were divided into 11 different types (from A to K) (Fig. 20). Type C strains were the most prevalent (n=13, 39%) and appeared throughout the studied period. They belonged to zymodeme MON-1 and presented the *L. infantum* consensus sequence for all the genes. Four strain types (E, F, G and I) differed from type C only in the zymodeme, MON-29 being the second most predominant. Type H differed only in the *hsp70* sequence, while five types (A, B, D, J and K) diverged in both zymodeme and sequence type. The other groups had short temporary

Table 8. Detailed information and identification results of autochthonous patients with more than one isolate (*L. infantum*).

Patient	WHO code	<i>hsp70</i>	<i>rpoHLS</i>	<i>fh</i>	ITS2	MLEE (MON)	Type	Interval	Lesion localization	VIH
1	MHOM/ES/94/BCN-113	ST1	ST1	ST1	ST1	1	C	17 months	Palate Sublingual	pos
	MHOM/ES/95/BCN-137	ST1	ST1	ST1	ST1	34	F			
2	MHOM/ES/96/BCN-148	ST1	ST1	ST1	ST1	1	C	2 months	Rectum	pos
	MHOM/ES/96/BCN-168	ST1	ST1	ST1	ST1	1	C			
3*	MHOM/ES/2002/BCN-466	ST1	ST1	ST1	ST1	1	C	simultaneously	Healthy skin	pos
	MHOM/ES/2002/BCN-467	ST1	ST1	ST1	ST1	1	C		Lesion	
4*	MHOM/ES/2005/BCN-657	ST1	ST1	ST1	ST1	NR	(C)	17 months	ND	pos
	MHOM/ES/2006/BCN-732	ST2	ST1	ST1	ST1	1	H		ND	
5	MHOM/ES/2007/BCN-763	ST1	ST1	ST1	ST1	34	F	31 months	Face	ND
	MHOM/ES/2010/BCN-816	ST1	ST1	ST1	ST1	1	C		Nose	

ST: sequence type; NR: not carried out; ND: no data; pos: positive. Bracketed type indicates that the predominant zymodeme was assumed. (\*) patients with diagnosed VL.

distributions, especially when a molecular change was detected, except for types F and G that were isolated over 12 and 13 years, respectively.

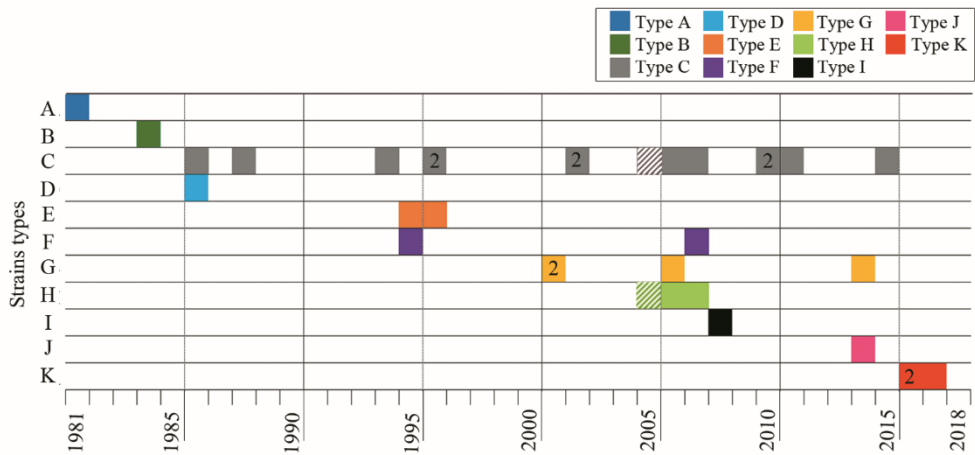


Fig 20. Temporal distribution of the *L. infantum* types from confirmed autochthonous cases. The number of strains is indicated when there was more than one isolate. Stripes denote the types deduced as probable due to the lack of MLEE results.

Cases classified as undoubtedly imported (20 patients and strains) were caused by five different taxa (*L. major*, *L. tropica*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis* and *L. panamensis*). Most of these patients were aged between 21 and 30 years, while the average age was 32. Fifty percent (7 males, 3 females) were of Spanish nationality who had travelled to other endemic areas, 40% were migrants (7 males and 1 female) and 10% were of unknown nationality. The only immunocompromised patient was a migrant with CL. CL lesions were single or multiple (8 and 10 cases, respectively) and mainly affected the extremities (14 cases). There was one case of MCL caused by *L. braziliensis*. As shown in Figure 17, the *L. major* strains came from North Africa and the Middle East and were usually associated with multiple lesions. The seven different profiles found among the strains differed in the geographical origin or year of isolation and were associated with MLEE and ITS2 types and to a lesser extent with the *hsp70* types. In three clusters (types N, O and Q), all the techniques gave identical characterization results and each was composed of two strains, which temporarily coincided in Jordan, Mauritania and Morocco, respectively. As only one *L. tropica* strain was found, acquired in Israel, a more in-depth analysis was not possible. *L. braziliensis* strains belonged to different countries of Latin America, *L. guyanensis* strains were isolated from patients originating from or visiting Ecuador, and the *L. panamensis* strain was from Panama. Each *L. (Viannia)* strain constituted a unique type, although some strains shared geographical origins.

#### 4.3.3. Results analysis

Since the Trypansomatid Cryobank of the UB (Spain) was created in 1983 (Gállego *et al.*, 2003), more than 1,000 strains, belonging principally to *Leishmania* genera, have been deposited. The *Leishmania* strains were acquired mainly from patients affected by VL or are collection strains. At the end of 2018, strains isolated in hospitals in the Catalonia region from patients suffering from TL represented only 5% of the total deposited. Despite fluctuating collaboration between the University and the hospitals over the years, the low number of TL strains is most likely to be due to under-diagnosis. As TL does not often require hospitalization, it is frequently diagnosed and treated in primary healthcare or private dermatological centres (García-Almagro, 2005, Portús *et al.*, 2007, Gil-Prieto *et al.*, 2011, Suárez Rodríguez *et al.*, 2012). Even so, in the last two decades, TL strains deposited or obtained by sample cultivation have quadrupled and tripled, respectively. This increase could be a consequence of imported cases involving other *Leishmania* species, the occurrence of rare or atypical lesions for a differential diagnosis of CL, and the implementation of identification protocols derived from treatment differences according to the species and lesion characteristics. Although strain isolation is less sensitive than other diagnostic methods (Aronson and Joya, 2019), a similar increase in TL cases has been observed in other studies (Giavedoni *et al.*, 2015, Riera *et al.*, 2016, Garrido-Jareño *et al.*, 2020).

Regarding the patient profile in autochthonous cases, the average age was 48 years, which coincides with the average observed for leishmaniasis patients in other studies in Spain (Fernández Martínez *et al.*, 2019). However, the infant population, one of the most affected by leishmaniasis, was not represented. One explanation is that the hospital providing 33% of the samples does not offer paediatric assistance, but another factor is that cases among children are predominantly of VL (Fernández Martínez *et al.*, 2019, Garrido-Jareño *et al.*, 2020). The majority of patients were male (71%), as in numerous other reports (Portús *et al.*, 2007, Gil-Prieto *et al.*, 2011, Herrador *et al.*, 2015, Riera *et al.*, 2016, Fernández Martínez *et al.*, 2019, Garrido-Jareño *et al.*, 2020). Among the hypotheses proposed by researchers for this gender bias, those more applicable in our context could be the dimorphic immunological response driven by sexual hormones (Lockard *et al.*, 2019) or the higher prevalence of *Leishmania*/HIV coinfection in males (Desjeux and Alvar, 2003, Herrador *et al.*, 2015). It is worth mentioning that most of the patients in the study were immunocompetent, or at least no immunosuppression had been reported. In the case of immunocompromised patients (39%), who were mainly coinfecting with HIV, all the strains were isolated between 1994 and 2010, and only two patients were female.

Mucocutaneous lesions are principally associated with South American *Leishmania* species, although they can also be caused by Old World species (Strazzulla *et al.*, 2013), primarily in immunosuppressed patients (World Health Organization, 2010, Mejia, 2018). In this study, five autochthonous patients presented mucocutaneous lesions and only two of them were immunocompromised. Although mucosal involvement is rarely associated with the *L.*



---

*infantum*, other cases of MCL in immunocompetent patients have been described in Spain (Aliaga *et al.*, 2003, Freites-Martinez *et al.*, 2015, Garrido-Jareño *et al.*, 2020). In the current work, only one out of six MCL cases was imported, and caused by *L. braziliensis*, the species most frequently responsible for this clinical form (Reithinger *et al.*, 2007).

Confirmed imported cases represented 39% of the analysed strains from the last decades, which constitutes an important increase, in agreement with other studies in Spain (Giavedoni *et al.*, 2015, Riera *et al.*, 2016). An increasing tendency of imported leishmaniasis has been observed around the world as a result of globalization, even affecting non-endemic countries (Stark *et al.*, 2008, Bart *et al.*, 2013, Di Muccio *et al.*, 2015, Söbirk *et al.*, 2018). According to data from the World Tourism Organization, the number of international tourist arrivals worldwide in the studied period rose from 277 million in 1981 to 1,407 million in 2018 (World Tourism Organization, 2020). Additionally, the immigrant population in Spain increased from nearly 20,000 people in the mid-1980s to over 600,000 people in 2018 (Romero Valiente, 2003, Instituto Nacional de Estadística, 2020). It is noteworthy that in 2011-2018 a higher number of samples were deposited from imported than from autochthonous cases. A certain bias towards imported cases could be related to their association with more complex lesions, in contrast with autochthonous cases, which are predominantly single (Giavedoni *et al.*, 2015, Merino-Espinosa *et al.*, 2018). However, a growing awareness among clinicians of the need for species identification in patients reporting travel history may also be occurring.

In imported cases, patients were younger than in autochthonous cases, with similar numbers of Spanish travellers and immigrants (10 and 8, respectively, and two patients of unknown nationality). The immigrants were often established in Spain but had recently carried out a journey to their countries of origin. Infections were acquired to a similar extent in the Old and New World (11 and 9, respectively), unlike in other studies, which usually report a predominance of Old World cases (Pérez-Ayala *et al.*, 2009, Bart *et al.*, 2013, Di Muccio *et al.*, 2015, Giavedoni *et al.*, 2015). Patient profiles in terms of age, origin or destination matched those reported for the immigrant population in Spain and the prototype of the Spanish traveller in several studies on imported diseases (Valerio *et al.*, 2005, Zamarrón Fuertes *et al.*, 2010, RICET, 2015, Jaén-Sánchez *et al.*, 2016, Instituto Nacional de Estadística, 2020).

In three cases with documented travel history, it was not possible to determine if the infection caused by *L. infantum* had occurred in Spain or during the stay in a foreign country (Mexico, Italy and Portugal). In South America, *L. infantum* predominantly causes VL (World Health Organization, 2010) and some cases of CL have been reported in Costa Rica, Honduras, Brazil and Venezuela (Zeledón *et al.*, 1989, Noyes *et al.*, 1997, De Lima *et al.*, 2009, Castro *et al.*, 2016). In Mexico, *L. infantum* has been reported to cause VL, but it is not associated with skin lesions (Pan American Health Organization, 2019). Without species characterization, the case would have likely been classified as imported, based on the history

of travel to Mexico and the clinical form (MCL), but the identification of *L. infantum* as the aetiological agent opens up the possibility of infection in Spain. In the other two cases, as Portugal and Italy are included in the large Mediterranean area where *L. infantum* is endemic, together with Spain (Campino *et al.*, 2006, Alvar *et al.*, 2012, Gramiccia *et al.*, 2013, Pratlong *et al.*, 2013), infection was equally possible in any of the three countries.

Similarly, in three other imported cases it was not possible to identify the country of infection, since multiple destinations with circulating species in common were reported. One patient had travelled to Jordan and Syria, both endemic for *L. major*, the species identified. However, its typing profile was identical to that of another temporally close Jordanian strain. It should be mentioned that *L. tropica* also causes CL in that area (Postigo, 2010, Alvar *et al.*, 2012), although usually resulting in a single lesion, whereas *L. major* is more associated with multiple lesions, as suffered by this patient (Aoun and Bouratbine, 2014). Another patient, also with a *L. major* isolate but producing a single lesion, had travelled to different countries of West Africa, where this species is responsible for human CL (Kone *et al.*, 2018). The third case was a patient who had visited Peru, Bolivia and Colombia and presented multiple CL lesions caused by *L. braziliensis*. This species is present in all three countries, where it cohabits with other species (Pan American Health Organization, 2019).

The aforementioned examples, as well as the overall taxonomic diversity found (six taxa from five complexes), indicate the growing risks of deducing the aetiological agent based only on epidemiological data, which may only be conclusive for autochthonous cases without any history of travelling abroad, and support the use of species identification tools. Today, the treatment of CL varies in each patient, depending on the *Leishmania* species as well as the number, appearance and duration of the lesions, which could determine the self-healing nature of the disease, the response to certain drugs and risk of metastatic complications (Aronson and Joya, 2019, Mensa *et al.*, 2020). From an epidemiological point of view, the imported species identified are unlikely to represent a risk in Spain, due to the absence of reservoirs or sand fly vectors. The exception is the anthroponotic species *L. tropica*, whose vector *P. sergenti* is present elsewhere in Spain (Gil Collado *et al.*, 1989, Barón *et al.*, 2008, Ballart *et al.*, 2014).

The use of high resolutive approaches or the combination of different methods can contribute other valuable information besides species identification. For example, the combination of MLEE with ITS2 allowed us to evaluate the variation of autochthonous strains along four decades. There was a prevailing strain type (type C) throughout the period (39%), which was probably equivalent to the predominant group found in other studies (Kuhls *et al.*, 2005). Variations of type C, most of them due to different zymodemes, appeared only in narrow intervals of time, except types F and G, which had longer distribution periods. Types F and G differed from type C, being zymodemes MON-34 and MON-29, respectively, which are frequently found in CL cases in other parts of Spain (Jiménez *et al.*, 1995, Chicharro *et al.*, 2003, Pratlong *et al.*, 2013). It should be noted that in the later years of the study, four strains

---

(types J and K) showed a particular ITS2 sequence type, which differed from the consensus sequence in the number of repetitions of three microsatellite regions and which probably corresponds to the Lombardi type found by Chicharro *et al.* in Madrid among strains with zymodemes MON-1 and MON-24 (Chicharro *et al.*, 2013). The zymodeme for type J was MON-27, which to the best of our knowledge has only been recorded in Italy and in a Spanish man living in Argentina with an uncertain origin of infection (Martín-Sánchez *et al.*, 2004, Pratlong *et al.*, 2013). In our study, the affected patient was Spanish and without a history of travelling. The zymodeme of strains type K was MON-24, which is abundant in Spain but did not appear in the current study among the autochthonous strains before 2016. Another interesting finding was a strain of MON-284 (type I). Rarely reported, this zymodeme is typically associated with HIV patients (Chicharro *et al.*, 2003), as in this case. Regarding the *L. infantum* strain whose geographical origin was either Spain or Mexico, MLEE typing results (MON-34) point towards an autochthonous case. As far as we are aware, this zymodeme has not been found in America (Ribeiro Coutinho *et al.*, 2011) and only one *L. infantum* strain from Panama has showed a profile other than MON-1 in the New World (Franssen *et al.*, 2020).

More in-depth characterization was also used to evaluate possible relapses or reinfections in the five patients with two isolates. For patient 3, and probably also patient 2, both isolates were taken during the same episode and the strain type did not change. In the other three cases, 17 to 31 months passed between obtaining the two isolates and in all of them there was a change in the strain type. Strains of patient 1 differed in the zymodeme, which changed from MON-1 to MON-34. However, based on the localization of the lesion, relapse seems the most plausible scenario, and the MLEE variation could be explained by culture selection from a mixed infection (Cortés *et al.*, 1997). An alternative hypothesis is that as long as MON-34 differs from MON-1 exclusively in the mobility of the MDH enzyme, a sequence mutation could have occurred specifically affecting enzyme mobility, as reported for other genes (Maurício *et al.*, 2006, Zemanová *et al.*, 2007). Similarly, in patient 4, the presence of a heterozygous allele in the *hsp70* gene in the second isolate, together with a HIV and VL background, again suggests a relapse. As the *hsp70* sequence type was also observed in two other strains isolated within a short period of time, a mixed infection would be a reasonable explanation. A different situation was observed for patient 5. Here, the change in zymodeme, together with a higher time interval between isolates, a slight difference in the localization of the lesion and no records of immunosuppression leads us to think it was a reinfection.

An additional use of strain characterization is for identification in outbreaks of disease. As we are all aware, a consequence of globalization is that health issues are increasingly crossing borders. Among our data, we observed three *L. major* strains isolated between 2017 and 2018, acquired in Morocco, and with similar results for the different typing methods –two were identical and the third differed in one repetition of a microsatellite in the ITS2–. In this period, an outbreak of leishmaniasis was active in Morocco (El Hamouchi *et al.*, 2019), as also

occurred in other countries at some point of the studied period (Oliveira-Neto *et al.*, 1988, Postigo, 2010, Mosleh *et al.*, 2018). It therefore seems plausible that some of the identified strains could have originated in an outbreak abroad.

Many markers and techniques have been used for *Leishmania* identification, as reviewed (Van der Auwera and Dujardin, 2015, Akhouni *et al.*, 2017, Kuhls and Maurício, 2019). Nevertheless, in most studies, they have been applied to a low number of strains, strains isolated only from the Old or New World, without covering both *Leishmania* and *Viannia* subgenera, or are limited to a single technique. In this study, we used biochemical (MLEE), molecular (sequencing) and proteomic (MALDI-TOF MS) techniques to identify 56 strains from different complexes isolated from autochthonous and imported *Leishmania* species in Catalonia. Although not always in a straightforward manner, all the techniques and markers used allowed the correct identification at the complex level, unlike the experience of another study carried out in different European laboratories (Van der Auwera *et al.*, 2016).

Since not all identification techniques provide the same degree of discrimination, choosing the most suitable methodology depends on the specific purpose of the research. *Grosso modo*, MLEE discriminates below the species level with a high level of correspondence among zymodemes and geographical origin. Used to type nearly all the described species, MLEE constitutes the basis of current taxonomy and is considered by many as the gold standard typing method (Van der Auwera and Dujardin, 2015). However, it requires large culture volumes, is time-consuming, expensive and cumbersome, and interpretation of results is not straightforward, which has limited its use to specialized laboratories. Moreover, the phenotype observed does not always correspond to the real genotype (Maurício *et al.*, 2006, Zemanová *et al.*, 2007). In contrast, MALDI-TOF is faster, easier to use and cost-effective, and allows identification. However, certain difficulties below the complex level could result in taxonomically controversial groups and different interpretation criteria of MSI data can produce slight differences in the results. Although the best score criteria proposed in section 4.1 (Lachaud *et al.*, 2017) is simpler, in practice the best agreement and the intermediate criteria are more intuitive. Regardless, identification at the species complex level is sufficient to manage *Leishmania*.

A third approach is sequencing, which generally takes up an intermediate position regarding discriminative power, workability and time consumption, but its pros and cons are hardly influenced by the target used (Kuhls and Maurício, 2019). In the current study, the four analysed genetic regions permitted a confident identification of the *Leishmania* subgenus at the species level. However, if punctual sequence-type mutations were not considered, far fewer constitutive differences were observed among complexes of the *Viannia* subgenus, up to the point that the *L. braziliensis* and *L. guyanensis* complexes differed by only a single position in the *fh* fragment. Differences among taxa within the *L. guyanensis* complex were especially scarce and indistinguishable by the *fh* marker. However, since only one *L. panamensis* strain was found, it is uncertain if the observed variations in the other genes are

---

characteristic of the taxon or polymorphisms of the strain. Below the species level, *hsp70* and ITS2 were the markers that provided additional inter-strain divergence for the entire genus. The high variability obtained among the ITS2 sequences, together with the degree of geographical and/or temporal correspondence found among the sequence types, render this molecular target suitable for epidemiological purposes beyond species identification. Nevertheless, the differences blurred the limits between the *L. braziliensis* and *L. guyanensis* complexes. The low variability observed with the *fh* fragment could be a consequence of the reduction in the fragment length made to amplify all the clinically important complexes. At least for the *L. donovani* complex, studies using the full-length gene have found greater diversity; the strains were also geographically diverse, unlike in our study (Zemanová *et al.*, 2007). In terms of workability and time efficiency, *rpoHLS* and *fh* were the simplest targets, due to their constant and relatively short length. For the whole *hsp70* sequencing, the concatenation of two shorter fragments rendered better results than a full-length amplification, making it less straightforward. In ITS2, the abundant microsatellites hampered sequencing reads and their interpretation. In addition, the final length variability among strains did not permit the alignment of all the sequences and their addition to the NJ tree. Nevertheless, the amplicon length could preliminarily orientate towards certain complexes. Finally, even if not applied here, another factor worth considering is that some of the used regions work well with small amounts of DNA, being directly available from a clinical sample (Schönian *et al.*, 2003, Montalvo *et al.*, 2017, Kuhls and Maurício, 2019). This reduces costs and other culture difficulties, but drawbacks could arise related to the sensitivity of the technique.

In conclusion, both autochthonous and an increasing number of imported TL cases are diagnosed in Spain, the latter caused by human-affecting species from the New and Old World. This gives rise to a diversification of clinical manifestations, some of which may be unfamiliar to clinicians. The autochthonous cases, which have also increased, are not caused by a single strain type, which could affect the severity of the disease or the healing process. Therefore, the identification and further characterization of the circulating strains affords valuable information for both the clinical and epidemiological management of the disease. While MLEE, sequencing and MALDI-TOF are all useful tools, they are not equally suitable for all contexts. MALDI-TOF and *rpoHLS* or *fh* sequencing could be key identification tools in the clinical area, where speed and simplicity are the most valuable features, whereas *hsp70* and ITS2 could constitute an interesting tandem to substitute MLEE in the epidemiological field.

#### 4.4. Non-autochthonous *Leishmania* species causing cutaneous leishmaniasis in Spain: description of new zymodemes in Latin-American strains isolated in Barcelona

##### 4.4.1. Background

MLEE was used to retrospectively characterize *Leishmania* strains isolated from non-autochthonous CL cases in Barcelona to assess the taxonomic diversity of imported strains. Four of the 23 analysed strains presented new isoenzyme profiles, which are here described.

All of them were isolated from CL cases presumably imported from Latin America according to the epidemiological data:

- MHOM/EC/2002/BCN-545: Strain isolated from a multi-ulcerated lesion on the left arm of an Ecuadorian male, 25 years old and resident in Spain, after a journey to his country of origin in 2001.
- MHOM/GU/2005/BCN-717: Strain isolated from a bi-nodular erythematous lesion on the left leg of a Spanish male, 36 years old, after a journey to Guatemala.
- MHOM/PA/2014/BCN-859: Strain isolated from a single skin lesion on the right hand of a Spanish male, 26 years old, after a journey to Panama some months before.
- MHOM/EC/2016/BCN-885: Strain isolated from a verrucous lesion on the forearm of an Ecuadorian male, 48 years old, after a reactivation of CL. The patient had been diagnosed with the disease and treated with Glucantime® in his country of origin.

##### 4.4.2. Results and analysis

Using MLEE, six taxa were identified from the 23 strains isolated from suspected cases of imported CL: three from the Old World, *L. infantum* (4), *L. tropica* (1), and *L. major* (10), and three from the New World, *L. braziliensis* (5), *L. guyanensis* (2), and *L. panamensis* (1). MLEE identification was in agreement with the geographical origin or travel history of the patients, as previously observed (Di Muccio *et al.*, 2015). Particular attention was paid to four strains, all from the *Viannia* subgenus, as their isoenzyme profiles were not recognized. These strains, imported from Latin America, were classified by MLEE as *L. guyanensis* (2 strains), *L. panamensis* (1) and *L. braziliensis* (1). The results are in accordance with a previous identification by *hsp70* sequencing, where strains showed similarity values ranging from 99.6% to 100% when compared with published strains available in GenBank.

In the new isoenzyme profiles, different combinations of known electrophoretic mobilities or new electromorphs for the taxa were detected. The new zymodemes, coded from MON-327 to MON-330, are given in Table 9. *L. guyanensis* MON-327 (BCN-545) presented an MPI<sup>70</sup>, a distance frequently observed in *L. braziliensis* and reported in a single zymodeme of *L. panamensis* from the *L. guyanensis* complex (Chouicha *et al.*, 1997, Thomaz-Soccol *et al.*, 2000).

Table 9. Enzymatic profile of the new zymodemes.

Taxon	MON	ME	PGD	G6PD	DIA	NP1	NP2	GOT1	GOT2	PGM	FH	MPI	GPI	Strain WHO Code
<i>L. guyanensis</i>	327	87	70	106	50	800	100	145	120	108,5	87	70 <sup>a</sup>	87	MHOM/EC/2002/BCN-545
<i>L. guyanensis</i>	330	87	45	103	50	800	100	148	118	108,5	87	60	87	MHOM/EC/2016/BCN-885
<i>L. panamensis</i>	329	87	45	103	50	0	100	145	90 <sup>a</sup>	108,5	87	60	87	MHOM/PA/2014/BCN-859
<i>L. braziliensis</i>	328	87	60 <sup>b</sup>	90	50	380	112	132	125	109,6	82	70	87	MHOM/GT/2005/BCN-717

<sup>a</sup>New electromorphs for the taxon, <sup>b</sup>New electromorph for the genus.

Table 10. Polymorphic positions among the strains in the *hsp70*-1245 pb fragment.

Species	Strain WHO Code	6	13	233	264	564	675	1017	1078	1102	1134	1168	1171	1181	1213	1236
<i>L. guyanensis</i>	MHOM/EC/2002/BCN-545	A	Y	C	G	G	A	C	T	A	T	A	G	A	G	C
<i>L. guyanensis</i>	MHOM/EC/2016/BCN-885	A	C	C	G	G	A	C	G	G	T	A	G	R	A	G
<i>L. panamensis</i>	MHOM/PA/2014/BCN-859	A	C	C	G	R	G	T	T	A	T	A	G	A	A	C
<i>L. braziliensis</i>	MHOM/GT/2005/BCN-717	G	C	G	A	G	G	C	T	A	C	G	T	A	A	C

*L. guyanensis* MON-330 (BCN-885) had a different combination of known *L. guyanensis* mobilities for the analysed enzymes (Thomaz-Soccol *et al.*, 2000). The electrophoretic mobility of *L. panamensis* MON-329 (BCN-859) GOT<sub>2</sub><sup>90</sup> has only been previously described in *L. tropica* (Rioux *et al.*, 1990). *L. braziliensis* MON-328 (BCN-717) showed a new combination of previously defined mobilities, and also presented a PGD<sup>60</sup>, a new mobility for this enzyme in the genus *Leishmania*.

In order to contextualize the four new zymodemes described above, a NJ tree was constructed using 60 distinct zymodemes from the 82 described, representative of the different branches of the *Viannia* subgenus (Fig. 21). All new zymodemes clustered within their respective taxa. New zymodemes from the *L. guyanensis* complex were included in deeper sub-clusters with other zymodemes found in the same or neighbouring countries, sharing at least 10 out of 12 enzyme mobilities analysed (Thomaz-Soccol, 1993, Thomaz-Soccol *et al.*, 2000). *L. braziliensis* MON-328 clustered with MON-44, with which it shared 10 of the studied enzymes (Thomaz-Soccol, 1993, Chouicha *et al.*, 1997). As far as we know, MON-44 has been previously isolated in Brazil, Colombia, Bolivia and French Guyana, but not in Guatemala or Central America (Raccurt *et al.*, 1995, Chouicha *et al.*, 1997, Thomaz-Soccol *et al.*, 2000). Finding these new zymodemes, after three decades of characterization by MLEE, reflects their wide variability.

Diversity was also apparent when sequencing *hsp70* gene. Each *L. guyanensis* complex isolate had a different sequence type, with strains presenting up to four particular single nucleotide polymorphisms (Table 10). Similarity among *L. guyanensis* strains (99.5%) was not higher than in *L. panamensis* (99.6% – 99.4%), and *L. braziliensis* strain BCN-717 was differentiated from the others by five additional positions.

With the rise in popularity of intercontinental travel, many countries have observed an increase in imported CL cases from America (Schwartz *et al.*, 2006). Indeed, according to Flores-Figueroa *et al.*, (2011), CL is one of the top five diseases acquired by travellers visiting the Belize-Guatemala and Costa Rica-Panama regions. Three of the new zymodemes described were found in patients who had travelled to Latin America, illustrating the wide variability of acquirable strains. The fourth was isolated from an Ecuadorian who was treated on his country of origin. Cases involving *L. braziliensis*, *L. panamensis* and to a lesser extent *L. guyanensis* can be severe and may lead to metastatic mucocutaneous leishmaniasis. Although intraspecific characterization is not necessary, identification of *Leishmania* species is strongly recommended as cutaneous leishmaniasis could not be considered as a single disease due to differences regarding clinical features, course of illness and prognosis (World Health Organization, 2010, Aronson and Joya, 2019).





Fig. 22. Neighbour-joining tree with representative zymodemes of *Viannia* subgenus. \*New zymodemes described in the current study.

---

## 5. Discusión general

*...Aún quedan vicios por perfeccionar en los días raros.  
Los destaparemos en la intimidad con la punta del zapato...*

---

## 5. Discusión general

A lo largo de esta memoria, se ha valorado la utilidad de distintas técnicas para la caracterización del género *Leishmania* cuando se aplican en diferentes contextos. En el apartado 4.1, se presenta una herramienta digital para la optimización de la identificación de las leishmanias mediante MALDI-TOF, una técnica en auge en el ámbito asistencial. En el apartado 4.2, se ahonda en la taxonomía del controvertido complejo *L. donovani* desde el enfoque isoenzimático, el de diversos marcadores genéticos y el MALDI-TOF. En los apartados 4.3 y 4.4 se valora la utilidad de técnicas como el MLEE, el MALDI-TOF y la secuenciación de distintas regiones genéticas para la identificación y el estudio epidemiológico de cepas causantes de LT en Cataluña.

Aunque en los diversos apartados se describan y se discutan los resultados individualizados obtenidos por cada una de las técnicas y también se incluya un estudio comparativo entre ellas, es posible que –tal vez debido a la simplicidad e inmediatez a la que nos tiene acostumbrados la sociedad actual– quede la sensación de falta de sentencia concluyente y que la pregunta “pero ¿qué técnica es la mejor?” todavía flote en el ambiente.

La respuesta, ni simple ni única, puede resumirse en “depende”. Dadas las diversas motivaciones que pueden llevar a la identificación de las leishmanias, los requerimientos y prioridades de los diversos ámbitos de aplicación son distintos en cuanto al poder de discriminación a alcanzar, el tiempo de obtención de resultados o la sencillez del proceso, entre otros. Por otro lado, dado que la leishmaniosis tiene una distribución mundial, dos laboratorios con las mismas inquietudes pueden tener escenarios muy dispares en lo referente a infraestructura, recursos económicos, personal o conocimiento. Al final, tal variabilidad de necesidades es lo que ha dado lugar a que, hoy en día, haya tantos métodos de caracterización como situaciones.

### 5.1. Las técnicas de caracterización desde el punto de vista asistencial

Sin duda, el fin último del estudio de una enfermedad yace en salvar o mejorar las expectativas de vida de un paciente. En el campo asistencial, las técnicas de caracterización suelen aplicarse después de un diagnóstico de certeza, siendo su objetivo el de alcanzar aquel nivel de diferenciación que permita una adecuada prognosis y manejo terapéutico de la enfermedad. Por lo general, en el caso de *Leishmania* la bibliografía aconseja que se realice la identificación a nivel de especie, al existir diferencias asociadas a estas en cuanto a la evolución de la clínica, la probabilidad de complicaciones y la respuesta al tratamiento, no siempre deducibles de los datos obtenidos en la anamnesis (World Health Organization, 2010, Burza *et al.*, 2018, Aronson y Joya, 2019). En el terreno práctico, y dada la controversia en la validez y sinonimia de determinadas especies en el seno de algunos complejos, la identificación a este nivel superior ya sería suficiente. Al ser un ámbito totalmente volcado en lo práctico, los lemas que se premian son la rapidez y la sencillez –tanto en la obtención

como en la interpretación de los resultados– al menor coste. En cuanto a la fiabilidad de la técnica, se ha de tener en cuenta la falta de poder de discriminación de algunas técnicas y la posibilidad de obtener resultados incorrectos (Van der Auwera y Dujardin, 2015, Gramiccia y Di Muccio, 2018). A la hora de elegir cual es la técnica más adecuada, algunos de los factores a considerar serían la tecnología disponible, el tipo de muestras o la posibilidad de realizar cultivos (Van der Auwera y Dujardin, 2015).

Una de las técnicas a tener en cuenta es el MALDI-TOF. Si bien la adquisición de un espectrómetro de masas tipo MALDI-TOF puede suponer una gran inversión inicial, son muchos los laboratorios que lo están incorporando a la rutina diagnóstica para la identificación de una gran variedad de microorganismos por su sencillez y ahorro económico a largo plazo, derivado de la reducción del tiempo de trabajo y bajo coste de reactivo (Croxatto *et al.*, 2012, Biswas y Rolain, 2013). Aplicado a la identificación de las leishmanias, una de las principales limitaciones, hasta el momento, era la falta de bases de espectros comerciales. La base de datos de la aplicación MSI representa un importante avance en esta dirección, a pesar de que todavía se recomienda únicamente para la investigación. Por otro lado, todavía existe la necesidad de partir de un cultivo, con los inconvenientes de que se alarga el proceso y de que no es un protocolo rutinario en nuestro entorno.

En este sentido, las técnicas moleculares como las PCR especie-específicas, PCR-RFLP o PCR-secuenciación ofrecen la posibilidad de llevar a cabo la identificación directamente de la muestra clínica, sin necesidad de cultivo, permitiendo simultanear el diagnóstico con la identificación. Sin embargo, esto no es tan sencillo. Tanto la sensibilidad como el poder de discriminación varían enormemente entre las regiones diana que se utilicen y, a menudo, aquellas que ofrecen una elevada sensibilidad presentan carencias en cuanto a la discriminación, y viceversa (Schönian *et al.*, 2011, Van der Auwera y Dujardin, 2015, Gramiccia y Di Muccio, 2018, Kuhls y Maurício, 2019). Según nuestra experiencia, y en contraposición con lo que reportan otros autores (García *et al.*, 2004, Montalvo *et al.*, 2017), el cultivo sigue siendo un paso necesario para dianas que permiten la diferenciación de especies, como por ejemplo la *hsp70* o la *rpoIII*S, salvo para muestras con cargas parasitarias muy elevadas.

A pesar de que el coste de reactivo en una PCR es mayor que el del MALDI-TOF (Croxatto *et al.*, 2012), la mayoría de los laboratorios disponen de un termociclador para realizar una PCR por lo que su uso está muy extendido. Dado que el coste del proceso aumenta si se realiza la secuenciación de los amplificadores, la PCR-RFLP es una de las técnicas más utilizadas a nivel mundial para llevar a cabo las identificaciones (Van der Auwera y Dujardin, 2015, Gramiccia y Di Muccio, 2018).

---

## 5.2. Las técnicas de caracterización desde el punto de vista taxonómico

En el extremo opuesto al punto anterior – eminentemente práctico – se encuentra la taxonomía, un ámbito fundamentalmente teórico, pero no por ello menos importante, ya que constituye la base para los más aplicados. Una taxonomía clara facilita el diálogo entre los expertos, la comparación y extrapolación de los resultados y una homogenización de los conceptos asociados a cada taxón (Lainson y Shaw, 1987, Maurício, 2018, Kuhls y Maurício, 2019). Lejos de lo ideal, la taxonomía del género *Leishmania* se caracteriza por ser compleja, no solo por sus numerosas subdivisiones sino por la controversia constante acerca de lo que debe, y no, considerarse especie (Akhoundi *et al.*, 2016, Maurício, 2018). La dificultad seguramente reside en la interpretación de la definición de especie, la unidad más elemental de la taxonomía. El concepto de especie que más se adapta al género *Leishmania* es el filogenético, el cual se basa en que la evolución de un organismo debe deducirse del análisis de las secuencias de sus genes y proteínas y para el que dos *clusters* son especies distintas si existen diferencias “diagnosticables” entre ellos (Staley, 2006, 2009). Pero ¿qué se entiende por diferencia “diagnosticable”? ¿dónde se sitúa el límite? Tal y como ya apuntaron Lainson y Shaw (1987), la importancia de las diferencias debería ser determinada mediante un acuerdo entre los especialistas del campo. Sin embargo, el único consenso existente actualmente parece ser la controversia en la taxonomía del género *Leishmania* (Van der Auwera y Dujardin, 2015, Akhoundi *et al.*, 2016, Schönian, 2017, Maurício, 2018).

La mayoría de las especies del género se crearon durante el siglo XX, basándose exclusivamente en factores “extrínsecos” como la ecología, la morfología o la clínica, al no existir otras herramientas (Akhoundi *et al.*, 2016, Maurício, 2018). Prueba de ello son los nombres de algunas especies, como, por ejemplo, *L. braziliensis*, *L. major* o *L. infantum*. Sin embargo, ya a finales de siglo, los autores apuntaban que la morfología no permitía la diferenciación de las especies (Garnham, 1971). Además, hoy en día es ampliamente conocido que el resultado de la infección se ve enormemente condicionado por la respuesta inmune del hospedador, de su estado inmune o por la saliva del vector, entre otros factores, y que los movimientos geográficos de los humanos, en particular, y los hospedadores, en general, pueden alterar la distribución de las especies (Bañuls *et al.*, 2011, Leblois *et al.*, 2011, Stamm, 2016). De hecho, tal y como se menciona en el estudio del complejo *L. donovani* (apartado 4.2), cada vez son más frecuentes las excepciones a los criterios preestablecidos (Thakur *et al.*, 2018, Mihalca *et al.*, 2019). A pesar de que estos conocimientos son útiles, en la actualidad, no tiene cabida fundamentar la existencia de los distintos taxones en la clínica o la ecología sin respaldo genético (Maurício, 2018). No obstante, con la implementación de las diversas técnicas de caracterización, no ha tenido lugar una reconstrucción desde cero de la taxonomía del género. En el punto de partida se han considerado los grupos ya descritos, lo que ha dado lugar a que se hayan utilizado diferentes “varas de medir” para encajar las especies y a que la taxonomía sea, todavía, inconsistente (Van der Auwera y Dujardin, 2015, Maurício, 2018).

Los conocimientos actuales indican que las interrelaciones entre las especies son complejas, por lo que la definición de los grupos no debería relegarse a la presencia o ausencia de un número limitado de caracteres; aunque este tipo de diferenciación sí pueda ser útil para el contexto asistencial (Mouri *et al.*, 2014, Kuhls y Maurício, 2019). Aquellas técnicas como el MLST o la secuenciación masiva, que permiten analizar las secuencias génicas desde una perspectiva más global, son las que ofrecen una visión más realista de las relaciones entre las cepas y, por lo tanto, son las más adecuadas para inferir filogenia (Kuhls y Maurício, 2019). Pese a que hay grandes expectativas en que la secuenciación masiva resuelva, al fin, la taxonomía del género *Leishmania*, actualmente existen muy pocos estudios con dicha finalidad. De éstos, la mayoría se centran en poblaciones concretas del complejo *L. donovani* (Downing *et al.*, 2011, Rogers *et al.*, 2014, Imamura *et al.*, 2016, Rai *et al.*, 2017, Zackay *et al.*, 2018), aunque también hay alguno sobre *L. braziliensis* (Figueiredo de Sá *et al.*, 2019) y otros que han explorado el ADNk de varias especies como marcador taxonómico o, al menos, para tipificación (Camacho *et al.*, 2019, Kaufer *et al.*, 2019). Recientemente, Franssen *et al.* (2020) han publicado, un estudio que abarca una representación global del complejo *L. donovani* y que, en cierta manera, es similar al estudio presentado en el apartado 4.2 de esta memoria, pero mediante secuenciación masiva. No es por casualidad que este sea uno de los complejos más estudiados, ya que es el principal responsable de los casos de LV y, por lo tanto, de la mortalidad de la enfermedad y, además, es el que tiene la distribución geográfica más amplia (World Health Organization, 2010, 2020b, 2020c, Akhoundi *et al.*, 2017). Pese a que las implicaciones taxonómicas entre ambos estudios son opuestas, en el fondo, son un buen ejemplo de la influencia de la resolución de las técnicas en la interpretación de las interacciones entre las cepas (Domagalska y Dujardin, 2020). Franssen *et al.* obtienen una diferenciación clara entre dos grandes grupos, prácticamente concordantes con lo que clásicamente se ha considerado como *L. donovani* y *L. infantum*, a excepción de las cepas de Sudán, todas ellas incluidas en el grupo *L. donovani*, o las MON-37, repartidas entre ambos grupos, como ya se había observado en otros estudios (Jamjoom *et al.*, 2004, Alam *et al.*, 2009). En nuestro trabajo, las técnicas que no están basadas en el estudio de la GOT-MLSA, secuenciación del gen *hsp70* y MALDI-TOF- mostraban aproximadamente los mismos dos grupos que Franssen *et al.*, pero con muy poca robustez (<50%). Además, en el análisis global de los polimorfismos genéticos, no se observaba un punto de corte claro entre los dos grandes grupos. Por ello, consideramos más prudente entender todo el complejo como una misma entidad. No obstante, salvando las distancias en el nivel de resolución, en ambos trabajos se destaca la existencia simultánea de diferentes escenarios genéticos dentro del complejo. Los nuevos linajes híbridos encontrados por secuenciación masiva podrían contribuir a la visión de continuidad y de gradiente este-oeste entre genotipos obtenida al utilizar un número limitado de marcadores. Por otro lado, los valores opuestos en el análisis del aislamiento por distancia encontrados por Franssen *et al.* (2020) entre *L. donovani* y *L. infantum*, pueden explicar los bajos valores de correlación encontrados en nuestro estudio al analizar los dos grupos en conjunto.

---

Así, todo parece indicar que la secuenciación masiva aportará la resolución necesaria para conseguir una visión más detallada sobre la estructura real de las distintas poblaciones de *Leishmania* y sus interrelaciones, aunque todavía sean pocos los equipos investigadores capaces de gestionar la gran cantidad de datos producidos por esta técnica (Domagalska y Dujardin, 2020). Para resolver completamente la taxonomía, deberían realizarse trabajos similares al de Franssen *et al.* (2020) para cada uno de complejos y, además, otros que comprendieran el género en conjunto o, en su defecto, los subgéneros. Llegados a ese punto –que puede que esté más cerca de lo que pensamos–, sería interesante definir y determinar, sin la influencia de etiquetas previas, los verdaderos taxones en función de los grupos observables; siempre sin perder de vista la funcionalidad de la taxonomía en las áreas aplicadas. Además, dada la naturaleza dinámica de la evolución y en el contexto actual de continuo cambio y desarrollo, podría ser de utilidad ver la taxonomía como algo dinámico; que pueda ser reevaluada, en consenso, periódicamente para adecuarla al momento y, así, seguir siendo una herramienta útil.

### **5.3. Las técnicas de caracterización desde el punto de vista epidemiológico**

Como un nexo entre teoría y práctica, la epidemiología estudia el estado, la distribución y los factores determinantes de la enfermedad para aplicarlos en el control de la misma (World Health Organization, 2020a). Para ello, la vigilancia es uno de los métodos clave, pero, pese a que se hacen grandes esfuerzos, todavía hay margen de mejora por lo que respecta a la leishmaniosis. Se estima que existe una importante subdeclaración de casos y se tiene poca información de los casos cutáneos, mucocutáneos e importados, existiendo un baile de cifras entre los diversos organismos centinela, que advierten posibles problemas en el traspaso de información (Carmona *et al.*, 2018, Fernández Martínez *et al.*, 2019, World Health Organization, 2020b, 2020c). A modo de ejemplo, resulta, si más no, llamativo que en los últimos mapas de endemicidad para la leishmaniosis de la OMS, elaborados con datos de 2018, países como España o Francia aparezcan coloreados como “sin datos” (Ruiz-Postigo *et al.*, 2020, World Health Organization, 2020d).

La epidemiología de la leishmaniosis está estrechamente ligada a factores sociales, económicos y ambientales (Okwor y Uzonna, 2016, Valero y Uriarte, 2020, World Health Organization, 2020b, 2020c). En el contexto actual de globalización y cambio climático, la situación de la enfermedad es susceptible de cambiar rápidamente (Ready, 2008, World Health Organization, 2010, Semenza *et al.*, 2016, Semenza y Suk, 2018). De hecho, en las últimas décadas ya son palpables algunas alteraciones como cambios en la incidencia de la enfermedad, la presencia global de casos importados, la declaración de nuevas zonas endémicas o el incremento de brotes (Shaw, 2007, Mansueto *et al.*, 2014, Giancchetti y Montomoli, 2020, Van der Auwera *et al.*, 2020). En alguno de los brotes, como en el de Fuenlabrada en España, se ha observado un cambio de escenario con respecto a los reservorios habituales, la distribución de la enfermedad o las formas clínicas en la población

(Molina *et al.*, 2012, Arce *et al.*, 2013, Jiménez *et al.*, 2014, Horrillo *et al.*, 2015), que podrían representar un cambio en las poblaciones de los parásitos. Ante estos antecedentes, y junto al aumento de casos importados, la presencia de los vectores para especies no autóctonas en España o los posibles cambios en la distribución de los vectores en general, no es descartable un futuro asentamiento de especies exóticas (Barón *et al.*, 2008, Ballart *et al.*, 2014, Chalghaf *et al.*, 2018).

Por todo ello, el conocimiento real de la situación epidemiológica de la leishmaniosis, en un sentido amplio, es fundamental para atajar problemas venideros. En este sentido, existen muy pocos estudios que aporten información reciente y actualizada sobre la epidemiología de la leishmaniosis humana en Cataluña y los que hay lo hacen desde el enfoque clínico o casuístico (Giavedoni *et al.*, 2015, Riera *et al.*, 2016, Marcoval y Penín, 2017). La incorporación de las técnicas de identificación a estos estudios resultarían especialmente útiles para conocer, además, las especies y cepas circulantes en la población humana, reservorios y vectores e identificar brotes (Jiménez *et al.*, 1995, Chicharro *et al.*, 2002, 2013, Martín-Sánchez *et al.*, 2004, Montoya *et al.*, 2007, Domagalska y Dujardin, 2020)

Los métodos más adecuados son aquellos que permiten discriminar por debajo del nivel de especie, como el análisis de regiones altamente variables, MLEE, MLST o MLMT (Schönian *et al.*, 2011, Akhouni *et al.*, 2017). En los últimos tiempos, además, se ha incorporado la secuenciación masiva (Rogers *et al.*, 2014, Imamura *et al.*, 2016, Zackay *et al.*, 2018, Domagalska y Dujardin, 2020). Es complicado, por no decir prácticamente imposible, que todos los laboratorios utilicen una misma técnica, pero promover el uso de aquellas que ya son más habituales permitiría la comparación de resultados entre laboratorios (Van der Auwera y Dujardin, 2015). En nuestros estudios (apartados 4.3 y 4.4) utilizamos algunos de los métodos más habituales, como la secuenciación del *hsp70* o del ITS2; además del MLEE que hoy en día tiende al desuso. Esto nos ha permitido corroborar, mediante búsqueda bibliográfica o con la ayuda de BLAST, la presencia, entre nuestras cepas autóctonas, de algunos perfiles alélicos ya descritos en España y/o en otros países y, entre las cepas importadas, perfiles coincidentes con los de cepas de los países de origen (Kuhls *et al.*, 2005, Fraga *et al.*, 2010, De Almeida *et al.*, 2011, Chicharro *et al.*, 2013). Otros perfiles, en cambio, parecen ser nuevos. La existencia de bases de datos de tipificación de acceso libre, hubiesen facilitado esta tarea y serían de gran utilidad para conocer mejor la diversidad y la distribución del género *Leishmania* a lo largo del territorio y el tiempo.





---

## 6. Conclusiones/Conclusions

*...Ya está aquí. ¿Quién lo vio?  
Baila como un lazo en un ventilador  
¿Quién iba a decir que sin borrón no hay trato?...*

---

## 6. Conclusiones

### A. Evaluación y comparación de técnicas bioquímicas, moleculares y proteómicas en la identificación de cepas de *Leishmania*.

1. La incorporación de la librería de espectros de *Leishmania* en la aplicación *Mass spectral identification* hace que sea la primera base de datos en línea, y de acceso libre, que permite la identificación de estos organismos mediante la metodología de espectrometría de masas MALDI-TOF.
2. Todas las técnicas empleadas en este trabajo –electroforesis de enzimas multilocus (MLEE), secuenciación de distintas regiones genéticas (*hsp70*, *rpoHLS*, *fh* e ITS2) y MALDI-TOF– han permitido obtener resultados comparables en la identificación de las leishmanias a nivel de complejo. Por debajo de este nivel taxonómico, el poder resolutivo alcanzado varía en función de la técnica y del complejo analizado.
3. El MALDI-TOF y la secuenciación de los genes *rpoHLS* y *fh*, al ser técnicas sencillas y rápidas, son adecuadas para su uso en el ámbito asistencial. El MLEE y la secuenciación del gen *hsp70* y de la región ITS2 destacan por su poder de discriminación. La menor complejidad de la secuenciación respecto al MLEE, hace interesante la combinación de ambos marcadores genéticos para aplicarlos en estudios epidemiológicos.

### B. Profundización en el estudio del complejo *Leishmania donovani*.

1. El poder de resolución de los análisis genéticos del complejo *Leishmania donovani* se ve obstaculizado por una muy baja diversidad genética, en comparación a la de otros complejos, y, especialmente, por un importante flujo genético a través de toda el área de distribución.
2. En los dendrogramas elaborados a partir de los resultados obtenidos con el MLEE y la secuenciación del gen *got* se aprecia una separación clara de los tres grupos considerados como *Leishmania donovani*, *Leishmania infantum* y *Leishmania archibaldi*. En cambio, cuando se emplean otras técnicas y marcadores –análisis de secuencias multilocus (MLSA), MALDI-TOF o secuenciación del gen *hsp70*– se observa una reorganización marcada en la distribución de las cepas que hace que se desdibujen las separaciones entre los tres grupos mencionados.
3. El estudio de la estructura genética del complejo *Leishmania donovani* ha permitido observar, de forma simultánea: 1) una continuidad de los distintos genotipos a lo largo del área de distribución; 2) un gradiente este-oeste en las frecuencias alélicas; 3) una gran cantidad de indicios de intercambios genéticos; 4) la existencia de ecotipos y subestructuración localizada y 5) una dispersión a gran escala de genotipos concretos.

4. A pesar de que existen diferencias entre focos geográficos, en cuanto al cuadro clínico ocasionado, los reservorios o los vectores implicados, los marcadores utilizados en este trabajo no muestran evidencias genéticas suficientes para separar las dos especies actualmente consideradas dentro del complejo *Leishmania donovani*: *Leishmania donovani* y *Leishmania infantum*.

### **C. Caracterización de las cepas causantes de leishmaniosis tegumentaria en la población autóctona e inmigrante en Cataluña.**

1. En las últimas dos décadas, se ha observado un incremento en el número de cepas tegumentarias depositadas en el Criobanco de Tripanosomátidos de la Universitat de Barcelona, siendo éste especialmente marcado para las cepas importadas.
2. Los casos autóctonos de leishmaniosis cutánea y mucocutánea han sido causados por *Leishmania infantum*, habiéndose identificado once tipos distintos basados en el análisis de las regiones *hsp70*, *ITS2* y en las isoenzimas. De éstos, el tipo C resultó ser el más prevalente durante todo el periodo de estudio (39% de las cepas autóctonas). El resto, mucho más minoritarios, aparecieron, por lo general, durante intervalos temporales concretos.
3. Los casos importados fueron adquiridos, en proporciones similares, tanto en el Nuevo Mundo (9 casos) como en el Viejo Mundo (11 casos). Las características de los pacientes de los casos importados corresponden con la edad, origen y/o destino del perfil del viajero y/o inmigrante en España.
4. Los casos importados fueron causados por cinco especies de *Leishmania*, tres del subgénero *Viannia*: *Leishmania braziliensis*, *Leishmania guyanensis* y *Leishmania panamensis* y dos del subgénero *Leishmania*: *Leishmania major* y *Leishmania tropica*.
5. Se han descrito cuatro zimodemas nuevos de *Leishmania*: uno de *Leishmania braziliensis* (MON-328), dos de *Leishmania guyanensis* (MON-327 y MON-330) y uno de *Leishmania panamensis* (MON-329), en cepas aisladas de pacientes que procedían o habían viajado a América Latina. Los nuevos perfiles enzimáticos resultan de una nueva combinación de movilidades ya definidas y/o presentaban movilidades nuevas para determinadas enzimas.
6. La presencia de casos importados de leishmaniosis tegumentaria enfatiza la importancia de la utilización de métodos de identificación de la especie causal.

---

## Conclusions

### **A. Evaluation and comparison of biochemical, molecular and proteomic techniques for the identification of *Leishmania*.**

1. The addition of the *Leishmania* mass spectral library into the Mass spectral identification application made it the first free web-based database allowing the identification of these organisms by MALDI-TOF mass spectrometry.
2. All the methodologies used in this study –multilocus enzyme electrophoresis (MLEE), sequencing of different genomic regions (*hsp70*, *rpoHLS*, *fh* and ITS2) and MALDI-TOF– allowed comparable identification results at the species complex level. Below this taxonomic level the resolving power achieved varied depending on the technique and the species complex analysed.
3. MALDI-TOF and *rpoHLS* or *fh* sequencing are suitable identification tools for clinical practice, due to their speed and simplicity. MLEE and *hsp70* and ITS2 sequencing stand out by their discriminative power. The lower complexity of sequencing makes the combination of both genetic markers interesting for epidemiological purposes.

### **B. In-depth study of the *Leishmania donovani* complex.**

1. The resolving power of the genetic analysis of the *Leishmania donovani* complex is hampered by very low genetic diversity compared with other complexes, and especially by the strong genetic flow across its distribution range.
2. The dendrograms obtained from MLEE and *got* sequencing showed a clear separation of the three groups considered as *Leishmania donovani*, *Leishmania infantum* y *Leishmania archibaldi*. However, when other techniques and markers are used –multilocus sequence analysis, MALDI-TOF or *hsp70* sequencing– there is a strong reshuffling of strains, blurring the differences of the aforementioned groups.
3. The study of the genetic structure of the *Leishmania donovani* complex showed simultaneously: 1) a continuum of the different genotypes across the geographical range of the population; 2) a roughly east-west allele frequency gradient; 3) a large amount of genetic exchange footprints; 4) the existence of ecotypes and local sub-structuration, and 5) a large-scale geographical spreading of a few genotypes.
4. Although there are obvious differences between geographic foci, including in clinical presentations, reservoirs or implied vectors, the markers used in this study do not show enough genetic evidence for separating the two species within the *Leishmania donovani* complex (*Leishmania donovani* and *Leishmania infantum*).

### C. Characterization of strains causing autochthonous and imported tegumentary leishmaniasis in Catalonia.

1. In the last two decades there has been an increase in the tegumentary leishmaniasis strains deposited in the Trypanosomatid Cryobank of the Universitat de Barcelona, particularly remarkable for those imported.
2. Cutaneous and mucocutaneous autochthonous cases were produced by eleven strains types of *Leishmania infantum*, according to *hsp70*, ITS2 and MLEE analysis. Strain type C prevailed throughout the studied period (39% of the autochthonous strains). Minor types generally appeared within a short time interval.
3. The imported cases were similarly acquired in both the New World (9 cases) and the Old World (11 cases). Patient profiles in terms of age, origin or destination match the traveller and/or the immigrant prototype in Spain.
4. The imported cases were caused by five *Leishmania* species, three from the *Viannia* subgenus: *Leishmania braziliensis*, *Leishmania guyanensis* and *Leishmania panamensis* and two from the *Leishmania* subgenus: *Leishmania major* and *Leishmania tropica*.
5. Four new *Leishmania* zymodemes have been described: one in *Leishmania braziliensis* (MON-328), two in *Leishmania guyanensis* (MON-327 and MON-330) and one in *Leishmania panamensis* (MON-329), in strains isolated from patients who had been in Latin America. The new enzymatic profiles were a new combination of previously defined mobilities and/or presented new mobilities for certain enzymes.
6. The presence of imported tegumentary leishmaniasis cases highlight the need for strain identification procedures.



---

## 7. Bibliografía



---

## Bibliografía

- Akhoundi, M., Downing, T., Votýpka, J., Kuhls, K., Lukeš, J., Cannet, A., Ravel, C., Marty, P., Delaunay, P., Kasbari, M., Granouillac, B., Gradoni, L., Sereno, D., 2017. *Leishmania* infections: molecular targets and diagnosis, *Molecular Aspects of Medicine*, 57, 1–29. doi: 10.1016/j.mam.2016.11.012.
- Akhoundi, M., Kuhls, K., Cannet, A., Votýpka, J., Marty, P., Delaunay, P., Sereno, D., 2016. A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies, *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10, e0004349. doi: 10.1371/journal.pntd.0004349.
- Al-Taqi, M., Evans, D. A., 1978. Characterization of *Leishmania* spp. from Kuwait by isoenzyme electrophoresis, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 72, 56–65. doi: 10.1016/0035-9203(78)90302-4.
- Alam, M. Z., Haralambous, C., Kuhls, K., Gouzelou, E., Sgouras, D., Soteriadou, K., Schnur, L., Pratlong, F., Schönian, G., 2009. The paraphyletic composition of *Leishmania donovani* zymodeme MON-37 revealed by multilocus microsatellite typing, *Microbes and Infection*, 11, 707–715. doi: 10.1016/j.micinf.2009.04.009.
- Aliaga, L., Cobo, F., Mediavilla, J. D., Bravo, J., Osuna, A., Amador, J. M., Martín-Sánchez, J., Cordero, E., Navarro, J. M., 2003. Localized mucosal leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) infantum* clinical and microbiologic findings in 31 patients, *Medicine*, 82, 147–158. doi: 10.1097/00005792-200305000-00001.
- Allahverdiyev, A. M., Bagirova, M., Uzun, S., Alabaz, D., Aksaray, N., Kocabas, E., Koksall, F., 2005. The value of a new microculture method for diagnosis of visceral leishmaniasis by using bone marrow and peripheral blood, *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 73, 276–280. doi: 10.4269/ajtmh.2005.73.276.
- De Almeida, M. E., Koru, O., Steurer, F., Herwaldt, B. L., Da Silva, A. J., 2017. Detection and differentiation of *Leishmania* spp. in clinical specimens by use of a SYBR green-based real-time PCR assay, *Journal of Clinical Microbiology*, 55, 281–290. doi: 10.1128/JCM.01764-16.
- 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, 3143–3149. doi: 10.1128/JCM.01177-11.
- Alvar Ezquerro, J. P., 2001. *Las Leishmaniasis: de la biología al control*. 2a edición, Salamanca, Laboratorio Intervet, S.A.
- Alvar, J., Cañavate, C., Molina, R., Moreno, J., Nieto, J., 2004. Canine leishmaniasis, *Advances in Parasitology*, 57, 1–88. doi: 10.1016/S0065-308X(04)57001-X.
- Alvar, J., Gutiérrez-Solar, B., Pachón, I., Calbacho, E., Ramírez, M., Vallés, R., Guillén, J. L., Cañavate, C., Amela, C., 1996. AIDS and *Leishmania infantum* new approaches for a new epidemiological problem, *Clinics in Dermatology*, 14, 541–546.
- Alvar, J., Vélez, I. D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., Jannin, J., Den Boer, M., 2012. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence., *PloS ONE*, 7,

- e35671. doi: 10.1371/journal.pone.0035671.
- Anders, G., Eisenberger, C. L., Jonas, F., Greenblatt, C. L., 2002. Distinguishing *Leishmania tropica* and *Leishmania major* in the Middle East using the polymerase chain reaction with kinetoplast DNA-specific primers, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 96, 87–92. doi: 10.1016/s0035-9203(02)90057-x.
- Andrade-Narvaez, F. J., Loría-Cervera, E. N., Sosa-Bibiano, E. I., Van Wynsberghe, N. R., 2016. Asymptomatic infection with American cutaneous leishmaniasis: epidemiological and immunological studies, *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 111, 599–604. doi: 10.1590/0074-02760160138.
- Antoniou, M., Gramiccia, M., Molina, R., Dvorak, V., Volf, P., 2013. The role of indigenous phlebotomine sandflies and mammals in the spreading of leishmaniasis agents in the Mediterranean region, *Eurosurveillance*, 18, 20540. doi: 10.2807/1560-7917.ES2013.18.30.20540.
- Antoniou, M., Haralambous, C., Mazeris, A., Pralong, F., Dedet, J.-P., Soteriadou, K., 2008. *Leishmania donovani* leishmaniasis in Cyprus, *The Lancet Infectious Diseases*, 8, 6–7. doi: 10.1016/S1473-3099(07)70297-9.
- Aoun, K., Bouratbine, A., 2014. Cutaneous leishmaniasis in North Africa: a review, *Parasite*, 21, 14. doi: 10.1051/parasite/2014014.
- Aransay, A. M., Scoulica, E., Tselentis, Y., 2000. Detection and identification of *Leishmania* DNA within naturally infected sand flies by seminested PCR on minicircle kinetoplastic DNA, *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 1933–1938. doi: 10.1128/AEM.66.5.1933-1938.2000.
- Arce, A., Estirado, A., Ordobas, M., Sevilla, S., García, N., Moratilla, L., De la Fuente, S., Martínez, A., Pérez, A., Aránguez, E., Iriso, A., Sevillano, O., Bernal, J., Vilas, F., 2013. Re-emergence of leishmaniasis in Spain: community outbreak in Madrid, Spain, 2009 to 2012, *Eurosurveillance*, 18, 20546. doi: 10.2807/1560-7917.ES2013.18.30.20546.
- Aronson, N. E., Joya, C. A., 2019. Cutaneous Leishmaniasis: updates in diagnosis and management, *Infectious Disease Clinics of North America*, 33, 101–117. doi: 10.1016/j.idc.2018.10.004.
- Aronson, N., Herwaldt, B. L., Libman, M., Pearson, R., López-Vélez, R., Weina, P., Carvalho, E. M., Ephros, M., Jeronimo, S., Magill, A., 2016. Diagnosis and treatment of leishmaniasis, *Clinical Infectious Diseases*, 63, e202–e264. doi: 10.1093/cid/ciw670.
- Asato, Y., Oshiro, M., Myint, C. K., Yamamoto, Y., Kato, H., Marco, J. D., Mimori, T., Gomez, E. A. L., Hashiguchi, Y., Uezato, H., 2009. Phylogenetic analysis of the genus *Leishmania* by cytochrome b gene sequencing, *Experimental Parasitology*, 121, 352–361. doi: 10.1016/j.exppara.2008.12.013.
- Ashford, R. W., 2000. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses, *International Journal for Parasitology*, 30, 1269–1281. doi: 10.1016/S0020-7519(00)00136-3.
- Attar, Z. J., Chance, M. L., El-Safi, S., Carney, J., Azazy, A., El-Hadi, M., Dourado, C.,

- 
- Hommel, M., 2001. Latex agglutination test for the detection of urinary antigens in visceral leishmaniasis, *Acta Tropica*, 78, 11–16. doi: 10.1016/S0001-706X(00)00155-8.
- Van der Auwera, G., Bart, A., Chicharro, C., Cortes, S., Davidsson, L., Di Muccio, T., Dujardin, J.-C., Felger, I., Paglia, M. G., Grimm, F., Harms, G., Jaffe, C. L., Manser, M., Ravel, C., Robert-Gagneux, 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, 30418. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2016.21.49.30418.
- Van der Auwera, G., Dujardin, J. -C., 2015. Species typing in dermal leishmaniasis, *Clinical Microbiology Reviews*, 28, 265–294. doi: 10.1128/CMR.00104-14.
- Van der Auwera, G., Guery, R., Davidsson, L., Karlsson Sobirk, S., Van Henten, S., Wampfler, R., Gramiccia, M., Di Muccio, T., Chiodini, P., Walker, S., Chicharro, C., Bart, A., Varani, S., Harms, G., Brekke, H., Robert-Gagneux, F., Cortes, S., Nicastrì, E., Buffet, P., Blum, J., 2020. *Leishmania* species diagnosed in European specialised treatment centres in the period 2014-2019, *Eccmid 2020*, Abstract 2641, p. 1269.
- 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, 18, 20543. doi: 10.2807/1560-7917.es2013.18.30.20543.
- Van der Auwera, G., Ravel, C., Verweij, J. J., Bart, A., Schönián, G., Felger, I., 2014. Evaluation of four single-locus markers for *Leishmania* species discrimination by sequencing, *Journal of Clinical Microbiology*, 52, 1098–1104. doi: 10.1128/JCM.02936-13.
- Azizi, K., Rassi, Y., Javadian, E., Motazedian, M. H., Rafizadeh, S., Yaghoobi Ershadi, M. R., Mohebbali, M., 2006. *Phlebotomus (Paraphlebotomus) alexandri*: a probable vector of *Leishmania infantum* in Iran, *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 100, 63–68. doi: 10.1179/136485906X78454.
- El Baidouri, F., Diancourt, L., Berry, V., Chevenet, F., Pratlong, F., Marty, P., Ravel, C., 2013. Genetic structure and evolution of the *Leishmania* genus in Africa and Eurasia: what does MLSA tell us, *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7, e2255. doi: 10.1371/journal.pntd.0002255.
- Baleela, R., Llewellyn, M. S., Fitzpatrick, S., Kuhls, K., Schönián, G., Miles, M. A., Maurício, I. L., 2014. *Leishmania donovani* populations in Eastern Sudan: temporal structuring and a link between human and canine transmission, *Parasites & vectors*, 7, 496. doi: 10.1186/s13071-014-0496-4.
- Ballart, C., Guerrero, I., Castells, X., Barón, S., Castillejo, S., Alcover, M. M., Portús, M., Gállego, M., 2014. Importance of individual analysis of environmental and climatic factors affecting the density of *Leishmania* vectors living in the same geographical area: the example of *Phlebotomus ariasi* and *P. perniciosus* in northeast Spain, *Geospatial Health*, 8, 389–403. doi: 10.4081/gh.2014.28.
- Banu, S. S., Meyer, W., Ferreira-Paim, K., Wang, Q., Kuhls, K., Cupolillo, E., Schönián, G., Lee, R., 2019. A novel multilocus sequence typing scheme identifying genetic diversity

- amongst *Leishmania donovani* isolates from a genetically homogeneous population in the Indian subcontinent, *International Journal for Parasitology*, 49, 555–567. doi: 10.1016/j.ijpara.2019.02.010.
- Bañuls, A.-L., Bastien, P., Pomares, C., Arévalo, J., Fisa, R., Hide, M., 2011. Clinical pleiomorphism in human leishmaniasis, with special mention of asymptomatic infection, *Clinical Microbiology and Infection*, 17, 1451–1461. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03640.x.
- Bañuls, A.-L., Dujardin, J.-C., Guerrini, F., De Doncker, S., Jacquet, D., Arévalo, J., Noël, 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.
- Bañuls, A.-L., Hide, M., Prugnolle, F., 2007. *Leishmania* and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans, *Advances in Parasitology*, 64, 1–109. doi: 10.1016/S0065-308X(06)64001-3.
- Bañuls, A.-L., Hide, M., Tibayrenc, M., 2002. Evolutionary genetics and molecular diagnosis of *Leishmania* species, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 96, S9-13.
- Bañuls, A.-L., Jonquieres, R., Guerrini, F., Le Pont, F., Barrera, C., Espinel, I., Guderian, R., Echeverria, R., Tibayrenc, M., 1999. Genetic analysis of *Leishmania* parasites in Ecuador: are *Leishmania (Viannia) panamensis* and *Leishmania (V.) guyanensis* distinct taxa?, *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 61, 838–845. doi: 10.4269/ajtmh.1999.61.838.
- Barker, D. C., Butcher, J., 1983. The use of DNA probes in the identification of leishmaniasis: discrimination between isolates of the *Leishmania mexicana* and *L. braziliensis* complexes, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 77, 285–297. doi: 10.1016/0035-9203(83)90146-3.
- Barón, S., Martín-Sánchez, J., Gállego, M., Morales-Yuste, M., Boussaa, S., Morillas-Márquez, F., 2008. Intraspecific variability (rDNA ITS and mtDNA Cyt b) of *Phlebotomus sergenti* in Spain and Morocco, *Acta Tropica*, 107, 259–267. doi: 10.1016/j.actatropica.2008.07.003.
- Barral, A., Barral-Netto, M., Almeida, R., De Jesus, A. R., Grimaldi, G., Netto, E. M., Santos, I., Bacellar, O., Carvalho, E. M., 1992. Lymphadenopathy associated with *Leishmania braziliensis* cutaneous infection, *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 47, 587–592. doi: 10.4269/ajtmh.1992.47.587.
- Bart, A., Van Thiel, P., De Vries, H., Hodiament, C., Van Gool, T., 2013. Imported leishmaniasis in the Netherlands from 2005 to 2012: epidemiology, diagnostic techniques and sequence-based species typing from 195 patients, *Eurosurveillance*, 18, 30, 20544. doi: 10.2807/1560-7917.ES2013.18.30.20544.
- Bates, P. A., 2007. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies, *International Journal for Parasitology*, 37, 1097–1106. doi: 10.1016/j.ijpara.2007.04.003.
- Bennis, I., Belaid, L., De Brouwere, V., Filali, H., Sahibi, H., Boelaert, M., 2017. ‘The

- 
- mosquitoes that destroy your face'. Social impact of cutaneous leishmaniasis in South-eastern Morocco, a qualitative study, *PLoS ONE*, 12, e0189906. doi: 10.1371/journal.pone.0189906.
- Bensoussan, E., Nasereddin, A., Jonas, F., Schnur, L. F., Jaffe, C. L., 2006. Comparison of PCR assays for diagnosis of cutaneous leishmaniasis, *Journal of Clinical Microbiology*, 44, 1435–1439. doi: 10.1128/JCM.44.4.1435-1439.2006.
- Bezerra, G. S. N., Barbosa, W. L., Da Silva, E. D., Leal, N. C., De Medeiros, Z. M., 2019. Urine as a promising sample for *Leishmania* DNA extraction in the diagnosis of visceral leishmaniasis – a review, *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 23, 111–120. doi: 10.1016/j.bjid.2019.04.001.
- Bhattarai, N. R., Dujardin, J. -C., Rijal, S., De Doncker, S., Boelaert, M., Van der Auwera, G., 2010. Development and evaluation of different PCR-based typing methods for discrimination of *Leishmania donovani* isolates from Nepal, *Parasitology*, 137, 947–957. doi: 10.1017/S0031182009991752.
- Biswas, S., Rolain, J.-M., 2013. Use of MALDI-TOF mass spectrometry for identification of bacteria that are difficult to culture, *Journal of Microbiological Methods*, 92, 14–24. doi: 10.1016/j.mimet.2012.10.014.
- Le Blancq, S. M., Schnur, L. F., Peters, W., 1986. *Leishmania* of the Old World. I: the geographical and hostal distribution of *L. major* zymodemes, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 80, 99–112.
- Blum, J., Buffet, P., Visser, L., Harms, G., Bailey, M. S., Caumes, E., Clerinx, J., Van Thiel, P. P. A. M., Morizot, G., Hatz, C., Dorlo, T. P., Lockwood, D. N., 2014. LeishMan recommendations for treatment of cutaneous and mucosal leishmaniasis in travelers, 2014, *Journal of Travel Medicine*, 21, 116–129. doi: 10.1111/jtm.12089.
- Blum, J., Neumayr, A., Lockwood, D., 2018. Treatment of tegumentary forms of leishmaniasis, en *The Leishmaniasis: Old Neglected Tropical Diseases*, pp. 191–226.
- Boggild, A. K., Espinosa, D., Miranda-Verastegui, C., Arévalo, J., Low, D. E., Martinez-Medina, D., Llanos-Cuentas, A., 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, 847–852. doi: 10.4269/ajtmh.2008.79.847.
- Boité, M. C., Maurício, I. L., Miles, M. A., 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, e1888. doi: 10.1371/journal.pntd.0001888.
- Botet, J., Portús, M., 1993. La leishmaniosis en la España peninsular: revisión histórico-bibliográfica (1912-1985), *Revista de Sanidad e Higiene Pública*, 67, 255–266.
- Botilde, Y., Laurent, T., Quispe Tintaya, W., Chicharro, C., Cañavate, C., Cruz, I., Kuhls, K., Schönian, G., Dujardin, J.-C., 2006. Comparison of molecular markers for strain typing of *Leishmania infantum*, *Infection, Genetics and Evolution*, 6, 440–446. doi: 10.1016/j.meegid.2006.02.003.
- Bousslimi, N., Ben-Ayed, S., Ben-Abda, I., Aoun, K., Bouratbine, A., 2012. Natural infection of North African gundi (*Ctenodactylus gundi*) by *Leishmania tropica* in the focus of

- cutaneous leishmaniasis, Southeast Tunisia, *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 86, 962–965. doi: 10.4269/ajtmh.2012.11-0572.
- Brenière, S. F., Telleria, J., Bosseno, M. F., Buitrago, R., Bastrenta, B., Cuny, G., Bañuls, A.-L., Brewster, S., Barker, D. C., 1999. Polymerase chain reaction-based identification of New World *Leishmania* species complexes by specific kDNA probes, *Acta Tropica*, 73, 283–293. doi: 10.1016/S0001-706X(99)00025-X.
- Britto, C., Ravel, C., Bastien, P., Blaineau, C., Pagès, M., Dedet, J. P., Wincker, P., 1998. Conserved linkage groups associated with large-scale chromosomal rearrangements between Old World and New World *Leishmania* genomes, *Gene*, 222, 107–117. doi: 10.1016/S0378-1119(98)00472-7.
- Brumpt, E., 1936. *Précis de parasitologie*, París, Masson et Cie.
- Burza, S., Croft, S. L., Boelaert, M., 2018. Leishmaniasis, *The Lancet*, 392, 951–970. doi: 10.1016/S0140-6736(18)31204-2.
- Bussotti, G., Gouzou, E., Boité, M. C., Kherachi, I., Harrat, Z., Eddaikra, N., Mottram, J. C., Antoniou, M., Christodoulou, V., Bali, A., Guerfali, F. Z., Laouini, D., Mukhtar, M., Dumetz, F., Dujardin, J.-C., Smirlis, D., Lechat, P., Pescher, P., Hamouchi, A. El, Lemrani, M., Chicharro, C., Llanes-Acevedo, I. P., Botana, L., Cruz, I., Moreno, J., Jeddi, F., Aoun, K., Bouratbine, A., Cupolillo, E., Späth, G. F., 2018. *Leishmania* genome dynamics during environmental adaptation reveal strain-specific differences in gene copy number variation, karyotype instability, and telomeric amplification, *mBio*, 9, 6. doi: 10.1128/mBio.01399-18.
- Calza, L., D'Antuono, A., Marinacci, G., Manfredi, R., Colangeli, V., Passarini, B., Orioli, R., Varoli, O., Chiodo, F., 2004. Disseminated cutaneous leishmaniasis after visceral disease in a patient with AIDS, *Journal of the American Academy of Dermatology*, 50, 461–465. doi: 10.1016/j.jaad.2003.10.005.
- 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, 758. doi: 10.3390/genes10100758.
- Campino, L., Pratlong, F., Abranches, P., Rioux, J.-A., Santos-Gomes, G., Alves-Pires, C., Cortes, S., Ramada, J., Cristovão, J. M., Afonso, M. O., Dedet, J. P., 2006. Leishmaniasis in Portugal: enzyme polymorphism of *Leishmania infantum* based on the identification of 213 strains, *Tropical Medicine and International Health*, 11, 1708–1714. doi: 10.1111/j.1365-3156.2006.01728.x.
- Carmona, G., Vives, N., Jané, M., 2018. Resum de les malalties de declaració obligatòria a Catalunya durant l'any 2017, *Bulletí Epidemiològic de Catalunya*, 39, 262–305. (online: <http://scientiasalut.gencat.cat/handle/11351/4204>).
- 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, 551–7. doi: 10.1111/1469-0691.12387.
- Castellani, A., Chalmers, A., 1919. *Manual of Tropical Medicine*. 3a edició, Londres, Balliere, Tindall and Cox.

- 
- 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, 540–546. doi: 10.1128/JCM.41.2.540-546.2003.
- Castro, L. S., França, A. de O., Ferreira, E. de C., Hans Filho, G., Higa Júnior, M. G., Gontijo, C. M. F., Pereira, A. A. S., Dorval, M. E. M. C., 2016. *Leishmania infantum* as a causative agent of cutaneous leishmaniasis in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil, *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 58, 23. doi: 10.1590/S1678-9946201658023.
- Castro Neto, A. L., Brito, A. N. A. L. M., Rezende, A. M., Magalhães, F. B., De Melo Neto, O. P., 2019. *In silico* characterization of multiple genes encoding the GP63 virulence protein from *Leishmania braziliensis*: identification of sources of variation and putative roles in immune evasion, *BMC Genomics*, 20, 118. doi: 10.1186/s12864-019-5465-z.
- Catorze, G., Alberto, J., Afonso, A., Vieira, R., Cortes, S., Campino, L., 2006. Co-infection *Leishmania infantum*/VIH: lésions cutanées après traitement d’une leishmaniose viscérale, *Annales de Dermatologie et de Venereologie*, 133, 39–42. doi: 10.1016/S0151-9638(06)70841-9.
- Ceccarelli, M., Galluzzi, L., Migliazzo, A., Magnani, M., 2014. Detection and characterization of *Leishmania* (*Leishmania*) and *Leishmania* (*Viannia*) by SYBR green-based real-time PCR and high resolution melt analysis targeting kinetoplast minicircle DNA, *PLoS ONE*, 9, 2, e88845. doi: 10.1371/journal.pone.0088845.
- Celesia, B. M., Cacopardo, B., Massimino, D., Gussio, M., Tosto, S., Nunnari, G., Pinzone, M. R., 2014. Atypical presentation of PKDL due to *Leishmania infantum* in an HIV-infected patient with relapsing visceral leishmaniasis, *Case Reports in Infectious Diseases*, 2014, 370286. doi: 10.1155/2014/370286.
- Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias Sanitarias, 2012. Evaluación del riesgo de transmisión de *Leishmania infantum* en España, *Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad*. (online: <https://www.mscbs.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/analisisituacion/doc/leishmania.pdf>).
- Centro Nacional de Epidemiología, 2019. Enfermedades de declaración obligatoria. Casos notificados por comunidades autónomas y tasas por 100.000 habitantes. España 2017. Datos definitivos (06/05/2019), *Instituto de Salud Carlos III*. (online: <https://www.isciii.es/QueHacemos/Servicios/VigilanciaSaludPublicaRENAVE/EnfermedadesTransmisibles/Paginas/Informes.aspx>).
- Centro Nacional de Epidemiología, 2019. Enfermedades de declaración obligatoria. Casos notificados por comunidades autónomas y tasas por 100.000 habitantes. España 2018. Datos definitivos (04/12/2019), *Instituto de Salud Carlos III*. (online: [https://www.isciii.es/QueHacemos/Servicios/VigilanciaSaludPublicaRENAVE/EnfermedadesTransmisibles/Documents/INFORMES/INFORMES\\_RENAVE/RENAVE\\_cierre\\_EDO\\_2018.pdf](https://www.isciii.es/QueHacemos/Servicios/VigilanciaSaludPublicaRENAVE/EnfermedadesTransmisibles/Documents/INFORMES/INFORMES_RENAVE/RENAVE_cierre_EDO_2018.pdf)).
- Chara, D., Ravel, C., Bañuls, A.-L., Haouas, N., Lami, P., Talignani, L., El Baidouri, F., Jaouadi, K., Harrat, Z., Dedet, J.-P., Babba, H., Pratlong, F., 2015. Evolutionary history of *Leishmania killicki* (synonymous *Leishmania tropica*) and taxonomic implications,

- Parasites & Vectors*, 8, 198. doi: 10.1186/s13071-015-0821-6.
- Chakravarty, J., Sundar, S., 2019. Current and emerging medications for the treatment of leishmaniasis, *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 20, 1251–1265. doi: 10.1080/14656566.2019.1609940.
- Chalghaf, B., Chemkhi, J., Mayala, B., Harrabi, M., Benie, G. B., Michael, E., Ben Salah, A., 2018. Ecological niche modeling predicting the potential distribution of *Leishmania* vectors in the Mediterranean basin: impact of climate change, *Parasites & Vectors*, 11, 461. doi: 10.1186/s13071-018-3019-x.
- Chambers, M. C., Maclean, B., Burke, R., Amode, D., Ruderman, D. L., Neumann, S., Gatto, L., Fischer, B., Pratt, B., Egertson, J., Hoff, K., Kessner, D., Tasman, N., Shulman, N., Frewen, B., Baker, T. A., Brusniak, M.-Y., Paulse, C., Creasy, D., Flashner, L., Kani, K., Moulding, C., Seymour, S. L., Nuwaysir, L. M., Lefebvre, B., Kuhlmann, F., Roark, J., Rainer, P., Detlev, S., Hemenway, T., Huhmer, A., Langridge, J., Connolly, B., Chadick, T., Holly, K., Eckels, J., Deutsch, E. W., Moritz, R. L., Katz, J. E., Agus, D. B., MacCoss, M., Tabb, D. L., Mallick, P., 2012. A cross-platform toolkit for mass spectrometry and proteomics, *Nature Biotechnology*, 30, 918–920. doi: 10.1038/nbt.2377.
- Chance, M. L., Peters, W., Shchory, L., 1974. Biochemical taxonomy of *Leishmania*, *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 68, 307–316. doi: 10.1080/00034983.1974.11686953.
- Chargui, N., Haouas, N., Jaouadi, K., Gorcii, M., Pralong, F., Dedet, J. P., Mezhoud, H., Babba, H., 2012. Usefulness of a PCR-based method in the detection and species identification of *Leishmania* from clinical samples, *Pathologie Biologie*, 60, e75–e79. doi: 10.1016/j.patbio.2011.11.011.
- Chicharro, C., Jiménez, M. I., Alvar, J., 2003. Iso-enzymatic variability of *Leishmania infantum* in Spain, *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 97, S57-S64. doi: 10.1179/000349803225002534.
- Chicharro, C., Llanes-Acevedo, P., García, E., Nieto, J., Moreno, J., Cruz, I., 2013. Molecular typing of *Leishmania infantum* isolates from a leishmaniasis outbreak in Madrid, Spain, 2009 to 2012, *Eurosurveillance*, 18, 20545. doi: 10.2807/1560-7917.ES2013.18.30.20545.
- Chicharro, C., Morales, M. A., Serra, T., Ares, M., Salas, A., Alvar, J., 2002. Molecular epidemiology of *Leishmania infantum* on the island of Majorca: a comparison of phenotypic and genotypic tools, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 96, S93–S99. doi: 10.1016/s0035-9203(02)90058-1.
- Chouicha, N., Lanotte, G., Pralong, 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, 343–348.
- Clark, A. E., Kaleta, E. J., Arora, A., Wolk, D. M., 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, 547–603. doi: 10.1128/CMR.00072-12.



- 
- Cortés, P., Cardeñosa, N., Romaní, J., Gállego, M., Muñoz, C., Barrio, J. L., Riera, C., Portús, M., 1997. Oral leishmaniasis in an HIV-positive patient caused by two different zymodemes of *Leishmania infantum*, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 91, 438–439. doi: 10.1016/S0035-9203(97)90273-X.
- Croan, D., Ellis, J., 1996. Phylogenetic relationships between *Leishmania*, *Viannia* and *Sauroleishmania* inferred from comparison of a variable domain within the RNA polymerase II largest subunit gene, *Molecular and Biochemical Parasitology*, 79, 97–102. doi: 10.1016/0166-6851(96)02629-1.
- Croan, D. G., Morrison, D. A., Ellis, J. T., 1997. Evolution of the genus *Leishmania* revealed by comparison of DNA and RNA polymerase gene sequences, *Molecular and Biochemical Parasitology*, 89, 149–159. doi: 10.1016/S0166-6851(97)00111-4.
- Croxatto, A., Prod'hom, G., Greub, G., 2012. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology, *FEMS Microbiology Reviews*, 36, 380–407. doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00298.x.
- Cruickshank, T. E., Hahn, M. W., 2014. Reanalysis suggests that genomic islands of speciation are due to reduced diversity, not reduced gene flow, *Molecular Ecology*, 23, 3133–3157. doi: 10.1111/mec.12796.
- 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 Parasitologyjournal of Parasitology*, 9, 239–248.
- Da Cunha, A. M., 1938. A aglutinação e o diagnostico diferencial das leishmanias, *Brasil-Medico*, 38, 849–855.
- Da Cunha, A. M., Chagas, E., 1937. Nova especie de protozoario do genero *Leishmania* pathogenica para o homen: *Leishmania chagasi* n.sp., *Instituto Oswaldo Cruz*, XI, 148–152.
- Cupolillo, E., Grimaldi, G., Momen, H., 1994. A general classification of new world *Leishmania* using numerical zymotaxonomy, *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 50, 296–311. doi: 10.4269/ajtmh.1994.50.296.
- Cupolillo, E., Grimaldi, G., Momen, H., Beverley, S. M., 1995. Intergenic region typing (IRT): a rapid molecular approach to the characterization and evolution of *Leishmania*, *Molecular and Biochemical Parasitology*, 73, 145–155. doi: 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*, 16, 142–144. doi: 10.1016/S0169-4758(99)01609-9.
- Decker, J. E., Schrot, J. R., Levin, G. V., 1977. Identification of *Leishmania* spp. by radiorespirometry, *The Journal of Protozoology*, 24, 463–70.
- Dereure, J., 1999. Réservoirs des leishmanies, en Dedet, J.-P. (Ed.), *Les Leishmaniasés*, Ellipses, pp. 109–130.
- Dereure, J., El-Safi, S. H., Bucheton, B., Boni, M., Kheir, M. M., Davoust, B., Pratlong, F., Feugier, E., Lambert, M., Dessein, A., Dedet, J. P., 2003. Visceral leishmaniasis in

- eastern Sudan: parasite identification in humans and dogs; Host-parasite relationships, *Microbes and Infection*, 5, 1103–1108. doi: 10.1016/j.micinf.2003.07.003.
- Dereure, J., Rioux, J. A., Gállego, M., Perières, J., Pratlong, F., Mahjour, J., Saddiki, H., 1991. *Leishmania tropica* in Morocco: infection dogs, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 85, 595.
- Desjeux, P., Alvar, J., 2003. *Leishmania*/HIV co-infections: epidemiology in Europe, *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 97, S3–S15. doi: 10.1179/000349803225002499.
- Dey, A., Singh, S., 2006. Transfusion transmitted leishmaniasis: a case report and review of literature, *Indian Journal of Medical Microbiology*, 24, 165–170.
- Dirección General de Salud Pública, Consejería de Sanidad de la Comunidad de Madrid, 2015. Leishmaniasis en la Comunidad de Madrid, *Documentos Técnicos de Salud Pública*, pp. 63.
- Domagalska, M. A., Dujardin, J.-C., 2020. Next-generation molecular surveillance of TriTryp diseases, *Trends in Parasitology*, 36, 356–367. doi: 10.1016/j.pt.2020.01.008.
- Downing, T., Imamura, H., Decuypere, S., Clark, T. G., Coombs, G. H., Cotton, J. A., Hilley, J. D., De Doncker, S., Maes, I., Mottram, J. C., Quail, M. A., Rijal, S., Sanders, M., Schönian, G., Stark, O., Sundar, S., Vanaerschot, M., Hertz-Fowler, C., Dujardin, J. - C., Berriman, M., 2011. Whole genome sequencing of multiple *Leishmania donovani* clinical isolates provides insights into population structure and mechanisms of drug resistance, *Genome Research*, 21, 2143–2156. doi: 10.1101/gr.123430.111.
- Drini, S., Criscuolo, A., Lechat, P., Imamura, H., Skalický, T., Rachidi, N., Lukeš, J., Dujardin, J. -C., Späth, G. F., 2016. Species and strain-specific adaptation of the HSP70 super family in pathogenic trypanosomatids, *Genome Biology and Evolution*, 8, 1980–1995. doi: 10.1093/gbe/evw140.
- Dujardin, J. -C., Bañuls, 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, 293–307. doi: 10.1016/0001-706X(95)00094-U.
- 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. M., 2016. HGVS recommendations for the description of sequence variants: 2016 Update, *Human Mutation*, 37, 564–569. doi: 10.1002/humu.22981.
- Dvorak, V., Shaw, J., Volf, P., 2018. Parasite biology: the vectors, en Bruschi, F. y Gradoni, L. (Eds.), *The Leishmaniasis: Old Neglected Tropical Diseases*, Springer, pp. 31–78.
- Elamin, E. M., Guerbouj, S., Musa, A. M., Guizani, I., Khalil, E. A. G., Mukhtar, M. M., Elkadaro, A. M. Y., Mohamed, H. S., Ibrahim, M. E., Abdel Hamid, M. M., El Azhari, M., El Hassan, A. M., 2005. Uncommon clinical presentations of cutaneous leishmaniasis in Sudan, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 99, 803–808. doi: 10.1016/j.trstmh.2005.04.009.
- Elamin, E. M., Guizani, I., Guerbouj, S., Gramiccia, M., El Hassan, A. M., Di Muccio, T., Taha, M. A., Mukhtar, M. M., 2008. Identification of *Leishmania donovani* as a cause

- 
- of cutaneous leishmaniasis in Sudan, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 102, 54–57. doi: 10.1016/j.trstmh.2007.10.005.
- Eroglu, F., Uzun, S., Koltas, I. S., 2014. Comparison of clinical samples and methods in chronic cutaneous leishmaniasis, *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 91, 895–900. doi: 10.4269/ajtmh.13-0582.
- Ersts, P. J., 2019. Geographic Distance Matrix Generator (version 1.2.3), American Museum of Natural History, Center for Biodiversity and Conservation. (online: [http://biodiversityinformatics.amnh.org/open\\_source/gdmg](http://biodiversityinformatics.amnh.org/open_source/gdmg)).
- 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, 430–442. doi: 10.1017/S0031182016002092.
- Evers, D. L., Frye, F. A., Weina, P. J., 2018. A simple empirical algorithm to distinguish among *Leishmania braziliensis*, *major*, and *tropica* species by MALDI-TOF mass spectrometry, *Journal of Microbiological Methods*, 148, 46–48. doi: 10.1016/j.mimet.2017.12.009.
- Fernandes Santos, A., Cayô, R., Schandert, L., Gales, A. C., 2013. Evaluation of MALDI-TOF MS in the microbiology laboratory, *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 49, 191–197. doi: 10.1590/S1676-24442013000300006.
- 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*, in press.
- Fernández Martínez, B., Gómez Barroso, D., Cano Portero, R., 2019. La leishmaniasis en España: evolución de los casos notificados a la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica desde 2005 a 2017 y resultados de la vigilancia de 2014 a 2017, *Boletín epidemiológico semanal*, 27, 15–27.
- Figueiredo de Sá, B. S. L., Rezende, A. M., De Melo Neto, O. P., De Brito, M. E. F., Brandão Filho, S. P., 2019. Identification of divergent *Leishmania (Viannia) braziliensis* ecotypes derived from a geographically restricted area through whole genome analysis, *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 13, e0007382. doi: 10.1371/journal.pntd.0007382.
- Figueiró-Filho, E. A., Duarte, G., El-Beitune, P., Quintana, S. M., Maia, T. L., 2004. Visceral leishmaniasis (kala-azar) and pregnancy, *Infectious Disease in Obstetrics and Gynecology*, 12, 31–40. doi: 10.1080/1064744042000210384.
- Flores-Figueroa, J., Okhuysen, P. C., Von Sonnenburg, F., DuPont, H. L., Libman, M. D., Keystone, J. S., Hale, D. C., Burchard, G., Han, P. V., Wilder-Smith, A., Freedman, D. O., 2011. Patterns of illness in travelers visiting Mexico and Central America: the GeoSentinel experience, *Clinical Infectious Diseases*, 53, 523–531. doi: 10.1093/cid/cir468.
- 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, 369–377. doi: 10.1017/S0031182006001570.
- Folgueira, C., Requena, J. M., 2007. A postgenomic view of the heat shock proteins in

- kinetoplastids, *FEMS Microbiology Reviews*, 31, 359–377. doi: 10.1111/j.1574-6976.2007.00069.x.
- Foulet, F., Botterel, F., Buffet, P., Morizot, G., Rivollet, D., Deniau, M., Pratlong, F., Costa, J. M., Bretagne, S., 2007. Detection and identification of *Leishmania* species from clinical specimens by using a real-time PCR assay and sequencing of the cytochrome b gene, *Journal of Clinical Microbiology*, 45, 2110–2115. doi: 10.1128/JCM.02555-06.
- Fraga, J., 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, 229–237. doi: 10.1016/j.meegid.2013.05.020.
- 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, 238–245. doi: 10.1016/j.meegid.2009.11.007.
- Fraga, J., Montalvo, A. M., Maes, L., Dujardin, J.-C., Van der Auwera, G., 2013. HindII and SduI digests of heat-shock protein 70 PCR for *Leishmania* typing, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 77, 245–247. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2013.07.023.
- Franssen, S. U., Durrant, C., Stark, O., Moser, B., Downing, T., Imamura, H., Dujardin, J.-C., Sanders, M. J., Maurício, I., Miles, M. A., Schnur, L. F., Jaffe, C. L., Nasereddin, A., Schallig, H., Yeo, M., Bhattacharyya, T., Alam, M. Z., Berriman, M., Wirth, T., Schönian, G., Cotton, J. A., Lionel, F., Jaffe, C. L., Nasereddin, A., Schallig, H., Yeo, M., Alam, M. Z., Berriman, M., Wirth, T., Cotton, J. A., Campus, W. G., Diseases, T., 2020. Global genome diversity of the *Leishmania donovani* complex, *eLife*, 9, e51243. doi: 10.7554/eLife.51243
- Freites-Martinez, A., Córdoba, S., Bermejo, A., Borbujo, J., 2015. Mucocutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* var Lombardi in an immunocompetent patient, Spain, *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 33, 7, 499–500. doi: 10.1016/j.eimc.2014.11.012.
- Galán-Puchades, M. T., Gómez-Samblás, M., Suárez-Morán, J. M., Osuna, A., Sanxis-Furió, J., Pascual, J., Bueno-Marí, R., Franco, S., Peracho, V., Montalvo, T., Fuentes, M. V., 2019. Leishmaniasis in norway rats in sewers, Barcelona, Spain, *Emerging Infectious Diseases*, 25, 1222–1224. doi: 10.3201/eid2506.181027.
- Gállego Berenguer, J., 2007. Mastigoforos hemotisulares. Orden Kinetoplastida, en *Manual de Parasitología. Morfología y biología de los parásitos de interés sanitario*. 3ª edición, Universitat de Barcelona, pp. 148–165.
- Gállego, M., Carrió, J., Castillejo, S., Fisa, R., Iniesta, L., López, P., Montoya, L., Riera, C., Tebar, S., Portús, M., 2003. Banco de cepas de *Leishmania* de la Universidad de Barcelona, *Revista Ibérica de Parasitología*, 63, 43–45.
- Gállego, M., Pratlong, F., Fisa, R., Riera, C., Rioux, J. A., Dedet, J. -P., Portús, M., 2001. The life-cycle of *Leishmania infantum* MON-77 in the Priorat (Catalonia, Spain) involves humans, dogs and sandflies; also literature review of distribution and hosts of

- 
- L. infantum* zymodemes in the Old World, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 95, 269–271. doi: 10.1016/S0035-9203(01)90231-7.
- Gállego, M., Riera, C., 2000. Leishmaniosis autóctona por *Leishmania infantum*, *Revisiones Temáticas. Sociedad Española de Enfermedades infecciosas y Microbiología Clínica*. (online: <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/parasitologia/leish.pdf>).
- García-Almagro, D., 2005. Leishmaniasis cutánea, *Actas Dermo-Sifiliográficas*, 96, 1–24. doi: 10.1016/S0001-7310(05)73027-1.
- García, L., Kindt, A., Bermudez, H., Llanos-Cuentas, A., De Doncker, S., Arévalo, J., Wilber 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, 2294–2297. doi: 10.1128/jcm.42.5.2294-2297.2004.
- Gardener, P. J., Chance, M. L., Peters, W., 1974. Biochemical taxonomy of *Leishmania*, *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 68, 317–325. doi: 10.1080/00034983.1974.11686954.
- Garnham, P. C., 1971. The genus *Leishmania*, *Bulletin of the World Health Organization*, 44, 477–489.
- Garrido-Jareño, M., Sahuquillo-Torralla, A., Chouman-Arcas, R., Castro-Hernández, I., Molina-Moreno, J. M., Llavador-Ros, M., Gómez-Ruiz, M. D., López-Hontangas, J. L., Botella-Estrada, R., Salavert-Lleti, M., Pemán-García, J., 2020. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: experience of a Mediterranean hospital, *Parasites & Vectors*, 13, 1–7. doi: 10.1186/s13071-020-3901-1.
- Gebhardt, M., Ertas, B., Falk, T. M., Blödorn-Schlicht, N., Metze, D., Böer-Auer, A., 2015. Fast, sensitive and specific diagnosis of infections with *Leishmania* spp. in formalin-fixed, paraffin-embedded skin biopsies by cytochrome b polymerase chain reaction, *British Journal of Dermatology*, 173, 1239–1249. doi: 10.1111/bjd.14088.
- Ghouila, A., Guerfali, F. Z., Atri, C., Bali, A., Attia, H., Sghaier, R. M., Mkannez, G., Dickens, N. J., Laouini, D., 2017. Comparative genomics of Tunisian *Leishmania major* isolates causing human cutaneous leishmaniasis with contrasting clinical severity, *Infection, Genetics and Evolution*, 50, 110–120. doi: 10.1016/j.meegid.2016.10.029.
- Giancchetti, E., Montomoli, E., 2020. The enemy at home: leishmaniasis in the Mediterranean basin, Italy on the focus, *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 18, 563–577. doi: 10.1080/14787210.2020.1751611.
- Giavedoni, P., Iranzo, P., Fuertes, I., Estrach, T., Alsina Gibert, M., 2015. Leishmaniasis cutánea. Experiencia de 20 años en un hospital español de tercer nivel, *Actas Dermo-Sifiliográficas*, 106, 310–316. doi: 10.1016/j.ad.2014.12.003.
- Gil-Prieto, R., Walter, S., Alvar, J., De Miguel, A. G., 2011. Epidemiology of leishmaniasis in Spain based on hospitalization records (1997–2008), *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 85, 820–825. doi: 10.4269/ajtmh.2011.11-0310.
- Gil Collado, J., Morillas Márquez, F., Sanchís Marín, M., 1989. Los flebotomos en España, *Revista de Sanidad e Higiene Pública*, 63, 15–34.

- González-De La Fuente, S., Peiró-Pastor, R., Rastrojo, A., Moreno, J., Carrasco-Ramiro, F., Requena, J. M., Aguado, B., 2017. Resequencing of the *Leishmania infantum* (strain JPCM5) genome and de novo assembly into 36 contigs, *Scientific Reports*, 7, 18050. doi: 10.1038/s41598-017-18374-y.
- González, E., Jiménez, M., Hernández, S., Martín-Martín, I., Molina, R., 2017. Phlebotomine sand fly survey in the focus of leishmaniasis in Madrid, Spain (2012-2014): seasonal dynamics, *Leishmania infantum* infection rates and blood meal preferences, *Parasites & Vectors*, 10, 368. doi: 10.1186/s13071-017-2309-z.
- Goto, H., Lindoso, A. J., 2010. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis, *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 8, 419–433. doi: 10.1586/eri.10.19.
- Gouzelou, E., Haralambous, C., Antoniou, M., Christodoulou, V., Martinković, F., Živičnjak, T., Smirlis, D., Pralong, F., Dedet, J. -P., Özbek, Y., Toz, S., Presber, W., Schönián, G., Soteriadou, K., 2013. Genetic diversity and structure in *Leishmania infantum* populations from southeastern Europe revealed by microsatellite analysis, *Parasites & Vectors*, 6, 342. doi: 10.1186/1756-3305-6-342.
- Gradoni, L., López-Vélez, R., Mokni, M., 2017. Manual on case management and surveillance of the leishmaniasis in the WHO European Region, *World Health Organization Regional Office for Europe*, Copenhagen, pp. 62
- Gramiccia, M., 2003. The identification and variability of the parasites causing leishmaniasis in HIV-positive patients in Italy, *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 97, 65–73. doi: 10.1179/000349803225002543.
- Gramiccia, M., Gradoni, L., 2005. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control, *International Journal for Parasitology*, 35, 1169–1180. doi: 10.1016/j.ijpara.2005.07.001.
- Gramiccia, M., Di Muccio, T., 2018. Diagnosis, en Bruschi, F. y Gradoni, L. (Eds.), *The Leishmaniasis: Old Neglected Tropical Diseases*, Springer, pp. 137–168.
- Gramiccia, M., Scalone, A., Di Muccio, T., Orsini, S., Fiorentino, E., Gradoni, L., 2013. The burden of visceral leishmaniasis in Italy from 1982 to 2012: a retrospective analysis of the multi-annual epidemic that occurred from 1989 to 2009, *Eurosurveillance*, 18, 20535. doi: 10.2807/1560-7917.ES2013.18.28.20535.
- Greenblatt, C. L., Schnur, L. F., Bar-Gal, G. K., Ermolaev, H., Peleg, N., Barrett, M. P., 2002. Polymorphism among alleles of the 6-phosphogluconate dehydrogenase gene from *Leishmania major* and *Leishmania tropica*, *Molecular and Biochemical Parasitology*, 125, 185–188. doi: 10.1016/S0166-6851(02)00213-X.
- Van Griensven, J., Diro, E., 2012. Visceral Leishmaniasis, *Infectious Disease Clinics of North America*, 26, 309–322. doi: 10.1016/j.idc.2012.03.005.
- Guerbouj, S., Victoir, K., Guizani, I., Seridi, N., Nuwayri-Salti, N., Belkaid, M., Ben Ismail, R., Ray, D. L. E., Dujardin, J. C., 2001. Gp63 gene polymorphism and population structure of *Leishmania donovani* complex: influence of the host selection pressure?, *Parasitology*, 122, 25–35. doi: 10.1017/S0031182000007125.
- Guilvard, E., Gállego, M., Moreno, G., Fisa, R., Rispaíl, P., Pralong, F., 1996. Infestation

- 
- naturelle de *Phlebotomus ariasi* et *Phlebotomus perniciosus* (Diptera-Psychodide) par *Leishmania infantum* (Kinetoplastida-Trypanosomatida) en Catalogne (Espagne), *Parasite*, 3, 191–192.
- Guindon, S., Dufayard, J. F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., Gascuel, O., 2010. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0, *Systematic Biology*, 59, 307–321. doi: 10.1093/sysbio/syq010.
- El Hamouchi, A., Daoui, O., Ait Kbaich, M., Mhaidi, I., El Kacem, S., Guizani, I., Sarih, M., Lemrani, M., 2019. Epidemiological features of a recent zoonotic cutaneous leishmaniasis outbreak in Zagora province, southern Morocco, *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 13, e0007321. doi: 10.1371/journal.pntd.0007321.
- 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 & Vectors*, 7, 501. doi: 10.1186/s13071-014-0501-y.
- Herrador, Z., Gherasim, A., Jimenez, B. C., Granados, M., San Martín, J. V., Aparicio, P., 2015. Epidemiological changes in leishmaniasis in Spain according to hospitalization-based records, 1997–2011: raising awareness towards leishmaniasis in non-HIV patients, *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9, e0003594. doi: 10.1371/journal.pntd.0003594.
- Herremans, T., Pinelli, E., Casparie, M., Nozari, N., Roelfsema, J., Kortbeek, L., 2010. Increase of imported leishmaniasis in the Netherlands: a twelve year overview (1996–2007), *International Health*, 2, 42–46. doi: 10.1016/j.inhe.2009.12.005.
- Herrera, G., Hernández, C., Ayala, M. S., Flórez, C., Teherán, A. A., Ramírez, J. D., 2017. Evaluation of a multilocus sequence typing (MLST) scheme for *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *Leishmania* (*Viannia*) *panamensis* in Colombia, *Parasites & Vectors*, 10, 1, 236. doi: 10.1186/s13071-017-2175-8.
- Horrillo, L., San Martín, J. V., Molina, L., Madroñal, E., Matía, B., Castro, A., García-Martínez, J., Barrios, A., Cabello, N., Arata, I. G., Casas, J. M., Ruiz Giardin, J. M., 2015. Atypical presentation in adults in the largest community outbreak of leishmaniasis in Europe (Fuenlabrada, Spain), *Clinical Microbiology and Infection*, 21, 269–273. doi: 10.1016/j.cmi.2014.10.017.
- Hosseini-Safa, A., Mohebbali, M., Hajjaran, H., Akhoundi, B., Zarei, Z., Arzamani, K., Davari, A., 2018. High resolution melting analysis as an accurate method for identifying *Leishmania infantum* in canine serum samples, *Journal of Vector Borne Diseases*, 55, 315–320. doi: 10.4103/0972-9062.256568.
- Huson, D. H., Bryant, D., 2006. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies, *Molecular Biology and Evolution*, 23, 254–267. doi: 10.1093/molbev/msj030.
- Imamura, H., Downing, T., Van den Broeck, F., Sanders, M. J., Rijal, S., Sundar, S., Mannaert, A., Vanaerschot, M., Berg, M., De Muylder, G., Dumetz, F., Cuypers, B., Maes, I., Domagalska, M., Decuypere, S., Rai, K., Uranw, S., Bhattarai, N. R., Khanal, B., Prajapati, V. K., Sharma, S., Stark, O., Schönian, G., De Koning, H. P., Settimo, L., Vanhollebeke, B., Roy, S., Ostyn, B., Boelaert, M., Maes, L., Berriman, M.,

- Dujardin, J.-C., Cotton, J. A., 2016. Evolutionary genomics of epidemic visceral leishmaniasis in the Indian subcontinent, *eLife*, 5, e12613. doi: 10.7554/eLife.12613.
- Inga, R., De Doncker, S., Gomez, J., Lopez, M., Garcia, R., Le Ray, D., Arévalo, J., Dujardin, J. -C., 1998. Relation between variation in copy number of ribosomal RNA encoding genes and size of harbouring chromosomes in *Leishmania* of subgenus *Viannia*, *Molecular and Biochemical Parasitology*, 92, 219–228. doi: 10.1016/S0166-6851(98)00009-7.
- Instituto Nacional de Estadística, 2020. Flujo de inmigración procedente del extranjero por año, país de origen y nacionalidad (española/extranjera), *Estadística de migraciones*. (online: <https://www.ine.es/dynt3/inebase/index.htm?padre=3694&capsel=1964>).
- Jacobson, R. L., Slutzky, G. M., Slutzky, G. M., Greenblatt, C. L., Schnur, L. F., 1982. Surface reaction of *Leishmania*: I. Lectin-mediated agglutination, *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 76, 45–52. doi: 10.1080/00034983.1982.11687503.
- Jaén-Sánchez, N., Suárez-Hormiga, L., Carranza-Rodríguez, C., Hernández-Cabrera, M., Pisos-Álamo, E., García-Reina, L., Pérez-Arellano, J. L., 2016. Características demográficas, quimioprofilaxis antimalárica e inmunoprofilaxis en 6.783 viajeros internacionales atendidos en una unidad monográfica, *Revista Española de Quimioterapia*, 29, 249–254.
- Jamjoom, M. B., Ashford, R. W., Bates, P. A., Chance, M. L., Kemp, S. J., Watts, P. C., Noyes, H. A., 2004. *Leishmania donovani* is the only cause of visceral leishmaniasis in East Africa; previous descriptions of *L. infantum* and '*L. archibaldi*' from this region are a consequence of convergent evolution in the isoenzyme data, *Parasitology*, 129, 399–409. doi: 10.1017/S0031182004005955.
- Jiménez, M., Ferrer-Dufol, M., Cañavate, C., Gutiérrez-Solar, B., Molina, R., Lagun, F., López-Vélez, R., Cercenado, E., Daudén, E., Blazquez, J., Ladrón de Guevara, C., Gómez, J., De la Torre, J., Barros, C., Altes, J., Serra, T., Alvar, J., 1995. Variability of *Leishmania (Leishmania) infantum* among stocks from immunocompromised, immunocompetent patients and dogs in Spain, *FEMS Microbiology Letters*, 131, 197–204. doi: 10.1016/0378-1097(95)00259-8.
- Jiménez, M., González, E., Martín-Martín, I., Hernández, S., Molina, R., 2014. Could wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) be reservoirs for *Leishmania infantum* in the focus of Madrid, Spain?, *Veterinary Parasitology*, 202, 296–300. doi: 10.1016/j.vetpar.2014.03.027.
- Karunaweera, N. D., Pralong, F., Siriwardane, H. V. Y. D., Ihalamulla, R. L., Dedet, J. -P., 2003. Sri Lankan cutaneous leishmaniasis is caused by *Leishmania donovani* zymodeme MON-37, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 97, 380–381. doi: 10.1016/S0035-9203(03)90061-7.
- Kassahun, A., Sadlova, J., Dvorak, V., Kostalova, T., Rohousova, I., Frynta, D., Aghova, T., Yasur-Landau, D., Lemma, W., Hailu, A., Baneth, G., Warburg, A., Volf, P., Votypka, J., 2015. Detection of *Leishmania donovani* and *L. tropica* in Ethiopian wild rodents, *Acta Tropica*, 145, 39–44. doi: 10.1016/j.actatropica.2015.02.006.
- Kato, H., Cáceres, A. G., Mimori, T., Ishimaru, Y., Sayed, A. S. M., Fujita, M., Iwata, H.,



- 
- Uezato, H., Velez, L. N., Gomez, E. A. L., Hashiguchi, Y., 2010. Use of FTA cards for direct sampling of patients' lesions in the ecological study of cutaneous leishmaniasis, *Journal of Clinical Microbiology*, 48, 3661–3665. doi: 10.1128/JCM.00498-10.
- 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., Yamamoto, D. S., 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, e0007496. doi: 10.1371/journal.pntd.0007496.
- 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, 90–100. doi: 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, 449–460. doi: 10.1016/j.ijpara.2020.03.003.
- Killick-Kendrick, R., 1999. The biology and control of Phlebotomine sand flies, *Clinics in Dermatology*, 17, 279–289.
- Knöpfel, N., Noguera-Morel, L., Azorin, D., Sanz, F., Torrelo, A., Hernández-Martín, A., 2018. Cutaneous *Leishmania tropica* in children: report of three imported cases successfully treated with liposomal amphotericin B, *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 32, e8–e10. doi: 10.1111/jdv.14434.
- Kocher, A., Valière, 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, 585–594. doi: 10.1017/S0031182017002013.
- Kone, A. K., Thera, M. A., Faye, B., Doumbo, O. K., 2018. Leishmaniasis in West Africa: past and current, en *Leishmaniasis as Re-emerging Diseases*, InTech, pp. 27–35. doi: 10.5772/intechopen.77009.
- Kostygov, A. Y., Yurchenko, V., 2017. Revised classification of the subfamily Leishmaniinae (Trypanosomatidae), *Folia Parasitologica*, 64, 020. doi: 10.14411/fp.2017.020.
- Kuhls, K., Alam, M. Z., Cupolillo, E., Ferreira, G. E. M., Maurício, I. L., Oddone, R., Feliciangeli, M. D., Wirth, T., Miles, M. A., Schönian, G., 2011. Comparative microsatellite typing of New World *Leishmania infantum* reveals low heterogeneity among populations and its recent Old World origin, *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5, e1155. doi: 10.1371/journal.pntd.0001155.
- Kuhls, K., Chicharro, C., Cañavate, C., Cortes, S., Campino, L., Haralambous, C., Soteriadou, K., Pratlong, F., Dedet, J. -P., Maurício, I. L., Miles, M., Schaar, M., Ochsenschreier, S., Radtke, O. A., Schönian, G., 2008. Differentiation and gene flow among European populations of *Leishmania infantum* MON-1, *PLoS Neglected*

- Tropical Diseases*, 2, e261. doi: 10.1371/journal.pntd.0000261.
- Kuhls, K., Maurício, I. L., 2019. Phylogenetic Studies, en Clos, J. (Ed.), *Leishmania, Methods in Molecular Biology*, New York, Humana Press, pp. 9–68. doi: 10.1007/978-1-4939-9210-2\_2.
- Kuhls, K., Maurício, 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, 1224–1234. doi: 10.1016/j.micinf.2005.04.009.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K., 2018. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms, *Molecular Biology and Evolution*, 35, 6, 1547–1549. doi: 10.1093/molbev/msy096.
- Kwakye-Nuako, G., Mosore, M.-T., Duplessis, C., Bates, M. D., Puplampu, N., Mensah-Attipoe, I., Desewu, K., Afegbe, G., Asmah, R. H., Jamjoom, M. B., Ayeh-Kumi, P. F., Boakye, D. A., Bates, P. A., 2015. First isolation of a new species of *Leishmania* responsible for human cutaneous leishmaniasis in Ghana and classification in the *Leishmania enriettii* complex, *International Journal for Parasitology*, 45, 679–684. doi: 10.1016/j.ijpara.2015.05.001.
- 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., 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, 2924–2933. doi: 10.1128/JCM.00845-17.
- Lainson, R., Shaw, J. J., 1987. Evolution, classification and geographical distribution, en Peters, W. y Killick-Kendrick, R. (Eds.), *The Leishmaniases in Biology and Medicine*, London, Academic Press, pp. 1–120.
- Lanotte, G., Rioux, J. A., Lepart, J., 1984. Contribution de la cladistique numerique a la phyletique du genre *Leishmania* Ross, 1903 (Kinetoplastida-Trypanosomatidae). Utilisation des caracteres enzymatiques, *Comptes Rendus des Seances de l'Academie des Sciences - Series III*, 299, 769–772.
- Lanotte, G., Rioux, J. A., Maazoun, R., Pasteur, N., Pratlong, F., Lepart, J., 1981. Application de la méthode numérique a la taxonomie du genre *Leishmania* Ross, 1903, *Annales de Parasitologie*, 56, 575–592.
- Lauthier, J. J., Korenaga, M., 2018. Immunological and immunopathological aspects, en Bruschi, F. y Gradoni, L. (Eds.), *The Leishmaniases: Old Neglected Tropical Diseases*, Springer, pp. 107–126.
- Lauthier, J. J., Ruybal, P., Barroso, P. A., Hashiguchi, Y., Marco, J. D., Korenaga, M., 2020. Development of a multilocus sequence typing (MLST) scheme for Pan-*Leishmania*, *Acta Tropica*, 201, 105189. doi: 10.1016/j.actatropica.2019.105189.
- Leblois, R. L., Kuhls, K., François, O., Schönian, G., Wirth, T., Schö Nian, G., Wirth, T., 2011. Guns, germs and dogs: on the origin of *Leishmania chagasi*, *Infection, Genetics and Evolution*, 11, 1091–1095. doi: 10.1016/j.meegid.2011.04.004.

- 
- De Lima, H., Rodríguez, N., Feliciangeli, M. D., Barrios, M. A., Sosa, A., Agrela, I., Sánchez, E., Lopez, O., 2009. Cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania chagasi/Le. infantum* in an endemic area of Guarico State, Venezuela, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 103, 721–726. doi: 10.1016/j.trstmh.2008.11.019.
- Liu, B., Liu, Y., Motyka, S. A., Agbo, E. E. C., Englund, P. T., 2005. Fellowship of the rings: the replication of kinetoplast DNA, *Trends in Parasitology*, 21, 363–369. doi: 10.1016/j.pt.2005.06.008.
- Lockard, R. D., Wilson, M. E., Rodríguez, N. E., 2019. Sex-related differences in immune response and symptomatic manifestations to infection with *Leishmania* species, *Journal of Immunology Research*, 2019, 4103819. doi: 10.1155/2019/4103819.
- Lopes, E. G., Geraldo Junior, C. A., Marcili, A., Silva, R. D., Keid, L. B., Oliveira, T. M. F. S., Soares, R. M., 2016. Performance of conventional PCRs based on primers directed to nuclear and mitochondrial genes for the detection and identification of *Leishmania* spp, *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 58, 41. doi: 10.1590/S1678-9946201658041.
- Lopez, M., Inga, R., Cangalaya, M., Echevarria, J., Llanos-Cuentas, A., Orrego, C., Arévalo, J., 1993. Diagnosis of *Leishmania* using the polymerase chain reaction: a simplified procedure for field work, *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 49, 348–356. doi: 10.4269/ajtmh.1993.49.348.
- Lukeš, J., Lys Guilbride, D., Votýpka, J., Zíková, A., Benne, R., Englund, P. T., 2002. Kinetoplast DNA network: evolution of an improbable structure, *Eukaryotic Cell*, 1, 495–502. doi: 10.1128/EC.1.4.495-502.2002.
- Lukes, J., Maurício, I. L., Schonian, G., Dujardin, J.-C., Soteriadou, K., Dedet, J.-P., Kuhls, K., Tintaya, K. W. Q., Jirku, M., Chocholova, E., Haralambous, C., Pratlong, F., Obornik, M., Horak, 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*, 104, 9375–9380. doi: 10.1073/pnas.0703678104.
- Luque-González, M. A., Tabraue-Chávez, M., López-Longarela, B., María Sánchez-Martín, R., Ortiz-González, M., Soriano-Rodríguez, M., García-Salcedo, J. A., Pernagallo, S., Díaz-Mochón, J. J., 2018. Identification of Trypanosomatids by detecting single nucleotide fingerprints using DNA analysis by dynamic chemistry with MALDI-TOF, *Talanta*, 176, 299–307. doi: 10.1016/j.talanta.2017.07.059.
- Luyo-Acero, G. E., Uezato, H., Oshiro, M., Takei, K., Kariya, K., Katakura, K., Gomez-Landires, E., Hashiguchi, Y., Nonaka, S., 2004. Sequence variation of the cytochrome b gene of various human infecting members of the genus *Leishmania* and their phylogeny, *Parasitology*, 128, 483–491. doi: 10.1017/S0031182004004792.
- Maazoun, R., Lanotte, G., Pasteur, N., Rioux, J. A., Kennou, M. F., Pratlong, F., 1981. Écologie des leishmanioses dans le sud de la France, *Annales de Parasitologie*, 56, 131–146. doi: 10.1051/parasite/1985603221.
- Machado, G. U., Prates, F. V., Machado, P. R. L., 2019. Disseminated leishmaniasis: Clinical, pathogenic, and therapeutic aspects, *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 94, 9–16. doi: 10.1590/abd1806-4841.20198775.

- Mahboudi, F., Abolhassani, M., Tehrani, S. R., Azimi, M., Asmar, M., 2002. Differentiation of Old and New World *Leishmania* species at complex and species levels by PCR, *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 34, 756–758. doi: 10.1080/0036554021000026930.
- Maia, C., Dantas-Torres, F., Campino, L., 2018. Parasite biology: the reservoir hosts, en Bruschi, F. y Gradoni, L. (Eds.), *The Leishmaniasis: Old Neglected Tropical Diseases*, Springer, pp. 79–106.
- Maldonado, N., Robledo, C., Robledo, J., 2017. La espectrometría de masas MALDI-TOF en el laboratorio de microbiología clínica, *Infectio*, 22, 35–45. doi: 10.22354/in.v0i0.703.
- Mansueto, P., Seidita, A., Vitale, G., Cascio, A., 2014. Leishmaniasis in travelers: a literature review, *Travel Medicine and Infectious Disease*, 12, 563–581. doi: 10.1016/j.tmaid.2014.09.007.
- Marcoval, J., Penín, R. M., 2017. Evolution of cutaneous leishmaniasis in the last 30 years in a tertiary hospital of the European Mediterranean coast, *International Journal of Dermatology*, 56, 750–753. doi: 10.1111/ijd.13588.
- Marfurt, J., Nasereddin, A., Niederwieser, I., Jaffe, C. L., Beck, H. P., Felger, I., 2003a. Identification and differentiation of *Leishmania* species in clinical samples by PCR amplification of the miniexon sequence and subsequent restriction fragment length polymorphism analysis, *Journal of Clinical Microbiology*, 41, 3147–3153. doi: 10.1128/JCM.41.7.3147-3153.2003.
- Marfurt, J., Niederwieser, I., Makia, N. D., Beck, H.-P., Felger, I., 2003b. Diagnostic genotyping of Old and New World *Leishmania* species by PCR-RFLP, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 46, 115–124. doi: 10.1016/S0732-8893(03)00040-3.
- Maroli, M., Feliciangeli, M. D., Bichaud, L., Charrel, R. N., Gradoni, L., 2013. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern, *Medical and Veterinary Entomology*, 27, 123–147. doi: 10.1111/j.1365-2915.2012.01034.x.
- Martín-Sánchez, J., Acedo, C., Muñoz-Pérez, M., Pesson, B., Marchal, O., Morillas-Márquez, F., 2007. Infection by *Leishmania infantum* in cats: epidemiological study in Spain, *Veterinary Parasitology*, 145, 267–273. doi: 10.1016/j.vetpar.2006.11.005.
- Martín-Sánchez, J., Gramiccia, M., Di Muccio, T., Ludovisi, A., Morillas-Márquez, F., 2004. Isoenzymatic polymorphism of *Leishmania infantum* in southern Spain, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 98, 228–232. doi: 10.1016/S0035-9203(03)00060-9.
- Martín-Sánchez, J., Navarro-Mari, J. M., Pasquau-Liaño, J., Salomón, O. D., Morillas-Márquez, F., 2004. Visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* in a Spanish patient in Argentina: what is the origin of the infection? Case report, *BMC infectious diseases*, 4, 20. doi: 10.1186/1471-2334-4-20.
- Martín-Sánchez, J., Rodríguez-Granger, J., Morillas-Márquez, F., Merino-Espinosa, G., Sampedro, A., Aliaga, L., Corpas-López, V., Tercedor-Sánchez, J., Aneiros-

- 
- Fernández, J., Acedo-Sánchez, C., Porcel-Rodríguez, L., Díaz-Sáez, V., 2020. Leishmaniasis due to *Leishmania infantum*: integration of human, animal and environmental data through a One Health approach, *Transboundary and Emerging Diseases*, 00, 1–12. doi: 10.1111/tbed.13580.
- Martínez-Calvillo, S., Sunkin, S. M., Yan, S., Fox, M., Stuart, K., Myler, P. J., 2001. Genomic organization and functional characterization of the *Leishmania major* Friedlin ribosomal RNA gene locus, *Molecular and Biochemical Parasitology*, 116, 147–157. doi: 10.1016/S0166-6851(01)00310-3.
- Maurício, I., Howard, M. K., Stothard, J. R., Miles, M. A., 1999. Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex, *Parasitology*, pp. 237–246. doi: 10.1017/S0031182099004710.
- Maurício, I. L., 2018. *Leishmania* taxonomy, en Bruschi, F. and Gradoni, L. (Eds.), *The Leishmaniasis: Old Neglected Tropical Diseases*, Springer, pp. 15–30.
- Maurício, 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, 565–576. doi: 10.1016/j.ijpara.2006.11.020.
- Maurício, I. L., Gaunt, M. W., Stothard, J. R., Miles, M. A., 2001. Genetic typing and phylogeny of the *Leishmania donovani* complex by restriction analysis of PCR amplified gp63 intergenic regions, *Parasitology*, 122, 393–403. doi: 10.1017/S0031182001007466.
- Maurício, I. L., Stothard, J. R., Miles, M. A., 2004. *Leishmania donovani* complex: Genotyping with the ribosomal internal transcribed spacer and the mini-exon, *Parasitology*, 128, 3, 263–267. doi: 10.1017/S0031182003004578.
- Maurício, I. L., Yeo, M., Baghaei, M., Doto, D., Pralong, F., Zemanova, E., Dedet, J.-P., Lukes, J., Miles, M. A., 2006. Towards multilocus sequence typing of the *Leishmania donovani* complex: resolving genotypes and haplotypes for five polymorphic metabolic enzymes (ASAT, GPI, NH1, NH2, PGD), *International Journal for Parasitology*, 36, 757–69. doi: 10.1016/j.ijpara.2006.03.006.
- Maurício, I., Stothard, J., Miles, M., 2000. The strange case of *Leishmania chagasi*, *Parasitology Today*, 16, 188–189. doi: 10.1016/S0169-4758(00)01637-9.
- Mayer, M. P., Bukau, B., 2005. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62, 670–684. doi: 10.1007/s00018-004-4464-6.
- Mazeris, A., Soteriadou, K., Dedet, J. -P., Haralambous, C., Tsatsaris, A., Moschandreas, J., Messaritakis, I., Christodoulou, V., Papadopoulos, B., Ivović, V., Pralong, F., Loucaides, F., Antoniou, M., 2010. Leishmaniasis and the Cyprus paradox, *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 82, 441–448. doi: 10.4269/ajtmh.2010.09-0282.
- McGwire, B. S., Satoskar, A. R., 2014. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment, *QJM: An Inernational Journal of Medicinerational Journal of Medicine*, 107, 7–14. doi: 10.1093/qjmed/hct116.

- Van der Meide, W. F., Schoone, G. J., Faber, W. R., Zeegelaar, J. E., De Vries, H. J. C., Özbel, Y., Lai A Fat, R. F. M., Coelho, L. I. A. R. C., Kassi, M., Schallig, H. D. F. H., 2005. Quantitative nucleic acid sequence-based assay as a new molecular tool for detection and quantification of *Leishmania* parasites in skin biopsy samples, *Journal of Clinical Microbiology*, 43, 5560–5566. doi: 10.1128/JCM.43.11.5560-5566.2005.
- Mejia, R., 2018. Clinical aspects in immunocompetent and immunocompromised patients, en Bruschi, F. y Gradoni, L. (Eds.), *The Leishmaniasis: Old Neglected Tropical Diseases*, Springer, pp. 127–136.
- Mensa, J., Soriano, A., García-Sánchez, J. E., Marco, F., Letang, E., Llinares, P., López-Suñé, E., Berberan, J., 2020. *Guía de terapéutica antimicrobiana: 2020*. 30a edición, Antares.
- Merino-Espinosa, G., Corpas-López, V., Díaz-Sáez, V., Morillas-Márquez, F., Tercedor-Sánchez, J., Azaña-Defez, J. M., López-Hidalgo, J., Aneiros-Fernández, J., Martín-Sánchez, J., 2018. Cutaneous leishmaniasis by *Leishmania infantum*: behind granulomatous lesions of unknown aetiology, *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 32, 117–124. doi: 10.1111/jdv.14506.
- Mihalca, A. D., Cazan, C. D., Sulesco, T., Dumitrache, M. O., 2019. A historical review on vector distribution and epidemiology of human and animal leishmanioses in Eastern Europe, *Research in Veterinary Science*, 123, 185–191. doi: 10.1016/j.rvsc.2019.01.018.
- Millán, J., Ferroglio, E., Solano-Gallego, L., 2014. Role of wildlife in the epidemiology of *Leishmania infantum* infection in Europe, *Parasitology Research*, 113, 2005–2014. doi: 10.1007/s00436-014-3929-2.
- Mirahmadi, H., Rezaee, N., Mehravaran, A., Heydarian, P., Raeghi, S., 2018. Detection of species and molecular typing of *Leishmania* in suspected patients by targeting cytochrome b gene in Zahedan, southeast of Iran, *Veterinary World*, 11, 700–705. doi: 10.14202/vetworld.2018.700-705.
- Miró Corrales, G., Molina Moreno, R., 2006. *Leishmaniosis canina: manejo clínico y situación actual en España*. 1a edición, Química Farmacéutica Bayer, S.A.
- Mohammadpour, I., Hatam, G. R., Handjani, F., Bozorg-Ghalati, F., PourKamal, D., Motazedian, M. H., 2019. *Leishmania* cytochrome b gene sequence polymorphisms in southern Iran: relationships with different cutaneous clinical manifestations, *BMC Infectious Diseases*, 19, 98. doi: 10.1186/s12879-018-3667-7.
- Mohebbi, M., Javadian, E., Yaghoobi-Ershadi, M. R., Akhavan, A. A., Hajjaran, H., Abaei, M. R., 2004. Characterization of *Leishmania* infection in rodents from endemic areas of the Islamic Republic of Iran, *Eastern Mediterranean Health Journal*, 10, 591–599.
- Molina, R., Jiménez, M. I., Cruz, I., Iriso, A., Martín-Martín, I., Sevillano, O., Melero, S., Bernal, J., 2012. The hare (*Lepus granatensis*) as potential sylvatic reservoir of *Leishmania infantum* in Spain., *Veterinary parasitology*, 190, 268–71. doi: 10.1016/j.vetpar.2012.05.006.
- Molyneux, D. H., Killick-Kendrick, R., 1987. Morphology, ultrastructure and life cycles, en Peters, W. y Killick-Kendrick, R. (Eds.), *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*,

- 
- London, Academic Press, pp. 121–176.
- Monge-Maillo, B., López-Vélez, R., 2013a. Therapeutic options for Old World cutaneous leishmaniasis and New World cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis, *Drugs*, 73, 1889–1920. doi: 10.1007/s40265-013-0132-1.
- Monge-Maillo, B., López-Vélez, R., 2013b. Therapeutic options for visceral leishmaniasis, *Drugs*, 73, 1863–1888. doi: 10.1007/s40265-013-0133-0.
- Monge-Maillo, B., López-Vélez, R., 2018. Treatment of visceral leishmaniasis, en Bruschi, F. y Gradoni, L. (Eds.), *The Leishmaniasis: Old Neglected Tropical Diseases*, Springer, pp. 169–190.
- Montalvo, A. M., Fraga, J., Maes, I., Dujardin, J.-C., Van der Auwera, G., 2012. Three new sensitive and specific heat-shock protein 70 PCRs for global *Leishmania* species identification, *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 31, 1453–1461. doi: 10.1007/s10096-011-1463-z.
- Montalvo, A. M., Fraga, J., Tirado, D., Blandón, G., Alba, A., Van der Auwera, G., Vélez, I. D., Muskus, C., 2017. Detection and identification of *Leishmania* spp.: application of two *hsp70*-based PCR-RFLP protocols to clinical samples from the New World, *Parasitology Research*, 116, 1843–1848. doi: 10.1007/s00436-017-5454-6.
- Montoya, L., Gállego, M., Gavignet, B., Piarroux, R., Rioux, J. A., Portús, M., Fisa, R., 2007. Application of microsatellite genotyping to the study of a restricted *Leishmania infantum* focus: different genotype compositions in isolates from dogs and sand flies, *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 76, 888–895. doi: 10.4269/ajtmh.2007.76.888.
- Moral, L., Rubio, E. M., Moya, M., 2002. A leishmanin skin test survey in the human population of l'Alacantí Region (Spain): implications for the epidemiology of *Leishmania infantum* infection in southern Europe, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 96, 129–132. doi: 10.1016/S0035-9203(02)90278-6.
- Moreno, J., 2017. Situación de la Leishmaniasis en España, en Dirección general de salud pública. Consejería de Sanidad de la Comunidad de Madrid (Ed.), *Brote de leishmaniasis en Fuenlabrada y otros municipios de la Comunidad de Madrid*. 1a edición, pp. 13–16.
- Morillas-Márquez, F., Martín-Sánchez, J., Acedo-Sánchez, C., Pineda, J. A., Macias, J., Sanjuan-Garcia, J., 2002. *Leishmania infantum* (Protozoa, Kinetoplastida): transmission from infected patients to experimental animal under conditions that simulate needle-sharing, *Experimental Parasitology*, 100, 71–74. doi: 10.1006/expr.2001.4678.
- Morillas Márquez, F., Guevara Benítez, D. C., Ubeda Ontiveros, J. M., González Castro, J., 1983. Fluctuations annuelles des populations de phlébotomes (Diptera, Phlebotomidae) dans la province de Grenade (Espagne), *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 58, 625–632. doi: 10.1051/parasite/1983586625.
- Mosleh, I. M., Schönián, G., Kanani, K., Shadfan, B., 2018. *Leishmania major* cutaneous leishmaniasis outbreak in the Jordanian side of the Northern Jordan Valley, *Pathogens and Global Health*, 112, 22–28. doi: 10.1080/20477724.2018.1431191.

- Motalleb, G., Mirahmadi, H., Zare-Zadeh, A., Mehravaran, A., 2017. Cytochrome b and molecular typing of *Leishmania* spp. In a passive sampling of suspected patients with cutaneous leishmaniasis in Sistan and Baluchestan province, Eastern Iran, *Iranian Journal of Parasitology*, 12, 534–543.
- 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, e2841. doi: 10.1371/journal.pntd.0002841.
- Di Muccio, T., Scalone, A., Bruno, A., Marangi, M., Grande, R., Armignacco, O., Gradoni, L., Gramiccia, M., 2015. Epidemiology of imported leishmaniasis in Italy: implications for a European endemic country, *PLoS ONE*, 10, e0129418. doi: 10.1371/journal.pone.0129418.
- Myint, C. K., Asato, Y., Yamamoto, Y. I., Kato, H., Bhutto, A. M., Soomro, F. R., Memon, M. Z., Matsumoto, J., Marco, J. D., Oshiro, M., Katakura, K., Hashiguchi, Y., Uezato, H., 2008. Polymorphisms of cytochrome b gene in *Leishmania* parasites and their relation to types of cutaneous leishmaniasis lesions in Pakistan, *Journal of Dermatology*, 35, 76–85. doi: 10.1111/j.1346-8138.2008.00419.x.
- 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, 2240–2242. doi: 10.1128/JCM.00553-10.
- Nath-Chowdhury, M., Sangaralingam, M., Bastien, P., Ravel, C., Pratlong, F., Mendez, J., Libman, M., Ndao, M., 2016. Real-time PCR using FRET technology for Old World cutaneous leishmaniasis species differentiation, *Parasites & Vectors*, 9, 255. doi: 10.1186/s13071-016-1531-4.
- Navea-Pérez, H. M., Díaz-Sáez, V., Corpas-López, V., Merino-Espinosa, G., Morillas-Márquez, F., Martín-Sánchez, J., 2015. *Leishmania infantum* in wild rodents: reservoirs or just irrelevant incidental hosts?, *Parasitology Research*, 114, 2363–2370. doi: 10.1007/s00436-015-4434-y.
- Nicolas, L., Milon, G., Prina, E., 2002. Rapid differentiation of Old World *Leishmania* species by LightCycler polymerase chain reaction and melting curve analysis, *Journal of Microbiological Methods*, 51, 295–299. doi: 10.1016/S0167-7012(02)00099-4.
- Nicolas, L., Sidjanski, S., Colle, J.-H., Milon, G., 2000. *Leishmania major* reaches distant cutaneous sites where it persists transiently while persisting durably in the primary dermal site and its draining lymph node: a study with laboratory mice, *Infection and Immunity*, 68, 6561–6566. doi: 10.1128/IAI.68.12.6561-6566.2000.
- Nicoli, R., 1963. Le genre *Leishmania* R. Ross, 1903, *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 56, 408–416.
- Nicolle, C., 1908. Su trois cas d'infection splénique infantile a corps de Leishman observés en Tunisie, *Archives de l'Institut Pasteur de Tunis*, 3–26.
- Normand, A.-C., Becker, P., Gabriel, F., Cassagne, C., Accoceberry, I., Gari-Toussaint, M., Hasseine, L., De Geyter, D., Pierard, D., Surmont, I., Djenad, F., Donnadieu, J. L., Piarroux, M., Ranque, S., Hendrickx, M., Piarroux, R., 2017. Validation of a new web



- 
- application for identification of fungi by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry, *Journal of Clinical Microbiology*, 55, 2661–2670. doi: 10.1128/JCM.00263-17.
- Normand, A. -C., Cassagne, C., Gautier, M., Becker, P., Ranque, S., Hendrickx, M., Piarroux, R., 2017. Decision criteria for MALDI-TOF MS-based identification of filamentous fungi using commercial and in-house reference databases, *BMC Microbiology*, 17, 25. doi: 10.1186/s12866-017-0937-2.
- Normand, A. -C., Cassagne, C., Ranque, S., L'Ollivier, C., Fourquet, P., Roesems, S., Hendrickx, M., Piarroux, R., 2013. Assessment of various parameters to improve MALDI-TOF MS reference spectra libraries constructed for the routine identification of filamentous fungi, *BMC Microbiology*, 13, 76. doi: 10.1186/1471-2180-13-76.
- Noyes, H. A., Reyburn, H., Bailey, J. W., Smith, D., 1998. A nested-PCR-based schizodeme method for identifying *Leishmania* kinetoplast minicircle classes directly from clinical samples and its application to the study of the epidemiology of *Leishmania tropica* in Pakistan, *Journal of Clinical Microbiology*, 36, 2877–2881.
- Noyes, H., Chance, M., Ponce, C., Ponce, E., Maingon, R., 1997. *Leishmania chagasi*: genotypically similar parasites from Honduras cause both visceral and cutaneous leishmaniasis in humans, *Experimental Parasitology*, 85, 264–273. doi: 10.1006/expr.1996.4133.
- Noyes, H., Pratlong, F., Chance, M., Ellis, J., Lanotte, G., Dedet, J.-P., 2002. A previously unclassified trypanosomaid responsible for human cutaneous lesions in Martinique (French West Indies) is the most divergent member of the genus *Leishmania* ss, *Parasitology*, 124, 17–24.
- Odiwuor, S., Saad, A., De Doncker, S., Maes, I., Laurent, T., El Safi, S., Mbuchi, M., Büscher, P., Dujardin, J. -C., Van der Auwera, G., 2011. Universal PCR assays for the differential detection of all Old World *Leishmania* species, *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 30, 209–218. doi: 10.1007/s10096-010-1071-3.
- 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, 1994–2202. doi: 10.1016/j.meegid.2012.03.028.
- Okwor, I., Uzonna, J., 2016. Social and economic burden of human leishmaniasis, *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 94, 489–493. doi: 10.4269/ajtmh.15-0408.
- Oliveira-Neto, M. P., Pirmez, C., Rangel, E., Schubach, A., Grimaldi Júnior, G., 1988. An outbreak of American cutaneous leishmaniasis (*Leishmania braziliensis braziliensis*) in a periurban area of Rio de Janeiro city, Brazil: clinical and epidemiological studies, *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 83, 427–435. doi: 10.1590/S0074-02761988000400006.
- Ostyn, B., Gidwani, K., Khanal, B., Picado, A., Chappuis, F., Singh, S. P., Rijal, S., Sundar, S., Boelaert, M., 2011. Incidence of symptomatic and asymptomatic *Leishmania donovani* infections in high-endemic foci in India and Nepal: a prospective study, *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5, e1284. doi: 10.1371/journal.pntd.0001284.

- Pagès, M., Bastien, P., Veas, F., Rossi, V., Bellis, M., Wincker, P., Rioux, J. A., Roizès, G., 1989. Chromosome size and number polymorphisms in *Leishmania infantum* suggest amplification/deletion and possible genetic exchange, *Molecular and Biochemical Parasitology*, 36, 161–168. doi: 10.1016/0166-6851(89)90188-6.
- De Paiva-Cavalcanti, M., Silva de Morais, R. C., Pessoa-e-Silva, R., Mendonça Trajano-Silva, L. A., Da Cunha Gonçalves-de-Albuquerque, S., Cavalcanti Tavares, D. H., Accioly Brelaz-de-Castro, M. C., De Freitas e Silva, R., Alves Pereira, V. R., 2015. Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of immunological and molecular tools, *Cell & Bioscience*, 5, 31. doi: 10.1186/s13578-015-0021-2.
- Pan American Health Organization, 2019. *Manual of procedures for surveillance and control of leishmaniasis in the Americas*, Washington, D.C., PAHO, pp.166.
- Pavli, A., Maltezou, H. C., 2010. Leishmaniasis, an emerging infection in travelers, *International Journal of Infectious Diseases*, 14, e1032–e1039. doi: 10.1016/j.ijid.2010.06.019.
- Pérez-Ayala, A., Norman, F., Pérez-Molina, J. A., Herrero, J. M., Monge, B., López-Vélez, R., 2009. Imported leishmaniasis: a heterogeneous group of diseases, *Journal of Travel Medicine*, 16, 395–401. doi: 10.1111/j.1708-8305.2009.00341.x.
- Piarroux, R., Trouvé, V., Pratlong, F., Martini, A., Lambert, M., Rioux, J. A., 1994. The use of isoelectric focusing on polyacrylamide gel for the enzymatic analysis of ‘Old World’ *Leishmania* species, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 88, 475–478. doi: 10.1016/0035-9203(94)90439-1.
- Pineda, J. A., Martín-Sánchez, J., Macías, J., Morillas, F., 2002. *Leishmania* spp. infection in injecting drug users, *Lancet*, 360, 950–951. doi: 10.1016/S0140-6736(02)11056-7.
- Pita-Pereira, D., Lins, R., Oliveira, M. P., Lima, R. B., Pereira, B. A., 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 & Vectors*, 5, 15. doi: 10.1186/1756-3305-5-15.
- Pittaluga, G., 1912. Hallazgo de *Leishmania infatum* (protozoo parásito del ‘kala-azar infantil’) en la costa de Levante de España, *Boletín del Instituto Nacional de Higiene de Alfonso XIII*, 8, 137–139.
- Poinar, G., Poinar, R., 2004a. Evidence of vector-borne disease of early cretaceous reptiles, *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 4, 281–284. doi: 10.1089/vbz.2004.4.281.
- Poinar, G., Poinar, R., 2004b. *Paleoleishmania proterus* n. gen., n. sp., (Trypanosomatidae: Kinetoplastida) from Cretaceous Burmese amber, *Protist*, 155, 305–310. doi: 10.1078/1434461041844259.
- Portús, M., Gállego, J., Rioux, J. A., Pratlong, F., Moreno, G., Fisa, R., Gállego, M., Muñoz, C., Riera, C., Sánchez, F., Serra, T., 1989. Enzymatic heterogeneity among strains of *Leishmania infantum* from human visceral and cutaneous leishmaniasis in Catalonia (Spain), *Revista Ibérica de Parasitología*, 49, 287–289.
- Portús, M., Gállego, M., Riera, C., Fisa, R., Aisa, M. J., Botet, J., Carrió, J., Castillejo, S., Iniesta, L., López, P., Montoya, L., Muñoz, C., Serra, T., Gállego, J., 2007. A review of human and canine leishmaniasis in Catalonia and associated vector distribution,

---

*Revista Ibérica de Parasitología*, 67, 59–67.

- Postigo, J. A. R., 2010. Leishmaniasis in the World Health Organization Eastern Mediterranean Region, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 36, 62–65. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2010.06.023.
- Pourmohammadi, B., Motazedian, M., Hatam, G., Kalantari, M., Habibi, P., Sarkari, B., 2010. Comparison of three methods for diagnosis of cutaneous leishmaniasis, *Iranian Journal of Parasitology*, 5, 1–8.
- Pratlong, F., Bastien, P., Perello, R., Lami, P., Dedet, J. -P., 1995. Human cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania donovani sensu stricto* in Yemen, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 89, 398–399. doi: 10.1016/0035-9203(95)90025-X.
- Pratlong, F., Dereure, J., Bucheton, B., El-Safi, S., Dessein, A., Lanotte, G., Dedet, J.-P., 2001. Sudan: the possible original focus of visceral leishmaniasis, *Parasitology*, 122, 599–605. doi: 10.1017/S0031182001007867.
- Pratlong, F., Lami, P., Ravel, C., Balard, Y., Dereure, J., Serres, G., El Baidouri, F., Dedet, J.-P., 2013. Geographical distribution and epidemiological features of Old World *Leishmania infantum* and *Leishmania donovani* foci, based on the isoenzyme analysis of 2277 strains, *Parasitology*, 140, 423–434. doi: 10.1017/S0031182012001825.
- Pratlong, F., Lanotte, G., 1999. Identification, taxonomie et phylogénèse, en Dedet, J.-P. (Ed.), *Les Leishmaniasés*, Ellipses, pp. 21–39.
- Pratlong, F., Rioux, J. A., Marry, P., Faraut-Gambarelli, F., Dereure, J., Lanotte, G., Dedet, J. -P., 2004. Isoenzymatic analysis of 712 strains of *Leishmania infantum* in the south of France and relationship of enzymatic polymorphism to clinical and epidemiological features, *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 4077–4082. doi: 10.1128/JCM.42.9.4077-4082.2004.
- R Core Team, 2019. R: a language and environment for statistical computing, Vienna, Austria, R Foundation for Statistical Computing. (online: <https://www.r-project.org/>).
- Raccurt, C. P., Pratlong, F., Moreau, B., Pradinaud, R., Dedet, J. -P., 1995. French Guiana must be recognized as an endemic area of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in South America, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 89, 372.
- Rai, K., Bhattarai, N. R., Vanaerschot, M., Imamura, H., Gebru, G., Khanal, B., Rijal, S., Boelaert, M., Pal, C., Karki, P., Dujardin, J.-C., Van der Auwera, G., 2017. Single locus genotyping to track *Leishmania donovani* in the Indian subcontinent: application in Nepal, *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11, e0005420. doi: 10.1371/journal.pntd.0005420.
- Ramírez, C. A., Requena, J. M., Puerta, C. J., 2011. Identification of the HSP70-II gene in *Leishmania braziliensis* HSP70 locus: genomic organization and UTRs characterization, *Parasites & Vectors*, 4, 166. doi: 10.1186/1756-3305-4-166.
- Rasti, S., Ghorbanzadeh, B., Kheirandish, F., Mousavi, S. G., Pirozmand, A., Hooshyar, H., Abani, B., 2016. Comparison of molecular, microscopic, and culture methods for diagnosis of cutaneous leishmaniasis, *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 30, 610–615. doi: 10.1002/jcla.21910.
- Rastrojo, A., García-Hernández, R., Vargas, P., Camacho, E., Corvo, L., Imamura, H.,

- Dujardin, J. C., Castanys, S., Aguado, B., Gamarro, F., Requena, J. M., 2018. Genomic and transcriptomic alterations in *Leishmania donovani* lines experimentally resistant to antileishmanial drugs, *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 8, 246–264. doi: 10.1016/j.ijpddr.2018.04.002.
- Ravel, C., Cortes, S., Pratlong, F., Morio, F., Dedet, J.-P., Campino, L., 2006. First report of genetic hybrids between two very divergent *Leishmania* species: *Leishmania infantum* and *Leishmania major*, *International Journal for Parasitology*, 36, 1383–1388. doi: 10.1016/j.ijpara.2006.06.019.
- Ready, P. D., 2008. Leishmaniasis emergence and climate change, *OIE Revue Scientifique et Technique*, 27, 399–412. doi: 10.20506/rst.27.2.1803.
- Reithinger, R., Dujardin, J.-C., Louzir, H., Pirmez, C., Alexander, B., Brooker, S., 2007. Cutaneous leishmaniasis, *Lancet*, 7, 581–596.
- Ribeiro Coutinho, C. E., Oliveira Santos, D., Baptista, C., Borges Figueiredo, F., Madeira, M. F., 2011. Evaluation of *Leishmania (Leishmania) chagasi* strains isolated from dogs originating from two visceral leishmaniasis-endemic areas in Brazil using multilocus enzyme electrophoresis, *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 44, 572–575. doi: 10.1590/S0037-86822011005000049.
- RICET, 2015. *Informe de resultados de la Red Cooperativa de Infecciones Importadas por Viajeros e Inmigrantes*, pp.20 (online: <http://www.ricet.es/media/13199/informe-de-resultados-plusredivi-2014.pdf>).
- Richter, M., Rosselló-Móra, R., Oliver Glöckner, F., Peplies, J., 2016. JSpeciesWS: a web server for prokaryotic species circumscription based on pairwise genome comparison, *Bioinformatics*, 32, 929–31. doi: 10.1093/bioinformatics/btv681.
- Riera, C., Fisa, R., López-Chejade, P., Serra, T., Girona, E., Jiménez, M. T., Muncunill, J., Sedeño, M., Mascaró, M., Udina, M., Gállego, M., Carrió, J., Forteza, A., Portús, M., 2008. Asymptomatic infection by *Leishmania infantum* in blood donors from the Balearic Islands (Spain), *Transfusion*, 48, 1383–1389. doi: 10.1111/j.1537-2995.2008.01708.x.
- Riera, C., Napp, S., Manzanares, S., 2016. Epidemiología de la leishmaniasis humana en la ciudad de Barcelona (1997-2014), *Revista Enfermedades emergentes*, 15, 68–76.
- Rioux, J. A., Lanotte, G., Serres, E., Pratlong, F., Bastien, P., Perieres, J., 1990. Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification, *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 65, 111–25. doi: 10.1051/parasite/1990653111.
- Risueño, J., Ortuño, M., Pérez-Cutillas, P., Goyena, E., Maia, C., Cortes, S., Campino, L., Bernal, L. J., Muñoz, C., Arcenillas, I., Martínez-Rondán, F. J., González, M., Collantes, F., Ortiz, J., Martínez-Carrasco, C., Berriatua, E., 2018. Epidemiological and genetic studies suggest a common *Leishmania infantum* transmission cycle in wildlife, dogs and humans associated to vector abundance in Southeast Spain., *Veterinary Parasitology*, 259, 61–67. doi: 10.1016/j.vetpar.2018.05.012.
- Rocha, M. N., Margonari, C., Presot, I. M., Soares, R. P., 2010. Evaluation of 4 polymerase chain reaction protocols for cultured *Leishmania* spp. typing, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 68, 401–409. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2010.08.007.

- 
- Roelfsema, J. H., Nozari, N., Herremans, T., Kortbeek, L. M., Pinelli, E., 2011. Evaluation and improvement of two PCR targets in molecular typing of clinical samples of *Leishmania* patients, *Experimental Parasitology*, 127, 36–41. doi: 10.1016/j.exppara.2010.06.024.
- Rogers, M. B., Downing, T., Smith, B. A., Imamura, H., Sanders, M., Svobodova, M., Volf, P., Berriman, M., Cotton, J. A., Smith, D. F., 2014. Genomic confirmation of hybridisation and recent inbreeding in a vector-isolated *Leishmania* population, *PLoS Genetics*, 10, e1004092. doi: 10.1371/journal.pgen.1004092.
- 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, 2129–2142. doi: 10.1101/gr.122945.111.
- Rohousova, I., Talmi-Frank, D., Kostalova, T., Polanska, N., Lestinova, T., Kassahun, A., Yasur-Landau, D., Maia, C., King, R., Votypka, J., Jaffe, C. L., Warburg, A., Hailu, A., Volf, P., Baneth, G., 2015. Exposure to *Leishmania* spp. and sand flies in domestic animals in northwestern Ethiopia., *Parasites & Vectors*, 8, 360. doi: 10.1186/s13071-015-0976-1.
- Romero Valiente, J. M., 2003. Migraciones, en Instituto Nacional de Estadística (Ed.), *Tendencias demográficas durante el siglo XX en España*, pp. 207–254.
- Roque, A. L. R., Jansen, A. M., 2014. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas, *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 3, 251–262. doi: 10.1016/j.ijppaw.2014.08.004.
- Ross, R., 1903. Note on the bodies recently described by Leishman and Donovan, *The British Medical Journal*, 2, 1261–1262. doi: 10.1136/bmj.2.2237.1261.
- Roth-Damas, P., Sempere-Manuel, M., Mialaret-Lahiguera, A., Fernández-García, C., Gil-Tomás, J. J., Colomina-Rodríguez, J., Palop-Larrea, V., 2017. Brote comunitario de leishmaniasis cutánea en la comarca de La Ribera: a propósito de las medidas de Salud Pública, *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 35, 338–343. doi: 10.1016/j.eimc.2016.04.006.
- Ruiz-Postigo, J. A., Grout, L., Jain, S., 2020. Global leishmaniasis surveillance, 2017–2018, and first report on 5 additional indicators, *World Health Organization Weekly epidemiological record*, 95, 265–280.
- Saab, M., El Hage, H., Charafeddine, K., Habib, R. H., Khalifeh, I., 2015. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis: why punch when you can scrape?, *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 92, 518–522. doi: 10.4269/ajtmh.14-0512.
- Sacks, D., Kamhawi, S., 2001. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis, *Annual Review of Microbiology*, 55, 453–483. doi: 10.1146/annurev.micro.55.1.453.
- Sacks, D. L., Kenney, R. T., Kreutzer, R. D., Jaffe, C. L., Gupta, A. K., Sharma, M. C., Sinha, S. P., Neva, F. A., Saran, R., 1995. Indian kala-azar caused by *Leishmania tropica*, *Lancet*, 345, 959–961. doi: 10.1016/s0140-6736(95)90703-3.
- Sáez, V. D., Morillas-Márquez, F., Merino-Espinosa, G., Corpas-López, V., Morales-Yuste,

- M., Pesson, B., Barón-López, S., Lucientes-Curdi, J., Martín-Sánchez, J., 2018. *Phlebotomus langeroni* Nitzulescu (Diptera, Psychodidae) a new vector for *Leishmania infantum* in Europe, *Parasitology Research*, 117, 1105–1113. doi: 10.1007/s00436-018-5788-8.
- Sakkas, H., Gartzonika, C., Levidiotou, S., 2016. Laboratory diagnosis of human visceral leishmaniasis, *Journal of Vector Borne Diseases*, 53, 8–16.
- Salotra, P., Sreenivas, G., Pogue, G. P., Lee, N., Nakhasi, H. L., Ramesh, V., Negi, N. S., 2001. Development of a species-specific PCR assay for detection of *Leishmania donovani* in clinical samples from patients with kala-azar and post-kala-azar dermal leishmaniasis, *Journal of Clinical Microbiology*, 39, 849–854. doi: 10.1128/JCM.39.3.849-854.2001.
- Salvioni, O. D., Pereira Brunelli, J., Rolon, M. S., Rojas de Arias, A., Aldama, O., Gómez, C. V., 2019. First molecular report of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) guyanensis* in Paraguayan inhabitants using high-resolution melt-PCR, *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 101, 780–788. doi: 10.4269/ajtmh.18-0880.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74, 5463–5467. doi: 10.1073/pnas.74.12.5463.
- Scaglia, M., Malfitano, A., Douville, H., Sacchi, P., Gatti, S., Gradoni, L., Gramiccia, M., 1996. Dermonodular and visceral leishmaniasis due to *Leishmania infantum* with a new isoenzyme pattern: report of a case involving a patient with AIDS, *Clinical Infectious Diseases*, 22, 376–377. doi: 10.1093/clinids/22.2.376.
- Schönian, G., 2017. Genetics and evolution of *Leishmania* parasites, *Infection, Genetics and Evolution*, 50, 93–94. doi: 10.1016/j.meegid.2017.03.016.
- Schönian, G., Kuhls, K., Maurício, I. L., 2011. Molecular approaches for a better understanding of the epidemiology and population genetics of *Leishmania*, *Parasitology*, 138, 405–425. doi: 10.1017/S0031182010001538.
- Schönian, G., Maurício, I., Cupolillo, E., 2010. Is it time to revise the nomenclature of *Leishmania*?, *Trends in Parasitology*, 26, 466–469. doi: 10.1016/j.pt.2010.06.013.
- 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, 349–358. doi: 10.1016/S0732-8893(03)00093-2.
- Schwartz, E., Hatz, C., Blum, J., 2006. New world cutaneous leishmaniasis in travellers, *The Lancet Infectious Diseases*, 6, 342–349. doi: 10.1016/S1473-3099(06)70492-3.
- Seblova, V., Myskova, J., Hlavacova, J., Votycka, J., Antoniou, M., Volf, 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, *Parasites & Vectors*, 8, 605. doi: 10.1186/s13071-015-1217-3.
- Séguin, O., Descoteaux, A., 2016. *Leishmania*, the phagosome, and host responses: the

- 
- journey of a parasite, *Cellular Immunology*, 309, 1–6. doi: 10.1016/j.cellimm.2016.08.004.
- Semenza, J. C., Rocklöv, J., Penttinen, P., Lindgren, E., 2016. Observed and projected drivers of emerging infectious diseases in Europe, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1382, 73–83. doi: 10.1111/nyas.13132.
- Semenza, J. C., Suk, J. E., 2018. Vector-borne diseases and climate change: a European perspective, *FEMS Microbiology Letters*, 365, fnx244. doi: 10.1093/femsle/fnx244.
- Sereno, D., Akhoundi, M., Sayehmri, K., Mirzaei, A., Holzmüller, P., Lejon, V., Waleckx, E., 2020. Noninvasive biological samples to detect and diagnose infections due to Trypanosomatidae parasites: a systematic review and meta-analysis, *International Journal of Molecular Sciences*, 21, 1684. doi: 10.3390/ijms21051684.
- Seridi, N., Belkaid, M., Quispe-Tintaya, W., Zidane, C., Dujardin, J. C., 2008. Application of PCR-RFLP for the exploration of the molecular diversity of *Leishmania infantum* in Algeria, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 102, 556–563. doi: 10.1016/j.trstmh.2008.03.004.
- Serin, M. S., Waki, K., Chang, K. P., Aslan, G., Direkel, S., Otag, F., Kayar, B., Koksall, F., Emekdas, G., 2007. Consistence of minixon polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism and single-copy gene sequence analyses in discriminating *Leishmania* genotypes, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 57, 295–299. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2006.09.001.
- Shaheen, N., Qureshi, N. A., Qureshi, M. Z., Fatima, H., Afzal, M., Alhewairini, S. S., 2020. Molecular epidemiological survey of cutaneous leishmaniasis from Azad Jammu and Kashmir, Pakistan., *Acta Tropica*, 206, 105434. doi: 10.1016/j.actatropica.2020.105434.
- Shaw, J., 2007. The leishmaniasis - survival and expansion in a changing world. A mini-review, *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 102, 541–546. doi: 10.1590/S0074-02762007000500001.
- Shaw, J. J., Floeter-Winter, L. M., Castilho, T. M., Camargo, L. M. A., McMahon-Pratt, D., 2008. A real-time polymerase chain reaction assay for the identification and quantification of American *Leishmania* species on the basis of glucose-6-phosphate dehydrogenase, *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 78, 122–132. doi: 10.4269/ajtmh.2008.78.122.
- Silva de Morais, R. C., Nascimento da Costa Oliveira, C., Da Cunha Gonçalves de Albuquerque, S., Mendonça Trajano Silva, L. A., Pessoa-E-Silva, R., Alves da Cruz, H. L., Felinto de Brito, M. E., De Paiva Cavalcanti, M., 2016. Real-time PCR for *Leishmania* species identification: evaluation and comparison with classical techniques, *Experimental parasitology*, 165, 43–50. doi: 10.1016/j.exppara.2016.03.005.
- De Silva, G., Somaratne, V., Senaratne, S., Vipuladasa, M., Wickremasinghe, Rajitha, Wickremasinghe, Renu, Ranasinghe, S., 2017. Efficacy of a new rapid diagnostic test kit to diagnose Sri Lankan cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania donovani*, *PLoS ONE*, 12, e0187024. doi: 10.1371/journal.pone.0187024.
- Da Silva, L. A., De Sousa, C. S., Da Graça, G. C., Porrozzini, R., Cupolillo, E., 2010. Sequence

- analysis and PCR-RFLP profiling of the *hsp70* gene as a valuable tool for identifying *Leishmania* species associated with human leishmaniasis in Brazil, *Infection, Genetics and Evolution*, 10, 77–83. doi: 10.1016/j.meegid.2009.11.001.
- Simpson, A. G. B., Stevens, J. R., Lukeš, J., 2006. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates, *Trends in Parasitology*, 22, 168–174. doi: 10.1016/j.pt.2006.02.006.
- Singh, O. P., Hasker, E., Sacks, D., Boelaert, M., Sundar, S., 2014. Asymptomatic *Leishmania* infection: a new challenge for *Leishmania* control, *Clinical Infectious Diseases*, 58, 1424–1429. doi: 10.1093/cid/ciu102.
- Singhal, N., Kumar, M., Viridi, J. S., 2016. MALDI-TOF MS in clinical parasitology: applications, constraints and prospects, *Parasitology*, 143, 1491–1500. doi: 10.1017/S0031182016001189.
- Siriwardana, Y., Noyes, H. A., Beeching, N. J., Chance, M. L., Karunaweera, N. D., Bates, P. A., 2007. *Leishmania donovani* and cutaneous leishmaniasis, Sri Lanka, *Emerging infectious diseases*, 13, 476–478. doi: 10.1007/978-3-319-70132-5\_13.
- Söbirk, S. K., Inghammar, M., Collin, M., Davidsson, L., 2018. Imported leishmaniasis in Sweden 1993–2016, *Epidemiology and Infection*, 146, 1267–1274. doi: 10.1017/S0950268818001309.
- Srividya, G., Kulshrestha, A., Singh, R., Salotra, P., 2012. Diagnosis of visceral leishmaniasis: developments over the last decade, *Parasitology Research*, 110, 1065–1078. doi: 10.1007/s00436-011-2680-1.
- Staley, J. T., 2006. The bacterial species dilemma and the genomic-phylogenetic species concept, *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 361, 1899–1909. doi: 10.1098/rstb.2006.1914.
- Staley, J. T., 2009. Universal species concept: pipe dream or a step toward unifying biology?, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 36, 1331–1336. doi: 10.1007/s10295-009-0642-8.
- Stamm, L. V., 2016. Human migration and leishmaniasis-on the move, *JAMA Dermatology*, 152, 373–374. doi: 10.1001/jamadermatol.2015.4765.
- Stark, D., Van Hal, S., Lee, R., Marriott, D., Harkness, J., 2008. Leishmaniasis, an emerging imported infection: report of 20 cases from Australia, *Journal of Travel Medicine*, 15, 351–354. doi: 10.1111/j.1708-8305.2008.00223.x.
- Stevenson, L. G., Fedorko, D. P., Zelazny, A. M., 2010. An enhanced method for the identification of *Leishmania* spp. using real-time polymerase chain reaction and sequence analysis of the 7SL RNA gene region, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 66, 432–435. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2009.11.005.
- Steverding, D., 2017. The history of leishmaniasis, *Parasites & Vectors*, 10, 82. doi: 10.1186/s13071-017-2028-5.
- Strazzulla, A., Cocuzza, S., Pinzone, M. R., Postorino, M. C., Cosentino, S., Serra, A., Cacopardo, B., Nunnari, G., 2013. Mucosal leishmaniasis: an underestimated presentation of a neglected disease, *BioMed Research International*, 2013, 805108. doi: 10.1155/2013/805108.



- 
- Suárez Rodríguez, B., Isidoro Fernández, B., Santos Sanz, S., Sierra Moros, M., Molina Moreno, R., Astray Mochales, J., Amela Heras, C., 2012. Situación epidemiológica y factores de riesgo de transmisión de *Leishmania infantum* en España, *Revista Española de Salud Pública*, 86, 555–564. doi: 10.4321/S1135-57272012000600002.
- Sundar, S., More, D. K., Singh, M. K., Singh, V. P., Sharma, S., Makharia, A., Kumar, P. C. K., Murray, H. W., 2000. Failure of pentavalent antimony in visceral leishmaniasis in India: report from the center of the Indian epidemic, *Clinical Infectious Diseases*, 31, 1104–1107. doi: 10.1086/318121.
- Sunter, J., Gull, K., 2017. Shape, form, function and *Leishmania* pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding, *Open biology*, 7, 170165. doi: 10.1098/rsob.170165.
- Swofford, D. L., 2003. *PAUP\*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and Other Methods) Version 4*, Sunderland, Massachusetts, Sinauer Associates.
- Symmers, W. S. C., 1960. Leishmaniasis acquired by contagion, *The Lancet*, 275, 127–132. doi: 10.1016/S0140-6736(60)90052-0.
- El Tai, N. O., El Fari, M., Mauricio, I., Miles, M. A., Oskam, L., El Safi, S. H., Presber, W. H., Schönian, G., 2001. *Leishmania donovani*: intraspecific polymorphisms of Sudanese isolates revealed by PCR-based analyses and DNA sequencing, *Experimental Parasitology*, 97, 35–44. doi: 10.1006/expr.2001.4592.
- El Tai, N. O., Osman, O. F., El Fari, M., Presber, W., Schönian, G., 2000. Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms and sequencing, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 94, 575–579. doi: 10.1016/S0035-9203(00)90093-2.
- Takagi, H., Itoh, M., Islam, M. Z., Razzaque, A., Saifuddin, A. R. M., 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, 578–582. doi: 10.4269/ajtmh.2009.09-0145.
- Talmi-Frank, D., Nasereddin, A., Schnur, L. F., Schönian, G., Töz, S. Ö., Jaffe, C. L., Baneth, G., 2010. Detection and identification of old world leishmania by high resolution melt analysis, *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4, e581. doi: 10.1371/journal.pntd.0000581.
- Taslimi, Y., Sadeghipour, P., Habibzadeh, S., Mashayekhi, V., Mortazavi, H., Müller, I., Lane, M. E., Kropf, P., Rafati, S., 2017. A novel non-invasive diagnostic sampling technique for cutaneous leishmaniasis, *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11, e0005750. doi: 10.1371/journal.pntd.0005750.
- 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, e1003594. doi: 10.1371/journal.ppat.1003594.
- Teixeira, D. G., Monteiro, G. R. G., Martins, D. R. A., Fernandes, M. Z., Macedo-Silva, V., Ansaldi, M., Nascimento, P. R. P., Kurtz, M. A., Streit, J. A., Ximenes, M. F. F. M., Pearson, R. D., Miles, A., Blackwell, J. M., Wilson, M. E., Kitchen, A., Donelson, J. E., Lima, J. P. M. S., Jeronimo, S. M. B., 2017. Comparative analyses of whole genome

- sequences of *Leishmania infantum* isolates from humans and dogs in Northeastern Brazil, *International Journal for Parasitology*, 47, 655–665. doi: 10.1016/j.ijpara.2017.04.004.
- Thakur, L., Singh, K. K., Shanker, V., Negi, A., Jain, A., Matlashewski, G., Jain, M., 2018. Atypical leishmaniasis: a global perspective with emphasis on the Indian subcontinent, *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 12, e0006659. doi: 10.1371/journal.pntd.0006659.
- Thomaz-Soccol, V., 1993. *Les Leishmania du Nouveau Monde. Analyse enzymatique. Démarche progressive phénétique-cladistique. Relations phylogénétiques avec les Leishmania de l'Ancien Monde*, Université Montpellier.
- Thomaz-Soccol, V., Lanotte, G., Rioux, J. A., Pratlong, F., Martini-Dumas, A., Serres, E., 1993. Monophyletic origin of the genus *Leishmania* Ross, 1903, *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 68, 107–108.
- Thomaz-Soccol, V., Lanotte, G., Rioux, J. A., Pratlong, F., Martini-Dumas, A., Serres, E., 1993. Phylogenetic taxonomy of New World *Leishmania*, *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 68, 104–106.
- Thomaz-Soccol, V., Velez, I. D., Pratlong, F., Agudelos, S., Lanotte, G., Rioux, J. A., 2000. Enzymatic polymorphism and phylogenetic relationships in *Leishmania* Ross, 1903 (Sarcomastigophora: Kinetoplastida): a case study in Colombia., *Systematic Parasitology*, 46, 59–68.
- Tomás-Pérez, M., Fisa, R., Riera, C., 2013. The use of fluorescent fragment length analysis (PCR-FFL) in the direct diagnosis and identification of cutaneous *Leishmania* species, *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 88, 586–591. doi: 10.4269/ajtmh.12-0402.
- Trouvé, V., 1989. *Isoélectrofocalisation: application au genre Leishmania Ross. 1903. A propos de 25 souches de l'Ancien Monde*, Université de Montpellier.
- 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, 355–362. doi: 10.1016/j.ijpara.2008.08.004.
- Tsukayama, P., Núñez, J. H., De los Santos, M., Soberón, V., Lucas, C. M., Matlashewski, G., Llanos-Cuentas, A., Ore, M., Baldeviano, G. C., Edgel, K. A., Lescano, A. G., Graf, P. C. F., Bacon, D. J., 2013. A FRET-based real-time PCR assay to identify the main causal agents of New World tegumentary leishmaniasis, *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7, e1956. doi: 10.1371/journal.pntd.0001956.
- Urrea, D. A., Triana-Chavez, O., Alzate, J. F., 2019. Mitochondrial genomics of human pathogenic parasite *Leishmania (Viannia) panamensis*, *PeerJ*, 7, e7235. doi: 10.7717/peerj.7235.
- Valerio, L., Martínez, O., Sabrià, M., Esteve, M., Urbiztondo, L., Roca, C., 2005. High-risk travel abroad overtook low-risk travel from 1999 to 2004: characterization and trends in 2,622 Spanish travelers, *Journal of Travel Medicine*, 12, 327–331.
- Valero, N. N. H., Uriarte, M., 2020. Environmental and socioeconomic risk factors associated with visceral and cutaneous leishmaniasis: a systematic review, *Parasitology Research*, 119, 365–384. doi: 10.1007/s00436-019-06575-5.

- 
- Vallur, A. C., Tutterrow, Y. L., Mohamath, R., Pattabhi, S., Hailu, A., Abdoun, A. O., Ahmed, A. E., Mukhtar, M., Salam, M. A., Almeida, M. L., Almeida, R. P., Mondal, D., Albertini, A., Ghalib, H., Duthie, M. S., Reed, S. G., 2015. Development and comparative evaluation of two antigen detection tests for visceral leishmaniasis, *BMC Infectious Diseases*, 15, 384. doi: 10.1186/s12879-015-1125-3.
- Velez, R., Ballart, C., Domenech, E., Abras, A., Fernández-Arévalo, A., Gómez, S. A., Tebar, S., Muñoz, C., Cairó, J., Gállego, M., 2019. Seroprevalence of canine *Leishmania infantum* infection in the Mediterranean region and identification of risk factors: the example of North-Eastern and Pyrenean areas of Spain, *Preventive Veterinary Medicine*, 162, 67–75. doi: 10.1016/J.PREVETMED.2018.10.015.
- Victoir, K., Bañuls, A.-L., Arévalo, 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, 1–13. (online: <http://dspace.itg.be/bitstream/handle/10390/5773/1998para0001.pdf?sequence=1>).
- Victoir, K., De Doncker, S., Cabrera, L., Alvarez, E., Arévalo, J., Llanos-Cuentas, A., Le Ray, D., Dujardin, J. -C., 2003. Direct identification of *Leishmania* species in biopsies from patients with American tegumentary leishmaniasis, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 97, 80–87. doi: 10.1016/S0035-9203(03)90031-9.
- Volpini, Â. C., Passos, V. M. A., Oliveira, G. C., Romanha, A. J., 2004. PCR-RFLP to identify *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis, *Acta Tropica*, 90, 31–37. doi: 10.1016/j.actatropica.2003.10.008.
- Wall, E. C., Watson, J., Armstrong, M., Chiodini, P. L., Lockwood, D. N., 2012. Short report: Epidemiology of imported cutaneous leishmaniasis at the hospital for tropical diseases, London, United Kingdom: Use of polymerase chain reaction to identify the species, *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 86, 115–118. doi: 10.4269/ajtmh.2012.10-0558.
- Wincker, P., Ravel, C., Blaineau, C., Pages, M., Jauffret, Y., Dedet, J. -P., Bastien, P., 1996. The *Leishmania* genome comprises 36 chromosomes conserved across widely divergent human pathogenic species, *Nucleic Acids Research*, 24, 1688–1694. doi: 10.1093/nar/24.9.1688.
- Wirth, D. F., McMahon Pratt, D., 1982. Rapid identification of *Leishmania* species by specific hybridization of kinetoplast DNA in cutaneous lesions, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79, 6999–7003. doi: 10.1073/pnas.79.22.6999.
- World Health Organization, 2010. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases, Geneva, 22-26 March 2010, *Technical report series*, 949, pp. 186. (online: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/44412>).
- World Health Organization, 2019. Leishmaniasis, *Global Health Observatory (GHO)*. (online: [https://www.who.int/gho/neglected\\_diseases/leishmaniasis/en/](https://www.who.int/gho/neglected_diseases/leishmaniasis/en/)).

- World Health Organization, 2020a. Epidemiología, *Temas de salud*. (online: <https://www.who.int/topics/epidemiology/es/>).
- World Health Organization, 2020b. *Leishmaniasis*. (online: <https://www.who.int/leishmaniasis/en/>).
- World Health Organization, 2020c. *Leishmaniasis, Fact Sheets*. (online: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>).
- World Health Organization, 2020d. *Leishmaniasis, Global Health Observatory (GHO)*. (online: [https://www.who.int/gho/neglected\\_diseases/leishmaniasis/en/](https://www.who.int/gho/neglected_diseases/leishmaniasis/en/)).
- World Tourism Organization, 2020. Global and regional tourism performance, *UNWTO Tourism data dashboard*. (online: <https://www.unwto.org/unwto-tourism-dashboard>).
- 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, *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 73, 999–1004. doi: 10.4269/ajtmh.2005.73.999.
- Yan, S., Lodes, M. J., Fox, M., Myler, P. J., Stuart, K., 1999. Characterization of the *Leishmania donovani* ribosomal RNA promoter, *Molecular and Biochemical Parasitology*, 103, 197–210. doi: 10.1016/S0166-6851(99)00126-7.
- Yasur-Landau, D., Jaffe, C. L., David, L., Doron-Faigenboim, A., Baneth, G., 2018. Resistance of *Leishmania infantum* to allopurinol is associated with chromosome and gene copy number variations including decrease in the S-adenosylmethionine synthetase (METK) gene copy number, *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 8, 403–410. doi: 10.1016/j.ijpddr.2018.08.002.
- Yatawara, L., Le, T. H., Wickramasinghe, S., Agatsuma, T., 2008. Maxicircle (mitochondrial) genome sequence (partial) of *Leishmania major*: gene content, arrangement and composition compared with *Leishmania tarentolae*, *Gene*, 424, 80–86. doi: 10.1016/j.gene.2008.07.026.
- Zackay, A., Cotton, J. A., Sanders, M., Hailu, A., Nasereddin, A., Warburg, A., Jaffe, C. L., 2018. Genome wide comparison of Ethiopian *Leishmania donovani* strains reveals differences potentially related to parasite survival, *PLoS Genetics*, 14, e1007133. doi: 10.1371/journal.pgen.1007133.
- Zamarrón Fuertes, P., Pérez-Ayala, A., Pérez Molina, J. A., Norman, F. F., Monge-Maíllo, B., Navarro, M., López-Vélez, R., 2010. Clinical and epidemiological characteristics of imported infectious diseases in Spanish travelers, *Journal of Travel Medicine*, 17, 303–309. doi: 10.1111/j.1708-8305.2010.00433.x.
- Zampieri, R. A., Laranjeira-Silva, M. F., Muxel, S. M., Stocco de Lima, A. C., Shaw, J. J., Floeter-Winter, L. M., 2016. High resolution melting analysis targeting *hsp70* as a fast and efficient method for the discrimination of *Leishmania* species., *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10, 2, e0004485. doi: 10.1371/journal.pntd.0004485.
- Zelazny, A. M., Fedorko, D. P., Li, L., Neva, F. A., Fischer, S. H., 2005. Evaluation of 7SL RNA gene sequences for the identification of *Leishmania* spp., *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 72, 415–420. doi: 10.4269/ajtmh.2005.72.415.
- Zeledón, R., Hidalgo, H., Viquez, A., Urbina, A., 1989. Atypical cutaneous leishmaniasis in

- 
- a semiarid region of north-west Costa Rica, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 83, 786. doi: 10.1016/0035-9203(89)90328-3.
- Zemanová, E., Jirků, M., Maurício, I. L., Horák, A., Miles, M. A., Lukes, 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, 149–160. doi: 10.1016/j.ijpara.2006.08.008.
- Zhang, W.-W., Miranda-Verastegui, C., Arévalo, J., Ndao, M., Ward, B., Cuentas, A. L., Matlashewski, G., 2006. Development of a genetic assay to distinguish between *Leishmania Viannia* species on the basis of isoenzyme differences, *Clinical Infectious Diseases*, 42, 801–809. doi: 10.1086/500326.

---

## 8. Anexos

## Anexo 1. Información sobre las cepas incluidas en los distintos estudios.

Tabla A1. Cepas del CRB-Leish utilizadas para construir la librería de espectros (apartado 4.1).

Sección	Subgénero	Complejo	Taxon (n° de cepas)	Código OMS de los aislados	
Euleishmania	<i>Leishmania</i>	<i>L. donovani</i>	<i>L. archibaldi</i> (8)	MHOM/ET/72/GEBRE1, MCAN/SD/98/LEM3556, MCAN/SD/99/LEM3796, MHOM/TR/2001/EP59, MHOM/SD/97/LEM3463, MHOM/SD/97/LEM3429, MHOM/SD/2002/MW116, MHOM/SD/2002/MW101	
			<i>L. donovani</i> (6)	MHOM/IN/00/DEVI, MHOM/IN/80/DD8, MHOM/IN/96/THAK57, MHOM/IN/99/8998, MHOM/TR/2012/LPS55, MHOM/LK/2010/OVN3	
			<i>L. infantum</i> (7)	MHOM/EG/87/RTC2, MCAN/FR/87/RM1, MHOM/DZ/82/LIPA59, MHOM/TN/80/IPT1, MHOM/FR/78/LEM75, MHOM/DZ/83/LIPA96, MHOM/FR/88/LEM1265	
		<i>L. major</i>	<i>L. arabica</i> (5)	MPSA/SA/83/JISH220, MCAN/SA/84/MD84, MPSA/SA/84/JISH238, MPSA/SA/84/JISH231, MPSA/SA/83/JISH224	
			<i>L. gerbilli</i> (3)	MRHO/CN/60/GERBILLI, MRHO/SU/87/E11, MRHO/SU/88/KD/88984	
			<i>L. major</i> (7)	MHOM/IL/80/FRIEDLIN2, MHOM/IL/2008/LRCL1350, MHOM/MA/81/LEM265, MHOM/MA/2003/LEM4685, MRHO/SU/59/Pstrain, MHOM/TN/2001/LEM4286, MHOM/SU/73/5ASKH	
		<i>L. mexicana</i>	<i>L. turanica</i> (6)		MMEL/SU/79/MEL, MHOM/SU/64/VL, MRHO/SU/65/VL, MRHO/SU/74/95A, MRHO/SU/95/T9562R, MRHO/SU/91/T/91011L TM
				<i>L. amazonensis</i> (4)	MHOM/BR/72/M1845, MHOM/BR/73/M2269, MHOM/GF/2002/LAV003, MHOM/VE/2004/OHN/15
				<i>L. aristidesi</i> (1)	MORY/PA/69/GML3
				<i>L. garnhami</i> (1)	MHOM/VE/76/JAP78
<i>L. mexicana</i> (4)	MHOM/BZ/82/BEL21, MNYC/BZ/62/M379, MHOM/VE/2004/CAP04, MHOM/HN/2002/LLM/1162				
<i>L. tropica</i>	<i>L. pifanoi</i> (1)		MHOM/VE/57/LL1		
		<i>L. aethiopica</i> (6)	MHOM/ET/72/L100, MHOM/ET/91/KASSAYE, MHOM/ET/2004/LPN241, MHOM/JO/2006/LSL103, MHOM/ET/83/10383, MHOM/ET/89/LEM151		

Tabla A1 (continuación)

Sección	Subgénero	Complejo	Taxon (nº de cepas)	Código OMS de los aislados
(Euleishmania)	<i>(Leishmania)</i>	<i>(L. tropica)</i>	<i>L. killicki</i> (4)	MHOM/DZ/2011/LIPA283, MHOM/TN/80/LEM163, MHOM/TN/80/LEM180, MHOM/TN/86/LEM904/CL
			<i>L. tropica</i> (5)	MHOM/SU/74/K27, MHOM/GR/80/GRL35, MHOM/MA/95/LEM3015, MHOM/MA/2008/W38, MRAT/IQ/72/ADHANIS1
	<i>Viannia</i>	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. braziliensis</i> (4)	MHOM/BR/75/M2904, MHOM/BR/82/LTB12JULY82, MHOM/GF/2003/LAV008, MHOM/BR/75/M2903
			<i>L. peruviana</i> (5)	MHOM/00/2007/TIM24, MHOM/PE/84/LC26, MHOM/PE/84/UN56, MHOM/PE/84/L13A, MHOM/PE/84/L9
		<i>L. guyanensis</i>	<i>L. guyanensis</i> (5)	MHOM/GF/98/LEM3657, MHOM/GF/2003/LEM4570, MHOM/GF/2004/LAV016, MHOM/GF/2005/LPC410, MHOM/GF/79/LEM85
			<i>L. panamensis</i> (6)	MHOM/CR/2004/TIM13, MHOM/CR/2007/TIM23, MHOM/00/2004/LEI27, MHOM/EC/90/TERESA, MHOM/CO/89/UA403, MHOM/CR/2001/LCB29A
		<i>L. shawi</i> (1)	MCEB/BR/84/M8408	
		<i>L. lainsoni</i> (6)	IUBI/BR/2000/M12025, MCUN/BR/85/M9342, MHOM/BR/81/M6426, MHOM/PE/2013/LEM6459, MHOM/EC/93/489, MHOM/GF/2002/LEM4449	
	<i>L. naiffi</i> (7)	MDAS/BR/79/M5533, MHOM/GF/LCB41, MHOM/GF/2006/LEM5108, MHOM/GF/2005/LEM5109, MHOM/GF/95/LBC1096, MHOM/00/94/CRE58, MHOM/00/99/TIM1		
	<i>Sauroleishmania</i>	<i>L. adleri</i> (1)	RLAT/KE/54/HU1433	
		<i>L. gymnodactyli</i> (1)	RGYM/SY/64/LV247	
		<i>L. hoogstraali</i> (1)	RLIZ/SD/2000/LV31	
		<i>L. tarentolae</i> (3)	RTAR/DZ/39/TARVI, RTAR/FR/77/LEM112, RTAR/FR/78/LEM126	
<i>Mundinia</i>	<i>L. enrietti</i> (2)	MCAV/BR/45/L88, MCAV/BR/95/CUR2		
	<i>L. martiniquensis</i> (3)	MHOM/GP/2008/LEM5748, MHOM/MQ/92/MAR1, MHOM/MQ/94/LEM2870CL		
	<i>L. siamensis</i> (1)	MHOM/TH/2010/TR		
Paraleishmania	Porcisia	<i>L. daenei</i> (2)	MCOE/BR/74/M2674, MCOE/BR/75/M2808	
		<i>L. hertigi</i> (1)	MCOE/PA/65/C8	
		<i>L. colombiensis</i> (2)	IGOM/PA/85/E58234, IHAR/CA/86/CL500	
		<i>L. equatorensis</i> (2)	MCHO/EC/82/LSP1.2, MCHO/EC/82/LSP1	



Tabla A2. Cepas utilizadas para el panel de validación del MALDI-TOF aportadas por el criobanco de cepas de Tripanosomátidos de la UB (apartado 4.1).

BCN	Código OMS	Identificación	País	Hospedador	Clínica
7	MCAN/ES/84/BCN-7	<i>L. infantum</i>	España	<i>Canis familiaris</i>	LV
13	MCAN/ES/84/BCN-13	<i>L. infantum</i>	España	<i>Canis familiaris</i>	LV
19	MHOM/BR/86/BCN-19	<i>L. braziliensis</i>	Brasil	<i>Homo sapiens</i>	LC
74	MCAN/ES/92/BCN-74	<i>L. infantum</i>	España	<i>Canis familiaris</i>	LV
77	MCAN/ES/92/BCN-77	<i>L. infantum</i>	España	<i>Canis familiaris</i>	LV
80	IPER/ES/92/BCN-80	<i>L. infantum</i>	España	<i>Phlebotomus perniciosus</i>	NA
158	MHOM/SY/94/BCN-158	<i>L. tropica</i>	Siria	<i>Homo sapiens</i>	LC
201	MHOM/MA/98/BCN-201	<i>L. tropica</i>	Marruecos	<i>Homo sapiens</i>	LC
344	IARI/ES/87/LEM1146	<i>L. infantum</i>	España	<i>Phlebotomus ariasi</i>	NA
360	IPER/ES/87/LEM1144	<i>L. infantum</i>	España	<i>Phlebotomus perniciosus</i>	NA
365	IARI/ES/86/LEM870	<i>L. infantum</i>	España	<i>Phlebotomus ariasi</i>	NA
415	MNYC/BZ/62/M379	<i>L. mexicana</i>	Belice	<i>Nyctomys rodentia</i>	LC
416	IFLA/BR/67/PH8	<i>L. amazonensis</i>	Brasil	<i>Lutzomyia flaviscutellata</i>	NA
418	MHOM/BR/70/M-1176	<i>L. guyanensis</i>	Brasil	<i>Homo sapiens</i>	LC
516	MHOM/SA/81/JEDDAH-KA	<i>L. infantum</i>	Arabia Saudí	<i>Homo sapiens</i>	LV
517	MHOM/IN/00/DEVI	<i>L. infantum</i>	India	<i>Homo sapiens</i>	LV
523	MHOM/KE/75/H9	<i>L. infantum</i>	Kenia	<i>Homo sapiens</i>	LV
526	MRHO/SU/59/P-strain	<i>L. major</i>	Ex-Unión Soviética	<i>Rhombomys opimus</i>	LC
527	MHOM/FR/78/LEM75	<i>L. infantum</i>	Francia	<i>Homo sapiens</i>	LV
550	MHOM/IQ/77/BUMM3	<i>L. infantum</i>	Irak	<i>Homo sapiens</i>	LV
635	MHOM/EC/2004/BCN-635	<i>L. braziliensis</i>	Ecuador	<i>Homo sapiens</i>	LC
717	MHOM/GT/2005/BCN-717	<i>L. braziliensis</i>	Guatemala	<i>Homo sapiens</i>	LC

Tabla A2 (continuación)

BCN	Código OMS	Identificación	País	Hospedador	Clínica
733	MHOM/ES/2006/BCN-733	<i>L. infantum</i>	España	<i>Homo sapiens</i>	LC
739	MHOM/MR/2007/BCN-739	<i>L. major</i>	Mauritania	<i>Homo sapiens</i>	LC
741	MHOM/ES/2007/BCN-741	<i>L. infantum</i>	España	<i>Homo sapiens</i>	LC
750	MHOM/MR/2007/BCN-750	<i>L. major</i>	Mauritania	<i>Homo sapiens</i>	LC
759	MCAN/ES/2007/BCN-759	<i>L. infantum</i>	España	<i>Canis familiaris</i>	LV
763	MHOM/ES/2007/BCN763	<i>L. infantum</i>	España	<i>Homo sapiens</i>	LC
766	MHOM/MA/2008/BCN-766	<i>L. major</i>	Marruecos	<i>Homo sapiens</i>	LC
849	MCAN/ES/2013/BCN-849	<i>L. infantum</i>	España	<i>Canis familiaris</i>	LV
850	MCAN/ES/2013/BCN-850	<i>L. infantum</i>	España	<i>Canis familiaris</i>	LV
851	MCAN/ES/2013/BCN-851	<i>L. infantum</i>	España	<i>Canis familiaris</i>	LV
853	MCAN/ES/20147BCN-853	<i>L. infantum</i>	España	<i>Canis familiaris</i>	LV
856	MCAN/ES/2014/BCN-856	<i>L. infantum</i>	España	<i>Canis familiaris</i>	LV
857	MHOM/ES/2014/BCN-857	<i>L. infantum</i>	España	<i>Homo sapiens</i>	LC
859	MHOM/PA/2014/BCN-859	<i>L. panamensis</i>	Panamá	<i>Homo sapiens</i>	LC
861	MHOM/BO/2014/CUM-1264	<i>L. braziliensis</i>	Bolivia	<i>Homo sapiens</i>	LMC
862	MHOM/BO/2014/CUM-1267	<i>L. braziliensis</i>	Bolivia	<i>Homo sapiens</i>	LC
863	MHOM/BO/2014/CUM-1266	<i>L. braziliensis</i>	Bolivia	<i>Homo sapiens</i>	LC
864	MHOM/ES/2014/BCN-864	<i>L. infantum</i>	España	<i>Homo sapiens</i>	LV
865	MHOM/ES/2014/BCN-865	<i>L. infantum</i>	España	<i>Homo sapiens</i>	LV
866	MHOM/ES/2014/BCN-866	<i>L. infantum</i>	España	<i>Homo sapiens</i>	LV
871	MHOM/ES/2015/BCN-871	<i>L. infantum</i>	España	<i>Homo sapiens</i>	LC
874	MHOM/00/2015/BCN-874	<i>L. braziliensis</i>	Perú/ Colombia/ Bolivia	<i>Homo sapiens</i>	LC

Tabla A2 (continuación)

BCN	Código OMS	Identificación	País	Hospedador	Clínica
876	MHOM/00/2015/BCN-876	<i>L. infantum</i>	España	<i>Homo sapiens</i>	LV
879	MHOM/ES/2016/BCN-879	<i>L. infantum</i>	España	<i>Homo sapiens</i>	LV
884	MHOM/ES/2016/BCN-884	<i>L. infantum</i>	España	<i>Homo sapiens</i>	LV

BCN: Código de la cepa criobanco de la Universitat de Barcelona. NA: no aplicable. NC: No consta.

Tabla A3. Cepas utilizadas para el estudio del complejo *Leishmania donovani* (apartado 4.2).

BCN	LEM	Código OMS	ID previa	LST	Zimodema	País	Hospedador	Clínica
517	L0138	MHOM/IN/00/DEVI	<i>L. donovani</i>	LST0019	MON-2	India	<i>Homo sapiens</i>	LV
527	L0075	MHOM/FR/78/LEM75	<i>L. infantum</i>	LST0001	MON-1	Francia	<i>Homo sapiens</i>	LV
906	L3141	MHOM/FR/95/LEM3141	<i>L. infantum</i>	LST0092	MON-28	Francia	<i>Homo sapiens</i>	LV
907	L4223	MHOM/ES/95/LLM480	<i>L. infantum</i>	LST0128	MON-228	España	<i>Homo sapiens</i>	LV
908	L3443	MHOM/SD/97/LEM3443	<i>L. archibaldi</i>	LST0108	MON-257	Sudán	<i>Homo sapiens</i>	LV
910	L0890	MHOM/SD/66/L46	<i>L. infantum</i>	LST0040	MON-30	España	<i>Homo sapiens</i>	LV
911	L1014	MHOM/ET/84/ADDIS135	<i>L. donovani</i>	LST0047	MON-32	Etiopía	<i>Homo sapiens</i>	LV
912	L2388	IMRT/ET/90/TESHOME210	<i>L. donovani</i>	LST0015	MON-37	Etiopía	<i>Phlebotomus martini</i>	NA
913	L5751	MHOM/TR/2005/CUK1	<i>L. donovani</i>	LST0140	MON-309	Turquía	<i>Homo sapiens</i>	LC
914	L1560	MHOM/ES/89/BCN32	<i>L. infantum</i>	LST0062	MON-33	España	<i>Homo sapiens</i>	LV
915	L1764	IARI/PT/89/IMT171	<i>L. infantum</i>	LST0067	MON-24	Portugal	<i>Phlebotomus ariasi</i>	NA
916	L0698	MHOM/ET/67/HU3	<i>L. donovani</i>	LST0038	MON-18	Etiopía	<i>Homo sapiens</i>	LV
917	L1043	MHOM/MT/85/BUCK	<i>L. infantum</i>	LST0050	MON-78	Malta	<i>Homo sapiens</i>	LC
919	L0417	MHOM/DZ/82/LIPA59	<i>L. infantum</i>	LST0024	MON-24	Argelia	<i>Homo sapiens</i>	LC
920	L4043	MHOM/IL/79/LANSBERG	<i>L. donovani</i>	LST0123	MON-280	Israel	<i>Homo sapiens</i>	LV
934	L0494	MHOM/SD/82/GILANI	<i>L. infantum</i>	LST0029	MON-30	Sudán	<i>Homo sapiens</i>	LV
935	L2677	MHOM/YE/93/LEM2677	<i>L. donovani</i>	LST0081	MON-191	Yemen	<i>Homo sapiens</i>	LC
938	L2506	MHOM/DZ/92/CRE21	<i>L. infantum</i>	LST0080	MON-78	Argelia	<i>Homo sapiens</i>	LV
939	L3463	MHOM/SD/97/LEM3463	<i>L. archibaldi</i>	LST0109	MON-258	Sudán	<i>Homo sapiens</i>	LV
940	L2795	MHOM/IT/92/ISS683	<i>L. infantum</i>	LST0084	MON-187	Italia	<i>Homo sapiens</i>	LV
941	L4046	MHOM/IL/87/BENAMI	<i>L. donovani</i>	LST0124	MON-37	Israel	<i>Homo sapiens</i>	LV
942	L0980	MHOM/ET/84/ADDIS164	<i>L. donovani</i>	LST0013	MON-83	Etiopía	<i>Homo sapiens</i>	LV

Tabla A3 (continuación)

BCN	LEM	Código OMS	ID previa	LST	Zimodema	País	Hospedador	Clínica
943	L2481	MHOM/IT/91/ISS666	<i>L. infantum</i>	LST0079	MON-185	Italia	<i>Homo sapiens</i>	LV
945	L2884	MHOM/DZ/94/CRE64	<i>L. infantum</i>	LST0086	MON-33	Argelia	<i>Homo sapiens</i>	LV
946	L1154	MHOM/SD/00/DH177	<i>L. infantum</i>	LST0056	MON-81	Sudán	<i>Homo sapiens</i>	LC
947	L2141	IALE/CN/88/Turfan10	<i>L. donovani</i>	LST0072	MON-138	China	<i>Phlebotomus alexandri</i>	NA
948	L4701	MHOM/GR/2003/GH15	<i>L. infantum</i>	LST0135	MON-98	Grecia	<i>Homo sapiens</i>	LV
949	L0935	MCAN/ES/86/LEM935	<i>L. infantum</i>	LST0043	MON-77	España	<i>Homo sapiens</i>	LV
950	L0991	MHOM/LB/84/SALTI1	<i>L. archibaldi</i>	LST0003	MON-82	Líbano	<i>Homo sapiens</i>	LV
951	L1019	MHOM/ET/82/BEKELE	<i>L. donovani</i>	LST0049	MON-31	Etiopía	<i>Homo sapiens</i>	LV
952	L3793	MHOM/SD/99/LEM3793	<i>L. donovani</i>	LST0114	MON-276	Sudán	<i>Homo sapiens</i>	LV
954	L4474	MHOM/LK/2002/L80	<i>L. donovani</i>	LST0132	MON-37	Sri Lanka	<i>Homo sapiens</i>	LC
960	L2793	MHOM/IT/93/ISS800	<i>L. infantum</i>	LST0082	MON-188	Italia	<i>Homo sapiens</i>	LV
961	L0719	IMRT/KE/62/LRC-L57	<i>L. donovani</i>	LST0039	MON-37	Kenia	<i>Phlebotomus martini</i>	NA
962	L3437	MHOM/IT/95/GIIPcos	<i>L. infantum</i>	LST0107	MON-29	Italia	<i>Homo sapiens</i>	LV
963	L0946	MHOM/SU/84/MARZ-KRIM	<i>L. donovani</i>	LST0044	MON-73	Ucrania	<i>Homo sapiens</i>	LV
964	L1005	MHOM/ET/72/GEBRE1	<i>L. archibaldi</i>	LST0046	MON-82	Etiopía	<i>Homo sapiens</i>	LV
967	L2455	MHOM/MA/92/LEM2455	<i>L. infantum</i>	LST0078	MON-24	Marruecos	<i>Homo sapiens</i>	LC
968	L4227	MHOM/ES/99/LLM855	<i>L. infantum</i>	LST0129	MON-284	España	<i>Homo sapiens</i>	LV
969	L2975	MHOM/00/95/CRE72	<i>L. donovani</i>	LST0089	MON-37	NC	<i>Homo sapiens</i>	LV
970	L1242	MHOM/YE/88/LEM1242	<i>L. donovani</i>	LST0010	MON-31	Yemen	<i>Homo sapiens</i>	LV
975	L2794	MHOM/IT/93/ISS822	<i>L. infantum</i>	LST0083	MON-201	Italia	<i>Homo sapiens</i>	LV
986	L3976	MHOM/PT/2000/IMT261	<i>L. infantum</i>	LST0120	MON-1	Portugal	<i>Homo sapiens</i>	LV
987	L3968	MHOM/TN/99/105	<i>L. infantum</i>	LST0119	MON-80	Túnez	<i>Homo sapiens</i>	LV

Tabla A3 (continuación)

BCN	LEM	Código OMS	ID previa	LST	Zimodema	País	Hospedador	Clínica
988	L0707	MHOM/KE/55/LRC-L53	<i>L. donovani</i>	LST0014	MON-36	Kenia	<i>Homo sapiens</i>	LV
989	L0232	MCAN/00/76/ISS2	<i>L. archibaldi</i>	LST0022	MON-82	NC	<i>Canis familiaris</i>	LC-LV
1010	L2180	MHOM/IT/90/ISS510	<i>L. infantum</i>	LST0073	MON-136	Italia	<i>Homo sapiens</i>	LV
1011	L0659	MHOM/GR/00/LEM659	<i>L. infantum</i>	LST0036	MON-80	Grecia	<i>Homo sapiens</i>	LV
1012	L0668	MHOM/CN/00/WANGJIE-1	<i>L. donovani</i>	LST0037	MON-35	China	<i>Homo sapiens</i>	LV
1013	L0425	MHOM/DZ/83/LEM425	<i>L. infantum</i>	LST0026	MON-80	Argelia	<i>Homo sapiens</i>	LC
1014	L3942	MCAN/SD/2000/LEM3942	<i>L. donovani</i>	LST0117	MON-277	Sudán	<i>Canis familiaris</i>	LV
1016	L3988	MCAN/SD/2000/LEM3988	<i>L. infantum</i>	LST0122	MON-267	Sudán	<i>Canis familiaris</i>	LV
1017	L3588	MHOM/ES/98/DPPE28	<i>L. infantum</i>	LST0004	MON-24	España	<i>Homo sapiens</i>	LV
1018	L0356	MHOM/FR/82/LEM356	<i>L. infantum</i>	LST0007	MON-33	Francia	<i>Homo sapiens</i>	LC
1019	L1153	MHOM/SD/62/3S	<i>L. infantum</i>	LST0055	MON-81	Sudán	<i>Homo sapiens</i>	LV
1020	L4392	MHOM/TN/2002/LC38	<i>L. infantum</i>	LST0131	MON-24	Túnez	<i>Homo sapiens</i>	LC

BCN: Código de la cepa Criobanco de la Universitat de Barcelona. LEM: Código de la cepa en el CRB-Leish de Montpellier. LST: secuenciotipo de *Leishmania* asignado por El Baidouri *et al.* 2013. NC: no consta. NA: no aplicable

Tabla A4. Cepas utilizadas para el estudio de cepas causantes de leishmaniosis tegumentaria en Catalunya (apartado 4.3).

BCN	Código OMS	País contaminación	Clínica	Lesión	Localización lesión
1	MHOM/ES/81/BCN-1	España	LC	Única	Cara
11	MHOM/ES/84/BCN-11	España	LC	Única	Cara
16	MHOM/ES/86/BCN-16	España	LC	Única	Cara
18	MHOM/ES/86/BCN-18	España	LC	Única	Cara
19	MHOM/BR/86/BCN-19	Brasil	LC	NC	NC
24	MHOM/ES/88/BCN-24	España	LMC	NA	Cara
25	MHOM/BR/88/BCN-25	Brasil	LC	Única	Extremidades
113	MHOM/ES/94/BCN-113	España	LMC	NA	Cara
135	MHOM/ES/95/BCN-135	España	LC	Única	Extremidades
137	MHOM/ES/95/BCN-137	España	LMC	NA	Cara
144	MHOM/ES/96/BCN-144	España	LC	Única	Extremidades
148	MHOM/ES/96/BCN-148	España	LMC	NA	Otros
168	MHOM/ES/96/BCN-168	España	LMC	NA	Otros
371	MHOM/ES/2001/BCN-371	España	LC	Múltiple	Extremidades y otros
421	MHOM/ES/2001/BCN-421	España	LC	Única	NC
466	MHOM/ES/2002/BCN-466	España	LC	NC	NC
467	MHOM/ES/2002/BCN-467	España	LC	Única	NC
545	MHOM/EC/2002/BCN-545	Ecuador	LC	Múltiple	Extremidades
635	MHOM/EC/2004/BCN-635	Ecuador	LC	Única	NC
645	MHOM/00/2004/BCN-645	España/ Italia	LC	Única	Extremidades
657	MHOM/ES/2005/BCN-657	España	LC	Única	NC
698	MHOM/00/2005/BCN-698	España/ México	LMC	NA	Cara
715	MHOM/ES/2005/BCN-715	España	LC	Múltiple	Otros
717	MHOM/GT/2005/BCN-717	Guatemala	LC	Múltiple	Extremidades
732	MHOM/ES/2006/BCN-732	España	LC	Única	NC
733	MHOM/ES/2006/BCN-733	España	LC	Única	Otros
735	MHOM/ES/2006/BCN-735	España	LC	Única	Extremidades
739	MHOM/MR/2007/BCN-739	Mauritania	LC	Múltiple	Extremidades
741	MHOM/ES/2007/BCN-741	España	LC	Múltiple	Cara y extremidades
742	MHOM/ES/2007/BCN-742	España	LC	Única	Cara
750	MHOM/MR/2007/BCN-750	Mauritania	LC	Múltiple	Extremidades
763	MHOM/ES/2007/BCN-763	España	LC	Múltiple	Cara
766	MHOM/MA/2008/BCN-766	Marruecos	LC	Múltiple	Extremidades
779	MHOM/ES/2008/BCN-779	España	LC	Múltiple	Extremidades
809	MHOM/IL/2010/BCN-809	Israel	LC	Única	NC
813	MHOM/ES/2010/BCN-813	España	LC	Múltiple	Otros

Tabla A4 (continuación)

BCN	Código OMS	País contaminación	Clínica	Lesión	Localización lesión
815	MHOM/JO/2010/BCN-815	Jordania	LC	NC	NC
816	MHOM/ES/2010/BCN-816	España	LMC	NA	Cara
822	MHOM/MA/2010/BCN-822	Marruecos	LC	Múltiple	Cara y extremidades
827	MHOM/00/2011/BCN-827	Jordania/Siria	LC	Múltiple	Extremidades y otros
828	MHOM/ES/2011/BCN-828	España	LC	NC	Extremidades
852	MHOM/ES/2014/BCN-852	España	LC	Única	Cara
857	MHOM/ES/2014/BCN-857	España	LC	Única	Cara
859	MHOM/PA/2014/BCN-859	Panamá	LC	Única	Extremidades
871	MHOM/ES/2015/BCN871	España	LC	Única	NC
874	MHOM/00/2015/BCN-874	Perú/ Bolivia/ Colombia	LC	Múltiple	Extremidades y otros
885	MHOM/EC/2016/BCN-885	Ecuador	LC	Única	Extremidades
887	MHOM/ES/2016/BCN-887	España	LC	Única	Extremidades
888	MHOM/ES/2016/BCN-888	España	LC	Única	Extremidades
936	MHOM/ES/2017/BCN-936	España	LC	Única	Extremidades
944	MHOM/MA/2017/BCN-944	Marruecos	LC	Única	Extremidades
971	MHOM/00/2017/BCN-971	Italia/ España/ Portugal	LC	Única	Cara
972	MHOM/BR/2017/BCN-972	Brasil	LMC	NA	Cara
1021	MHOM/00/2017/BCN-1021	África occidental	LC	Única	Extremidades
1023	MHOM/MA/2018/BCN-1023	Marruecos	LC	Múltiple	Extremidades
1043	MHOM/MA/2018/BCN-1043	Marruecos	LC	Múltiple	NC

BCN: Código de la cepa del criobanco de la Universitat de Barcelona, NA: no aplicable, NC: No consta.



Tabla A5. Cepas utilizadas para el estudio isoenzimático y descripción de nuevos zimodemas causantes de leishmaniosis tegumentaria en América Latina (apartado 4.4).

BCN	Código OMS	País	Clínica	Lesión	Localización lesión	Centro aislador
545	MHOM/EC/2002/BCN-545	Ecuador	LC	Múltiple	Extremidades	HCB
717	MHOM/GT/2005/BCN-717	Guatemala	LC	Múltiple	Extremidades	HCB
859	MHOM/PA/2014/BCN-859	Panamá	LC	Única	Extremidades	HCB
885	MHOM/EC/2016/BCN-885	Ecuador	LC	Única	Extremidades	HSCSP

BCN: Código de la cepa criobanco de la Universitat de Barcelona. HCB: Hospital Clínic de Barcelona; HSCSP: Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona.

## Anexo 2. Condiciones específicas para las enzimas en las técnicas bioquímicas.

Tabla A6. Condiciones utilizadas para MLEE y soluciones de revelación.

Enzima	Tampón gel	Coenzimas y aditivos del gel	pH del gel	Solución revelación
MDH	Tris-Citrato	NAD	9,5	Tris-HCl (pH 8) + ácido málico + NaCO <sub>3</sub> + NAD + NBT + NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + PMS + agar
ME	Tris-Malato-EDTA/ Tris-Citrato	NADP/NAD	7,4/9,5	Tris-HCl (pH 8) + ácido málico + NaCO <sub>3</sub> + MgCl <sub>2</sub> + NADP + NBT + PMS + agar
ICD	Tris-Citrato	Mn	8,6	Tris-HCl (pH 8) + ácido isocítrico + MnCl <sub>2</sub> + MgCl <sub>2</sub> + NADP + NBT + PMS + agar
PGD	Tris-Malato-EDTA	NADP	7,4	Tris-HCl (pH 8) + ácido 6-fosfogluónico + MgCl <sub>2</sub> + NADP + NBT + PMS + agar
G6PD	Tris-Malato-EDTA	NADP	7,4	Tris-HCl (pH 8) + glucosa-6-fosfato + EDTA + NADP + NBT + PMS + agar
GLUD	Tris-Citrato	NADP	8,6	Tris-HCl (pH 8) + ácido glutámico + NADP + NBT + PMS + agar
DIA	Tris-Citrato	NADP	8,6	Tris-HCl (pH 8) + βNADH + MTT + DICIP + agar
NP <sub>1</sub> /NP <sub>2</sub>	Tris-Citrato	NADP	8,6	Tris-HCl (pH 8) + iosina + NBT + xantina oxidasa + PMS + agar
GOT <sub>1</sub> /GOT <sub>2</sub>	Tris-Malato-EDTA/ Tris-Citrato	NAD/NADP	7,4-8,6	Tris-HCl + α-ketoglutarato + ácido aspártico + pirodoxal-5-fosfato + FastBlue BB
PGM	Tris-Malato-EDTA	NAD	7,4	Tris-HCl (pH 8) + glucosa-1-fosfato + MgCl <sub>2</sub> + NAD + NADP + NBT + glucosa-6-fosfato deshidrogenasa + PMS + agar
FH	Tris-Malato-EDTA	-	7,4	Tris-HCl (pH 8) + ácido fumárico + piruvato monosódico + NAD + NBT + malato deshidrogenasa + PMS + agar
MPI	Tris-Citrato	NADP	8,6	Tris-HCl (pH 8) + fructosa-6-fosfato + MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O + NADP + NAD+ NBT + glucosa-6-fosfato deshidrogenasa + PMS + agar
GPI	Tris-Malato-EDTA	NAD	7,4	Tris-HCl (pH 8) + glucosa-1-fosfato + MgCl <sub>2</sub> + NAD + NADP + NBT + glucosa-6-fosfato deshidrogenasa + PMS + agar

**Anexo 3. Listado de secuencias obtenidas de GenBank para el estudio del complejo *L. donovani* (apartado 4.2).**

Tabla A7. Secuencias del *multilocus sequence analysis* de las cepas estudiadas. Números de acceso de GenBank para los siete loci.

<b>BCN</b>	<b>LEM</b>	<b>03.0980</b>	<b>04.0580</b>	<b>10.0580</b>	<b>12.0010</b>	<b>14.0130</b>	<b>31.0280</b>	<b>31.2610</b>
517	L0138	KC159259.1	KC159481.1	KC159037.1	KC159703.1	KC158815.1	KC159925.1	KC158593.1
527	L0075	KC159255.1	KC159477.1	KC159033.1	KC159699.1	KC158811.1	KC159921.1	KC158589.1
906	L3141	KC159385.1	KC159607.1	KC159163.1	KC159829.1	KC158941.1	KC160051.1	KC158719.1
907	L4223	KC159439.1	KC159661.1	KC159217.1	KC159883.1	KC158995.1	KC160105.1	KC158773.1
908	L3443	KC159408.1	KC159630.1	KC159186.1	KC159852.1	KC158964.1	KC160074.1	KC158742.1
910	L0890	KC159296.1	KC159518.1	KC159074.1	KC159740.1	KC158852.1	KC159962.1	KC158630.1
911	L1014	KC159308.1	KC159530.1	KC159086.1	KC159752.1	KC158864.1	KC159974.1	KC158642.1
912	L2388	KC159359.1	KC159581.1	KC159137.1	KC159803.1	KC158915.1	KC160025.1	KC158693.1
913	L5751	KC159475.1	KC159697.1	KC159253.1	KC159919.1	KC159031.1	KC160141.1	KC158809.1
914	L1560	KC159332.1	KC159554.1	KC159110.1	KC159776.1	KC158888.1	KC159998.1	KC158666.1
915	L1764	KC159341.1	KC159563.1	KC159119.1	KC159785.1	KC158897.1	KC160007.1	KC158675.1
916	L0698	KC159293.1	KC159515.1	KC159071.1	KC159737.1	KC158849.1	KC159959.1	KC158627.1
917	L1043	KC159311.1	KC159533.1	KC159089.1	KC159755.1	KC158867.1	KC159977.1	KC158645.1
919	L0417	KC159274.1	KC159496.1	KC159052.1	KC159718.1	KC158830.1	KC159940.1	KC158608.1
920	L4043	KC159434.1	KC159656.1	KC159212.1	KC159878.1	KC158990.1	KC160100.1	KC158768.1
934	L0494	KC159281.1	KC159503.1	KC159059.1	KC159725.1	KC158837.1	KC159947.1	KC158615.1
935	L2677	KC159369.1	KC159591.1	KC159147.1	KC159813.1	KC158925.1	KC160035.1	KC158703.1
938	L2506	KC159366.1	KC159588.1	KC159144.1	KC159810.1	KC158922.1	KC160032.1	KC158700.1
939	L3463	KC159409.1	KC159631.1	KC159187.1	KC159853.1	KC158965.1	KC160075.1	KC158743.1
940	L2795	KC159374.1	KC159596.1	KC159152.1	KC159818.1	KC158930.1	KC160040.1	KC158708.1
941	L4046	KC159435.1	KC159657.1	KC159213.1	KC159879.1	KC158991.1	KC160101.1	KC158769.1

Tabla A7 (continuación)

BCN	LEM	03.0980	04.0580	10.0580	12.0010	14.0130	31.0280	31.2610
942	L0980	KC159304.1	KC159526.1	KC159082.1	KC159748.1	KC158860.1	KC159970.1	KC158638.1
943	L2481	KC159365.1	KC159587.1	KC159143.1	KC159809.1	KC158921.1	KC160031.1	KC158699.1
945	L2884	KC159381.1	KC159603.1	KC159159.1	KC159825.1	KC158937.1	KC160047.1	KC158715.1
946	L1154	KC159318.1	KC159540.1	KC159096.1	KC159762.1	KC158874.1	KC159984.1	KC158652.1
947	L2141	KC159351.1	KC159573.1	KC159129.1	KC159795.1	KC158907.1	KC160017.1	KC158685.1
948	L4701	KC159455.1	KC159677.1	KC159233.1	KC159899.1	KC159011.1	KC160121.1	KC158789.1
949	L0935	KC159301.1	KC159523.1	KC159079.1	KC159745.1	KC158857.1	KC159967.1	KC158635.1
950	L0991	KC159305.1	KC159527.1	KC159083.1	KC159749.1	KC158861.1	KC159971.1	KC158639.1
951	L1019	KC159310.1	KC159532.1	KC159088.1	KC159754.1	KC158866.1	KC159976.1	KC158644.1
952	L3793	KC159421.1	KC159643.1	KC159199.1	KC159865.1	KC158977.1	KC160087.1	KC158755.1
954	L4474	KC159448.1	KC159670.1	KC159226.1	KC159892.1	KC159004.1	KC160114.1	KC158782.1
960	L2793	KC159372.1	KC159594.1	KC159150.1	KC159816.1	KC158928.1	KC160038.1	KC158706.1
961	L0719	KC159295.1	KC159517.1	KC159073.1	KC159739.1	KC158851.1	KC159961.1	KC158629.1
962	L3437	KC159407.1	KC159629.1	KC159185.1	KC159851.1	KC158963.1	KC160073.1	KC158741.1
963	L0946	KC159302.1	KC159524.1	KC159080.1	KC159746.1	KC158858.1	KC159968.1	KC158636.1
964	L1005	KC159307.1	KC159529.1	KC159085.1	KC159751.1	KC158863.1	KC159973.1	KC158641.1
967	L2455	KC159363.1	KC159585.1	KC159141.1	KC159807.1	KC158919.1	KC160029.1	KC158697.1
968	L4227	KC159441.1	KC159663.1	KC159219.1	KC159885.1	KC158997.1	KC160107.1	KC158775.1
969	L2975	KC159382.1	KC159604.1	KC159160.1	KC159826.1	KC158938.1	KC160048.1	KC158716.1
970	L1242	KC159322.1	KC159544.1	KC159100.1	KC159766.1	KC158878.1	KC159988.1	KC158656.1
975	L2794	KC159373.1	KC159595.1	KC159151.1	KC159817.1	KC158929.1	KC160039.1	KC158707.1
986	L3976	KC159430.1	KC159652.1	KC159208.1	KC159874.1	KC158986.1	KC160096.1	KC158764.1

Tabla A7 (continuación)

BCN	LEM	03.0980	04.0580	10.0580	12.0010	14.0130	31.0280	31.2610
987	L3968	KC159429.1	KC159651.1	KC159207.1	KC159873.1	KC158985.1	KC160095.1	KC158763.1
988	L0707	KC159294.1	KC159516.1	KC159072.1	KC159738.1	KC158850.1	KC159960.1	KC158628.1
989	L0232	KC159266.1	KC159488.1	KC159044.1	KC159710.1	KC158822.1	KC159932.1	KC158600.1
1010	L2180	KC159352.1	KC159574.1	KC159130.1	KC159796.1	KC158908.1	KC160018.1	KC158686.1
1011	L0659	KC159290.1	KC159512.1	KC159068.1	KC159734.1	KC158846.1	KC159956.1	KC158624.1
1012	L0668	KC159292.1	KC159514.1	KC159070.1	KC159736.1	KC158848.1	KC159958.1	KC158626.1
1013	L0425	KC159276.1	KC159498.1	KC159054.1	KC159720.1	KC158832.1	KC159942.1	KC158610.1
1014	L3942	KC159426.1	KC159648.1	KC159204.1	KC159870.1	KC158982.1	KC160092.1	KC158760.1
1016	L3988	KC159432.1	KC159654.1	KC159210.1	KC159876.1	KC158988.1	KC160098.1	KC158766.1
1017	L3588	KC159417.1	KC159639.1	KC159195.1	KC159861.1	KC158973.1	KC160083.1	KC158751.1
1018	L0356	KC159272.1	KC159494.1	KC159050.1	KC159716.1	KC158828.1	KC159938.1	KC158606.1
1019	L1153	KC159317.1	KC159539.1	KC159095.1	KC159761.1	KC158873.1	KC159983.1	KC158651.1
1020	L4392	KC159447.1	KC159669.1	KC159225.1	KC159891.1	KC159003.1	KC160113.1	KC158781.1

BCN: Código de la cepa en el Criobanco de la Universitat de Barcelona. LEM: Código de la cepa en el CRB-Leish de Montpellier.

Tabla A8. Número de acceso de las secuencias adicionales utilizadas para construir la *neighbour-net* del *multilocus sequence analysis*.

03.0980	04.0580	10.0580	12.0010	14.0130	31.0280	31.2610	Complejo	Especie
KC159397.1	KC159619.1	KC159175.1	KC159841.1	KC158953.1	KC160063.1	KC158731.1	<i>L. tropica</i>	<i>L. aethiopica</i>
KC159396.1	KC159618.1	KC159174.1	KC159840.1	KC158952.1	KC160062.1	KC158730.1	<i>L. tropica</i>	<i>L. aethiopica</i>
KC159395.1	KC159617.1	KC159173.1	KC159839.1	KC158951.1	KC160061.1	KC158729.1	<i>L. tropica</i>	<i>L. aethiopica</i>
KC159392.1	KC159614.1	KC159170.1	KC159836.1	KC158948.1	KC160058.1	KC158726.1	<i>L. tropica</i>	<i>L. aethiopica</i>
KC159358.1	KC159580.1	KC159136.1	KC159802.1	KC158914.1	KC160024.1	KC158692.1	<i>L. tropica</i>	<i>L. aethiopica</i>
KC159357.1	KC159579.1	KC159135.1	KC159801.1	KC158913.1	KC160023.1	KC158691.1	<i>L. tropica</i>	<i>L. aethiopica</i>
KC159336.1	KC159560.1	KC159114.1	KC159780.1	KC158892.1	KC160002.1	KC158670.1	<i>L. tropica</i>	<i>L. aethiopica</i>
KC159335.1	KC159557.1	KC159113.1	KC159779.1	KC158891.1	KC160000.1	KC158669.1	<i>L. tropica</i>	<i>L. aethiopica</i>
KC159330.1	KC159552.1	KC159108.1	KC159774.1	KC158886.1	KC159996.1	KC158664.1	<i>L. tropica</i>	<i>L. aethiopica</i>
KC159316.1	KC159538.1	KC159094.1	KC159760.1	KC158872.1	KC159982.1	KC158650.1	<i>L. tropica</i>	<i>L. aethiopica</i>
KC159315.1	KC159537.1	KC159093.1	KC159759.1	KC158871.1	KC159981.1	KC158649.1	<i>L. tropica</i>	<i>L. aethiopica</i>
KC159312.1	KC159534.1	KC159090.1	KC159756.1	KC158868.1	KC159978.1	KC158646.1	<i>L. tropica</i>	<i>L. aethiopica</i>
KC159288.1	KC159510.1	KC159066.1	KC159732.1	KC158844.1	KC159954.1	KC158622.1	<i>L. tropica</i>	<i>L. aethiopica</i>
KC159286.1	KC159508.1	KC159064.1	KC159730.1	KC158842.1	KC159952.1	KC158620.1	<i>L. tropica</i>	<i>L. aethiopica</i>
KC159261.1	KC159483.1	KC159039.1	KC159705.1	KC158817.1	KC159927.1	KC158595.1	<i>L. tropica</i>	<i>L. aethiopica</i>
KC159260.1	KC159482.1	KC159038.1	KC159704.1	KC158816.1	KC159926.1	KC158594.1	<i>L. tropica</i>	<i>L. aethiopica</i>
KC159314.1	KC159536.1	KC159092.1	KC159758.1	KC158870.1	KC159980.1	KC158648.1	<i>L. major</i>	<i>L. arabica</i>
KC159402.1	KC159624.1	KC159180.1	KC159846.1	KC158958.1	KC160068.1	KC158736.1	<i>L. major</i>	<i>L. gerbilli</i>
KC159400.1	KC159622.1	KC159178.1	KC159844.1	KC158956.1	KC160066.1	KC158734.1	<i>L. major</i>	<i>L. gerbilli</i>
KC159399.1	KC159621.1	KC159177.1	KC159843.1	KC158955.1	KC160065.1	KC158733.1	<i>L. major</i>	<i>L. gerbilli</i>
KC159277.1	KC159499.1	KC159055.1	KC159721.1	KC158833.1	KC159943.1	KC158611.1	<i>L. major</i>	<i>L. gerbilli</i>
KC159473.1	KC159695.1	KC159251.1	KC159917.1	KC159029.1	KC160139.1	KC158807.1	<i>L. major</i>	<i>L. major</i>

Tabla A8 (continuación)

03.0980	04.0580	10.0580	12.0010	14.0130	31.0280	31.2610	Complejo	Especie
KC159465.1	KC159687.1	KC159243.1	KC159909.1	KC159021.1	KC160131.1	KC158799.1	<i>L. major</i>	<i>L. major</i>
KC159461.1	KC159683.1	KC159239.1	KC159905.1	KC159017.1	KC160127.1	KC158795.1	<i>L. major</i>	<i>L. major</i>
KC159459.1	KC159681.1	KC159237.1	KC159903.1	KC159015.1	KC160125.1	KC158792.1	<i>L. major</i>	<i>L. major</i>
KC159452.1	KC159674.1	KC159230.1	KC159896.1	KC159008.1	KC160118.1	KC158786.1	<i>L. major</i>	<i>L. major</i>
KC159438.1	KC159660.1	KC159216.1	KC159882.1	KC158994.1	KC160104.1	KC158772.1	<i>L. major</i>	<i>L. major</i>
KC159437.1	KC159659.1	KC159215.1	KC159881.1	KC158993.1	KC160103.1	KC158771.1	<i>L. major</i>	<i>L. major</i>
KC159436.1	KC159658.1	KC159214.1	KC159880.1	KC158992.1	KC160102.1	KC158770.1	<i>L. major</i>	<i>L. major</i>
KC159413.1	KC159635.1	KC159191.1	KC159857.1	KC158969.1	KC160079.1	KC158747.1	<i>L. major</i>	<i>L. major</i>
KC159412.1	KC159634.1	KC159190.1	KC159856.1	KC158968.1	KC160078.1	KC158746.1	<i>L. major</i>	<i>L. major</i>
KC159410.1	KC159632.1	KC159188.1	KC159854.1	KC158966.1	KC160076.1	KC158744.1	<i>L. major</i>	<i>L. major</i>
KC159386.1	KC159608.1	KC159164.1	KC159830.1	KC158942.1	KC160052.1	KC158720.1	<i>L. major</i>	<i>L. major</i>
KC159384.1	KC159606.1	KC159162.1	KC159828.1	KC158940.1	KC160050.1	KC158718.1	<i>L. major</i>	<i>L. major</i>
KC159379.1	KC159601.1	KC159157.1	KC159823.1	KC158935.1	KC160045.1	KC158713.1	<i>L. major</i>	<i>L. major</i>
KC159331.1	KC159553.1	KC159109.1	KC159775.1	KC158887.1	KC159997.1	KC158665.1	<i>L. major</i>	<i>L. major</i>
KC159319.1	KC159541.1	KC159097.1	KC159763.1	KC158875.1	KC159985.1	KC158653.1	<i>L. major</i>	<i>L. major</i>
KC159299.1	KC159521.1	KC159077.1	KC159743.1	KC158855.1	KC159965.1	KC158633.1	<i>L. major</i>	<i>L. major</i>
KC159298.1	KC159520.1	KC159076.1	KC159742.1	KC158854.1	KC159964.1	KC158632.1	<i>L. major</i>	<i>L. major</i>
KC159297.1	KC159519.1	KC159075.1	KC159741.1	KC158853.1	KC159963.1	KC158631.1	<i>L. major</i>	<i>L. major</i>
KC159280.1	KC159502.1	KC159058.1	KC159724.1	KC158836.1	KC159946.1	KC158614.1	<i>L. major</i>	<i>L. major</i>
KC159271.1	KC159493.1	KC159049.1	KC159715.1	KC158827.1	KC159937.1	KC158605.1	<i>L. major</i>	<i>L. major</i>
KC159263.1	KC159485.1	KC159041.1	KC159707.1	KC158819.1	KC159929.1	KC158597.1	<i>L. major</i>	<i>L. major</i>
KC159262.1	KC159484.1	KC159040.1	KC159706.1	KC158818.1	KC159928.1	KC158596.1	<i>L. major</i>	<i>L. major</i>

Tabla A8 (continuación)

03.0980	04.0580	10.0580	12.0010	14.0130	31.0280	31.2610	Complejo	Especie
KC159258.1	KC159480.1	KC159036.1	KC159702.1	KC158814.1	KC159924.1	KC158592.1	<i>L. major</i>	<i>L. major</i>
KC159257.1	KC159479.1	KC159035.1	KC159701.1	KC158813.1	KC159923.1	KC158591.1	<i>L. major</i>	<i>L. major</i>
KC159256.1	KC159478.1	KC159034.1	KC159700.1	KC158812.1	KC159922.1	KC158590.1	<i>L. major</i>	<i>L. major</i>
KC159254.1	KC159476.1	KC159032.1	KC159698.1	KC158810.1	KC159920.1	KC158588.1	<i>L. major</i>	<i>L. major</i>
KC159431.1	KC159653.1	KC159209.1	KC159875.1	KC158987.1	KC160097.1	KC158765.1	<i>L. tropica</i>	<i>L. tropica</i>
KC159427.1	KC159649.1	KC159205.1	KC159871.1	KC158983.1	KC160093.1	KC158761.1	<i>L. tropica</i>	<i>L. tropica</i>
KC159423.1	KC159645.1	KC159201.1	KC159867.1	KC158979.1	KC160089.1	KC158757.1	<i>L. tropica</i>	<i>L. tropica</i>
KC159388.1	KC159610.1	KC159166.1	KC159832.1	KC158944.1	KC160054.1	KC158722.1	<i>L. tropica</i>	<i>L. tropica</i>
KC159377.1	KC159599.1	KC159155.1	KC159821.1	KC158933.1	KC160043.1	KC158711.1	<i>L. tropica</i>	<i>L. tropica</i>
KC159362.1	KC159584.1	KC159140.1	KC159806.1	KC158918.1	KC160028.1	KC158696.1	<i>L. tropica</i>	<i>L. tropica</i>
KC159356.1	KC159578.1	KC159134.1	KC159800.1	KC158912.1	KC160022.1	KC158690.1	<i>L. tropica</i>	<i>L. tropica</i>
KC159349.1	KC159571.1	KC159127.1	KC159793.1	KC158905.1	KC160015.1	KC158683.1	<i>L. tropica</i>	<i>L. tropica</i>
KC159348.1	KC159570.1	KC159126.1	KC159792.1	KC158904.1	KC160014.1	KC158682.1	<i>L. tropica</i>	<i>L. tropica</i>
KC159345.1	KC159567.1	KC159123.1	KC159789.1	KC158901.1	KC160011.1	KC158679.1	<i>L. tropica</i>	<i>L. tropica</i>
KC159343.1	KC159565.1	KC159121.1	KC159787.1	KC158899.1	KC160009.1	KC158677.1	<i>L. tropica</i>	<i>L. tropica</i>
KC159339.1	KC159561.1	KC159117.1	KC159783.1	KC158895.1	KC160005.1	KC158673.1	<i>L. tropica</i>	<i>L. tropica</i>
KC159329.1	KC159551.1	KC159107.1	KC159773.1	KC158885.1	KC159995.1	KC158663.1	<i>L. tropica</i>	<i>L. tropica</i>
KC159328.1	KC159550.1	KC159106.1	KC159772.1	KC158884.1	KC159994.1	KC158662.1	<i>L. tropica</i>	<i>L. tropica</i>
KC159323.1	KC159545.1	KC159101.1	KC159767.1	KC158879.1	KC159989.1	KC158657.1	<i>L. tropica</i>	<i>L. tropica</i>
KC159309.1	KC159531.1	KC159087.1	KC159753.1	KC158865.1	KC159975.1	KC158643.1	<i>L. tropica</i>	<i>L. tropica</i>
KC159303.1	KC159525.1	KC159081.1	KC159747.1	KC158862.1	KC159969.1	KC158637.1	<i>L. tropica</i>	<i>L. tropica</i>
KC159287.1	KC159509.1	KC159065.1	KC159731.1	KC158843.1	KC159953.1	KC158621.1	<i>L. tropica</i>	<i>L. tropica</i>



Tabla A8 (continuación)

03.0980	04.0580	10.0580	12.0010	14.0130	31.0280	31.2610	Complejo	Especie
KC159285.1	KC159507.1	KC159063.1	KC159729.1	KC158841.1	KC159951.1	KC158619.1	<i>L. tropica</i>	<i>L. tropica</i>
KC159264.1	KC159486.1	KC159042.1	KC159708.1	KC158820.1	KC159930.1	KC158598.1	<i>L. tropica</i>	<i>L. tropica</i>
KC159406.1	KC159628.1	KC159184.1	KC159850.1	KC158962.1	KC160072.1	KC158740.1	<i>L. major</i>	<i>L. turanica</i>
KC159405.1	KC159627.1	KC159183.1	KC159849.1	KC158961.1	KC160071.1	KC158739.1	<i>L. major</i>	<i>L. turanica</i>
KC159404.1	KC159626.1	KC159182.1	KC159848.1	KC158960.1	KC160070.1	KC158738.1	<i>L. major</i>	<i>L. turanica</i>
KC159403.1	KC159625.1	KC159181.1	KC159847.1	KC158959.1	KC160069.1	KC158737.1	<i>L. major</i>	<i>L. turanica</i>
KC159401.1	KC159623.1	KC159179.1	KC159845.1	KC158957.1	KC160067.1	KC158735.1	<i>L. major</i>	<i>L. turanica</i>
KC159284.1	KC159506.1	KC159062.1	KC159728.1	KC158840.1	KC159950.1	KC158618.1	<i>L. major</i>	<i>L. turanica</i>
KC159283.1	KC159505.1	KC159061.1	KC159727.1	KC158839.1	KC159949.1	KC158617.1	<i>L. major</i>	<i>L. turanica</i>
KC159275.1	KC159497.1	KC159053.1	KC159719.1	KC158831.1	KC159941.1	KC158609.1	<i>L. major</i>	<i>L. turanica</i>

Tabla A9. Número de acceso de las secuencias adicionales utilizadas para construir la *neighbour-net* del *hsp70*.

Número de acceso	Complejo	Especie
HF586381	<i>L. major</i>	<i>L. major</i>
HF586380	<i>L. major</i>	<i>L. major</i>
HF586379	<i>L. major</i>	<i>L. major</i>
HF586346	<i>L. major</i>	<i>L. major</i>
HF586344	<i>L. major</i>	<i>L. major</i>
LN907840	<i>L. major</i>	<i>L. major</i>
HF586398	<i>L. major</i>	<i>L. major</i>
HF586391	<i>L. major</i>	<i>L. major</i>
HF586390	<i>L. major</i>	<i>L. major</i>
HF586387	<i>L. major</i>	<i>L. major</i>
HF586382	<i>L. major</i>	<i>L. major</i>
HF586403	<i>L. major</i>	<i>L. major</i>
HF586356	<i>L. major</i>	<i>L. turanica</i>
JX021443	<i>L. major</i>	<i>L. turanica</i>
JX021442	<i>L. major</i>	<i>L. turanica</i>
JX021438	<i>L. major</i>	<i>L. turanica</i>
JX021441	<i>L. major</i>	<i>L. turanica</i>
KX061901	<i>L. major</i>	<i>L. gerbilli</i>
HF586355	<i>L. major</i>	<i>L. gerbilli</i>
KX061899	<i>L. tropica</i>	<i>L. tropica</i>
HF586348	<i>L. tropica</i>	<i>L. tropica</i>
HF586347	<i>L. tropica</i>	<i>L. tropica</i>
FN395025	<i>L. tropica</i>	<i>L. tropica</i>
FN395026	<i>L. tropica</i>	<i>L. tropica</i>
LN907846	<i>L. tropica</i>	<i>L. tropica</i>
HF586411	<i>L. tropica</i>	<i>L. aethiopica</i>
HF586410	<i>L. tropica</i>	<i>L. aethiopica</i>
HF586407	<i>L. tropica</i>	<i>L. aethiopica</i>
HF586383	<i>L. tropica</i>	<i>L. aethiopica</i>
FN395021	<i>L. tropica</i>	<i>L. aethiopica</i>
FN395018	<i>L. tropica</i>	<i>L. aethiopica</i>
LN907830	<i>L. tropica</i>	<i>L. aethiopica</i>
FN395019	<i>L. tropica</i>	<i>L. aethiopica</i>
FN395020	<i>L. tropica</i>	<i>L. aethiopica</i>

Tabla A10. Número de acceso de las secuencias adicionales utilizadas para construir la *neighbour-net* del *got*.

Número de acceso	Complejo	Especie
AM117189	<i>L. major</i>	<i>L. major</i>
AODR01000053	<i>L. major</i>	<i>L. major</i>
AFZI01000779	<i>L. major</i>	<i>L. major</i>
AM117190	<i>L. major</i>	<i>L. arabica</i>
ATBH02001297	<i>L. major</i>	<i>L. arabica</i>
ATBU01000001	<i>L. major</i>	<i>L. turanica</i>
ATBK01000149	<i>L. major</i>	<i>L. gerbilli</i>
ATAT01000063	<i>L. tropica</i>	<i>L. tropica</i>
AM117191	<i>L. tropica</i>	<i>L. tropica</i>
AJ620822	<i>L. tropica</i>	<i>L. tropica</i>
QEHO01000523	<i>L. tropica</i>	<i>L. tropica</i>
AUMB02001491	<i>L. tropica</i>	<i>L. aethiopica</i>
AJ620823	<i>L. tropica</i>	<i>L. aethiopica</i>

Tabla A11. Números de acceso de los genomas utilizados para la comparativa *average nucleotide identity*.

Número de acceso	Complejo	Especie
GCA_000227135	<i>L. donovani</i>	<i>L. donovani</i>
GCA_003719575	<i>L. donovani</i>	<i>L. donovani</i>
GCA_001989955	<i>L. donovani</i>	<i>L. donovani</i>
GCA_001989975	<i>L. donovani</i>	<i>L. donovani</i>
GCA_002243465	<i>L. donovani</i>	<i>L. donovani</i>
GCA_000470725	<i>L. donovani</i>	<i>L. donovani</i>
GCA_003730175	<i>L. donovani</i>	<i>L. donovani</i>
GCA_003730215	<i>L. donovani</i>	<i>L. donovani</i>
GCA_000002875	<i>L. donovani</i>	<i>L. infantum</i>
GCA_003020905	<i>L. donovani</i>	<i>L. infantum</i>
GCA_003671315	<i>L. donovani</i>	<i>L. infantum</i>
GCA_900500625	<i>L. donovani</i>	<i>L. infantum</i>
GCA_000002725	<i>L. major</i>	<i>L. major</i>
GCA_000250755	<i>L. major</i>	<i>L. major</i>
GCA_000331345	<i>L. major</i>	<i>L. major</i>
GCA_000410695	<i>L. major</i>	<i>L. arabica</i>
GCA_000441995	<i>L. major</i>	<i>L. turanica</i>
GCA_000443025	<i>L. major</i>	<i>L. gerbilli</i>
GCA_000410715	<i>L. tropica</i>	<i>L. tropica</i>
GCA_003067545	<i>L. tropica</i>	<i>L. tropica</i>
GCA_003352575	<i>L. tropica</i>	<i>L. tropica</i>
GCA_000444285	<i>L. tropica</i>	<i>L. aethiopica</i>
GCA_003992445	<i>L. tropica</i>	<i>L. aethiopica</i>

#### Anexo 4. Condiciones de amplificación de cada uno de los genes.

Tabla A12. Cebadores y ciclos de temperaturas utilizados en la amplificación de cada uno de los genes.

Fragmento (tamaño)	Cebadores	Ciclos de temperatura	Referencias
<i>hsp70-N</i> <sup>1</sup> (552 pb)	<i>hsp70-F</i> 25: 5'-ggacgccggcagcattkct-3' <i>hsp70-R</i> 617: 5'-cgaagaagtccgatacgaggga-3'	3 min a 95 °C 35 ciclos de: 40 s a 94 °C, 1 min a 61 °C, 1 min a 72 °C 10 min a 72 °C	Van der Auwera <i>et al.</i> (2013)
<i>hsp70-T</i> <sup>1</sup> (723 pb)	<i>hsp70-F</i> 6: 5'-gtgcacgacgtggtgctggtg-3' <i>hsp70-R</i> 1310: 5'-cctggttgtttcagccactc-3'		
<i>rpoHLLS</i> (529 pb)	31.2610-F: 5'-aagtaccagcagtcacctc-3' 31.2610-R: 5'-gcagccgcacaatgcgct-3'	3 min a 96 °C 35 ciclos de: 30 s a 94 °C, 30 min a 58 °C, 1 min a 72 °C 5 min a 72 °C	Ravel <i>et al.</i> (2006)
<i>fh</i> (615 pb)	Subgénero <i>Leishmania</i> FH-F: 5'-agcgtcttgtttccca-3' fhint_R: 5'-ggcaatgaagaggaaactcgta-3'  Subgénero <i>Viannia</i> fhnm_F: 5'-tcgtcttcgtcttctgtgc-3' fhint_R: 5'-ggcaatgaagaggaaactcgta-3'	5 min a 95 °C 35 ciclos de: 1 min a 95 °C, 1 min a 57 °C, 1 min a 72 °C 10 min a 72 °C	Zemanová <i>et al.</i> (2007)
ITS2 (entre 524 y 683 pb)	L5.8SR: 5'-aagtgcgataagtggta-3' LVTSV: 5'-acactcaggtctgtaaac-3'	2 min a 95°C 34 ciclos de: 20s a 95°C, 30s a 57°C, 1 min a 72°C 6 min a 72°C	El Tai <i>et al.</i> (2001)

Fragmento (tamaño)	Cebadores	Ciclos de temperatura	Referencias
<i>got</i> (1239 pb)	<p>got-f2new: 5'-ACGAGCGCCGTCCGYAA-3'</p> <p>got-r2new: 5'-ttcymcatccaccaagc-3'</p> <p>Cebadores adicionales para secuenciación<sup>2</sup>:</p> <p>got_Inc: 5'-gcatgagacggcgctgat-3'</p> <p>got_Fin: 5'-tgcgagatgaagatgacatc-3'</p>	<p>3 min a 95°C</p> <p>35 ciclos de:</p> <p>1 min a 95°C,</p> <p>1 min a 60°C,</p> <p>90s a 72°C</p> <p>10 min a 72°C</p>	Maurício <i>et al.</i> (2006)

<sup>1</sup> El fragmento completo de 1245pb del *hsp70* se obtuvo mediante la amplificación de dos fragmentos más pequeños (N y T), unidos *in silico* en el proceso de análisis.

<sup>2</sup> Los cebadores adicionales fueron utilizados en una segunda secuenciación cuando los con los cebadores principales no se consiguió secuenciar los extremos con suficiente calidad.

## Anexo 5. Publicación resultante de la aplicación del MALDI-TOF a la caracterización de las leishmanias (apartado 4.1).



Journal of  
Clinical Microbiology®

PARASITOLOGY



# 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

Laurence Lachaud,<sup>a</sup> Anna Fernández-Arévalo,<sup>b,c,d</sup> Anne-Cécile Normand,<sup>e</sup> Patrick Lami,<sup>a</sup> Cécile Nabet,<sup>f</sup> Jean Luc Donnadieu,<sup>g</sup> Martine Piarroux,<sup>h</sup> Farid Djenad,<sup>a</sup> Carole Cassagne,<sup>e</sup> Christophe Ravel,<sup>a</sup> Silvia Tebar,<sup>c</sup> Teresa Llovet,<sup>b,i</sup> Denis Blanchet,<sup>j</sup> Magalie Demar,<sup>k</sup> Zoubir Harrat,<sup>j</sup> Karim Aoun,<sup>k</sup> Patrick Bastien,<sup>a</sup> Carmen Muñoz,<sup>b,i</sup> Montserrat Gállego,<sup>c,d</sup> Renaud Piarroux<sup>e</sup>

Département de Parasitologie-Mycologie, Centre National de Référence des Leishmanioses, Université de Montpellier, Centre Hospitalier Universitaire de Montpellier, Montpellier, France<sup>a</sup>; Servei de Microbiologia, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain<sup>b</sup>; Secció de Parasitologia, Facultat de Farmàcia i Ciències de l’Alimentació, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain<sup>c</sup>; ISGlobal, Barcelona Center of International Health Research (CRESB), Hospital Clinic-Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain<sup>d</sup>; Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU Timone, Université d’Aix-Marseille, Marseille, France<sup>e</sup>; Laboratoire Hospitalo-Universitaire de Parasito-Mycologie, EA 3593, EPat Ecosystèmes Amazoniens et Pathologie Tropicale, Université de Guyane, Laboratoire Associé au CNR Leishmania, Cayenne, France<sup>f</sup>; Association Passerelles, Montpellier, France<sup>g</sup>; Université Aix-Marseille, INSERM-IRD-AMU UMR 912, Marseille, France<sup>h</sup>; Departament de Genètica i Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, Cerdanyola del Vallès, Spain<sup>i</sup>; Laboratoire d’Eco-Epidémiologie Parasitaire et Génétique des Populations, Institut Pasteur d’Algérie, Algiers, Algeria<sup>j</sup>; Laboratoire de Parasitologie Médicale, Biotechnologies et Biomolécules, Institut Pasteur de Tunis, Tunis, Tunisia<sup>k</sup>

**ABSTRACT** Human leishmaniasis are widespread diseases with different clinical forms caused by about 20 species within the *Leishmania* genus. *Leishmania* species identification is relevant for therapeutic management and prognosis, especially for cutaneous and mucocutaneous forms. Several methods are available to identify *Leishmania* species from culture, but they have not been standardized for the majority of the currently described species, with the exception of multilocus enzyme electrophoresis. Moreover, these techniques are expensive, time-consuming, and not available in all laboratories. Within the last decade, mass spectrometry (MS) has been adapted for the identification of microorganisms, including *Leishmania*. However, no commercial reference mass-spectral database is available. In this study, a reference mass-spectral library (MSL) for *Leishmania* isolates, accessible through a free Web-based application (mass-spectral identification [MSI]), was constructed and tested. It includes mass-spectral data for 33 different *Leishmania* species, including species that infect humans, animals, and phlebotomine vectors. Four laboratories on two continents evaluated the performance of MSI using 268 samples, 231 of which were *Leishmania* strains. All *Leishmania* strains, but one, were correctly identified at least to the complex level. A risk of species misidentification within the *Leishmania donovani*, *L. guyanensis*, and *L. braziliensis* complexes was observed, as previously reported for other techniques. The tested application was reliable, with identification results being comparable to those obtained with reference methods but with a more favorable cost-efficiency ratio. This free online identification system relies on a scalable database and can be implemented directly in users’ computers.

**KEYWORDS** *Leishmania*, MALDI-TOF, database, identification online

Received 31 May 2017. Returned for modification 27 June 2017. Accepted 11 July 2017.

Accepted manuscript posted online 19 July 2017.

**Citation** Lachaud L, Fernández-Arévalo A, Normand A-C, Lami P, Nabet C, Donnadieu JL, 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. *J Clin Microbiol* 55:2924–2933. <https://doi.org/10.1128/JCM.00845-17>.

**Editor** Michael J. Loeffelholz, University of Texas Medical Branch

**Copyright** © 2017 American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Address correspondence to Renaud Piarroux, [mpiarroux@yahoo.fr](mailto:mpiarroux@yahoo.fr).

L.L. and A.F.-A. contributed equally to this work.

Leishmaniasis is caused by protozoan parasites that belong to the genus *Leishmania* and are transmitted by the bite of female phlebotomine sand flies. Leishmaniasis is a widespread disease, with 350 million people at risk and 12 million new cases per year in more than 98 countries (1). Currently, 53 *Leishmania* species have been described and are included in the two main phylogenetic lineages, euleishmania and paraleishmania. Among them, 31 species are involved in mammalian parasitism, and 20 species are associated with human leishmaniasis (2). Different clinical forms are commonly observed, including cutaneous, mucocutaneous, and visceral forms. Cutaneous leishmaniasis (CL) affects 1.5 million patients per year and displays a large spectrum of clinical forms, from small self-resolving papules to destructive mucosal lesions. The clinical presentation of CL depends on the *Leishmania* species, but the lesion characteristics and the probable place of contamination are not specific enough to determine the species involved (3). Nevertheless, the patient's travel history is a very important piece of information and could be considered a quality control for diagnostic results. Infections by two species of the *Leishmania* subgenus (*Leishmania major* and *L. mexicana*) show frequent spontaneous cures within a few months (3). On the other hand, the two main species of the *Viannia* subgenus (*Leishmania braziliensis* and *L. panamensis-L. guyanensis*) are associated with a 1 to 15% risk of delayed mucosal metastasis (4). Therefore, *Leishmania* species identification is especially relevant in CL and mucocutaneous leishmaniasis for therapeutic management (5). Moreover, *Leishmania* species identification remains fundamental for understanding complex epidemiological cycles and for setting up disease control measures. Several methods for *Leishmania* identification to the species level are available (reviewed in reference 6). Molecular methods allow *Leishmania* typing directly from clinical samples (e.g., skin biopsy specimens) or from parasite cultures (7). Multilocus enzyme electrophoresis (MLEE), which is based on parasite culture isolation, is considered by the World Health Organization to be the gold standard for parasite typing and is the only technique that has been evaluated for almost all currently identified *Leishmania* species (8). Nevertheless, this method is cumbersome, time-consuming, and used in only a few laboratories worldwide. Alternatively, PCR-based methods, such as restriction fragment length polymorphism (RFLP) or amplicon sequence analysis, have been proposed as methods to identify *Leishmania* species. Although they are simpler than MLEE, they remain time-consuming and are not available everywhere.

During the last decade, mass spectrometry (MS) has been adapted to microorganism identification. Nowadays, matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight (MALDI-TOF) MS is integrated into the workflow of many routine laboratories, thus greatly simplifying pathogen identification and improving patient care (reviewed in reference 9). A few studies support the proof-of-concept for *Leishmania* species identification with this method (10–12). However, those studies were done by using in-house databases that are not available to other people working on leishmaniasis. As no reference mass-spectral library (MSL) for *Leishmania* is commercially available, the aim of this study was to construct and test the reliability of a reference MSL using samples from an international collection of *Leishmania* isolates in Montpellier, France (Centre de Ressources Biologiques des *Leishmania* [CRB-Leish]). This library is available through a free online mass-spectral identification (MSI) application.

(This study was presented in part as a poster at the 6th World Congress on Leishmaniasis, Toledo, Spain, 16 to 20 May 2017 [13].)

## RESULTS

**Construction and testing of the mass-spectral reference database (MSL).** The *Leishmania* MSL was built by using the mass spectra of 121 well-characterized *Leishmania* strains from the CRB-Leish collection (Table 1). The MSL was implemented in a specific Web-based application designed for mass-spectral identification (MSI application; <https://biological-mass-spectrometry-identification.com/msi/>) and then tested with an independent panel of 268 samples (231 *Leishmania* isolates and 37 outgroup controls) from four different laboratories (see Table 2 for a complete description of



**TABLE 1** Isolates used for mass-spectral library construction<sup>a</sup>

Section	Subgenus	Complex	Taxon (no. of isolates)	Isolate(s) (WHO code) used for MSL construction	
Euleishmania	<i>L. enriettii</i> complex	<i>L. enriettii</i>	<i>L. enriettii</i> (2)	MCAV/BR/45/L88, MCAV/BR/95/CUR2	
			<i>L. martiniquensis</i> (3)	MHOM/GP/2008/LEM5748, MHOM/MQ/92/MAR1, MHOM/MQ/94/LEM2870CL	
			<i>L. siamensis</i> (1)	MHOM/TH/2010/TR	
	<i>Leishmania</i>	<i>L. donovani</i>	<i>L. archibaldi</i> (8)	MHOM/ET/72/GEBRE1, MCAN/SD/98/LEM3556, MCAN/SD/99/LEM3796, MHOM/TR/2001/EP59, MHOM/SD/97/LEM3463, MHOM/SD/97/LEM3429, MHOM/SD/2002/MW116, MHOM/SD/2002/MW101	
			<i>L. donovani</i> (6)	MHOM/IN/00/DEVI, MHOM/IN/80/DD8, MHOM/IN/96/THAK57, MHOM/IN/99/8998, MHOM/TR/2012/LP555, MHOM/LK/2010/OVN3	
			<i>L. infantum</i> (7)	MHOM/EG/87/RTC2, MCAN/FR/87/RM1, MHOM/DZ/82/LIPA59, MHOM/TN/80/IPT1, MHOM/FR/78/LEM75, MHOM/DZ/83/LIPA96, MHOM/FR/88/LEM1265	
			<i>L. major</i>	<i>L. arabica</i> (5)	MPSA/SA/83/JISH220, MCAN/SA/84/MD84, MPSA/SA/84/JISH238, MPSA/SA/84/JISH231, MPSA/SA/83/JISH224
			<i>L. gerbilli</i> (3)	MRHO/CN/60/GERBILLI, MRHO/SU/87/E11, MRHO/SU/88/KD/88984	
		<i>L. major</i> (7)	MHOM/IL/80/FRIEDLIN2, MHOM/IL/2008/LRCL1350, MHOM/MA/81/LEM265, MHOM/MA/2003/LEM4685, MRHO/SU/59/Pstrain, MHOM/TN/2001/LEM4286, MHOM/SU/73/5ASKH		
		<i>L. turanica</i> (6)	MMEL/SU/79/MEL, MHOM/SU/64/VL, MRHO/SU/65/VL, MRHO/SU/74/95A, MRHO/SU/95/T9562R, MRHO/SU/91/T/91011L TM		
		<i>L. mexicana</i>	<i>L. amazonensis</i> (4)	MHOM/BR/72/M1845, MHOM/BR/73/M2269, MHOM/GF/2002/LAV003, MHOM/VE/2004/OHN/15	
		<i>L. aristidesi</i> (1)	MORY/PA/69/GML3		
		<i>L. garnhami</i> (1)	MHOM/VE/76/JAP78		
	<i>L. mexicana</i> (4)	MHOM/BZ/82/BEL21, MNYC/BZ/62/M379, MHOM/VE/2004/CAP04, MHOM/HN/2002/LLM/1162			
	<i>L. pifanoi</i> (1)	MHOM/VE/57/LL1			
	<i>L. tropica</i>	<i>L. aethiopia</i> (6)	MHOM/ET/72/L100, MHOM/ET/91/KASSAYE, MHOM/ET/2004/LPN241, MHOM/JO/2006/LSL103, MHOM/ET/83/10383, MHOM/ET/89/LEM151		
	<i>L. killicki</i> (4)	MHOM/DZ/2011/LIPA283, MHOM/TN/80/LEM163, MHOM/TN/80/LEM180, MHOM/TN/86/LEM904/CL			
	<i>L. tropica</i> (5)	MHOM/SU/74/K27, MHOM/GR/80/GRL35, MHOM/MA/95/LEM3015, MHOM/MA/2008/W38, MRAT/IQ/72/ADHANIS1			
	<i>Viannia</i>	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. braziliensis</i> (4)	MHOM/BR/75/M2904, MHOM/BR/82/LTB12JULY82, MHOM/GF/2003/LAV008, MHOM/BR/75/M2903	
			<i>L. peruviana</i> (5)	MHOM/00/2007/TIM24, MHOM/PE/84/LC26, MHOM/PE/84/UN56, MHOM/PE/84/L13A, MHOM/PE/84/L9	
		<i>L. guyanensis</i>	<i>L. guyanensis</i> (5)	MHOM/GF/98/LEM3657, MHOM/GF/2003/LEM4570, MHOM/GF/2004/LAV016, MHOM/GF/2005/LPC410, MHOM/GF/79/LEM85	
			<i>L. panamensis</i> (6)	MHOM/CR/2004/TIM13, MHOM/CR/2007/TIM23, MHOM/00/2004/LEI27, MHOM/EC/90/TERESA, MHOM/CO/89/UA403, MHOM/CR/2001/LCB29A	
		<i>L. shawi</i> (1)	MCEB/BR/84/M8408		
<i>L. lainsoni</i>		<i>L. lainsoni</i> (6)	IUBI/BR/2000/M12025, MCUN/BR/85/M9342, MHOM/BR/81/M6426, MHOM/PE/2013/LEM6459, MHOM/EC/93/489, MHOM/GF/2002/LEM4449		
		<i>L. naiffi</i> (7)	MDAS/BR/79/M5533, MHOM/GF/LCB41, MHOM/GF/2006/LEM5108, MHOM/GF/2005/LEM5109, MHOM/GF/95/LBC1096, MHOM/00/94/CRES8, MHOM/00/99/TIM1		
<i>Sauroleishmania</i>		<i>Sauroleishmania</i>	<i>L. adleri</i> (1)	RLAT/KE/54/HU1433	
			<i>L. gymnodactyli</i> (1)	RGYM/SY/64/LV247	
			<i>L. hoogstraali</i> (1)	RLIZ/SD/2000/LV31	
<i>L. tarentolae</i> (3)	RTAR/DZ/39/TARV1, RTAR/FR/77/LEM112, RTAR/FR/78/LEM126				
Paraleishmania	<i>L. herrerii</i>	<i>L. colombiensis</i> (2)	IGOM/PA/85/E58234, IHAR/CA/86/CL500		
		<i>L. deanei</i> (2)	MCOE/BR/74/M2674, MCOE/BR/75/M2808		
		<i>L. equatoriensis</i> (2)	MCHO/EC/82/LSP1.2, MCHO/EC/82/LSP1		
		<i>L. hertigi</i> (1)	MCOE/PA/65/C8		

<sup>a</sup>The total number of isolates was 121.

these samples). In each laboratory, the MS spectra of the allotted samples (four replicates for each sample) from the panel were used for sample identification with the MSI application and the reference MSL. For each submitted spectrum, the application gave a similarity score that includes three subscores (identification to the species level [score A], identification to the complex level [score B], and identification in a different complex [score C]). Each subscore ranged from 0 to 100 (100 indicates a perfect match

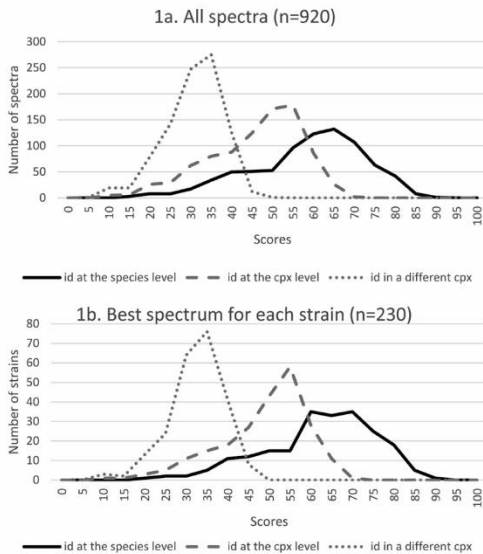
**TABLE 2** List of *Leishmania* species tested by the 4 centers and the gold-standard method used<sup>a</sup>

Panel description	No. of isolates tested (method)				Total
	Montpellier	Cayenne	Barcelona	Marseille	
<i>L. adleri</i>	1 (MLEE)				1
<i>L. aethiopica</i>	2 (MLEE)				2
<i>L. amazonensis</i>		1 (RFLP)	1 ( <i>hsp70</i> and <i>rpollS</i> )		2
<i>L. archibaldi</i>	1 (MLEE)				1
<i>L. braziliensis</i>	6 (MLEE), 2 ( <i>rpollS</i> )	4 ( <i>rpollS</i> )	7 ( <i>hsp70</i> and <i>rpollS</i> )	1 (MLEE)	20
<i>L. deanei</i>	1 (MLEE)				1
<i>L. donovani</i>	3 (MLEE)		4 ( <i>hsp70</i> and <i>rpollS</i> )		7
<i>L. enriettii</i>	1 (MLEE)				1
<i>L. gerbilli</i>	1 (MLEE)				1
<i>L. guyanensis</i>	3 (MLEE), 51 ( <i>rpollS</i> )	15 ( <i>rpollS</i> ), 1 (RFLP)	1 ( <i>hsp70</i> and <i>rpollS</i> )	1 (MLEE)	72
<i>L. gymnodactyli</i>	1 ( <i>rpollS</i> )				1
<i>L. infantum</i>	1 (MLEE)		26 ( <i>hsp70</i> and <i>rpollS</i> )	47 (MLEE)	74
<i>L. killicki</i>				3 (MLEE)	3
<i>L. lainsoni</i>	3 (MLEE), 1 ( <i>rpollS</i> )				4
<i>L. major</i>	3 (MLEE), 3 ( <i>rpollS</i> )		4 ( <i>hsp70</i> and <i>rpollS</i> )	7 (MLEE)	17
<i>L. mexicana</i>	4 (MLEE)		1 ( <i>hsp70</i> and <i>rpollS</i> )		5
<i>L. naiffi</i>	1 ( <i>rpollS</i> )	1 (RFLP)			2
<i>L. panamensis</i>			1 ( <i>hsp70</i> and <i>rpollS</i> )	1 (MLEE)	2
<i>L. peruviana</i>	4 (MLEE)			1 (MLEE)	5
<i>L. pifanoi</i>	1 (MLEE)			1 (MLEE)	2
<i>L. tropica</i>	2 (MLEE), 1 ( <i>rpollS</i> )		2 ( <i>hsp70</i> and <i>rpollS</i> )	1 (MLEE)	6
<i>L. turanica</i>	1 (MLEE)			1 (MLEE)	2
<i>Trypanosoma brucei</i>	2				2
<i>Herpetomonas</i>	2				2
<i>Crithidia</i>	2				2
<i>Endotrypanum</i>	1				1
Bacteria	10 (16S rRNA)				10
Fungi	20 (ITS2)				20
Total	135	22	47	64	268

<sup>a</sup>ITS2, internal transcribed spacer 2.

between the compared spectra (Fig. 1). For the 37 outgroup controls (*Herpetomonas*, *Crithidia*, *Endotrypanum*, bacteria, and fungi), no match with *Leishmania* was obtained, and the similarity score was systematically <17 (data not shown). The MSI application results were then compared with those obtained with the reference identification method used in that laboratory (Table 2). Overall, there was good concordance between methods; however, weakness in species differentiation, particularly within the *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, and *L. donovani* complexes, was observed (Table 3). Specifically, only 6 (32%) of the 20 *L. braziliensis* isolates were well classified. However, among the 31 misidentified samples, only 1 was a wrong identification at the complex level and corresponded to 1 *L. braziliensis* isolate that was identified as *L. guyanensis* (Table 3).

**Score threshold assessment.** Analysis of the three similarity subscores for each sample (Fig. 1) relative to the results obtained with the reference methods indicated that most scores corresponding to a correct identification to the species or complex level were >35. However, the distinction between correct species identification and correct complex identification was more difficult to determine, because there was a clear overlap of the two score distributions (Fig. 1). Therefore, 15 different similarity score thresholds were tested, and positive predictive values (PPVs) (i.e., the proportion of true-positive results) were calculated for each threshold by taking into account only the highest similarity score among the four replicates for each sample (Table 4). The PPV for complex identification was always above 0.99, regardless of the considered threshold. Conversely, it was more difficult to distinguish between species belonging to the same complex, as shown by the PPV results at the species level. The number of misidentifications, particularly at the species level, decreased with higher threshold scores, whereas the number of unidentified strains (with similarity scores below the threshold) increased (Table 4). For instance, with a threshold of 40, all samples were



**FIG 1** Distribution of the three similarity subscores for all spectra (four replicates for each isolate) (a) and for the spectrum with the best score for each isolate (b), id, identification; cpx, complex. The validation panel included 231 *Leishmania* isolates, but only 230 were identified by the MSI application.

correctly identified to the complex level (PPV = 1), but 13 isolates remained unidentified. These samples corresponded to five correct species identifications, seven correct complex identifications, and one wrong identification.

**Culture conditions and testing of parasite concentrations.** To identify the best conditions for MALDI-TOF analysis, three strains from the CRB-Leish collection were used for comparing different culture media, parasite concentrations, and culture durations. Species identification for all three strains was obtained with all tested culture media (RPMI, SDM-79, and Schneider media). The best identification scores were obtained when MALDI-TOF analysis was performed with cultures of  $3 \times 10^6$  *Leishmania*

**TABLE 3** List of the 31 misidentifications by MALDI-TOF MS and MS scores obtained

Organism identified by reference method (no. of isolates)	Organism identified by MALDI-TOF MS	MS score(s)
<i>L. braziliensis</i> (13)	<i>L. peruviana</i>	32.45, 35.17, 36.45, 38.42, 38.71, 43.49, 47.94, 48.44, 54.44, 56.24, 59.96, 65.8, 66.63
<i>L. braziliensis</i> (1)	<i>L. guyanensis</i>	36.48
<i>L. peruviana</i> (1)	<i>L. braziliensis</i>	63.83
<i>L. guyanensis</i> (7)	<i>L. panamensis</i>	41.08, 41.66, 41.95, 42.78, 43.14, 51.73, 60.21
<i>L. panamensis</i> (1)	<i>L. guyanensis</i>	55.8
<i>L. mexicana</i> (1)	<i>L. pifanoi</i>	69.57
<i>L. pifanoi</i> (1)	<i>L. mexicana</i>	55.79
<i>L. deanei</i> (1)	<i>L. hertigi</i>	43.84
<i>L. donovani</i> (2)	<i>L. archibaldi</i>	45.04, 53.57
<i>L. infantum</i> (3)	<i>L. archibaldi</i>	40.49, 47.22, 52.78

**TABLE 4** Identification capacities with the various tested score thresholds

Score threshold	No. of isolates identified correctly to the taxon level	No. of isolates identified correctly to the complex or species level	No. of isolates with incorrect identification	No. of isolates for which the score threshold was not reached	PPV	
					Taxon level	Complex level
20	200	0	1	0	0.86	0.99
25	198	30	1	2	0.86	0.99
30	198	30	1	2	0.86	0.99
35	197	29	1	4	0.86	0.99
40	193	25	0	13	0.89	1
45	184	17	0	30	0.91	1
50	171	13	0	47	0.92	1
55	159	9	0	63	0.94	1
60	138	5	0	88	0.96	1
65	100	3	0	128	0.97	1
70	63	0	0	168	1	1
75	34	0	0	197	1	1
80	13	0	0	218	1	1
85	2	0	0	229	1	1
90	0	0	0	231		

parasites/ml in the exponential phase of culture growth, regardless of the time required to obtain this concentration.

**MS data acquisition.** In terms of identification performance, no difference was observed when mass spectra were acquired by using the Microflex or Autoflex instrument (Bruker Daltonics).

**Online accessibility.** The four participating centers tested the online accessibility of the MSI application. The delay between the query submission and the Excel report acquisition for inputs containing up to 96 spectra was <1 min for all centers. Performances were equivalent with the Mac and Windows operating systems using any of the most used Web browsers (Google Chrome, Mozilla Firefox, Safari, and Internet Explorer).

## DISCUSSION

The purpose of this study was to create and test the reliability of a database for *Leishmania* identification by MALDI-TOF MS using a free Web-based application to meet researchers' and public health needs. The database included spectra from 10 *Leishmania* complexes representing 33 species, thus covering the main diversity of this genus. Access to the MSI application requires an account and acceptance of a policy agreement. The account is password protected, and access codes are delivered for free after a discussion of the nature of the project, with the aim of ensuring that users are using the application for public health or scientific purposes.

Our results show that neither the medium used nor the time spent to reach the appropriate promastigote concentration significantly influenced the quality of spectra and, thus, the identification. The important point is to obtain a promastigote concentration of  $3 \times 10^6$  parasites/ml from an exponential-phase culture. Once the sample is prepared, at least four replicates per strain are required, as previously recommended by Cassagne et al. (14). As already observed in many studies, the interpretation of results depends on the chosen score threshold (15, 16). In this study, the lower threshold considered was 20 because our experience with other organisms, such as fungi, indicates that nonspecific identifications are frequent below this threshold (17). With this threshold, 230 of the 231 *Leishmania* strains were correctly identified at least to the complex level. By increasing the threshold up to 40, the frequency of misidentification at the species level was greatly reduced; however, the number of samples that did not reach the threshold increased, despite these samples being correctly identified in most cases. In real life, the threshold choice can be influenced by many factors, and each user will have to weigh the advantages and disadvantages of each threshold, depending on the required level of accuracy of identification. Nevertheless, the MSI application allows

obtaining reliable *Leishmania* identifications by MALDI-TOF MS in most cases. Moreover, as already seen with other databases, its reliability should increase progressively with the addition of new references (18).

Considering the complexes frequently involved in CL, we observed that *L. major* and *L. tropica* identifications were 100% correct. Moreover, our identification system performed well in differentiating *L. killicki* from *L. tropica* strains, although it was recently proposed that they could be considered synonymous (19). Conversely, many more incorrect species identifications were obtained for the *L. braziliensis* complex, which is composed of *L. braziliensis* and *L. peruviana*. According to the literature and our experience, very few differences are observed between these species using MLEE (20) or molecular methods (20–23). As the epidemiological data, clinical presentations, and treatments of CL caused by these two species are quite similar, identification to the complex level remains adequate. When considering a threshold value below 40, one *L. braziliensis* isolate was misidentified by the MSI application as *L. guyanensis*, a species belonging to the same subgenus but to a different complex. It is known that the *L. braziliensis* complex is very polymorphic, with a high recombination level, and is closely related to the *L. guyanensis* complex (24). Only one spectrum (although it obtained the highest similarity score) pointed to an identification of *L. guyanensis* (score of 36.48), while the other three replicates identified *L. braziliensis* (scores of 31.22 and 31.46) and *L. panamensis* (score of 31.98). Thus, in some cases, a general view of the results of the four scores could provide a better approach. For the *L. guyanensis* complex, which includes the species *L. guyanensis*, *L. panamensis*, and *L. shawi*, 100% and 90.4% of the identifications were correct at the complex and species levels, respectively. As for *L. braziliensis* and *L. peruviana*, *L. shawi* and *L. panamensis* are considered to be two clusters inside the *L. guyanensis* complex rather than two different species (21, 24–26).

As CL is a heterogeneous entity, and no therapeutic option is currently effective for all clinical forms, the species involved and the geographic area of contamination guide treatment decisions. Indeed, metastatic extension to the mucosa occurs in 1 to 3% of patients for some species. Fortunately, complex identification is sufficient to guide treatment management (5, 27, 28). Therefore, MALDI-TOF MS is adequate for the first-line identification of strains involved in CL or mucocutaneous leishmaniasis.

Some misidentifications also occurred within the *L. donovani* complex, which currently includes three species: *L. donovani*, *L. infantum*, and *L. archibaldi*. In our study, it was possible to identify 96% of *L. infantum*, 71% of *L. donovani*, and all *L. archibaldi* strains to the species level. All misidentified *L. donovani* isolates were erroneously identified as *L. archibaldi*. According to MLEE, the species *L. archibaldi* is characterized by a single enzyme, and some molecular studies suggest that the *L. donovani* complex is more likely to be a continuum in which *L. archibaldi* stands between the two other species (29). Therefore, some authors attribute the category of subspecies to *L. infantum* and *L. donovani* (30), and it is widely accepted that *L. archibaldi* should not be considered a real species (31–34). Anyway, there is no impact on therapeutic management because this complex is responsible for visceral forms of leishmaniasis, for which treatment does not depend on the species but on the therapeutic agents available in that country.

Although work is in progress to improve the sensitivity of the MSI application for the *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, and *L. donovani* complexes, the clinical context and epidemiological data also need to be considered to confirm *Leishmania* identification. Therefore, the medical biologist should remain completely responsible for the diagnostic procedure.

Overall, the MSI application proved to be a solid identification tool, leading to identification results comparable to those obtained with reference techniques but faster. As shown by the large experience acquired with other microorganisms, the addition of new references will improve current performances; therefore, this identification tool will be further developed with the user community's help. The database could be regularly enriched and updated by users, by adding spectra representing new or rare species. Sharing access to a database, as we propose, should facilitate the

implementation of studies requiring the identification of various organisms, by making available a common identification tool. Moreover, it provides an opportunity to implement collaborative research between groups working on related topics. Beyond the specific problem of identifying *Leishmania*, the approach presented here has also been applied to other organisms such as fungi (35), and we hope that similar initiatives will be implemented to build other identification systems, based on the collective construction of databases by scientific teams.

## MATERIALS AND METHODS

**Sample preparation. (i) *Leishmania* cultures.** *Leishmania* cultures were grown in RPMI (Sigma) and Schneider medium (Sigma) supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum or in SDM-79 medium at 25°C for 4 to 7 days.

**(ii) Sample preparation for MALDI-TOF analysis.** Five milliliters of a promastigote culture containing about  $3 \times 10^6$  parasites/ml in the exponential phase was harvested by centrifugation (10 min at  $3,000 \times g$ ) and washed three times with 10 ml of 0.9% NaCl. Promastigote pellets were resuspended in one drop (approximately 20  $\mu$ l) of 0.9% NaCl. One microliter of the solution was deposited onto the steel target and, once dried, covered with 1  $\mu$ l of an  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA) matrix (Sigma-Aldrich, Lyon, France). Ten replicates were prepared for every isolate included in the MSL, and four replicates were performed for each isolate in the panel to be tested.

**(iii) Mass spectrum acquisition.** Mass spectra were acquired with a Microflex LT instrument (Bruker Daltonics) (three centers, Marseille, Montpellier, and Cayenne, France) or an Autoflex II TOF-TOF instrument (Bruker Daltonics) (one center, Barcelona, Spain) with the default acquisition parameters recommended by Bruker, as described previously by Cassagne et al. (11).

**Identification system. (i) Reference database.** A total of 121 *Leishmania* isolates (Table 1) to be included in the MSL were selected from the CRB-Leish collection. All strains were previously identified by using MLEE as described previously by Rioux et al. (36), and for 50 isolates, species identification was also confirmed by multilocus sequence typing (29). Raw mass spectra were obtained with the Microflex LT instrument (Bruker Daltonics) in Montpellier and used to construct the database. The assignment of each isolate to a group/complex/species was based on the taxonomic classification proposed recently by Akhoundi et al. (2).

**(ii) Identification system.** The MSL was implemented in a Web-based application designed for microbial mass spectrum identification (MSI application).

For identification, the raw mass spectra of a sample were compressed into a zip file and submitted to the Web application. As soon as they were uploaded, raw spectra were subjected to several mathematical operations to eliminate background noise, smooth intensity values, and identify relevant peaks. A series of peak values was automatically built and compared with the peak values of all the reference spectra included in the database. The similarity between the spectrum to be identified and each reference spectrum was rated on a scale ranging from 0 to 100 (100 indicates a perfect match between the compared spectra). To establish the similarity level, the identification system relies on original algorithms, independently from the FlexAnalysis and MaldiBioTyper software provided by Bruker Daltonics. Many samples can be analyzed in one request provided that the number of spectra remains below a few hundred. Results can be exported as Excel files with a similarity score value for each spectrum. Reports may be stored in the user's account.

**Implementation of the identification system. (i) Tested panel.** The panel of isolates used to test the online MSI application and the MSL database included 268 strains: 231 *Leishmania* isolates and 37 outgroup controls (Table 2). The panel was constituted by strains from the four laboratories that participated in the study (four subpanels): (i) 47 isolates were obtained in Barcelona (Secció de Parasitologia, Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació, Universitat de Barcelona) and analyzed at the Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (Barcelona, Spain); (ii) 22 isolates were obtained prospectively in French Guyana (Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Centre Hospitalier Universitaire de Cayenne); (iii) 64 strains, 31 originating from Maghreb countries (12 from the Institut Pasteur de Tunis, 19 from the Institut Pasteur of Alger) and 33 isolated in Marseille, were analyzed in Marseille, France; and (iv) 98 strains were selected from CRB-Leish in Montpellier, France, to increase the diversity of species and countries of origin of the strains. For each subpanel, various reference identification methods were used as gold standards, depending on the technique available in the laboratory, including MLEE (36), RFLP, sequencing of the heat shock protein 70 gene (*hsp70*) (22), or sequencing of the *rpoll5* gene (2).

**(ii) MSI performance and score threshold assessments.** Isolates from the panel were identified by using the MSI application and the MSL. The analysis report for each spectrum indicates (i) the species with the highest similarity score (this can be considered the isolate identification result) (score A); (ii) the best score obtained for a different species of the same complex, according to the taxonomy reported by Akhoundi et al. (2) (score B); and (iii) the best score obtained for a species in a different complex (score C). The identification results were compared to the results obtained with the gold-standard/reference method for each isolate. The threshold was established in two steps. First, the three scores for each spectrum, when available, were plotted to visualize their overlap (Fig. 1). Next, the performance of the identification system was tested with different thresholds, from 20 to 90, with increments of 5 units for each cutoff (Table 4). Threshold values below 20 were not considered because our previous experience with fungi (17) showed that misidentifications might occur at values below this threshold.

As suggested previously by Normand et al. (17), four replicates for each isolate were deposited, but only the replicate with the highest score was selected, and the identification corresponds to the one obtained for this replicate.

**(iii) Testing of culture conditions (medium and duration) and parasite concentrations.** To identify the best culture conditions and parasite concentration for MS identification, three strains from CRB-Leish were selected: *L. donovani* MHOM/IN/2003/LEM4537, *L. major* MHOM/TN/93/LPN89, and *L. guyanensis* MHOM/GF/2004/LBC45. Three different media were tested: SDM-79, RPMI, and Schneider medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum. Isolates were cultured at 25°C. Testing (in triplicate) was done on days 4, 6, 8, and 10 of culture by using five concentrations (from 10<sup>2</sup> to 10<sup>6</sup> parasites/ml).

**(iv) Online accessibility.** The four centers tested MSI application accessibility and capacities for Mac and PC systems (Windows 7 and Windows 10) with several Web browsers (Google Chrome, Mozilla Firefox, Safari, and Internet Explorer).

## REFERENCES

- Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, den Boer M, WHO Leishmaniasis Control Team. 2012. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. PLoS One 7:e35671. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035671>.
- 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:e0004349. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004349>.
- Morizot G, Kendjo E, Mourí O, Thellier M, Pérignon A, Foulet F, Cordoliani F, Bourrat E, Laffitte E, Alcaraz I, Bodak N, Ravel C, Vray M, Grogil M, Mazier D, Caumes E, Lachaud L, Buffet PA, Cutaneous Leishmaniasis French Study Group. 2013. Travelers with cutaneous leishmaniasis cured without systemic therapy. Clin Infect Dis 57:370–380. <https://doi.org/10.1093/cid/cit269>.
- Blum J, Lockwood DNJ, Visser L, Harms G, Bailey MS, Caumes E, Clerinx J, van Thiel PPAM, Morizot G, Hatz C, Buffet P. 2012. Local or systemic treatment for New World cutaneous leishmaniasis? Re-evaluating the evidence for the risk of mucosal leishmaniasis. Int Health 4:153–163. <https://doi.org/10.1016/j.inhe.2012.06.004>.
- Buffet PA, Rosenthal E, Gagneux J-P, Lightburne E, Couppié P, Morizot G, Lachaud L, Marty P, Dedet J-P, Société de Pathologie Exotique. 2011. Therapy of leishmaniasis in France: consensus on proposed guidelines. Presse Med 40:173–184. (In French.) <https://doi.org/10.1016/j.jpm.2010.09.023>.
- Van der Auwera G, Dujardin J-C. 2015. Species typing in dermal leishmaniasis. Clin Microbiol Rev 28:265–294. <https://doi.org/10.1128/CMR.00104-14>.
- Akhoundi M, Downing T, Votýpka J, Kuhls K, Lukeš J, Cannet A, Ravel C, Marty P, Delaunay P, Kasbari M, Granooullac B, Gradoni L, Sereno D. 31 January 2017. *Leishmania* infections: molecular targets and diagnosis. Mol Aspects Med <https://doi.org/10.1016/j.mam.2016.11.012>.
- World Health Organization. 2010. Control of the leishmaniases. World Health Organization technical report series 949. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Clark AE, Kaleta EJ, Arora A, Wolk DM. 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>.
- Mourí O, Morizot G, Van der Auwera G, Ravel C, Passet M, Chartrél 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 Negl Trop Dis 8:e2841. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002841>.
- Cassagne C, Pratloug F, Jeddi F, Benikhef 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. Clin Microbiol Infect 20:551–557. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12387>.
- Culha G, Akyar I, Yildiz Zeyrek F, Kurt Ö, Gündüz C, Özensoy 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.
- Lachaud L, Fernández-Arévalo A, Cécile Normand A, Lami P, Nabet C, Donnadieu JL, 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. Abstr 6th World Congr Leishmaniasis, poster C1235.
- Cassagne C, Normand A-C, Bonzon L, L'Ollivier C, Gautier M, Jeddi F, Ranque S, Piarroux R. 2016. Routine identification and mixed species detection in 6,192 clinical yeast isolates. Med Mycol 54:256–265. <https://doi.org/10.1093/mmy/myv095>.
- Fernandes Santos A, Cayò R, Schandert L, Gales AC. 2013. Evaluation of MALDI-TOF MS in the microbiology laboratory. J Bras Patol Med Lab 49:191–197. <https://doi.org/10.1590/S1676-24442013000300006>.
- Biswas S, Rolain J-M. 2013. Use of MALDI-TOF mass spectrometry for identification of bacteria that are difficult to culture. J Microbiol Methods 92:14–24. <https://doi.org/10.1016/j.jmimet.2012.10.014>.
- Normand A-C, Cassagne C, Gautier M, Becker P, Ranque S, Hendrickx M, Piarroux R. 2017. Decision criteria for MALDI-TOF MS-based identification of filamentous fungi using commercial and in-house reference databases. BMC Microbiol 17:25. <https://doi.org/10.1186/s12866-017-0937-2>.
- Normand A-C, Cassagne C, Ranque S, L'Ollivier C, Fourquet P, Roeseams S, Hendrickx M, Piarroux R. 2013. Assessment of various parameters to improve MALDI-TOF MS reference spectra libraries constructed for the routine identification of filamentous fungi. BMC Microbiol 13:76. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-76>.
- Chaara D, Ravel C, Bañuls A-L, Haouas N, Lami P, Talagnani L, El Baidouri F, Jaouadi K, Harrat Z, Dedet J-P, Babba H, Pratloug F. 2015. Evolutionary history of *Leishmania killicki* (synonymous *Leishmania tropica*) and taxonomic implications. Parasit Vectors 8:198. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0821-6>.
- Bañuls AL, Dujardin JC, Guerrini F, De Doncker S, Jacquet D, Arevalo J, Noël S, Le Ray D, Tibayrenc M. 2000. Is *Leishmania (Viannia) peruviana* a distinct species? A MLEE/RAPD evolutionary genetics answer. J Eukaryot Microbiol 47:197–207. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2000.tb00039.x>.
- Bañuls A-L, Hide M, Tibayrenc M. 2002. Evolutionary genetics and molecular diagnosis of *Leishmania* species. Trans R Soc Trop Med Hyg 96(Suppl 1):S9–S13. [https://doi.org/10.1016/S0035-9203\(02\)90045-3](https://doi.org/10.1016/S0035-9203(02)90045-3).
- Van der Auwera G, Ravel C, Verweij JJ, Bart A, Schöniag G, Felger J. 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>.
- 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. Infect Genet Evol 12:1994–2002. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.03.028>.
- Boité MC, Mauricio IL, Miles MA, 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:e1888. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001888>.
- Bañuls AL, Jonquieres R, Guerrini F, Le Pont F, Barrera C, Espinel I, Guderian R, Echeverría R, Tibayrenc M. 1999. Genetic analysis of *Leishmania* parasites in Ecuador: are *Leishmania (Viannia) panamensis* and *Leishmania (Viannia) guyanensis* distinct taxa? Am J Trop Med Hyg 61: 838–845. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1999.61.838>.
- Fraga J, Montalvo AM, De Doncker S, Dujardin J-C, 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>.
- Blum J, Buffet P, Visser L, Harms G, Bailey MS, Caumes E, Clerinx J, van

- Thiel PPAM, Morizot G, Hatz C, Dorlo TPC, Lockwood DNJ. 2014. Leishman recommendations for treatment of cutaneous and mucosal leishmaniasis in travelers, 2014. *J Travel Med* 21:116–129. <https://doi.org/10.1111/jtm.12089>.
28. Aronson N, Herwaldt BL, Libman M, Pearson R, Lopez-Velez R, Weina P, Carvalho EM, Ephros M, Jeronimo S, Magill A. 2016. 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). *Clin Infect Dis* 63:e202–e264. <https://doi.org/10.1093/cid/ciw670>.
29. El Baidouri F, Diancourt L, Berry V, Chevenet F, Pratlong F, Marty P, Ravel C. 2013. Genetic structure and evolution of the *Leishmania* genus in Africa and Eurasia: what does MLSA tell us. *PLoS Negl Trop Dis* 7:e2255. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002255>.
30. Fraga J, Montalvo AM, Van der Auwera G, Maes I, Dujardin J-C, Requena JM. 2013. Evolution and species discrimination according to the *Leishmania* heat-shock protein 20 gene. *Infect Genet Evol* 18:229–237. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.05.020>.
31. Lukes J, Mauricio IL, Schönian G, Dujardin J-C, Soteriadou K, Dedet J-P, Kuhls K, Tintaya KWQ, Jirků M, Chocholová E, Haralambous C, Pratlong F, Obornik M, Horák A, Ayala FJ, Miles MA. 2007. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:9375–9380. <https://doi.org/10.1073/pnas.0703678104>.
32. Kuhls K, Mauricio IL, Pratlong F, Presber W, Schönian G. 2005. Analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences of the *Leishmania donovani* complex. *Microbes Infect* 7:1224–1234. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2005.04.009>.
33. Jamjoom MB, Ashford RW, Bates PA, Chance ML, Kemp SJ, Watts PC, Noyes HA. 2004. *Leishmania donovani* is the only cause of visceral leishmaniasis in East Africa; previous descriptions of *L. infantum* and "*L. archibaldi*" from this region are a consequence of convergent evolution in the isoenzyme data. *Parasitology* 129:399–409. <https://doi.org/10.1017/S0031182004005955>.
34. Mauricio IL, Stothard JR, Miles MA. 2004. *Leishmania donovani* complex: genotyping with the ribosomal internal transcribed spacer and the mini-exon. *Parasitology* 128:263–267. <https://doi.org/10.1017/S0031182003004578>.
35. Normand AC, Becker P, Gabriel F, Cassagne C, Accoceberry I, Gari-Toussaint M, Housseine L, De Geyter D, Pierard D, Surmont I, Djenad F, Donnadieu JL, Piarroux M, Ranque S, Hendrickx M, Piarroux R. 21 June 2017. Online identification of fungi using MALDI-TOF mass spectrometry: validation of a new Web application. *J Clin Microbiol* <https://doi.org/10.1128/JCM.00263-17>.
36. Rioux JA, Lanotte G, Serres E, Pratlong F, Bastien P, Perieres J. 1990. Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. *Ann Parasitol Hum Comp* 65:111–125. <https://doi.org/10.1051/parasite/1990653111>.



---

**Anexo 6. Tablas y figuras suplementarias del estudio del complejo *L. donovani* (apartado 4.2).**

Table A13. List of polymorphic nucleotide positions included in the *got* amplified fragment that produce non-synonymous changes.

<b>Position</b>	<b>MHOM/IN/00/DEVI</b>	<b>Polymorphism</b>
352	GCA: Alanine (-7)	ACA: Threonine (-7)
419	CCC: Proline (-7)	CTC: Leucine (-7)
823	GAC: Aspartic acid(-7)	TAC: Tyrosine (-6,1)

*L. donovani* strain BCN 517 (MHOM/IN/00/DEVI) was used as a reference sequence. Nucleotide changes are bolded and the estimated electric charge of the protein at pH 8.6 is bracketed.



---

**Anexo 7. Carta de aceptación de la publicación resultante del estudio del complejo *L. donovani* (apartado 4.2).**

**Date:** 11 Jun 2020  
**To:** "Carme Muñoz Batet" cmunoz@santpau.cat  
**cc:** jan.slapeta@sydney.edu.au, editor@ijp.org.au  
**From:** "Int J Parasitol" editor@IJP.org.au  
**Subject:** IJPara20\_068R2

Ms. Ref. No.: IJPara20\_068R2  
Title: The Leishmania donovani species complex: a new insight into taxonomy  
International Journal for Parasitology

Dear Dr. Muñoz Batet,

I am pleased to confirm that your paper "The Leishmania donovani species complex: a new insight into taxonomy" has been accepted for publication in the International Journal for Parasitology.

For every issue of the IJP the Editor will endeavour to feature an image on the cover from, or relating to, an article in that issue. We invite all authors to submit images that would be suitable. To maximize their aesthetic qualities, these images may be stylized/modified versions of pictures or diagrams from the author's article.

The Editor will choose the image that is the most eye-catching and informative for each issue and complements those chosen for recent issues.

Thank you for submitting your work to this journal.

Yours sincerely,

Jan Slapeta  
Deputy Editor  
International Journal for Parasitology

\*\*\*\*\*  
For further editorial assistance, please contact the International Journal for Parasitology E-mail:  
editor@IJP.org.au.

In compliance with data protection regulations, you may request that we remove your personal registration details at any time. (Use the following URL: <https://www.editorialmanager.com/ijpara/login.asp?a=r>). Please contact the publication office if you have any questions.

---

*...El futuro se vistió con el traje nuevo del emperador.  
¿Quién iba a decir que sin carbón no hay Reyes Magos? [...]*

Los días raros. Vetusta Morla

