



Genotipado de las especies de *Leishmania* y variabilidad intraespecífica de *L. infantum*. Aportaciones al diagnóstico molecular y a la epidemiología de las leishmaniosis

Míriam Tomás Pérez

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Microbiología y Parasitología Sanitarias



Genotipado de las especies de *Leishmania* y variabilidad intraespecífica de *L. infantum*. Aportaciones al diagnóstico molecular y a la epidemiología de las leishmaniosis.

Míriam Tomás Pérez, 2014

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Microbiología y Parasitología Sanitarias

Programa de Doctorado de *Recerca, Desenvolupament i Control de Medicaments*



Genotipado de las especies de *Leishmania* y variabilidad intraespecífica de *L. infantum*. Aportaciones al diagnóstico molecular y a la epidemiología de las leishmaniosis.

Memoria presentada por Míriam Tomás Pérez para optar al título de Doctor por la Universitat de Barcelona.

DIRECTORAS: Roser Fisa Saladrigas y Maria Cristina Riera Lizandra

DOCTORANDA: Míriam Tomás Pérez TUTORA: Isabel de Montoliu Sanllehy

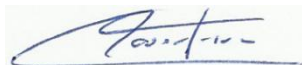
Míriam Tomás Pérez, 2014

Roser Fisa Saladrigas y María Cristina Riera Lizandra, Doctoras en Farmacia y Profesoras Titulares de la Unidad de Parasitología del Departamento de Microbiología y Parasitología Sanitarias de la Universitat de Barcelona.

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo de investigación titulado: “Genotipado de las especies de *Leishmania* y variabilidad intraespecífica de *L. infantum*. Aportaciones al diagnóstico molecular y a la epidemiología de las leishmaniosis”, presentado por la Licenciada en Farmacia Míriam Tomás Pérez, ha sido realizado en la Unidad de Parasitología del Departamento de Microbiología y Parasitología Sanitarias de la Universitat de Barcelona bajo su dirección y cumple las condiciones exigidas para ser presentado y defendido como Tesis Doctoral con Mención Internacional.

Barcelona, 29 de Septiembre del 2014



Dra. Roser Fisa Saladrigas
Directora de la Tesis Doctoral



Dra. María Cristina Riera Lizandra
Directora de la Tesis Doctoral



Míriam Tomás Pérez
Doctoranda

A mi madre

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a la Dra. Roser Fisa y la Dra. Cristina Riera por darme la oportunidad de realizar esta Tesis Doctoral en el laboratorio de Parasitología de la Facultat de Farmàcia; por su apoyo y confianza durante estos 4 años y su paciencia, especialmente en la recta final de la tesis, mostrándome siempre su mejor cara. Gracias por vuestra amistad.

También quisiera agradecer la colaboración de la Dra. Montserrat Portús, por sus consejos y experiencia aportada. Así como al Dr. Alexis Ribas, por su ayuda y participación en este estudio, mediando además con el Dr. Mourad Khaldi y el resto del equipo de Argelia, a quienes agradezco su colaboración. También a los demás miembros de la Unidad de Parasitología que de una manera u otra han ayudado en la realización de esta Tesis, especialmente a la Dra. Isabel Montoliu y a la Dra. Montserrat Gállego.

Agradezco a la Dra. Mallorie Hide, de l'IRD de Montpellier, por todo lo que me enseñó durante mis 3 meses de estudio en su laboratorio, además de su ayuda para hacer mi "accidentada" estancia más llevadera. Así como a la Dra. Anne-Laure Bañuls, por sus consejos y participación en este trabajo. Y a mis compañeros en Francia, a Daniel, Kevin y Andrés, por su amistad y en definitiva, por hacer de mi paso por el IRD una bonita experiencia.

A mis compañeras de Tesis, a Magda, Alba A., Alba P., Bea, Diana y Anna; así como a Silvia, Carme, Roser, Cristina y Laura, por los buenos momentos que hemos celebrado juntas, y también por su apoyo y comprensión en los momentos bajos, dejándome un muy buen recuerdo de estos años en el laboratorio. A Santi, por convencerme de que hacer la Tesis era una buena idea, por sus consejos, y sobretodo, por las risas.

Agradecer también a todos los miembros de la Unitat de Genòmica del CCiTUB, especialmente a Amaya Amador y Ramón Seminago, por su ayuda en la realización de los diferentes análisis incluidos en este estudio, facilitándome siempre el trabajo. Así como a los servicios de Dermatología, Microbiología y Enfermedades Infecciosas de los diferentes hospitales de Barcelona y Mallorca (Hospital Clínic, Hospital Universitari de la Vall d'Hebron, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau y Hospital de Manacor) por su colaboración en este estudio.

A mis amigos, de aquí y de allá, por escucharme y por el interés que siempre me demuestran. Por sus consejos y por sus ánimos.

A mi familia. A mis tíos y a mis primos, por interesarse tanto por lo que hago, por su apoyo y por lo mucho que me cuidan. Agradezco a Patricia su ayuda en el montaje final de la tesis, el uso del Adobe, que tantos dolores de cabeza me ha dado; y a Daniel, por la cantidad de veces que me ha ayudado con el tema informático, y la de veces que aún le esperan. Y especialmente a mi hermano Raúl, por estar siempre ahí, por sus consejos y su ayuda, en todo, y por lo de “¿puedo decir que eres mi hermana?”; y a él y Nuria por Hugo, el mejor regalo que podían hacerme.

A mis abuelos, por cuánto me cuidaron y me quisieron.

A Miguel, por cada uno de los momentos que hemos compartido estos 10 años juntos, por escucharme y apoyarme tanto en mis decisiones, y en definitiva, por todo el amor que me da.

Finalmente, quiero dedicar esta tesis a mi madre, a la que tanto echo de menos, y a quién no tuve la oportunidad de agradecer su esfuerzo para que yo llegara hasta dónde he llegado. Por todo lo que me enseñó y el cariño que me dio siempre.

Este estudio ha sido subvencionado con el proyecto 306525: “Asesoramiento e investigación aplicada en el campo del diagnóstico, tipación molecular y ensayo de fármacos para *Leishmania* spp y *Trypanosoma cruzi*.” de la Fundació Bosch i Gimpera. Además de la Beca del Ministerio de Educación (MEC): “Movilidad de estudiantes para obtener la mención europea en el título de doctor”, otorgada durante el curso académico 2011-2012 para subvencionar la estancia realizada de 3 meses en el extranjero.

“Por lo que fue y por lo que pudo ser; por lo que hay, por lo que puede faltar; por lo que venga y por este instante” Calle13.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. AGENTE ETIOLÓGICO	3
1.1.1. Taxonomía del género <i>Leishmania</i>	3
1.1.2. Organización genómica y reproducción	4
1.1.3. Formas evolutivas y ciclo biológico	6
1.2. VECTORES.....	7
1.3. RESERVORIOS	8
1.4. LAS LEISHMANIOSIS HUMANAS.....	10
1.4.1. Co-infección <i>Leishmania</i> /VIH en el Mediterráneo	12
1.5. DIAGNÓSTICO	14
1.5.1. Diagnóstico directo.....	15
1.5.2. Diagnóstico serológico.....	16
1.5.3. Diagnóstico molecular	19
1.6. CARACTERIZACIÓN DE <i>LEISHMANIA</i> SPP.....	21
1.6.1. Caracterización isoenzimática	21
1.6.2. Técnicas genotípicas.....	22
2. OBJETIVOS (“OBJECTIVES”)	27
3. RESULTADOS	31
3.1. ARTÍCULO 1: The use of fluorescent fragment length analysis (PCR-FFL) in the direct diagnosis and identification of cutaneous <i>Leishmania</i> species (Tomás-Pérez <i>et al.</i> , 2013).....	33
3.2. ARTÍCULO 2: First report of natural infection in hedgehogs with <i>Leishmania major</i> , a possible reservoir of zoonotic cutaneous leishmaniasis in Algeria (Tomás-Pérez <i>et al.</i> , 2014).....	43
3.3. ARTÍCULO 3: Multilocus microsatellite typing of <i>Leishmania</i> <i>infantum</i> in monitored <i>Leishmania</i> /HIV coinfecting patients (Tomás-Pérez <i>et al.</i> , En revisión).....	53
4. DISCUSIÓN.....	85
5. CONCLUSIONES (“CONCLUSIONS”)	99
6. BIBLIOGRAFÍA	103

7SL	<i>7 Spliced Leader</i>
A	Adenina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNg	ADN genómico
ADNk	ADN del kinetoplasto
ARN	Ácido ribonucleico
ARNr	ARN ribosómico
C	Citosina
DAT	<i>Direct Agglutination Test</i>
dNTP	Deoxinucleótidos
EDTA	Ácido etilendiaminotetracetato sódico
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
FAST	<i>Fast Agglutination Screening Test</i>
FFL	<i>Fluorescent Fragment Length analysis</i>
FRET	<i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i>
gp63	Glicoproteína 63
HAART	<i>Highly Active Antiretroviral Therapy</i>
HRM	<i>High Resolution Melting</i>
hsp70	<i>Heat Shock Protein 70</i>
IFAT	<i>Indirect Immunofluorescence Assay</i>
IHQ	Inmunohistoquímica
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i>
KATex	<i>Urine Latex Agglutination Test</i>
kb	Kilobases
kDa	Kilodaltons
LAMP	<i>Loop-Mediated Isothermal Amplification</i>
LC	Leishmaniosis cutánea
LCD	Leishmaniosis cutánea difusa
LCPK	Leishmaniosis cutánea post-kala azar
LMC	Leishmaniosis mucocutánea
LV	Leishmaniosis visceral, kala azar
MALDI-TOF MS	<i>Matrix-assisted laser desorption ionization–time-of-flight mass spectrometry</i>
MCM	Métodos de microcultivo
min	Minutos
MLEE	<i>Multilocus Enzyme Electrophoresis</i>
MLMT	<i>Multilocus Microsatellite Typing</i>
MLST	<i>Multilocus Sequence Typing</i>
mm	Milímetros
mM	Milimolar
μL	Microlitros
μm	Micrómetros
NASBA	<i>Nucleic Acid Sequence Based Amplification</i>
NASBA-OC	<i>NASBA- oligochromatography</i>

ABREVIATURAS

NNN	Medio de Novy, McNeal, Nicolle
OC-PCR	<i>oligochromatography-PCR</i>
pb	Pares de bases
PBS	Solución salina tamponada con fosfato
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PCR-FFL	<i>PCR-Fluorescent Fragment Length analysis</i>
PCR-RFLP	<i>PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
PKDL	Leishmaniasis post-kala-azar
qPCR	PCR a tiempo real
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
spp	Especies
T	Timina
TAE	Tampón Tris-Acetato-EDTA
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
WB	<i>Western Blot</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

Las leishmaniosis son un grupo de enfermedades causadas por protozoos parásitos pertenecientes al género *Leishmania*, transmitidos mediante la picadura de hembras de flebótomos infectadas. Afecta a animales domésticos, silvestres y al hombre con tres formas clínicas: leishmaniosis cutánea (LC), leishmaniosis mucocutánea (LMC) y leishmaniosis visceral (LV), relacionadas con la especie causante de la enfermedad y el estado inmunológico del hospedador (WHO, 2010; 2013).

La distribución geográfica de *Leishmania* es muy amplia y varía según la especie estudiada. En la actualidad está presente en 98 países con una población aproximada de 350 millones de personas en zona de riesgo (WHO, 2010; 2013). Anualmente se registran alrededor de 1,3 millones de nuevos casos, de los cuales 300.000 son de LV (el 90% registrados en Bangladesh, Brasil, Etiopía, India, Nepal, Sudán del Sur y Sudán) y 1 millón son de LC (principalmente en Afganistán, Argelia, Brasil, Colombia, República Islámica de Irán, Pakistán, Perú, Arabia Saudí, República Árabe Siria y Túnez) o LMC (mayoritariamente en Brasil, Perú y Estado Plurinacional de Bolivia). De los estimados 1,3 millones de casos sólo 600.000 son declarados. Entre 20.000 y 30.000 personas mueren anualmente de LV en el mundo (WHO, 2013). Entre los factores de riesgo para contraer la leishmaniosis se encuentran unas condiciones socioeconómicas desfavorables con malnutrición, falta de higiene y dormir a la intemperie, facilitando el contacto de las personas con los vectores; un sistema inmunológico deprimido, debido en muchas ocasiones a la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana; los movimientos migratorios, en los cuales los individuos no inmunes entran en contacto con el parásito; y los cambios climáticos y ambientales, afectando a la distribución y comportamiento del vector (WHO, 2010).

1.1. AGENTE ETIOLÓGICO

1.1.1. Taxonomía del género *Leishmania*

Leishmania es un protozoo parásito perteneciente a la familia Trypanosomatidae, orden Kinetoplastida (Levine *et al.*, 1980; Lainson y Shaw, 1987; WHO, 2010), que se clasifica taxonómicamente de la siguiente manera:

INTRODUCCIÓN

Reino	PROTISTA Haeckel, 1866
Subreino	PROTOZOA Goldfuss, 1817
Phylum	SARCOMASTIGOPHORA Honigberg, 1963
Subphylum	MASTIGOPHORA Deising, 1866
Clase	ZOOMASTIGOPHOREA Calkins, 1909
Orden	KINETOPLASTIDA Honigberg, 1963; modificada por Vickerman, 1976
Suborden	TRYPANOSOMATINA Kent, 1880
Familia	TRYPANOSOMATIDAE Doflein, 1901; modificada por Grobden, 1905
Género	<i>Leishmania</i> Ross, 1903

Dentro del género *Leishmania* se describen dos subgéneros en función del lugar de multiplicación de los promastigotes en el tracto digestivo del vector (Lainson *et al.*, 1979; 1987): subgénero *Leishmania* presente en el Viejo Mundo (Safjanova, 1982) con reproducción suprapilórica y subgénero *Viannia* en el Nuevo Mundo (Lainson y Shaw, 1987) de reproducción peripilórica. Cada subgénero comprende varios complejos separados por características bioquímicas y moleculares, cada uno a su vez con una o varias especies, de las cuales al menos 20 se consideran patógenas para el hombre (Ashford, 2000).

1.1.2. Organización genómica y reproducción

Los protozoos pertenecientes a la familia Trypanosomatidae se caracterizan por la presencia de un único flagelo y una mitocondria donde se localiza el kinetoplasto, un orgánulo que contiene ADN (ADNk) con replicación independiente (Simpson *et al.*, 2006). El ADNk está constituido por dos tipos de moléculas de ADN circular entrelazadas y organizadas en red: docenas de maxicírculos y miles de minicírculos (Shapiro y Englund, 1995). Los maxicírculos, equivalentes al genoma mitocondrial de los mamíferos, tienen una composición intramolecular rica en A+T (74 - 85%) y su tamaño varía entre 20 a 40 kb según la especie (Simpson *et al.*, 1987). Éstos codifican la información genética mitocondrial mediante transcripciones modificadas en un proceso conocido como *RNA-editing*, controlado por ARN del minicírculo y que es especialmente activo dentro del genoma de los tripanosomátidos (Lukes *et al.*, 2005; Simpson *et al.*, 2006). Los minicírculos, que representan entre el 95 - 99% del kDNA, son una estructura circular de menos de 1 kb de tamaño formada por moléculas

dispuestas en forma de malla divididas en dos regiones: una constante y una variable (Simpson *et al.*, 1987). El minicírculo representa una diana ideal para el diagnóstico de las leishmaniosis debido al gran número de copias distribuidas en 10 clases de secuencias distintas, cuya región variable ofrece discriminación entre especies (Aransay *et al.*, 2000). A parte de los telómeros, que son idénticos a los de los humanos (CCCTAA) (Ellis *et al.*, 1989), otras secuencias repetidas de *Leishmania* han sido caracterizadas: algunas secuencias de mini-satélites (Howard *et al.*, 1991, Ravel *et al.*, 1995) y un gran número de microsátélites para cada especie de *Leishmania*. Los microsátélites son secuencias cortas de ADN repetidas en tándem que presentan una elevada variabilidad en el número de repeticiones, permitiendo con su estudio la diferenciación interespecífica así como intraespecífica (Rossi *et al.*, 1994; Dikhit *et al.*, 2014). En la actualidad, se cree que el genoma de *Leishmania* presenta aneuploidía con una organización mosaica en todos sus cromosomas (Lachaud *et al.*, 2014; Sterkers *et al.*, 2014), en lugar de tratarse de un genoma estrictamente diploide como ha sido considerado durante los últimos 20 años (Iovannisci y Beverley, 1989; Bastien *et al.*, 1992). Éste está constituido por 32.816.678 pares de bases organizadas en cromosomas (Ivens *et al.*, 2005), las especies del Viejo Mundo tienen 36 cromosomas (Wincker *et al.*, 1996), mientras que las del Nuevo Mundo tienen 34 o 35 cromosomas (Britto *et al.*, 1998).

El modo reproductivo de *Leishmania* es considerado clonal, junto con la teórica existencia de una recombinación genética poco frecuente reforzada por la observación de híbridos interespecíficos (Bastien *et al.*, 1992; Tibayrenc y Ayala, 2002; Ravel *et al.*, 2006; Rougeron *et al.*, 2010). También se ha propuesto que las especies de *Leishmania* podrían alternar los diferentes modos reproductivos dependiendo de la fase del ciclo biológico en la que se encuentran: clonalidad en el huésped vertebrado así como en el vector, y endogamia en el vector; además de poco frecuentes recombinaciones mediante un proceso de parasexualidad entre individuos que sólo se producirían en el vector, cuya progenie sería transmitida al hospedador vertebrado por la picada del flebótomo (Akopyants *et al.*, 2009; Rougeron *et al.*, 2010; Sterkers *et al.*, 2014). La diversidad observada en recientes estudios poblacionales de *Leishmania* ha sido atribuida a la acumulación de mutaciones con el tiempo, además de proponerse la teoría de un probable intercambio genético entre individuos generalmente producido en el vector (Ravel *et al.*, 2006; Gelanew *et al.*, 2010; 2014).

1.1.3. Formas evolutivas y ciclo biológico

Existen dos formas evolutivas principales: la forma amastigota y la promastigota. La forma amastigota se multiplica dentro de los macrófagos y células del sistema mononuclear fagocítico del hospedador vertebrado. Presenta una forma oval o redondeada, de 2-5 μm de longitud. En su citoplasma se distingue muy bien un gran núcleo, un bolsillo flagelar para el desarrollo del flagelo y un corpúsculo baciliforme localizado entre la extremidad anterior y el núcleo, que corresponde al kinetoplasto. Dentro del macrófago, el parásito se divide hasta romper la célula, liberándose así para infectar otros macrófagos. La forma promastigota es la que se desarrolla en el flebótomo vector; tiene aspecto fusiforme, de entre 7-15 μm de longitud, con un núcleo oval o redondeado en la parte media del cuerpo y un kinetonúcleo visibles al microscopio tras tinción. Posee un flagelo libre en la porción anterior del cuerpo que permite su movimiento, siendo perceptible en fresco y con tinción (Killick-Kendrick, 1990). Ambas formas se dividen repetidamente por fisión binaria longitudinal (Ashford, 2000).

El ciclo biológico de *Leishmania* difiere en cuanto a epidemiología, tejidos afectados y manifestaciones clínicas según la especie implicada. En líneas generales, se trata de un parásito digénico, que realiza parte de su ciclo biológico en el tubo digestivo del hospedador invertebrado (insectos de la familia *Psychodidae*, subfamilia *Phlebotominae*) y parte dentro de células del sistema fagocítico mononuclear del hospedador vertebrado (Chang *et al.*, 1985; Handman, 1999).

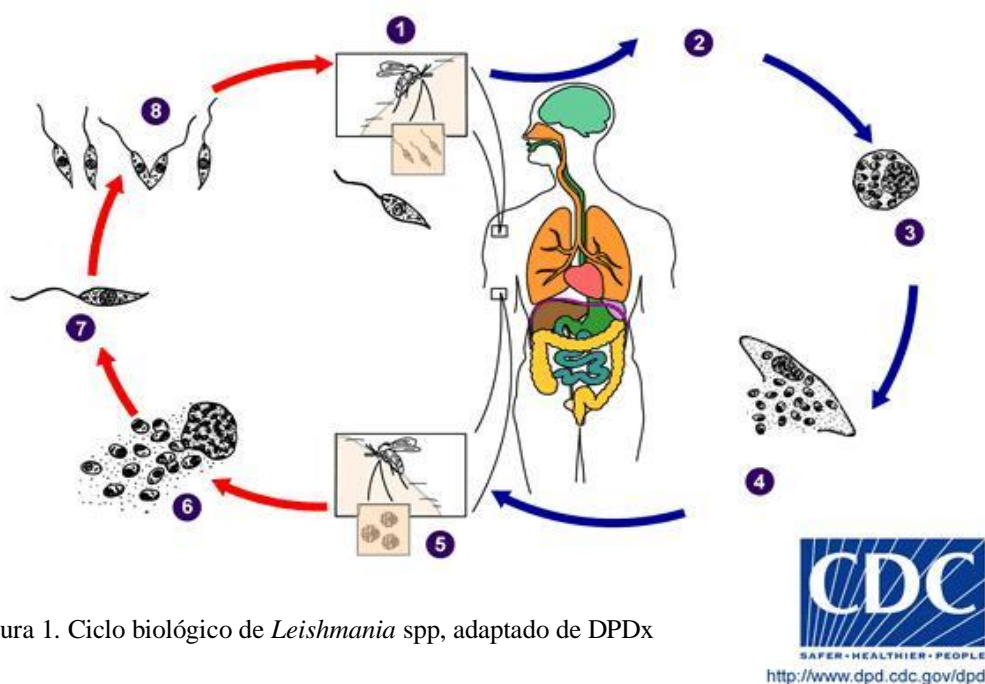


Figura 1. Ciclo biológico de *Leishmania* spp, adaptado de DPDx

Cuando un flebótomo parasitado ingurgita sangre de un vertebrado (1), inocula los promastigotes presentes en la probóscide. El parásito en los capilares cutáneos del hospedador vertebrado es fagocitado por el macrófago (2), quien lo engloba en una vacuola parasitófora para tratar de eliminarlo mediante una cascada de metabolitos derivados del oxígeno y la liberación de hidrolasas lisosomales. En el espacio intravacuolar, *Leishmania* evade las reacciones inmunológicas inespecíficas y se transforma en forma amastigota (3), multiplicándose en el interior del macrófago (4). La progresión de la enfermedad dependerá de la virulencia de los amastigotes y de su capacidad de sobrevivir a la respuesta inmune. Los macrófagos parasitados circundantes pueden ser ingurgitados por otro flebótomo (5), en cuyo aparato digestivo se liberan los amastigotes (6) para transformarse en promastigotes (7), que se multiplican activamente en la luz del estómago e intestino del insecto (8). Tras varios días, los promastigotes alcanzan la capacidad infectiva (promastigotes metacíclicos) y se localizan en la probóscide del flebótomo pudiendo ser inoculados a otro hospedador vertebrado, cerrándose así el ciclo (Figura 1).

1.2. VECTORES

Los vectores de *Leishmania* spp son los flebótomos, pequeños dípteros nematóceros de 2 a 3 mm, color amarillento, alas lanceoladas, patas muy largas y con todo el cuerpo recubierto por cerdas. Éstos pertenecen a la familia *Psychodidae*, subfamilia *Phlebotominae*; los géneros capaces de transmitir este protozoo son *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo y *Phlebotomus* en el Viejo Mundo, distribuidos preferiblemente en zonas intertropicales y templadas desde la selva húmeda a regiones muy áridas, entre el nivel del mar y los 1.500 metros de altura o incluso más (Killick-Kendrick, 1999). El género *Sergentomyia* es vector de *Sauroleishmania*, propia de reptiles y no patógeno para el ser humano (WHO, 2010). De las estimadas 800 existentes, sólo 98 especies son reconocidos o probables vectores de leishmaniosis humana, 42 de éstos presentes en el Viejo Mundo (Maroli *et al.*, 2013).

En la Península Ibérica, las principales especies que actúan como vectores de *L. infantum* son *P. perniciosus*, vector muy abundante y ampliamente distribuido en zonas áridas y templadas, y *P. ariasi*, que se encuentra en territorios más elevados, frescos y

húmedos (Aransay *et al.*, 2004; Suarez *et al.*, 2012). Su periodo de máxima actividad en el clima mediterráneo va desde el crepúsculo hasta la medianoche, siempre y cuando la temperatura ronde los 18-20°C y no haya viento; sólo las hembras son hematófagas (Killick-Kendrick, 1999). En el sur de España, *P. perniciosus* entra en actividad a finales de febrero y termina a principios de diciembre, mientras que en el norte comienza en mayo y acaba a principios de noviembre. La época de máximo riesgo de transmisión del parásito es a finales de septiembre y principios de octubre (Morillas Márquez *et al.*, 1991; Suárez *et al.*, 2012). En áreas tropicales los flebótomos realizan su ciclo vital completo durante todo el año.

Además de estas especies, *P. sergenti* también se encuentra distribuido por el centro y sur del territorio peninsular; este flebótomo es un reconocido vector de *L. tropica* y, aunque dicha especie de *Leishmania* no es endémica en esta zona, podría llegar a serlo debido al constante flujo migratorio de personas infectadas (Gil Collado *et al.*, 1989; Barón *et al.*, 2013). Junto a *P. sergenti*, en la Península Ibérica también encontramos otras especies vectores de leishmaniosis, como *P. papatasi*, vector de *L. major*, o *P. perfiliewi* y *P. alexandri*, vectores de *L. infantum* en otras zonas endémicas (Maroli *et al.*, 2013). La adaptación de los flebótomos a nuevos territorios viene condicionada principalmente por factores climáticos y por las características del terreno, así como la proximidad de otras zonas endémicas (Amela *et al.*, 2012; Barón *et al.*, 2013).

1.3. RESERVORIOS

Se considera que un animal es huésped reservorio de una enfermedad cuando garantiza tanto la existencia del agente etiológico como facilita su posterior transmisión, manteniendo de esta manera la población parasitaria a largo plazo (WHO 1984; 2010). Un mamífero debe reunir ciertos requisitos para ser incriminado como reservorio, que en el caso de las leishmaniosis son, principalmente: estar presente en abundancia en el foco de leishmaniosis, ser suficientemente longevo, permitir un buen contacto con el vector, contener suficientes parásitos en la piel o sangre para que puedan pasar al flebótomo, existir una proporción considerable de individuos parasitados y estar infectados de manera perdurable de una época de transmisión a la siguiente. Generalmente existe un único reservorio principal para una determinada especie de

Leishmania en un foco en particular, pero en la misma zona pueden verse infectados otros mamíferos, que pueden actuar como huéspedes secundarios y participar en el mantenimiento del foco endémico (WHO 2010). Las leishmaniasis pueden ser zoonóticas, cuando el reservorio es un animal (ya sean animales domésticos, peridomésticos o salvajes) o antroponóticas cuando los humanos actúan como únicos reservorios; aunque algunas especies de *Leishmania* no siempre siguen esta regla (WHO, 2010).

En la zona Mediterránea, coexisten diferentes leishmaniasis zoonóticas que involucran distintas especies de *Leishmania*, cuyos reservorios dependerán de la especie implicada y de la zona geográfica considerada. Así, la especie *L. infantum* se extiende desde el nordeste de China hasta el Mediterráneo occidental, habitualmente en zonas húmedas o semi-húmedas, aunque también se ha encontrado en zonas semi-áridas junto a *L. tropica*. Su principal reservorio en toda la cuenca Mediterránea es el perro doméstico (*Canis familiaris*) (Rioux *et al.*, 1973; Bettini y Gradoni, 1986; Abranches *et al.*, 1991; Gramiccia y Gradoni, 2005), con una prevalencia de leishmaniasis entre el 5-30% en el área Mediterránea (Fisa *et al.*, 1999; Solano-Gallego *et al.*, 2009), aunque en algunos focos la infección puede llegar al 70% teniendo en cuenta los casos asintomáticos (Solano-Gallego *et al.*, 2001; Leontides *et al.*, 2002). También se han descrito como reservorios de un ciclo salvaje de poca interacción con los humanos al lobo (*Canis lupus*), el chacal (*Canis aureus*) y el zorro (*Vulpes vulpes*), éste último implicado en un ciclo peridoméstico con una prevalencia de infección muy parecida a la del perro (Martín Luengo y Quiles Mora, 1982; Fisa *et al.*, 1999; Criado-Fornelio *et al.*, 2000; Alvar *et al.*, 2004). Entre otros reservorios implicados en determinados focos de leishmaniasis se han citado las ratas (Bettini *et al.*, 1978; Morillas-Márquez *et al.*, 1985), conejos (Chitimia *et al.*, 2011; Jiménez *et al.*, 2014) y liebres (Molina *et al.*, 2012; Jiménez *et al.*, 2013). Además se han encontrado evidencias de parasitación en gatos domésticos y salvajes (Martín-Sánchez *et al.*, 2007; Solano-Gallego *et al.*, 2007a; Millán *et al.*, 2011), jinetas comunes (Portús *et al.*, 2002), comadreja (Millán *et al.*, 2011), y erizos (Muñoz-Madrid *et al.*, 2013), entre otros.

L. major se encuentra en zonas áridas y semi-áridas desde el Senegal hasta las llanuras de Asia central (Desjeux *et al.*, 1982). Los reservorios más habituales de esta especie son los roedores *Psammomys obesus* (Bellazoug, 1986) y *Rhombomys opimus* (Latyshev y Krujukova, 1941). También están implicadas en la transmisión del parásito

diversas especies del género *Meriones* (Rioux *et al.*, 1982; Ben-Ismaïl *et al.*, 1989; Morsy *et al.*, 1993; Derbali *et al.*, 2012). Estudios previos en Asia durante los años 70 indicaron la implicación de una especie de erizo (*Hemiechinus albulus major*) como reservorio natural de *L. major* en la ex-URSS (Petrisceva, 1971; Faizulin *et al.*, 1975). También se han detectado algunos casos de parasitación en el perro, tanto a nivel cutáneo como visceral; así como estudios recientes sugieren que los gorilas salvajes podrían ser también reservorios de *L. major* (Hamad *et al.*, 2014).

La especie *L. killicki*, antes considerada como *L. tropica* (Rioux y Lanotte, 1993), se encuentra en zonas de Túnez, República de Yemen, Kenia, y recientemente también ha sido descrita en Argelia (Harrat *et al.*, 2009). Sus principales reservorios son los mamíferos hiracoideos, comúnmente conocidos como damanes; aunque también se han dado casos de infección por esta especie en los gondis (*Ctenodactylus gundi*) en Túnez (Jaouadi *et al.*, 2011). Otra especie cuyos reservorios son los damanes es *L. aethiopica*, especie causante de leishmaniosis cutáneas en Etiopía (Ashford, 1984; Morsy *et al.*, 1997). *L. gerbilli*, *L. turanica* y *L. arabica* son especies que afectan a los damanes, roedores y perros (Strelkova, 1996; Strelkova *et al.*, 2001; Akhavan *et al.*, 2010), sin que se haya registrado de momento ningún caso en humanos. *L. tropica*, especie considerada antroponótica, también ha sido encontrada en algunas ocasiones en animales. Entre ellas, se relacionó un caso de leishmaniosis visceral canina en Marruecos con dicha especie (Guessous-Idrissi *et al.*, 1997); así como en Túnez se descubrió que los gondis también estaban infectados por *L. tropica* en un foco de LC situado en el sudeste del país (Bousslimi *et al.*, 2012).

1.4. LAS LEISHMANIOSIS HUMANAS

Las leishmaniosis humanas presentan formas clínicas diversas con afectación cutánea, mucocutánea y visceral, relacionadas con la especie del parásito implicada, la interacción entre parásito y hospedador y la respuesta inmune producida. La LC o botón de Oriente, junto a la LMC, son las formas de leishmaniosis más frecuentes, representando entre el 50-75% de los casos a nivel mundial. Las principales especies causantes de LC en el Viejo Mundo son *L. major*, *L. tropica*, *L. infantum*, *L. aethiopica* y *L. killicki* (Bañuls *et al.*, 2011). Inicialmente aparece como una picadura persistente de

insecto que va creciendo gradualmente, siendo de un color rojizo, aunque no caliente, y sin causar dolor. El sistema inmunológico acaba aislando el área afectada dando lugar a necrosis de los tejidos y a la formación de un granuloma en la base de la lesión. Dependiendo de la especie causante, puede dar lugar a una gran úlcera abierta (*L. major*) o ser más leve sin causar ulceración (*L. tropica*, *L. infantum* y *L. aethiopica*). Las lesiones suelen aparecer principalmente en rostro y extremidades con un tamaño que varía desde pocos milímetros hasta varios centímetros de diámetro. Éstas tienden a curar espontáneamente en un periodo de tiempo que depende de la especie causante y del lugar afectado, aunque en algunos casos, especialmente en infecciones de *L. major*, pueden llegar a causar importantes discapacidades en los pacientes, así como cicatrices permanentes debido a la aparición de numerosas lesiones simultáneamente (Ashford, 2000; WHO, 2010). En el Viejo Mundo, los casos de LC difusa están relacionados con episodios de inmunosupresión debidos a la co-infección con el VIH, y están causados por *L. infantum*, *L. major* y *L. donovani*. En estos enfermos se suelen producir erupciones cutáneas generalizadas (Ashford, 2000; WHO, 2010).

La LV, también conocida como kala azar, es la forma más grave de leishmaniosis siendo en muchos casos mortal si no es tratada a tiempo. La LV es a veces precedida por la aparición de una lesión o úlcera en el lugar de la picadura del vector y su sintomatología consiste en fiebre, anemia, leucopenia, hepatoesplenomegalia y en algunos casos linfadenopatía, tos, diarrea y pérdida de peso. Dichos síntomas derivan de la invasión de los órganos diana: bazo, hígado, médula ósea, etc., y aparecen después de un periodo de incubación largo. La LV antroponótica causada por *L. donovani* se encuentra presente en el este de África y en la India afectando a personas de todas las edades, aunque otras especies como *L. tropica* pueden visceralizar ocasionalmente (Sacks *et al.* 1995). En la zona Mediterránea, la LV es causada por la especie zoonótica *L. infantum*, afectando fundamentalmente a niños y personas inmunodeprimidas (Desjeux, 2004).

La leishmaniosis cutánea post-kala-azar (LCPK) es causada por *L. donovani* y representa una secuela de LV tratada y curada con anterioridad. Suele aparecer en los siguientes dos años de la aparente curación de la LV y se caracteriza por la aparición de placas hiperpigmentadas o nódulos indurados dispersos en la piel, localizados habitualmente en la cara, los brazos, el tronco y otras partes del cuerpo. Esta forma se encuentra principalmente en África oriental y en la India, donde hasta el 50% y entre el

5-10% de los pacientes con LV, respectivamente, manifiestan la enfermedad. La LCPK se considera una forma donde el hombre actúa como reservorio en zonas donde la transmisión de la LV es principalmente antroponótica, debido a que las lesiones presentan una gran concentración de amastigotes; es por eso que su diagnóstico y tratamiento es muy importante para el control y eliminación de la leishmaniosis en la zona de estudio (Rahman *et al.*, 2010).

La co-infección de *Leishmania* con el VIH en el área del Mediterráneo ha representado un incremento en el número de casos de LV en los últimos años, debidos en muchas ocasiones a la reactivación de una leishmaniosis asintomática o críptica. El debilitamiento del sistema inmune que presentan los enfermos infectados por el VIH, junto a una supresión de su inmunidad celular, hace que las infecciones oportunistas sean frecuentes en este grupo de enfermos, entre ellas la leishmaniosis (Ashford, 2000; WHO, 2010). Recientemente también se ha relacionado la LCPK con *L. infantum* en casos de co-infección con VIH (Antinori *et al.*, 2007; Farooq *et al.*, 2013).

1.4.1. Co-infección *Leishmania*/VIH en el Mediterráneo

El primer caso de leishmaniosis asociada al virus de la inmunodeficiencia humana VIH en el sur de Europa fue declarado en 1985 (De la Loma *et al.* 1985), desde entonces los casos de co-infección detectados han ido en aumento. La infección por VIH aumenta entre 100-2.320 veces el riesgo de padecer también LV en áreas endémicas, que es la forma clínica más frecuente asociada al VIH, a la vez que reduce la respuesta al tratamiento y aumenta considerablemente las probabilidades de recaer en la enfermedad una vez controlada (Alvar *et al.*, 2008). Los amastigotes de *Leishmania* y el VIH pueden infectar tanto células dendríticas como macrófagos, cuya presencia concomitante en éstos produce efectos recíprocos que promueven la expresión y multiplicación de uno o ambos patógenos (Cruz *et al.*, 2002; Ezra *et al.*, 2010), produciendo un daño sinérgico en la respuesta inmune celular (Alvar *et al.*, 2008).

Un total de 35 países han declarado casos de co-infección *Leishmania*/VIH (Figura 2), que representan el 2-12% del total de casos de LV. En el sur de Europa, 1.911 casos fueron declarados hasta finales del año 2001 entre Francia, Italia, Portugal y España; 717 de éstos se produjeron en un pico entre los años 1996 y 1998. Con la introducción

en Europa de la terapia HAART (*Highly Active Antiretroviral Therapy*) como tratamiento para el VIH en el año 1997, dichas cifras de co-infección disminuyeron considerablemente en todos los países excepto, por causas desconocidas, en Portugal. Entre 2001-2006 se produjeron 241 nuevos casos, 95 de los cuales en España. La mayoría de estos casos se declaran en centros de referencia de áreas urbanas, estimándose una posible subestimación de éstos en áreas rurales. Otros países como Alemania, Grecia, Suiza y Reino Unido declaran casos esporádicos importados (WHO, 2007).

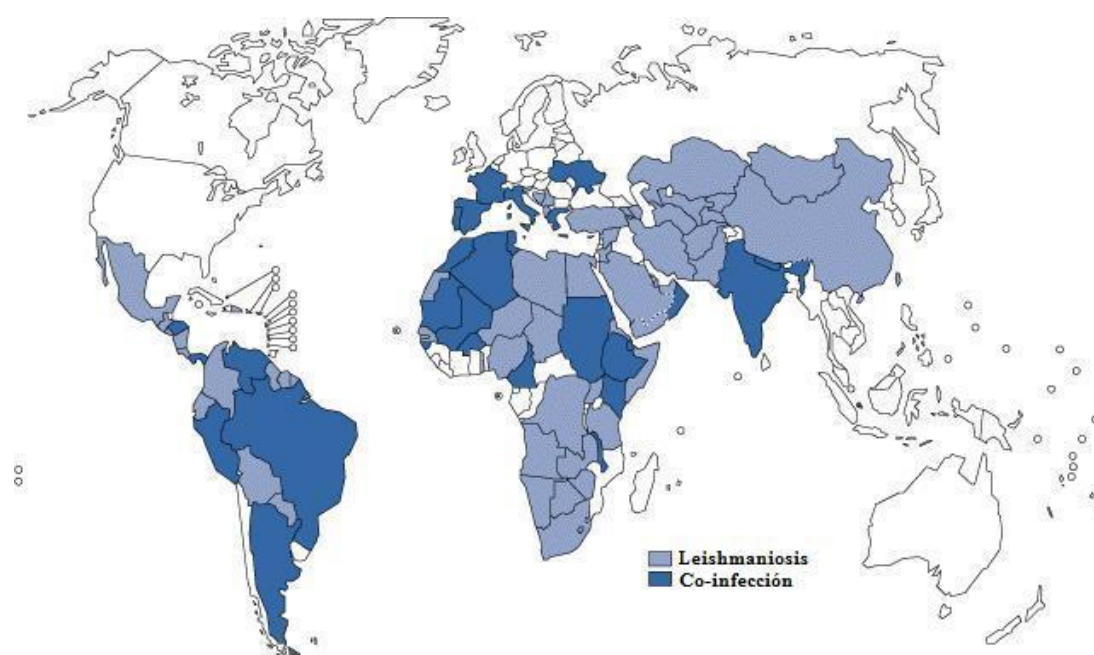


Figura 2. Distribución de los casos declarados de leishmaniosis y los de co-infección *Leishmania*/VIH entre 1990-1998. (http://www.who.int/csr/resources/publications/CSR_ISR_2000_1leish/en/)

Los casos de leishmaniosis asociados a VIH en el área Mediterránea son producidos básicamente por *L. infantum*. Éstos pueden ser adquiridos por la picada del vector, en la Península Ibérica pertenecientes a las especies *P. perniciosus* y *P. ariasi* (WHO, 2010), por reactivaciones de una infección previa asintomática (Alvar *et al.*, 2008), o bien nuevas infecciones adquiridas por otras vías, como podría ser compartir jeringas contaminadas entre drogadictos, creando así un nuevo ciclo antroponótico en el que la jeringa haría la función del vector (Morales *et al.*, 2002). La forma de leishmaniosis más habitualmente asociada a VIH es la visceral, aunque también se dan casos de cutánea que suelen manifestarse como formas anómalas de la enfermedad, más severas y poco

frecuentes, debido a que el parásito alcanza tejidos que normalmente no habita debido a un sistema inmunológico debilitado (Pintado y López-Vélez, 2001). Asimismo, especies de *Leishmania* típicamente viscerotrópicas pueden dar sintomatología cutánea e incluso encontrarse en piel sana (Paredes *et al.*, 2003). Las manifestaciones clínicas de la LV también suelen verse alteradas, como la ausencia de esplenomegalia y la afectación, en cambio, de los pulmones o el sistema gastrointestinal (Romeu *et al.*, 1991; Mondain-Miton *et al.*, 1995).

Los pacientes co-infectados con VIH normalmente sufren sucesivos episodios de LV, de los cuales alrededor de un 90% son considerados recaídas clínicas en lugar de reinfecciones. En áreas donde la leishmaniosis es endémica, el ratio de reinfecciones puede ser mayor de lo esperado, lo que en muchos casos puede ser interpretado como una recaída de la enfermedad. Por esta razón, cuando no es posible distinguir entre reinfección y recaída se dificulta la correcta evaluación de los protocolos de tratamiento (Morales *et al.*, 2002). Si un paciente co-infectado no recibe tratamiento con la terapia HAART, el ratio de recaídas aumenta un 60% entre los 6-9 meses post-tratamiento y hasta un 90% en los siguientes 12 meses, con un intervalo entre cada uno de estos episodios cada vez menor (López-Vélez, 2003). Dichas recaídas también suelen producirse en un alto porcentaje a pesar de la incorporación del tratamiento (Mira *et al.*, 2004). Recientemente, el uso de la qPCR en sangre periférica para la monitorización de la carga parasitaria ha facilitado el seguimiento de los pacientes, demostrando una elevada parasitemia en los casos de co-infección con VIH (Molina *et al.*, 1999; Colomba *et al.*, 2009).

1.5. DIAGNÓSTICO

Un diagnóstico preciso y rápido es necesario para la elección y el establecimiento del tratamiento de las leishmaniosis. En el diagnóstico de la enfermedad es importante la observación de signos clínicos característicos, entre los que se encuentran las lesiones cutáneas propias de la LC, o en el caso de LV, será necesario averiguar la existencia de fiebre, fatiga, pérdida de apetito y, en consecuencia, de peso; así como el desarrollo de hepato-esplenomegalia e inflamación de los nódulos linfáticos, que podrá averiguarse en el examen físico (Reus *et al.*, 2005; Artan *et al.*, 2006; Del Olmo *et al.*, 2009). Las

alteraciones clínico-patológicas más frecuentes son la anemia, hipoalbuminemia, hiperglobulinemia, linfopenia, trombocitopenia y proteinuria entre otras. Estas alteraciones pueden ser muy distintas entre los humanos y los animales, como por ejemplo los perros, que también padecen esta enfermedad (Solano-Gallego *et al.*, 2001). Otro punto a tener en cuenta es el conocimiento de la procedencia del paciente, que va a permitir relacionar la zona geográfica con las especies presentes en ella. Dado que la mayoría de los signos y alteraciones mencionadas son comunes para muchas otras enfermedades, será necesario realizar un diagnóstico de confirmación, para el cual en la actualidad existen diferentes técnicas.

1.5.1. Diagnóstico directo

El examen microscópico es un diagnóstico directo de confirmación que se basa en la observación del parásito. Éste se suele realizar sobre aspirados de tejido procedente del bazo, médula ósea y nódulos linfáticos en el caso de las LV, y de las lesiones cutáneas en las LC (Srividya *et al.*, 2012), con la posterior realización del frotis y tinción con Giemsa o Diff-Quick[®]. En el caso del reservorio canino, la muestra biológica de elección es el aspirado de ganglio linfático o de médula ósea (Slappendel y Ferrer, 1998). Los resultados parasitológicos dependerán del tejido observado, de la carga parasitaria, de la fase de la enfermedad, así como de la experiencia del personal técnico encargado de la observación. Las técnicas inmunohistoquímicas (IHQ) se realizan sobre cortes de biopsias parafinadas y empleando anticuerpos monoclonales o policlonales anti-*Leishmania*, permitiendo localizar el parásito fácilmente gracias al contraste que da su coloración (Martín-Ezquerro *et al.*, 2009), y mejorando la sensibilidad de técnicas convencionales de Hematoxilina-Eosina.

El cultivo *in vitro* a partir de la muestra biológica permite mejorar la sensibilidad y poder aislar la cepa con fines taxonómicos. Los medios habitualmente empleados para el aislamiento de *Leishmania* son el medio NNN (Novy-McNeal-Nicolle) o el medio de Schneider suplementado con suero bovino fetal. El cultivo requiere disponer de un laboratorio de nivel 2 de seguridad, y mantener la muestra en estufa a 26°C al menos durante un mes antes de ser descartado como negativo. Para facilitar el proceso, se han

desarrollado los métodos de microcultivo (MCM) en tubo de microhematocrito o en placa de microtitulación (Allahverdiyev *et al.*, 2005; Hide *et al.*, 2007).

La dificultad que plantea la microscopia y el cultivo *in vitro* ha hecho que se desarrollen otras técnicas alternativas para detectar el parásito, como la técnica de KAtex (*Urine Latex Agglutination Test*), capaz de detectar fracciones antigénicas de *Leishmania* en la orina de los pacientes (El-Safi *et al.*, 2003; Vilaplana *et al.*, 2004; Riera *et al.*, 2004a; Sundar *et al.*, 2005; Chappuis *et al.*, 2006; Ghatei *et al.*, 2009). Es un test con una alta especificidad y sensibilidad especialmente útil en los casos en que el paciente no desarrolla suficiente cantidad de anticuerpos, como por ejemplo en la co-infección con VIH (Srividya *et al.*, 2012). Sus ventajas son la simplicidad de la técnica, su rapidez y que no se trata de una técnica cara, por lo que es útil en trabajos de campo para la detección de LV (Rijal *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2010; Salam *et al.*, 2011). Como desventajas, es necesario hervir la orina para evitar falsos positivos y, además, es fácil confundir un positivo bajo con un resultado negativo.

1.5.2. Diagnóstico serológico

Las técnicas serológicas basadas en la detección en suero de los anticuerpos generados frente al parásito son muy útiles en el diagnóstico de la LV y la LMC, así como para la detección de casos asintomáticos en estudios epidemiológicos, puesto que indican contacto con el parásito. En algunas LC no suele ser el método de elección ya que, debido a la baja respuesta inmunológica humoral, el título de anticuerpos suele ser muy bajo y a veces incluso indetectable. La sensibilidad y especificidad de estas metodologías dependerá de la técnica utilizada y del antígeno escogido, que puede ser total o recombinante. Las desventajas que presenta la serología es la presencia de reacciones cruzadas con otros agentes patógenos, y que no nos permiten diferenciar entre infecciones recientes y pasadas debido a la larga duración de la respuesta inmune (Srividya *et al.*, 2012).

La técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) se considera la técnica serológica de referencia en el diagnóstico de la LV y la leishmaniosis canina dada su buena sensibilidad y especificidad (Mancianti y Meciani, 1988; Gradoni, 2002). Esta técnica permite el diagnóstico poco tiempo después de la infección y la observación de una

disminución de la tasa de anticuerpos meses después de la curación de los pacientes. La IFI también ha sido utilizada en el seguimiento de pacientes con LV, tanto para la detección de recaídas como para el control de la respuesta al tratamiento (Şakru *et al.*, 2011). Como desventaja, necesita de un microscopio de fluorescencia y está sujeta a la lectura subjetiva del observador (Srividya *et al.*, 2012). El test de aglutinación directa (DAT) se utiliza de manera rutinaria en los casos de LV por su rapidez, fácil manipulación, alta sensibilidad y especificidad, y no precisa de equipos sofisticados (Sreenivas *et al.*, 2002; El Harith *et al.*, 2003; El Mutasim *et al.*, 2006; Jacquet *et al.*, 2006). Este test se puede realizar sobre muestras de suero, sangre e incluso orina, y es de fácil realización, lo que facilita el trabajo cuando no se dispone de un laboratorio analítico adecuado (Islam *et al.*, 2004; Chappuis *et al.*, 2006; Sundar *et al.*, 2007; Mandal *et al.*, 2008; Bhattarai *et al.*, 2009; Oliveira *et al.*, 2009). Para solventar algunos de los problemas del DAT, como las largas incubaciones que requiere, se desarrolló la técnica del FAST (*Fast Agglutination Screening Test*), que ha sido utilizada en el diagnóstico de la leishmaniosis en perros (Schallig *et al.*, 2002), así como de LC y LV en humanos (Silva *et al.*, 2005; Hailu *et al.*, 2006). Ésta se basa en el mismo principio que el DAT pero utiliza tan solo una dilución y los resultados se obtienen en 3 horas, en contraste con las 18-20 horas que requiere el DAT (Schallig *et al.*, 2002).

La técnica de ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) se ha desarrollado utilizando una gran diversidad de antígenos, ya sean antígenos totales, solubles o recombinantes, para el diagnóstico de las leishmaniosis. Al igual que ocurre con otras técnicas serológicas, su especificidad y sensibilidad dependerán del antígeno testado, por lo cual hay que prestar especial atención en la elección de éste ya que es frecuente la aparición de reacciones cruzadas (Srividya *et al.*, 2012). La utilización de un antígeno total a partir de las formas promastigotas del parásito permite obtener una alta sensibilidad en la técnica, como han demostrado estudios previos tanto en pacientes humanos como en perros (Fisa *et al.*, 1997; Riera *et al.*, 1999; Cruz *et al.*, 2006; Mandal *et al.*, 2008; Rodríguez-Cortés *et al.*, 2010; 2013).

Con el objetivo de evitar las posibles reacciones cruzadas con otros tripanosomátidos y diferentes microorganismos, se están utilizando antígenos recombinantes; uno de los más utilizados es la proteína de kinesina rK39, para la que existe un test de diagnóstico rápido basado en la inmunocromatografía (*rK39 dipstick test*) y que es de gran utilidad en trabajos de campo por su rapidez y facilidad de uso (Chappuis *et al.*, 2005; Ter Horst

et al., 2009). Esta proteína ha dado buenos resultados utilizada en ELISA para confirmar casos sospechosos de LV, así como en la detección de infecciones asintomáticas para *L. donovani* (Kurkjian *et al.*, 2005). Es capaz de detectar el 98% de los casos siempre y cuando la leishmaniosis se encuentre en su forma activa (Badaro *et al.*, 1996; Singh *et al.*, 2010); además, ha demostrado ser de gran utilidad para la detección de la leishmaniosis canina (Ferroglia *et al.*, 2013). Otras proteínas de kinesina han sido testadas en el diagnóstico de la LV presentando sensibilidades menores y variables, como por ejemplo la K26, K9, KRP42 y la KE16 (Sivakumar *et al.*, 2006; Takagi *et al.*, 2007; Mohapatra *et al.*, 2010). Además de éstas, también se utilizan proteínas específicas de amastigotes, como la A2, aunque se ha encontrado una sensibilidad muy variable dependiendo de la zona de estudio (Ghedini *et al.*, 1997; Carvalho *et al.*, 2002; Rafati *et al.*, 2006). Por último, para el diagnóstico de las LV también se han utilizado, con resultados dispares, proteínas heat-shock (HSP70 y HSP83), éstas más conservadas que las anteriores, y las proteínas de histonas (H2A, H2B, H3 y H4); así como antígenos no proteicos como el ácido 9-*O*-acetilsialílico (Bandyopadhyay *et al.*, 2004; Maache *et al.*, 2005).

La técnica de WB (*Western Blot*) ha sido considerada una técnica altamente sensible y específica que permite determinar seroreactividad frente a determinadas fracciones antigénicas del parásito consideradas específicas y se utiliza tanto para el diagnóstico de la LV sintomática y asintomática como de la LC o la leishmaniosis canina. La eficacia del WB dependerá de las bandas escogidas como diagnósticas, siendo las comprendidas entre 14 y 31 kDa (Mary *et al.*, 1992) buenos marcadores de LV; mientras que las de 14 y 16 kDa están siempre presentes en la LV aguda y pueden aparecer en individuos asintomáticos, indicando contacto con el parásito (Mary *et al.*, 1992; De Colmenares *et al.*, 1995; Aisa *et al.*, 1998; Le Fichoux *et al.*, 1999; Riera *et al.*, 1999; 2004b).

Para solventar problemas de sensibilidad y especificidad, se ha sugerido el uso de dos técnicas serológicas combinadas para aumentar la fiabilidad en el diagnóstico; normalmente se trata de la técnica de referencia IFI o el ELISA junto con la inmunocromatografía o *rK39 dipstick test*, obteniendo muy buenos resultados tanto en asintomáticos como en animales enfermos (Riera *et al.*, 2004b; Da Silva *et al.*, 2014). También se está trabajando en la combinación de diferentes antígenos en un único test, como los arrays de diagnóstico, que pueden ser de gran utilidad para evitar falsos negativos (Chappuis *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2010).

1.5.3. Diagnóstico molecular

Las técnicas de diagnóstico molecular se han basado fundamentalmente en las metodologías de amplificación del ADN mediante la técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) por ser altamente sensibles, rápidas, seguras y específicas para el diagnóstico de las leishmaniosis. Estas técnicas han sido utilizadas sobre diferentes dianas, entre ellas genes del ARN ribosómico (Lachaud *et al.*, 2000; Srivastava *et al.*, 2011); ADN del kinetoplasto (ADNk) (Salotra *et al.*, 2001; Cortés *et al.*, 2004; Maurya *et al.*, 2005) genes de ARN derivados del miniexón (med RNA), y repeticiones genómicas (Kuhls *et al.*, 2007), genes de la región de la β -tubulina (Akman *et al.*, 2000; Dey y Singh, 2007), genes de la glicoproteína 63 (gp63) (Guerbouj *et al.*, 2001; Quispe Tintaya *et al.*, 2004), y regiones de la ITS (*Internal Transcribed Spacer*) (Schönian *et al.*, 2003; Mauricio *et al.*, 2004). Con el objetivo de mejorar la sensibilidad del análisis se han desarrollado técnicas de PCR anidadas (Fisa *et al.*, 2001; 2002). Para simplificar la detección del producto de PCR se diseñó una PCR-ELISA, basada en un método de hibridación reversa donde los amplicones son visualizados por colorimetría utilizando un ELISA. Esta técnica presenta una alta sensibilidad en el diagnóstico de pacientes no inmunodeprimidos (De Doncker *et al.*, 2005). Otra variante es la OC-PCR (*oligochromatography-PCR*), que realiza la lectura de los amplicones mediante cromatografía utilizando conjugados en oro (Deborggraeve *et al.*, 2006). Estas metodologías permiten la utilización de una gran variedad de muestras biológicas, como por ejemplo sangre periférica, nódulos linfáticos, médula ósea, suero y piel, así como en otras de más fácil obtención como orina o hisopos conjuntivales, muy útiles para ser usados en niños ya que se trata de muestras poco invasivas, evitando además posibles infecciones secundarias derivadas de la extracción de la muestra (Fisa *et al.*, 2008; Motazedian *et al.*, 2008; Pilatti *et al.*, 2009).

Una variante muy utilizada en la actualidad para el diagnóstico es la qPCR (*Real-Time Polymerase Chain Reaction*), que a diferencia de la PCR convencional, monitoriza el proceso de amplificación a tiempo real permitiendo la cuantificación además de la identificación de *Leishmania* a nivel de género o especie, dependiendo de los cebadores y las sondas utilizadas. Para la lectura del producto de amplificación se trabaja con sondas de hidrólisis, como TaqMan, o sondas de hibridación FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) y también fluoróforos de unión al ADN como el SYBR-green (Espy *et al.*, 2006; Reithinger y Dujardin, 2007; Martin-Ezquerria *et al.*, 2009). El

uso de la qPCR ha sido utilizado en el diagnóstico y monitorización de pacientes con leishmaniosis, tanto de formas cutáneas como viscerales, y en la co-infección con el VIH (Mary *et al.*, 2004; Martin-Ezquerro *et al.*, 2009; Bourgeois *et al.*, 2010; Verma *et al.*, 2010; Molina *et al.*, 2013); además del estudio en reservorios animales (Francino *et al.*, 2006; Solano-Gallego *et al.*, 2007b; Chitimia *et al.*, 2011). Esta técnica permite además analizar diferentes secuencias en un único análisis en ensayos multiplex, como el que fue diseñado para el diagnóstico simultáneo de *Yersinia pestis*, *Bacillus anthracis* y *L. donovani* directamente desde aspirados de sangre o médula ósea (Selvapandiyar *et al.*, 2005; 2008), u otros para la identificación de diversas especies de *Leishmania* (Oliveira *et al.*, 2011). En general, la qPCR presenta una excelente sensibilidad y especificidad, es rápida y al estar automatizada dentro de un proceso cerrado disminuye el riesgo de contaminación, sin embargo, resulta una técnica cara que precisa de equipos sofisticados.

Actualmente, nuevas metodologías de amplificación no basadas en la PCR están siendo implementadas, entre ellas el LAMP (*Loop-Mediated Isothermal Amplification*), que es un método de amplificación dotado de una alta especificidad (requiere 6 cebadores para su desarrollo) y sensibilidad, capaz de discriminar entre diferencias de un sólo nucleótido. Esta técnica se ha aplicado en el diagnóstico de *Leishmania* utilizando el ADNk y el 18S ARNr como dianas bajo condiciones isotérmicas (entre 60-65 °C) y el SYBR-green como marcador, que presenta un buen rendimiento y ha eliminado la necesidad de utilizar un termociclador, acortando también el tiempo de desarrollo de la técnica en menos de una hora (Notomi *et al.*, 2000; Adams *et al.*, 2010). Ésta ha sido utilizada en el diagnóstico de *L. donovani* en muestras de sangre de pacientes con LV, obteniendo unos resultados comparables a la PCR (Takagi *et al.*, 2009; Khan *et al.*, 2012). En estudios recientes se ha probado su utilidad para el diagnóstico de LCPK (Verma *et al.*, 2013), así como LC utilizando muestras no invasivas consistentes en hisopos hervidos, obteniendo también buenos resultados (Mikita *et al.*, 2014). El LAMP es una metodología asequible a laboratorios pequeños, especialmente en áreas endémicas rurales en trabajos de campo, ya que sus reactivos son estables a temperatura ambiente (Takagi *et al.*, 2009) y no requiere de un equipo muy sofisticado (Notomi *et al.*, 2000). Otras metodologías como el NASBA (*Nucleic Acid Sequence Based Amplification*) es también muy sensible y específica, y se basa en la amplificación del ARN bajo condiciones isotérmicas (Van der Meide *et al.*, 2005). Entre las utilidades

que se le ha dado al NASBA para las leishmaniosis están los estudios de respuesta al tratamiento (Van der Meide *et al.*, 2005; 2008; De Vries *et al.*, 2006), así como los ensayos mediante oligocromatografía (NASBA-OC) con los que se pretende estandarizar la técnica para el diagnóstico de *Leishmania* de una manera más simple mediante kits de diagnóstico (Saad *et al.*, 2010; Basiye *et al.*, 2010).

1.6. CARACTERIZACIÓN DE *LEISHMANIA* SPP

Todas las especies del género *Leishmania* son similares morfológicamente, por lo que no es posible su identificación a nivel de especie mediante técnicas de microscopía y son necesarias técnicas bioquímicas y moleculares (Asford, 2000). Por esta razón es necesario contar con metodologías de caracterización que permitan diferenciar las especies de *Leishmania* de manera fiable, fácil y lo más rápido posible. Esta diferenciación es especialmente útil en áreas donde coexisten diversas especies del parásito, como en la cuenca Mediterránea, donde los casos de LC pueden ser causados por *L. infantum*, *L. major* o *L. tropica*. De la misma manera, estas técnicas serán necesarias para profundizar en los estudios epidemiológicos, en los estudios de genética de poblaciones o en los de filogenia (Schönian *et al.*, 2011). En general, los métodos de caracterización se dividen en extrínsecos, basados en el fenotipo, o intrínsecos, basados en el genoma.

1.6.1. Caracterización isoenzimática

La caracterización de isoenzimas mediante MLEE (*Multilocus Enzyme Electrophoresis*) es la técnica fenotípica más utilizada y en la que se basa la clasificación de *Leishmania* (Rioux *et al.*, 1990). Se trata de enzimas que comparten una misma función pero presentan una movilidad electroforética distinta al ser sometidos a un campo eléctrico (Markert y Moller, 1959); de este modo, las cepas pertenecen al mismo zimodema cuando comparten un mismo perfil enzimático (Lumsden, 1977). Los sistemas utilizados en Europa y en Sud-América son distintos, ya que se estudian diferentes grupos de enzimas (Rioux *et al.*, 1990; Cupolillo *et al.*, 1994). El protocolo de análisis isoenzimático en el sur de Europa está unificado, utilizando los mismos 15 sistemas

enzimáticos y el almidón como sustrato. La caracterización de cepas de *L. infantum* en España ha permitido observar la presencia de más de 29 zimodemas en el hombre, perro, caballo, rata y vector (Morillas Márquez *et al.*, 1985; Gállego *et al.*, 2001; Chicharro *et al.*, 2003; Solano-Gallego *et al.*, 2003; Martín-Sánchez *et al.*, 2004). Esta técnica ha sido ampliamente utilizada para la identificación del parásito a nivel de especie y subespecie aunque presenta importantes limitaciones, como su bajo poder de discriminación intraespecífica dando lugar a una población mayormente perteneciente al zimodema MON-1 (Pratlong *et al.*, 2003) que en estudios posteriores, utilizando metodologías más discriminantes basadas en el genotipo, se ha podido separar en diferentes poblaciones (Hide *et al.*, 2001; Chicharro *et al.*, 2003; Martín-Sánchez *et al.*, 2004; Mauricio *et al.*, 2006; Kuhls *et al.*, 2008; Alam *et al.*, 2009). Estudios moleculares han demostrado que pueden darse diferencias en la movilidad electroforética como consecuencia de variaciones en una sola posición de un nucleótido (Jamjoon *et al.*, 2004; Mauricio *et al.*, 2006; Zemanová *et al.*, 2007).

1.6.2. Técnicas genotípicas

Las técnicas genotípicas son de gran utilidad cuando se trata de la caracterización de especies. El genoma de los parásitos permanece invariable durante la vida de éstos, independientemente de los cambios que se producen durante su ciclo biológico o los posibles daños que el sistema inmunológico puede causarles (Blackwell, 1992). Desde la llegada de la PCR, se han desarrollado numerosas técnicas basadas en ésta para distinguir *Leishmania* a nivel de especie e incluso de cepa, cada una con un poder discriminatorio distinto y con diferentes ventajas e inconvenientes. En general, la principal ventaja de estas técnicas es que combinan una alta sensibilidad con una gran especificidad, permitiendo identificar sin necesidad de aislar el parásito.

La diferenciación a nivel de especie puede llevarse a cabo mediante diferentes técnicas, la PCR-RFLP (*PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism*) ha sido muy utilizada en el diagnóstico y tipado a nivel de especie de *Leishmania*. Ésta es una técnica en la que se utilizan endonucleasas de restricción capaces de encontrar blancos específicos en la secuencia del ADN, previamente amplificada, de entre 4 a 6 nucleótidos y cortar en tantos fragmentos como puntos de corte encuentren. Los fragmentos obtenidos se

separan por su tamaño mediante electroforesis en geles de agarosa obteniéndose un patrón de bandas. Para su realización se han utilizado diferentes dianas, como la ITS (*Ribosomal Internal Transcribed Spacer*) (Cupolillo *et al.*, 1995; Schönian *et al.*, 2003; Nasereddin *et al.*, 2008), el mini-exón (Harris *et al.*, 1998), el gen de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Castilho *et al.*, 2003), genes del *gp63* (Victoir *et al.*, 1998), genes del *hsp70* (García *et al.*, 2004, Fraga *et al.*, 2010), genes del citocromo b (Kato *et al.*, 2005) y secuencias del gen ribosómico 7SL (Zelazny *et al.*, 2005). De todas las secuencias, la más utilizada para la detección directa de *Leishmania* spp y también para la identificación de especies en el Viejo Mundo es la ITS-1 (Harms *et al.*, 2003; Al-Jawabreh *et al.*, 2004; Rhajaoui *et al.*, 2007). En este caso, al producto de PCR se le realiza una digestión con el enzima de restricción *HaeIII*, permitiendo distinguir las especies más relevantes de *Leishmania* (Schönian *et al.*, 2003). Esta misma técnica ha sido utilizada con el *hsp70*, demostrando ser muy útil en el tipado de especies sudamericanas, las cuales no pueden ser separadas con la ITS-1 (García *et al.*, 2004; Da Silva *et al.*, 2010).

Para el tipado de especies también se han llevado a cabo PCRs que utilizan cebadores o sondas específicas dirigidos a amplificar una secuencia de ADN específica de una especie en concreto (Salotra *et al.*, 2001; Fisa *et al.*, 2002; Jirkù *et al.*, 2006; Laurent *et al.*, 2009), aunque pueden dar lugar a falsos negativos si no se combinan con otras PCR específicas de género. El análisis por HRM (*High Resolution Melting*) ha sido recientemente desarrollado para el tipado de *Leishmania* spp en el Viejo Mundo, previa qPCR en la secuencia ITS-1 (Talmi-Frank *et al.*, 2010) o en 7SL (Nasereddin y Jaffe, 2010). Esta técnica presenta ventajas, como que se trata de un análisis en tubo cerrado, evitando así contaminaciones; aunque los valores de temperatura de disociación que obtiene están muy próximos entre especies, con el consecuente riesgo de fallos en la interpretación de éstos (Schönian *et al.*, 2011).

El MLST (*Multilocus Sequence Typing*) se basa en el análisis de las secuencias de ADN de múltiples genes diana (Maiden *et al.*, 1998). Esta técnica ha sido utilizada en el estudio de *L. donovani* con 10 dianas distintas (Mauricio *et al.*, 2006; Zemanová *et al.*, 2007), y para *L. Viannia* con 4 dianas (Tsukayama *et al.*, 2009), entre otros; llegando a discriminar tanto a nivel de especie como de cepa. La principal ventaja que presenta es su gran reproducibilidad, haciendo que los resultados puedan ser comparables entre laboratorios, lo que la convierte una buena candidata a convertirse en la técnica de

referencia para el estudio taxonómico y de identificación de *Leishmania* spp, en sustitución del MLEE, en el futuro (Schönian *et al.*, 2008; 2011).

Para el análisis y discriminación de *Leishmania* spp a nivel de cepa también existen diferentes técnicas genotípicas ampliamente utilizadas. Una de ellas es el RAPD (Noyes *et al.*, 1996). Ésta es una técnica rápida y simple aunque poco reproducible, basada en la amplificación al azar de diferentes secuencias del genoma que son separadas posteriormente por electroforesis, obteniendo un patrón de bandas que se usará como perfil genómico. Se requieren cebadores de diez bases poco específicos que se unen a múltiples lugares homólogos, generando un gran número de fragmentos de ADN. El RAPD ha sido utilizado para caracterizar cepas de *L. tropica* en distintos focos como Israel (Jacobson *et al.*, 2003); o para la detección de variaciones intraespecie de *L. donovani* (Hide *et al.*, 2001; Zemanová *et al.*, 2004).

El MLMT (*Multilocus Microsatellite Typing*) se basa en la combinación del análisis de las variaciones de tamaño de entre 14-20 locus de microsatélites para el tipado, a nivel de cepa, en estudios epidemiológicos y poblacionales. Los microsatélites son fragmentos pequeños de nucleótidos, de entre 1 y 6 pares de bases, que están repetidos en tándem y presentan una gran capacidad de mutación, lo que facilita los cambios de longitud de sus alelos siendo detectables desde diferencias de una sola base. A partir del tamaño de los fragmentos analizados se realiza un perfil para cada muestra mediante el cálculo de las distancias génicas. El estudio de MLMT se utiliza en los últimos tiempos para establecer variaciones intraespecíficas y filogenéticas en diferentes organismos. Esta técnica es capaz de detectar polimorfismos en nucleótidos co-dominantes de una manera reproducible y fácilmente comparable entre laboratorios, facilitando el uso de bases de datos compartidas (Schönian *et al.*, 2011). El genoma de *Leishmania* es rico en microsatélites, razón por la que el MLMT resulta una técnica óptima para su estudio y ya ha sido aplicada en la caracterización de *L. donovani* y *L. infantum* (Bulle *et al.*, 2002; Jamjooon *et al.*, 2002; Ochsenreither *et al.*, 2006; Montoya *et al.*, 2007), para *L. major* (Jamjooon *et al.*, 2002; Al-Jawabreh *et al.*, 2008), *L. tropica* (Schwenkenbecher *et al.*, 2006), y las demás especies del Nuevo Mundo (Russell *et al.*, 1999; Rougeron *et al.*, 2008; Oddone *et al.*, 2009). La mayoría de estos estudios han sido dirigidos a la resolución de cuestiones epidemiológicas y poblacionales recomendando una batería de entre 14-20 microsatélites para su análisis (Kuhls *et al.*, 2007; Hide *et al.*, 2013). La mayor diversidad de microsatélites para *L. infantum* se encuentra en el área del

Mediterráneo, que presenta grandes diferencias de cepa incluso dentro de un mismo zimodema (Kuhls *et al.*, 2007; 2008; Cortés *et al.*, 2014). El MLMT ha resultado ser una técnica rápida, muy sensible y también reproducible, permitiendo el uso conjunto de bases de datos entre laboratorios (Kuhls *et al.*, 2007; Schönian *et al.*, 2011; Hide *et al.*, 2013).

Estudios recientes en proteómica están dando resultados muy prometedores en diagnóstico y tipado de *Leishmania* spp mediante la técnica de MALDI-TOF MS (*Matrix-assisted laser desorption ionization–time-of-flight mass spectrometry*), convirtiéndose en una clara tendencia de futuro (Mouri *et al.*, 2014; Cassagne *et al.*, 2014), con los inconvenientes propios de precisar el aislamiento de las cepas.

2. OBJECTIVES

2. OBJECTIVES

Identification of *Leishmania* species is important for selecting a suitable treatment and taking appropriate public health control measures, since each species has its own epidemiological pattern. Furthermore, genetic characterization at the strain level plays an important part in population studies, which are useful for understanding *Leishmania* behavior. For these reasons, it is required fast, accurate and sensitive analytical molecular techniques applicable to the study of *Leishmania* parasite.

The main objectives of our study are focused on developing and applying molecular tools, together with parasitological and serological tests, for diagnosis and epidemiological studies, and are as follows:

- To develop a molecular method based on DNA fluorescent fragment length analysis (PCR-FFL) for the interspecific characterization of *Leishmania*, and to directly assess its utility as a sensitive diagnosis tool in different types of biological samples.
- To study the presence of *Leishmania* in hedgehogs from an endemic area of cutaneous leishmaniasis by serological and molecular methods, and to determine the possible role of hedgehogs as reservoir hosts. The usefulness of PCR-FFL analysis for interspecific characterization of the *Leishmania* species involved has been evaluated.
- To study the intraspecific variability of *L. infantum* in stocks from *Leishmania*/HIV co-infected patients by multilocus microsatellite typing (MLMT) to improve knowledge about genetic diversity and the disease epidemiology in our endemic area.

3. RESULTADOS

3.1. ARTÍCULO 1:

“The use of Fluorescent Fragment Length analysis (PCR-FFL)
in the direct diagnosis and identification of cutaneous
Leishmania species”

**DIAGNÓSTICO DIRECTO E IDENTIFICACIÓN DE LAS ESPÉCIES
CUTÁNEAS DE *LEISHMANIA* MEDIANTE EL ANÁLISIS DEL TAMAÑO DE
LOS FRAGMENTOS FLUORESCENTES (PCR-FFL)**

Miriam Tomás Pérez, Roser Fisa y Cristina Riera

American Journal of Tropical Medicine and Hygiene

88(3), 2013, pp. 586–591

doi:10.4269/ajtmh.12-0402

Factor de impacto: 2,74

RESUMEN

La leishmaniosis es una enfermedad causada por diferentes especies pertenecientes al género *Leishmania*. Ésta presenta diferentes características epidemiológicas y clínicas, y requiere el desarrollo de técnicas rápidas y sensibles para mejorar el diagnóstico específico. En este estudio, hemos comparado la técnica tradicional de reacción en cadena de la polimerasa - polimorfismo en el tamaño de los fragmentos de restricción (PCR-RFLP) con la PCR - análisis del tamaño de los fragmentos fluorescentes (PCR-FFL). Los cebadores marcados fluorescentemente, diseñados sobre el ARN ribosómico correspondiente a las regiones ITS-1 y 7SL, fueron utilizados para amplificar dichos fragmentos, que tras su digestión, se determinó su tamaño utilizando un secuenciador de ADN automatizado. Validamos la técnica utilizando 19 cepas de *Leishmania* de cinco especies cutáneas antes de analizar 36 muestras clínicas: 23 biopsias de piel y 13 papeles de filtro impregnados con exudado de las lesiones. En el diagnóstico real, la PCR-FFL resultó ser rápida, precisa y más sensible (83,3% analizando el fragmento ITS-1 y 94,4% analizando el 7SL) que el análisis mediante PCR-RFLP (75% y 80,6%). Los papeles de filtro mejoraron el diagnóstico específico en ambas técnicas mediante el uso de muestras no invasivas.

The Use of Fluorescent Fragment Length Analysis (PCR-FFL) in the Direct Diagnosis and Identification of Cutaneous *Leishmania* Species

Miriam Tomás-Pérez, Roser Fisa,* and Cristina Riera

Laboratori de Parasitologia, Departament de Microbiologia i Parasitologia Sanitàries, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

Abstract. Leishmaniasis is a disease caused by different species belonging to the genus *Leishmania*. It presents different epidemiological and clinical features and requires the development of rapid, sensitive techniques to improve specific diagnosis. In this study, we compared the traditional technique of polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) with PCR-fluorescent fragment length analysis (PCR-FFL). Fluorescently tagged primers, designed in the rRNA fragment ITS-1 and 7SL region, were used to amplify fragments, which were later digested and whose sizes were accurately determined using an automated DNA sequencer. We validated the technique using 19 *Leishmania* strains from five cutaneous *Leishmania* species before testing 36 clinical samples: 23 skin biopsies and 13 skin scrapings/lesion exudates on filter paper. In real diagnostic, PCR-FFL has proved to be quick, accurate, and more sensitive (83.3% testing the ITS-1 fragment and 94.4% testing the 7SL) than PCR-RFLP analysis (75% and 80.6%). Filter papers improved the specific diagnosis in both techniques using non-invasive samples.

INTRODUCTION

Leishmaniasis is a vector-borne disease caused by a protozoan parasite of the *Leishmania* genus that is transmitted by the bite of species of the *Phlebotomus* genus in the Old World and the *Lutzomyia* genus in the New World. It is endemic in 88 countries across four continents and it has four known forms: cutaneous, diffuse cutaneous, mucocutaneous, and visceral.¹ In Mediterranean countries, the major etiological agents of the cutaneous forms are *Leishmania infantum*, *Leishmania major*, and *Leishmania tropica*.² The presence of multiple *Leishmania* species that cause similar clinical features requires the development of accurate and sensitive techniques for the diagnosis of *Leishmania* infections and for species identification. This is important for the selection of a suitable treatment and appropriate public health control measures, because each species has its own epidemiological pattern.³ Classical laboratory methods such as the examination of skin lesions using smears and cultures and histopathological examinations are specific but they have a low and variable sensitivity.⁴ Methods based on the observation and identification of the amastigote and promastigote forms through morphology do not distinguish different species, therefore other techniques are needed to correctly diagnose the disease. Isoenzyme analysis is the gold standard technique for the characterization and classification of *Leishmania* parasites.⁵ However, this assay is culture dependent, time consuming, and requires the examination of 15 different enzymatic profiles. It is therefore not available in routine diagnosis.⁵ To overcome these problems, DNA-based methods have been widely used for the identification and classification of *Leishmania* spp. with a variety of targets such as protein-coding genes, non-coding segments, microsatellites, and extrachromosomal DNA such as repetitive kinetoplast DNA (kDNA) minicircles.^{5–7} Several polymerase chain reaction (PCR)-methods, such as PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP), DNA sequencing, hybridization probes, high resolution melting analysis, and real-time PCR, are used.⁶

Sequence data of the ribosomal RNA gene, the two highly variable internal transcribed spacer regions (ITS-1 and ITS-2), have been successfully used to resolve taxonomic and phylogenetic affinities among related *Leishmania* species.⁵ The PCR-RFLP of ITS-1 has been used as an alternative to conventional methods for the identification of parasites from clinical samples. It is increasingly used for routine diagnosis because it is simple, sensitive, and does not require cultivation.⁸ More recently, targeting another ribosomal gene, the 7 spliced leader (7SL), has proven to be useful for detecting and identifying leishmanial parasites from samples. A comparative PCR-RFLP assay using ITS-1 and 7SL sequences showed more sensitivity in the 7SL assay, which detected a lower number of parasites in the clinical samples.⁹ However, the possibility of false negative results when applying PCR-RFLP and the time-consuming nature of the nested-PCR that is required to solve it made it necessary to develop faster, more sensitive techniques.^{10,11}

The PCR-fluorescent fragment length analysis (PCR-FFL) is a method for discriminating species by gene size polymorphisms.¹² In previous studies, it has proved to be quick and accurate in the identification and classification of African trypanosomes, and has also been useful with other organisms such as anisakids and seaweeds.^{12–15} Therefore, in the current study we analyzed the ITS-1 and 7SL regions using this technique, first applying it to the identification and classification of the different Old World *Leishmania* species from skin samples. To show the advantages of PCR-FFL, we compared it with the widely used PCR-RFLP method and tested the same PCR products from *Leishmania* strains and clinical skin samples.

MATERIAL AND METHODS

***Leishmania* strains.** The PCR-FFL analysis was validated using 19 *Leishmania* strains belonging to the three cutaneous species of the Old World (*L. infantum*, *L. major*, and *L. tropica*) and the *Leishmania braziliensis* complex from the New World (Table 1). Strains were taken from the *Leishmania* Cryobank at the Universitat de Barcelona and the DNA of five strains was kindly donated by Dr. M. Hide, MIVEGEC, Montpellier, France and Dr. L. García, Centro Universitario de Medicina Tropical, Cochabamba, Bolivia.

* Address correspondence to Roser Fisa, Laboratori de Parasitologia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Avda. Joan XXIII sn, 08028 Barcelona, Spain. E-mail: rfisa@ub.edu

TABLE 1
Control strains examined

Species	Control strains
<i>Leishmania infantum</i>	MCRI/ES/2002/BCN-503
	MHOM/ES/2007/BCN-741
	MHOM/ES/2007/BCN-742
	MHOM/ES/2007/BCN-763
	MHOM/ES/2008/BCN-779
<i>Leishmania major</i>	MHOM/ES/2010/BCN-815
	MHOM/ES/2006/BCN-876
	MHOM/ES/2007/BCN-750
	MHOM/OO/2008/BCN-766
	MHOM/ES/2010/BCN-822
	MHOM/ES/2011/BCN-827
	MHOM/IL/81/FRIEDLIN
<i>Leishmania tropica</i>	MHOM/SU/73/5ASKH
	MHOM/ES/2010/BCN-809
<i>Leishmania braziliensis</i>	MHOM/SU/74/K27
	MHOM/BR/86/BCN-19
<i>Leishmania guyanensis</i>	MHOM/BR/75/M-2901
	MHOM/BO/09/CUM1000
	MHOM/PE/91/LC1447

Patient and sample collection. Twenty-three skin biopsies and 13 skin scrapings or lesion impressions on filter papers (Whatman 3M, Whatman International Ltd., Maidstone, England) were obtained from 36 patients with cutaneous leishmaniasis who were attending different dermatologist services in hospitals in Barcelona and Majorca. The criteria used to confirm cutaneous leishmaniasis and include subjects in the study were microscopic and/or *Leishmania* spp. DNA detection by highly sensitive real-time PCR.¹⁶ We examined 28 skin samples (including all 13 filter papers) from patients from the local endemic area, six patients from other Mediterranean-endemic areas (Morocco, Israel, and Jordan) and two from Mauritania, or people who had traveled to those areas.

Ethical considerations. The ethics committee of each participating center approved the study. All patients gave their written informed consent to participate in the study.

Statistical analysis. Between-test agreement was determined by the concordance coefficient, measured by Cohen's kappa statistic ($k > 0.75$ substantial agreement; $k = 0.4-0.75$, fair to good agreement; $k < 0.40$, poor agreement).

DNA extractions. With control strains, the DNA was extracted from cultured parasites using a chelex resin protocol: 100 μ L of sterile water and 400 μ L of chelex solution [1% Tween 20 (Panreac Química S.A. Barcelona, Spain), 1% Nonidet P-40 (Amresco, Solon, OH), and 20% of chelex 100 resin (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)] were added to the promastigote sediment. It was heated at 100°C for 20 min and then vortexed. Finally, the mixture was centrifuged for 10 min at 12,000 $\times g$ to separate the resin from the supernatant, which contains the genomic DNA that was used as template for the PCR.

For the skin samples, DNA was extracted from 25–50 mg of tissue lesion or one filter paper 6 mm in diameter by isolating the nucleic acids using the mammalian tissue protocol of the High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Applied Science, Mannheim, Germany), in accordance with the manufacturer's instructions.

PCR amplification. For the identification and diagnosis of the *Leishmania* species, we amplified the ribosomal ITS-1 region with the previously described primers LITSR (5'-CTGGATCATTTTCCGATG-3') and L5.8S (5'-TGATACC ACTTATCGCACTT-3'),¹¹ which were fluorescently labeled

with blue and green fluorochromes (6-FAM and VIC), respectively (Applied Biosystems, Warrington, Cheshire, UK). For the 7SL region, we used the primers TRY7SL.For1 (5'-TGCT CTGTAACCTTCGGGGGCT-3') and TRY7SL.Rev1 (5'-GG CTGCTCCGTYNCCGGCCTGACCC-3').^{17,9} These primers were also fluorescently labeled with the same fluorochromes (6-FAM and VIC), respectively (Applied Biosystems).

Amplification reactions were performed in volumes of 50 μ L containing 5 μ L of 10X buffer (BIOTAQ DNA Polymerase, Bionline, London, UK), 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, 0.2 μ M of each primer and 1.5 units of *Taq* polymerase (BIOTAQ DNA Polymerase, Bionline, London, UK). We added 3 μ L of isolated DNA to the mixture and incubated it in the thermal cycler (MJ Research PTC-200 DNA Engine, Alameda, CA) under the following conditions: for the ITS-1 PCR, we started with a denaturing step at 95°C for 2 min, followed by 35 cycles of denaturing for 20 sec at 95°C, annealing for 30 sec at 53°C, and extension for 1 min at 72°C, followed by a final extension at 72°C for 1 h. For the 7SL PCR, the denaturing step lasted for 5 min at 95°C, followed by 35 cycles of denaturing for 20 sec at 95°C, annealing for 30 sec at 65°C, and extension for 1 min at 72°C. The final extension consisted of 10 min at 72°C. Previously, the optimal primer annealing temperatures (*T_a*) for both programs were experimentally determined using the temperature gradient program of the thermal cycler. The concentrations of MgCl₂ and the primers were also previously tested to achieve better conditions for the PCR.

PCR-FFL analysis of amplified ITS-1 and 7SL sequences.

The PCR products were digested with the restriction enzyme *BsuRI* (*HaeIII*) (Fermentas, Life Sciences, Germany, EU) without prior purification, in accordance with the manufacturer's recommendations. Digestion products were pooled with the internal lane size standard GeneScan-500 LIZ (Applied Biosystems, Warrington, UK) for the analysis on the DNA sequencer ABI Prism 3730 (Applied Biosystems). Fragment sizes were determined using the fragment analysis program Peak Scanner Software v1.0 (Applied Biosystems).

PCR-RFLP analysis of amplified ITS-1 and 7SL sequences.

The PCR products, previously digested with the restriction enzyme *BsuRI* (*HaeIII*), were separated by electrophoresis in 3% wide-range agarose (Sigma) at 150 V in SGTB 1X buffer (GRISP LDA, Research Solutions, Porto, Portugal). A solution of SYBR safe DNA gel stain (Invitrogen Ltd. Paisley, UK) was used to visualize the separated DNA fragments under UV light. This system was performed in parallel with the same strains and samples we used in the PCR-FFL analysis, which made it possible to compare the two methods.

RESULTS

Validation of PCR-FFL using control strains. Initially, we tested PCR-FFL using control DNAs in parallel with the commonly used PCR-RFLP analysis; in both cases, previous digestion with the restriction enzyme *BsuRI* (*HaeIII*) was required.

For the ITS-1 PCR, all isolates examined with capillary electrophoresis gave two different peaks (Figure 1). Only from the position of these peaks, the method detected and identified the Old World *Leishmania* species without any overlap between them, giving reproducible results and a small degree of intraspecific variation (Table 2). The *L. braziliensis* complex was clearly distinguishable from the Old World species studied.

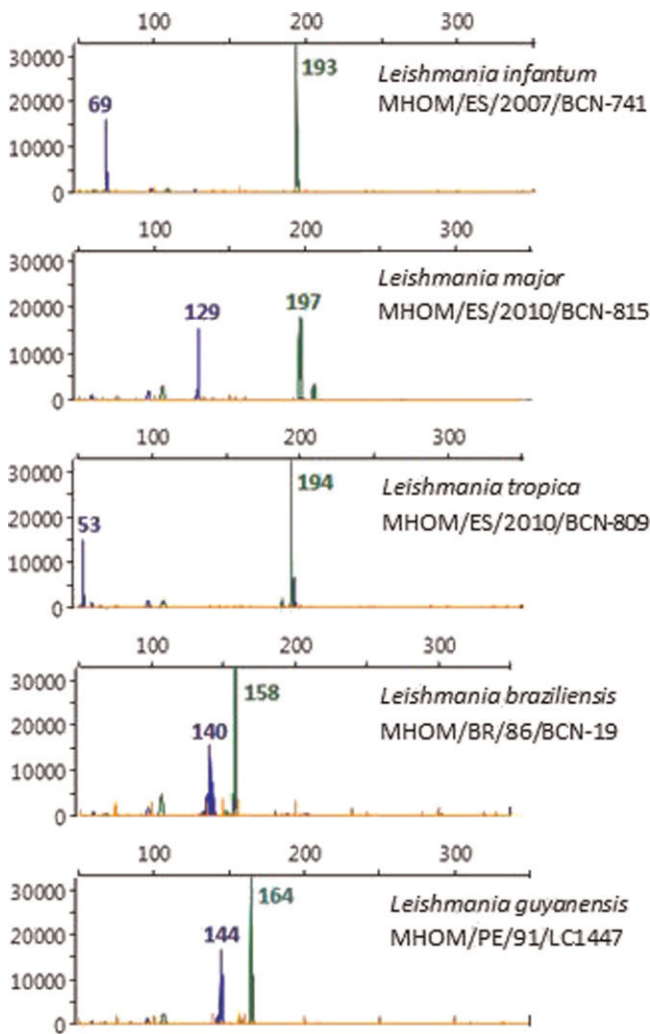


FIGURE 1. Example ITS-1 electropherograms of different *Leishmania* spp. reference strains.

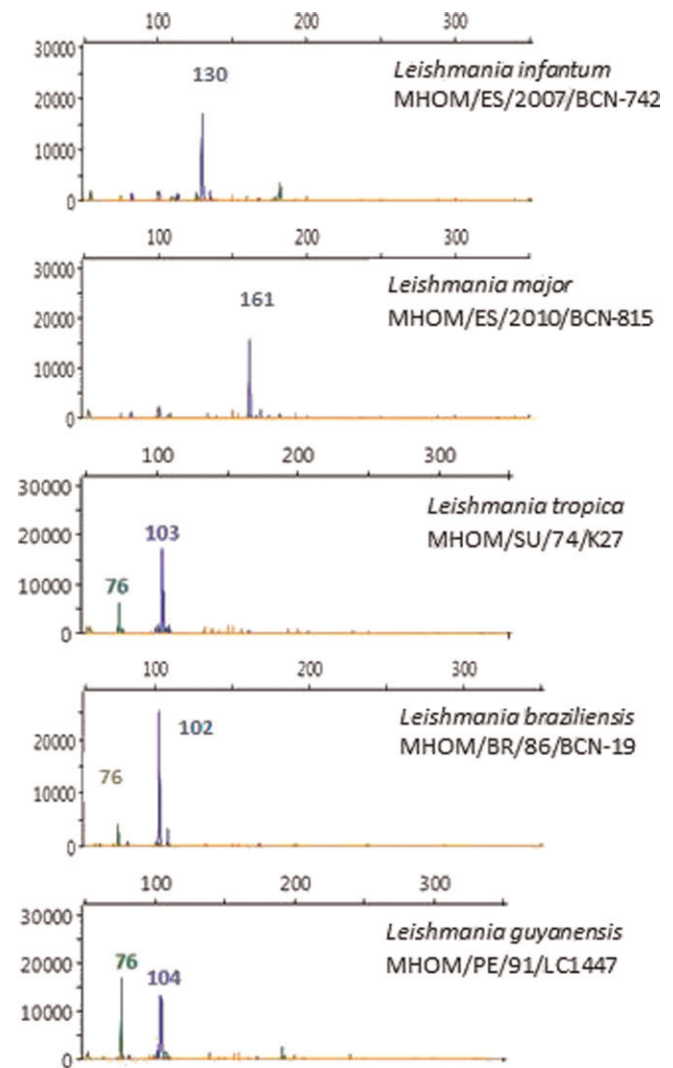


FIGURE 2. Example 7SL electropherograms of different *Leishmania* spp. reference strains.

The 7SL PCR gave one peak in the capillary electrophoresis, corresponding to the fluorescent labeled primer TRY7SL. For1, for *L. infantum* and *L. major*. Two fragments were visible on the *L. braziliensis* complex species and *L. tropica* (Figure 2). From the position of these peaks, the method detected and identified the Old World *Leishmania* species without any overlap between them, with a small degree of intraspecific variation (Table 2). The *L. braziliensis* complex

TABLE 2

Experimental ITS-1 and 7SL fragment length base pair (bp) profiles obtained by PCR-FFL from the 19 *Leishmania* control strains studied*

Species	ITS-1 fragment (bp)		7SL fragment (bp)	
	LitSR-FAM	Lit5.8S-VIC	TRY7SL.For1-FAM	TRY7SL.Rev1-VIC
<i>L. infantum</i> (5)	68–69	186–193	129–134	ND
<i>L. major</i> (8)	129–136	196–205	160–168	ND
<i>L. tropica</i> (2)	53–54	185–193	103–109	76
<i>L. braziliensis</i> (3)	134–140	157–164	102–104	76
<i>L. guyanensis</i> (1)	144	164	104	76

*PCR-FFL = polymerase chain reaction- fluorescent fragment length; () = number of *Leishmania* strains analyzed; ND = not detected.

species could not be distinguished from *L. tropica* because the peak position obtained for both was the same.

Analysis of biological samples by PCR-FFL. The 36 clinical samples were tested in triplicate, with a week of difference between the analyses, by PCR-FFL with ITS-1 and 7SL sequences obtaining a reproducibility of 98.6%. With the ITS-1 sequence, the analysis was positive for 30 of the samples, with three different patterns corresponding to *L. infantum*, *L. tropica*, and *L. major* having a product length variation within that previously observed in the analysis of the control strains (*L. infantum* 68–69, 186–193; *L. major* 129–135, 196–205; *L. tropica* 53, 185–187). When we analyzed the 7SL region, we obtained 34 positives, with three different patterns corresponding to *L. infantum*, *L. tropica*, and *L. major* and the fragment lengths within those previously predicted (*L. infantum* 129–134; *L. major* 160–168; *L. tropica* 103–108, 76). Between the samples, we analyzed 13 filter papers and obtained 12 positives for both sequences tested (ITS-1 and 7SL) (Table 3).

PCR-RFLP analysis and comparison with the PCR-FFL system. The PCR-RFLP method is the most widely used assay for the identification of *Leishmania* species. We tested it in

TABLE 3

Leishmania species identified by PCR-FFL (ITS-1 and 7SL sequences) from 36 CL patients biological samples*

Species	Biopsies (23)		Filter paper† (13)	
	ITS-1	7SL	ITS-1	7SL
<i>L. infantum</i>	11	14	12	12
<i>L. major</i>	5	5	–	–
<i>L. tropica</i>	2	3	–	–
NI	5	1	1	1

*PCR-FFL = polymerase chain reaction-fluorescent fragment length; ITS-1 = internal transcribed spacer region; 7SL = 7 spliced leader; CL = cutaneous leishmaniasis; NI = non-identified.

†Scraping or lesion impression on filter paper.

parallel with PCR-FFL for the ITS-1 and 7SL regions after digestion with the restriction enzyme *BsuRI* (*HaeIII*). As a result, we found the same speciation results for the two analysis systems in both sequences studied. The 19 control strains were identified in all tests. However, in real diagnosis situations, PCR-FFL was more sensitive (83.3% when testing the ITS-1 fragment and 94.4% when testing the 7SL sequence, versus 75% and 80.6% with PCR-RFLP, respectively). The 7SL fragment sensitivities for PCR-FFL were higher than 7SL PCR-RFLP (fair agreement $k = 0.392$), although the ITS-1 fragment sensitivities by PCR-FFL were higher than PCR-RFLP but not significantly (good agreement $k = 0.750$). These differences were clearly observed with the skin biopsies in the 7SL sequence (82.6% in PCR-RFLP and 95.7% with PCR-FFL, fair agreement $k = 0.355$) but not in the ITS-1 sequence (73.9% in PCR-RFLP and 78.3% with PCR-FFL, very good agreement $k = 0.881$). However, filter paper PCR-FFL was more sensitive (92.3% in ITS-1 and 7SL) than the PCR-RFLP (76.9% for ITS-1 and 7SL) in both techniques (moderate agreement $k = 0.435$) (Table 4).

DISCUSSION

Molecular techniques using PCR technology are useful for the identification and classification of *Leishmania* species found in human skin samples. The ITS-1 region, lying between the genes coding for the 18S and the 5.8S rRNA, allows classification of the parasites studied because of the differences in interspecific sequences and the low level of intraspecific variation.¹⁸ This region does not encode any product and has less impact on organism viability, which permits it to evolve at a faster rate than the ribosomal coding regions.¹⁹ Recently, the evaluation of the 7SL rRNA gene for the identification of *Leishmania* spp. has produced satisfactory results.^{20,21} Its advantages include being very abundant in cells; having a sequence that is not particularly similar to the mammalian

7SL, although they have the same secondary structure; and having a divergent central domain flanked by other conserved domains.^{22,23} These characteristics make both rRNA fragments useful as genetic markers because of the length polymorphism and the nucleotide differences among species.

The PCR-RFLP method has been widely used because it is simple and cheaper than other techniques such as sequencing, making it useful for routine analysis.²⁴ The digestion of the PCR product with the restriction enzyme *BsuRI* (*HaeIII*) makes it possible to identify the most clinically important species by their RFLP patterns.¹¹ However, the problems encountered in the identification of some species and the false negative results with a sensitivity rate of about 85%¹⁰ led to the development of a nested PCR to increase sensitivity, but this is more time consuming and has greater potential for contamination.¹²

The study described here compares PCR-RFLP with the new PCR-FFL technique using both rRNA fragments described, ITS-1 and 7SL, for the identification and classification of the *Leishmania* species. The prior use of control strains as standards makes subsequent diagnosis in real skin samples (biopsies and filter papers) possible by comparing the combination of fragment sizes obtained. When we tested ITS-1, all control strains were positive with both techniques, and two different peaks were obtained for each fluorescent-labeled primer in the PCR-FFL technique. The new method differentiated the Old World *Leishmania* species without overlap between them, but the New World species (*L. braziliensis* complex) could not be distinguished from each other, as occurs in PCR-RFLP analysis. In the 7SL analysis, the results were also satisfactory, with 19 positives, and only one peak that differentiated the Old World species without overlap between them. Previous studies indicated that 7SL assay cannot be used to distinguish between *L. donovani* and *L. infantum*.¹⁷ When we tested the New World species, we obtained two different peaks. However, as with the ITS-1 fragment and PCR-RFLP technique, they could not be differentiated from each other or from the Old World species *L. tropica*. In prior studies with the 7SL sequence, *L. tropica* could not be differentiated from *Leishmania aethiopica*.^{9,17} In this respect, the ITS-1 has the advantage of being more specific and could be more useful for identifying species.

The experimental PCR product lengths of the control strains, which were accurately determined using an automated DNA sequencer, showed a small degree of intraspecific variation in both the sequences studied (7SL and ITS-1). This may have been caused by the secondary structure or differences in the base composition of the DNA, both of which could affect mobility in the chromatography process.²⁵ In the ITS-1 region studied, there are two known microsatellites that affect the sequence

TABLE 4

Comparison of PCR-RFLP and PCR-FFL techniques applied on the ITS-1 and 7SL sequences for the identification of the 36 CL biological samples (23 skin biopsies and 13 filter papers)

	PCR-RFLP		PCR-FFL	
	ITS-1	7SL	ITS-1	7SL
CL skin biopsies	17/23 (73.9%)	19/23 (82.6%)	18/23 (78.3%)	22/23 (95.7%)
95% CI	53.2–87.7	62.3–93.6	57.7–90.8	77.3–99.9
CL filter papers	10/13 (76.9%)	10/13 (76.9%)	12/13 (92.3%)	12/13 (92.3%)
95% CI	49.1–92.5	49.1–92.5	64.6–99.9	64.6–99.9
TOTAL	27/36 (75%)	29/36 (80.6%)	30/36 (83.3%)	34/36 (94.4%)
95% CI	58.7–86.4	64.7–90.6	67.7–92.5	80.9–99.4

PCR-RFLP = polymerase chain reaction-restriction fragment polymorphism; PCR-FFL = polymerase chain reaction-fluorescent fragment length; ITS-1 = internal transcribed spacer region; 7SL = 7 spliced leader; CL = cutaneous leishmaniasis; CI = confidence interval.

length of the DNA and are also a typical cause of variation in the results of the PCR-FFL technique.⁷ Despite all these possible differences, the results obtained were reproducible.

The two techniques used and the rRNA sequences tested in the analysis of the 36 skin samples presented differences. The ITS-1 gave 27 positive results with the PCR-RFLP method, which obtained 75% sensitivity, compared with 30 positives and 83.3% sensitivity obtained with the PCR-FFL test. This lower sensitivity with the PCR-RFLP technique shows the problem with false negative results observed before with some PCR methods used to analyze clinical samples,⁹ however it is possible to reduce them using PCR-FFL because it increased the number of positive samples in this study. The 7SL analysis gave 29 positives and 80.6% sensitivity with PCR-RFLP and 34 positive samples and 94.4% sensitivity with PCR-FFL. Again, this shows how the PCR-FFL test increases sensitivity obtaining better results with the 7SL sequence, which is in agreement with previous studies of the application of PCR techniques to the 7SL fragment and how it provides better results than the ITS-1 sequence.^{20,21} Additionally, in both sequences, the PCR-FFL showed a small degree of intraspecific variation in the fragment length, which was probably caused by the previously mentioned factors and could be useful for genotyping different lineages in epidemiological studies. This characteristic does not pose a problem for the classification of the *Leishmania* species because of the high level of interspecific variation.

Skin scrapings and aspirates on filter papers are non-invasive clinical specimens and their sensitivity and specificity are similar to the invasive-specimen PCR used in prior studies.²⁶ They offer some advantages over biopsy techniques, including easy transportation from hospitals to diagnostic laboratories and the possibility of storing them for years when frozen and months when kept at room temperature.¹¹ In addition, filter papers are more likely to be favored by patients and clinics because they represent a non-invasive technique for collecting samples. When used in this study, filter papers also resulted in higher sensitivity in PCR-FFL than in PCR-RFLP for both the sequences studied (7SL and ITS-1). This shows how the use of filter papers benefits the analysis, because both methods achieved good, comparable results with both sequences.

In conclusion, PCR-FFL is a simple, quick, and sensitive method based on the amplification of small regions of DNA and fluorescence detection without prior use of *Leishmania* culturing. Using a single pair of primers, it identifies the *Leishmania* species and gives different profiles for each one with a high level of accuracy. The method is easy to standardize, presents a high reproducibility, and can handle a high throughput of samples, typically producing 96 results within 24 hours. Furthermore, the application of this technique on the 7SL ribosomal sequence allowed us to obtain a sensitivity of 94% in the diagnosis of different kinds of skin samples, compared with 83% obtained with ITS-1 using the same analysis method. This makes PCR-FFL on the 7SL sequence the best combination for the diagnosis and identification of *Leishmania* species.

Received June 28, 2012. Accepted for publication October 9, 2012.

Published online February 4, 2013.

Acknowledgments: We thank Dr. Hide (MIVEGEC, Montpellier, France) and Dr. García (Centro Universitario de Medicina Tropical, Cochabamba, Bolivia) for providing several of the DNA *Leishmania*

strains used as the control in this study. We also thank the different dermatology and microbiology services in the following hospitals for their collaboration: Hospital Clínic, Hospital Vall d'Hebron and Hospital de la Santa Creu i Sant Pau in Barcelona, and Hospital de Manacor in Majorca. Finally, we thank the Unitat de Genòmica de the CCiTUB (Parc Científic, Universitat de Barcelona) for their collaboration.

Authors' addresses: Míriam Tomás-Pérez, Roser Fisa, and Cristina Riera, Universitat de Barcelona, Facultat de Farmàcia – Parasitologia, Barcelona, Spain, E-mails: noymah@hotmail.com, rfisa@ub.edu, and mcriteria@ub.edu.

REFERENCES

- Desjeux P, 2004. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 27: 305–318.
- Ashford RW, 2000. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int J Parasitol* 30: 1269–1281.
- Pratlong F, Rioux JA, Marty P, Faraut-Gambarelli F, Dereure J, Lanotte G, Dedet JP, 2004. Isoenzymatic analysis of 712 strains of *Leishmania infantum* in the south of France and relationship of enzymatic polymorphism to clinical and epidemiological features. *J Clin Microbiol* 42: 4077–4082.
- Bensoussan E, Nasereddin A, Jonas F, Schnur LF, Jaffe CL, 2006. Comparison of PCR assays for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *J Clin Microbiol* 44: 1435–1439.
- 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.
- Schönian G, Kuhls K, Mauricio IL, 2011. Molecular approaches for a better understanding of the epidemiology and population genetics of *Leishmania*. *Parasitology* 138: 405–425.
- El Tai NO, El Fari M, Mauricio I, Miles MA, Oskam L, El Safi SH, Presber WH, Schönian G, 2001. *Leishmania donovani*: intraspecific polymorphisms of Sudanese isolates revealed by PCR-based analyses and DNA sequencing. *Exp Parasitol* 97: 35–44.
- Abda IB, De Monbrison F, Bousslimi N, Aoun K, Bouratbine A, Picot S, 2011. Advantages and limits of real-time PCR assay and PCR-restriction fragment length polymorphism for the identification of cutaneous *Leishmania* species in Tunisia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 105: 17–22.
- Azmi K, Nasereddin A, Eraqat S, Schönian G, Abdeen Z, 2010. Identification of Old World *Leishmania* species by PCR-RFLP of the 7 spliced leader RNA gene and reverse dot blot assay. *Trop Med Int Health* 15: 872–880.
- Hajjaran H, Vasigheh F, Mohebbi M, Rezaei S, Mamishi S, Charedar S, 2011. Direct diagnosis of *Leishmania* species on serosity materials punctured from cutaneous leishmaniasis patients using PCR-RFLP. *J Clin Lab Anal* 25: 20–24.
- Schönian G, Nasereddin A, Dinse N, Schweynoch C, Schallig HD, Presber W, Jaffe CL, 2003. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagn Microbiol Infect Dis* 47: 349–358.
- Hamilton PB, Adams ER, Malele II, Gibson WC, 2008. A novel, high-throughput technique for species identification reveals a new species of tsetse-transmitted trypanosome related to the *Trypanosoma brucei* subgenus, *Trypanozoon*. *Infect Genet Evol* 8: 26–33.
- Adams E, Hamilton PB, Malele I, Gibson WC, 2008. The identification, diversity and prevalence of trypanosomes in field caught tsetse in Tanzania using ITS-1 primers and fluorescent fragment length barcoding. *Infect Genet Evol* 8: 439–444.
- Espiñeira M, Herrero B, Vieites JM, Santaclara FJ, 2010. Detection and identification of anisakids in seafood by fragment length polymorphism analysis and PCR-RFLP of ITS-1 region. *Food Contr* 21: 1051–1060.
- Herrero B, Madriñán M, Vieites JM, Espiñeira M, 2010. Rapid identification of seaweeds in food products by PCR combined with ALF-RFLP and FINS methodologies. *J Agric Food Chem* 58: 11586–11592.
- Martín-Ezquerro G, Fisa R, Riera C, Rocamora V, Fernández-Casado A, Barranco C, Serra T, Baró T, Pujol RM, 2009. Role of *Leishmania* spp. infestation in non-diagnostic

- cutaneous granulomatous lesions: report of a series of patients from a western Mediterranean area. *Br J Dermatol* 161: 320–325.
17. Zelazny AM, Fedorko DP, Li L, Neva FA, Fischer SH, 2005. Evaluation of 7SL RNA gene sequences for the identification of *Leishmania* spp. *Am J Trop Med Hyg* 72: 415–420.
 18. D'Amelio S, Mathiopoulos KD, Santos CP, Pugachev ON, Webb SC, Picanco M, 2000. Genetic markers in ribosomal DNA for the identification of members of the genus *Anisakis* (Nematoda: Ascaridoidea) defined by polymerase chain reaction-based restriction fragment length polymorphism. *Int J Parasitol* 30: 223–226.
 19. Umehara A, Kawakami Y, Matsumi T, Araki J, Uchida A, 2006. Molecular identification of *Anisakis simplex sensu stricto* and *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae) from fish and cetacean in Japanese waters. *Parasitol Int* 55: 267–271.
 20. Azmi K, Nasereddin A, Ereqat S, Schnur L, Schönian G, Abdeen Z, 2011. Methods incorporating a polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism and their use as a 'gold standard' in diagnosing Old World cutaneous leishmaniasis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 71: 151–155.
 21. Nasereddin A, Jaffe CL, 2010. Rapid diagnosis of Old World leishmaniasis by high-resolution melting analysis of the 7SL RNA gene. *J Clin Microbiol* 48: 2240–2242.
 22. Michaeli S, Podell D, Agabian N, Ullu E, 1992. The 7SL RNA homologue of *Trypanosoma brucei* is closely related to mammalian 7SL RNA. *Mol Biochem Parasitol* 51: 55–64.
 23. Ben-Shlomo H, Levitan A, Shay NE, Goncharov I, Michaeli S, 1999. RNA editing associated with the generation of two distinct conformations of the trypanosomatid *Leptomonas collosoma* 7SL RNA. *J Biol Chem* 274: 25642–25650.
 24. Meyer R, Hoffelein C, Candrian U, 1995. Polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism analysis: a simple method for species identification in food. *JAOAC Int* 78: 1542–1551.
 25. Saitoh H, Ueda S, Kurosaki K, Kiuchi M, 1998. The different mobility of complementary strands depends on the proportion AC/GT. *Forensic Sci Int* 91: 81–90.
 26. Boggild AK, Ramos AP, Valencia BM, Veland N, Calderon F, Arevalo J, Low DE, Llanos-Cuentas A, 2011. Diagnostic performance of filter paper lesion impression PCR for secondarily infected ulcers and nonulcerative lesions caused by cutaneous leishmaniasis. *Am Soc Microbiol* 49: 1097–1100.

3.2. ARTÍCULO 2:

“First report of natural infection in hedgehogs with
Leishmania major, a possible reservoir of zoonotic cutaneous
leishmaniasis in Algeria”

**PRIMERA CITA SOBRE INFECCIÓN NATURAL DE ERIZOS
CON *LEISHMANIA MAJOR*, UN POSIBLE RESERVORIO DE
LEISHMANIOSIS CUTÁNEA ZONÓTICA EN ARGELIA**

**Míriam Tomás Pérez, Mourad Khaldi, Cristina Riera, Denis Mozo-León,
Alexis Ribas, Mallorie Hide, Ghania Barech, Meryam Benyettou,
Kamel Seghiri, Souad Doudou y Roser Fisa**

Acta Tropica

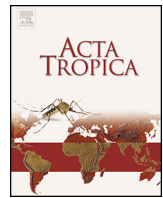
2014 Jul; 135: 44-49

doi:10.1016/j.actatropica.2014.03.018

Factor de impacto: 2,52

RESUMEN

Esta es la primera cita sobre casos conocidos de infección natural de erizos con *Leishmania major*. La leishmaniosis cutánea es un problema importante de salud pública en el área de M'sila, una provincia semi-árida situada al norte del Sahara en Argelia, donde habitan dos especies de erizos, *Atelerix algirus* y *Paraechinus aethiopicus*. El objetivo de este estudio fue investigar la infección por *Leishmania* en estos erizos y evaluar si se tratan de reservorios de *Leishmania* en un foco endémico zoonótico de leishmaniosis. Se utilizaron métodos serológicos y moleculares para determinar la presencia de *Leishmania* en 24 erizos atrapados e identificados a nivel de especie como 19 *A. algirus* y 5 *P. aethiopicus*. Se detectaron anticuerpos específicos anti-*Leishmania* en un 29,2% de los individuos por Western blot y un 26,3% mediante ELISA. La PCR a tiempo real realizada sobre muestras de bazo, oreja y sangre detectó ADN de *Leishmania* spp. en un 12,5% de los individuos, un *A. algirus* y dos *P. aethiopicus*. Se encontraron parasitadas tres muestras de piel y dos de bazo de estos animales, que fueron identificadas mediante técnicas moleculares como *L. major*. Considerando nuestros resultados, sugerimos que los erizos presentan un potencial papel epidemiológico como reservorios de *L. major*.



First report of natural infection in hedgehogs with *Leishmania major*, a possible reservoir of zoonotic cutaneous leishmaniasis in Algeria



Míriam Tomás-Pérez^{a,1}, Mourad Khaldi^{b,c,1}, Cristina Riera^a, Denis Mozo-León^a, Alexis Ribas^{a,d}, Mallorie Hide^e, Ghania Barech^{b,c}, Meryam Benyettou^b, Kamel Seghiri^b, Souad Doudou^b, Roser Fisa^{a,*}

^a Laboratori de Parasitologia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Avda. Joan XXIII s/n, 08028 Barcelona, Spain

^b Laboratoire d'Écologie, Département des Sciences de la Nature et de la Vie, Faculté des Sciences, Pôle Universitaire de M'sila, 28000, Algeria

^c Département de Zoologie Agricole et Forestière, Ecole Nationale Supérieure Agronomique, El-Harrach, Algeria

^d Biodiversity Research Group, Faculty of Science, Udon Thani Rajabhat University, Udon Thani 41000 Thailand

^e Laboratoire MIVEGEC (UMR IRD 224-CNRS 5290-Université Montpellier 1), Montpellier, F-34394, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 December 2013

Received in revised form 13 March 2014

Accepted 17 March 2014

Available online 31 March 2014

Keywords:

Leishmania major

Hedgehogs

Reservoir host

Algeria

Serology

qPCR

Molecular analysis

ABSTRACT

We report here the first known cases of natural infection of hedgehogs with *Leishmania major*. Cutaneous leishmaniasis is an important public health problem in the area of M'sila, a semi-arid province in Algeria's northern Sahara, where two species of hedgehog live, *Aterix algirus* and *Paraechinus aethiopicus*. The aim of this research was to survey *Leishmania* infection in these hedgehogs and evaluate whether they were reservoir hosts of *Leishmania* in an endemic zoonotic focus of leishmaniasis. Serological and molecular methods were used to determine the presence of *Leishmania* in 24 hedgehogs caught directly by hand and identified at species level as 19 *A. algirus* and 5 *P. aethiopicus*. Specific anti-*Leishmania* antibodies were detected in 29.2% of individuals by Western blot and in 26.3% by ELISA. The real-time PCR performed in spleen, ear and blood samples detected *Leishmania* spp. DNA in 12.5% of the individuals, one *A. algirus* and two *P. aethiopicus*. Three skin and two spleen samples of these animals were found to be parasitized and were identified by molecular test as *L. major*. Considering our results, it is suggested that hedgehogs have a potential epidemiological role as reservoir hosts of *L. major*.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Leishmaniasis is one of the parasitic diseases frequent in the Mediterranean Basin. In Algeria they are the main parasitic disease, accounting for 35% of diseases with compulsory notification. This is one of the countries most affected by cutaneous leishmaniasis (CL), with 54,145 cases reported between 2000 and 2005 (Ahour Barchiche and Madiou, 2009). CL in Algeria, known to be endemic since the beginning of the century (Lemaire et al., 1913), are caused by *Leishmania infantum*, *Leishmania tropica*, *Leishmania major* and a *Leishmania* close to *Leishmania killicki* (Harrat et al., 1996; Benikhlef et al., 2004; Mihoubi et al., 2008; Harrat et al., 2009). In the steppe areas of the center and south of the country (northern Sahara), zoonotic cutaneous leishmaniasis (ZCL), caused by the *L. major* zymodeme MON-25, is endemo-epidemic (Harrat et al., 1996). It

is transmitted by *Phlebotomus papatasi* (Izri et al., 1992), with the rodents *Psammomys obesus* and *Meriones shawi* the main reservoir hosts identified (Belazzoug, 1983, 1986). This same author found *L. major* in ear margin lesions of *P. obesus* in 1983. Sporadic CL caused by *L. infantum* occurs on the northern coastline of the country (Benikhlef et al., 2004), with *Ph. perfiliewi* as vector (Izri and Belazzoug, 1993) and dogs involved as reservoir host (Benikhlef et al., 2004). A few cases caused by *L. tropica* have been related in the northern region of Constantine (Mihoubi et al., 2008). The study of an epidemic outbreak in an emergent focus in Ghardaïa (south Algeria) indicated the presence of a new dermatropic *Leishmania* close to *L. killicki*, which coexists sympatrically with *L. major* MON-25 (Harrat et al., 2009; Boubidi et al., 2011). It has been suggested that it is a zoonotic disease, with *Ph. sergenti* sand flies acting as vectors and the rodent *Ctenodactylus gundi* as reservoirs (Boubidi et al., 2011). Studies in Tunisia detected *L. killicki* in the rodent *C. gundi* by direct examination and PCR analysis, which was the first evidence of the potential role of this wild rodent as natural host of this parasite and of the involvement of *L. killicki* in CL cases in this area (Jaouadi et al., 2011).

* Corresponding author. Tel.: +34 934024502; fax: +34 934024504.

E-mail address: rfisa@ub.edu (R. Fisa).

¹ These authors have contributed equally to the study.

Two mammal species, the North African hedgehog, *Atelerix algirus*, and the desert hedgehog, *Paraechinus aethiopicus*, members of the Erinaceidae family, Erinaceomorpha order, are widely distributed and have a seemingly stable population in North Africa, particularly in the ZCL endemic area of the M'sila region (Khaldi et al., 2012a,b). M'sila is an arid province in the northern Sahara desert that is an important focus of *L. major*, with peaks of annual incidence higher than 500 per 100,000 inhabitants (REM, 2003, 2009). Here, the worst outbreak of leishmaniasis in Algeria was reported since the historic outbreak in the Biskra region (Belazzoug, 1982). To our knowledge, there are no serological and molecular studies identifying these mammals as reservoir hosts of *Leishmania*. However, in the 1970s, the possible *Leishmania* reservoir role of hedgehogs was posed in research from the ex-USSR that had cited as a natural host of *Leishmania* the long-eared hedgehog (*Hemiechinus albulus major*), along with other small mammals (Petrisceva, 1971; Faizulin et al., 1975). Recently, *Leishmania* DNA has been detected in hair of one hedgehog (*Erinaceus europaeus*) studied in Spain (Muñoz-Madrid et al., 2013), but no other reports of hedgehogs as natural reservoir hosts of *Leishmania* are cited.

Due to the unknown role of these mammals as possible reservoirs of *Leishmania*, the aim of this research was to determine the presence of *Leishmania* in two species of hedgehog (*A. algirus* and *P. aethiopicus*) from the M'sila region (Algeria) and to study whether they were a wild reservoir in an endemic zoonotic focus of leishmaniasis. *Leishmania* infection was determined by serological and molecular methods and the research was completed with the identification of the *Leishmania* species by molecular tests.

2. Material and methods

2.1. Area and time of study

This study was conducted during the period April–September 2009 at 16 sampling sites (Fig. 1) in the area around Hodna (M'sila) (35°40'00"N, 4°31'00"E). The watershed Hodna has an area of 26,000 km² and is the fifth largest basin in Algeria. It is an open steppe area surrounded by mountains that contain various habitats (Hasbaia et al., 2012). The mean annual rainfall varied according to altitude between 370 mm in the higher mountains and 150 mm lower down and to the south of the salt lake of Hodna (Chott of Hodna), characterized by an upper arid climate with a mean annual temperature of 18 °C and cool winters.

2.2. Sampling of hedgehogs

The wild individuals were caught directly by hand with the aid of spotlights during walks at night, achievable due to these species' nocturnal activity, or retrieved as fresh road-kills. Later, they were weighed, measured and sexed; each individual was surveyed for the presence of skin lesions. The identification of species level was done in the Laboratoire d'Écologie at the University of M'sila, using morphological criteria keys (Aulagnier and Thévenot, 1986; Reeve, 1994; Aulagnier et al., 2008). The study was authorized by the local ethical committee and national legislation (le journal officiel n° 47 du 19 juillet 2006).

2.3. Studied samples

After the hedgehogs were killed painlessly, spleen and non-injured ear skin pieces and blood samples were collected at the Laboratoire d'Écologie, University of M'sila. Tissue samples from each animal were placed in Eppendorf tubes and frozen at –40 °C; blood samples were kept on air-dried filter paper and preserved at room temperature; and sera samples were frozen at –40 °C. The

serological and molecular studies were conducted at the Laboratory of Parasitology, Universitat de Barcelona.

2.4. Serological study

Anti-*Leishmania* antibodies were detected by ELISA and Western blot using whole *L. infantum* antigens (MHOM/FR/78/LEM75 zymodeme MON-1). Western blot (WB) was performed as described by Riera et al. (1999), with some modifications. It was done on 0.1% SDS–13% polyacrylamide gel on a Mini-gel Bio Rad System. Sera diluted at 1/50 were assayed and a protein A peroxidase conjugate (1/1000 dilution; Pierce) was used. We considered a serum positive when immunoreactivity against the 14 and/or 16 kDa *Leishmania* antigen fraction was observed. ELISA was performed as described by Riera et al. (1999). Sera were diluted at 1/50 and a protein A peroxidase conjugate (dilution, 1/30,000; Pierce) was used. The reaction results were measured in units (U) and the cut-off was established at 20 U.

2.5. Molecular study

2.5.1. DNA extraction

DNA was extracted from 25 to 50 mg of tissue (ear and spleen pieces) and two 6 mm-diameter filter papers by the isolation of nucleic acids with the mammalian tissue and the blood protocol of High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Applied Science, Mannheim, Germany). It was eluted in 200 µL of elution buffer, following the manufacturer's instructions.

2.5.2. Real-time PCR

The detection and quantification of *Leishmania* spp. DNA was analyzed by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequence by real-time PCR (qPCR) (Martín-Ezquerro et al., 2009). Each amplification was performed in triplicate, in a 20 µL reaction mixture containing 1X iTaq supermix with Rox (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), 15 pmol of direct primer (CTTTTCTGGTCTCCGGGTAGG), 15 pmol of reverse primer (CCACCCGGCCTATTTTACACCAA), 50 pmol of the labeled TaqMan probe (FAM-TTTTTCGAGAAGCCCTACCCGCTAMRA) and 5 µL of sample DNA. The ABI Prism 7700 system (Applied Biosystems) at 94 °C and 55 °C cycling over 40 cycles was used. A non-template control was used in each run as the qPCR negative control. A 10-fold dilution series of DNA from promastigotes (MHOM/ES/04/BCN-61, *L. infantum* zymodeme MON-1) was used as calibrators (serial dilution from 10⁵ parasites/ml to 10^{–3} parasites/ml), allowing plotting of a standard curve. The qPCR was considered positive for *Leishmania* when the threshold cycle (tC) was <40 in all replicates.

2.5.3. PCR-RFLP and PCR-FFL analysis of the ribosomal ITS-1 gene

For the identification of *Leishmania* species, the ribosomal internal transcribed spacer 1 (ITS-1) region was amplified with the primers LITSR (5'-CTGGATCATTTTCCGATG-3') and L5.8S (5'-TGATACCACTTATCGCACTT-3'), previously described by Schönian et al. (2003), which were fluorescently labeled for the fluorescent fragment length (FFL) analysis with blue and green fluorochromes (6-FAM and VIC), respectively (Applied Biosystems, UK) (Tomás-Pérez et al., 2013). PCR products were digested with the restriction enzyme *BsuRI* (*HaeIII*) (Fermentas, Life Sciences, Germany) without prior purification, in accordance with the manufacturer's recommendations. For the restriction fragment length polymorphism analysis (PCR-RFLP), PCR products were separated by electrophoresis in 3% Wide Range Agarose (Sigma, USA) at 150 V in SGTB 1X buffer (GRISP LDA; Portugal). A solution of SYBR safe DNA gel stain (Invitrogen, UK) was used to view the separated DNA fragments under ultraviolet light. In PCR-FFL analysis, digestion products were pooled with the internal lane size standard GeneScan™-500 LIZ®

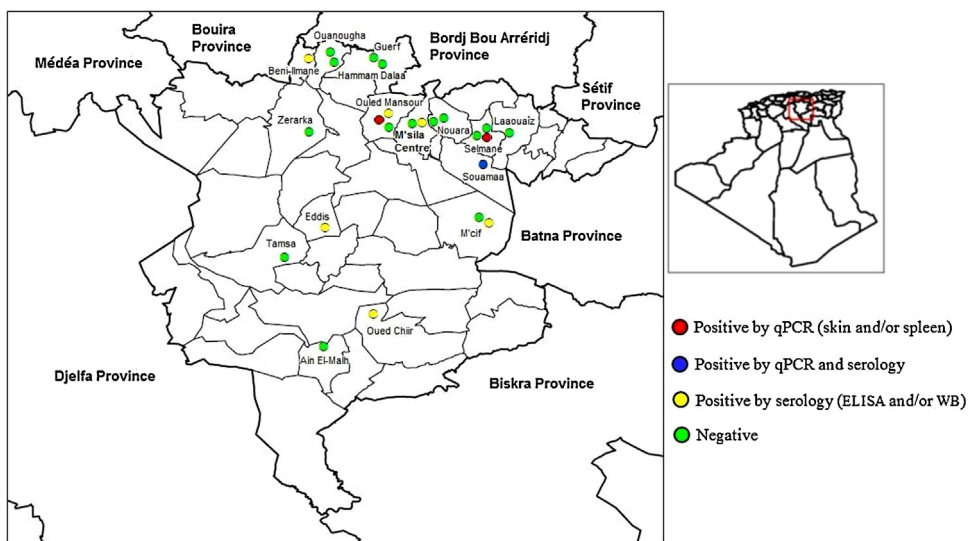


Fig. 1. Geographical distribution of the capture sites of the 24 hedgehogs studied in the M'sila region (Algeria) with the molecular and serological results obtained.

(Applied Biosystems, USA) for the analysis on the DNA sequencer ABI Prism 3730 (Applied Biosystems). Fragment sizes were determined using the fragment analysis program, Peak Scanner Software v1.0 (Applied Biosystems).

2.5.4. Nested PCR

For the identification of the *Leishmania* species, a nested PCR was performed with the external primers CSB2XF (C/GA/GTA/GCAGAAAC/TCCCGTTCA) and CSB1XR (ATTTTCG/CGA/TTTT/CGCAGAACG), and the internal primers 13Z (ACTGGGGTTGGTGTAAATAG) and LiR (TCGCAGAACGCCCT), previously designed by Noyes et al. (1998) around conserved kDNA regions. The PCR mix contained 3 μ L of 10X Roche Buffer, 5 mM dNTP, 0.3 U of *Taq* Roche and 0.3 μ M of each primer in a final volume of 30 μ L. The mixture was incubated in the thermocycler under the following conditions: 94 °C for 120 s, then 40 cycles of 94 °C for 30 s, 54 °C for 60 s and 72 °C for 90 s. The product was diluted in water 9:1 and used as template for the second PCR under the same conditions. The PCR products were viewed under ultraviolet light after separation by electrophoresis in 1.5% agarose gel (TAE 0.5%).

3. Results

3.1. Captured individuals

During the study, 24 wild adult hedgehogs were captured in 16 sampling sites between 412 and 974 meters of altitude. All were found near human settlements at distances ranging from 50 to 150 m in gardens, palm groves, olive groves and apricot orchards. They were identified as two different species: 19 individuals of *A. algirus* (7 males, 12 females) and 5 of *P. aethiopicus* (1 male, 4 females) (Table 1). No skin lesions were observed except in one individual (H40) who had one lesion on the snout.

3.2. Serological study

Immunoreactivity from the *Leishmania* antigen was detected by WB in 6 of the 19 *A. algirus* tested, which came from the localities of M'cif, Oued Chiir, Eddis, Ouled Mansour, M'sila center and Beni-Ilmane (31.6%, 95% CI: 15.16–54.20%), and in 1 of the 5 *P. aethiopicus* from Souamaa (20%, 95% CI: 2.03–64.04%). Specific antibodies were detected by ELISA in sera from 5 *A. algirus* with 26.3% seropositivity

(95% CI: 11.45–49.14%). Overall, antibodies were detected in 7 of 24 individuals, with a seropositivity of 29.2% (95% CI: 14.71–49.37%). All ELISA-positive results were also WB-positive (Tables 2 and 3).

3.3. Detection of *Leishmania* spp. by qPCR

Leishmania spp. DNA was detected in one male of *A. algirus* (5.3%, 95% CI: 0.0–26.48%) from Selmane (H44); and in two *P. aethiopicus* (40%, 95% CI: 11.60–77.09%), one female and one male from Souamaa (H40) and Ouled Mansour (H49) respectively. These results account for 3 of the 24 individuals studied (12.5%, 95% CI: 3.51–31.84%), with 5 positive samples out of the 67 studied (3/24 skin samples, 2/24 spleen samples and 0/19 blood samples) (Tables 2 and 3). PCR threshold cycles among positive samples ranged from 23 to 32, with the highest parasite load found in skin (Table 2). One qPCR positive *P. aethiopicus* was also positive by WB analysis but not by ELISA analysis. The other two qPCR positives individuals presented negative results in WB and ELISA analysis (Table 2).

3.4. Identification of *Leishmania* species by PCR-RFLP, PCR-FFL and nested PCR

The five positive qPCR samples were analyzed by ITS-1 PCR-RFLP and PCR-FFL and only the ear skin sample from *A. algirus* (H44) was identified as infected by *L. major* by both methods, with fragment lengths of 135 and 204 bp by PCR-FFL, which fall within the lengths previously described for *L. major* species (Tomás-Pérez et al., 2013). To increase the sensitivity of the identification, a kDNA nested PCR was performed being able to identify the five *Leishmania* DNA-positive samples as *L. major* (Table 2).

4. Discussion

In the area of M'sila studied there are two species of hedgehog: *A. algirus* and *P. aethiopicus* (Khaldi et al., 2012a,b) which are widely distributed in the same geographical territory as the rodents *P. obesus* and *M. shawi*, considered the main reservoir hosts of *L. major* in this area (Belazzoug, 1983, 1986). It is not currently known whether hedgehogs might be infected by the parasite and their possible epidemiological role as reservoir hosts of *Leishmania*.

Serology has been used in several epidemiological studies for detection of *Leishmania* infection in reservoir hosts (Abranches

Table 1

Hedgehog species, date of capture, location of capture site, altitude of capture site, sex, weight and body length of the 24 individuals studied from the area of M'sila (Algeria).

Sample	Species	Date of capture	Procedence	Altitude (m)	Sex	Weight (g)	Body length (cm)
H20	<i>A. algirus</i>	26/04/2009	M'cif	412	F	535	23.5
H24	<i>A. algirus</i>	29/04/2009	Nouara	472	M	701.1	26
H25	<i>A. algirus</i>	03/05/2009	Oued Chiir	535	F	560.2	21
H26	<i>A. algirus</i>	04/05/2009	M'cif	412	F	425	18
H27	<i>A. algirus</i>	05/05/2009	Hammam Dalaa	767	F	797.6	27
H28	<i>A. algirus</i>	05/05/2009	Selmane	528	F	649.3	25.5
H29	<i>P. aethiopicus</i>	09/05/2009	Zerarka	477	F	364.6	18
H30	<i>A. algirus</i>	10/05/2009	Nouara	472	F	539.2	22
H32	<i>A. algirus</i>	13/05/2009	Ouanougha	944	M	858.4	30
H33	<i>A. algirus</i>	17/05/2009	Ouanougha	944	F	590.5	25
H34	<i>A. algirus</i>	19/05/2009	Eddis	536	M	692.6	25
H35	<i>A. algirus</i>	31/05/2009	Ouled Mansour	486	F	712	22
H36	<i>A. algirus</i>	03/06/2009	Guerf	966	M	562.2	25
H38	<i>A. algirus</i>	13/06/2009	M'sila centre	479	M	414	20
H39	<i>P. aethiopicus</i>	13/06/2009	Ouled Mansour	486	F	360	19
H40	<i>P. aethiopicus</i>	14/06/2009	Souamaa	476	F	215.2	14.5
H41	<i>A. algirus</i>	15/06/2009	Laaouaiz	552	F	694.1	23
H42	<i>A. algirus</i>	16/06/2009	M'sila centre	479	M	661	24
H43	<i>P. aethiopicus</i>	16/06/2009	Tamsa	707	F	325.7	10
H44	<i>A. algirus</i>	17/06/2009	Selmane	528	M	424	19
H45	<i>A. algirus</i>	17/06/2009	Selmane	528	F	662.5	22
H46	<i>A. algirus</i>	28/06/2009	Beni-Ilmane	860	F	615.6	22.5
H47	<i>A. algirus</i>	08/07/2009	Ain El-Malh	974	F	922.5	26.5
H49	<i>P. aethiopicus</i>	30/09/2009	Ouled Mansour	486	M	352.1	21

A. algirus: *Atelerix algirus*; *P. aethiopicus*: *Paraechinus aethiopicus*; F: female; M: male.

Table 2

Results obtained in 9 out of the 24 hedgehogs studied that were positive in any of the techniques used: ELISA, WB or qPCR, and molecular *Leishmania* species identification.

Positive individuals	Serology		<i>Leishmania</i> DNA qPCR (tC) ^a			Species identification
	ELISA (U)	WB (kDa)	Skin	Spleen	Blood	
H25	22	16	40	40	40	–
H26	13	14, 16, 18, 24, 31	40	40	ns	–
H34	20	14, 16, 18, 20	40	40	40	–
H35	20	16	40	40	40	–
H38	28	14, 16, 18, 24, 31, 40	40	40	40	–
H40	13	16	32	40	40	<i>L. major</i>
H44	10	nb	23	32	ns	<i>L. major</i>
H46	21	16, 18, 20	40	40	40	–
H49	9	nb	32	32	ns	<i>L. major</i>

ELISA cut off: 20 U; WB positive: 14 and/or 16 kDa; nb: no band detected; tC: threshold cycle; qPCR positive: tC values <40; ns: no sample.

^a Mean values of the three replicates of each sample.

et al., 1984; Fisa et al., 1999; Di Bella et al., 2003; Sastre et al., 2008; Millán et al., 2011), but there have been no serological studies to detect specific antibodies in hedgehogs. Data obtained in this study show that specific antibodies were detected by ELISA and WB in 20.83% and 29.17% of hedgehogs tested, respectively. The seroprevalence obtained in our study with Algerian hedgehogs corroborates serological studies made in central Tunisia of the main *L. major* reservoirs, *P. obesus* and *M. shawi*, which reported 20% and 33% seropositivity, respectively (Ghawar et al., 2011). The detection of specific antibodies in individuals widely distributed in the endemic region of M'sila shows a contact between the parasite and the hedgehog population that could indicate present or past infection. For this reason, confirmation of active infection by

direct techniques or molecular methods is required to detect the parasite in the possible reservoir hosts and to determine the species involved.

Molecular biology techniques were used in studies to detect new reservoirs of *Leishmania* because of their high specificity and sensitivity (Chitimia et al., 2011; Millán et al., 2011). In our research, parasites were studied by qPCR in three different samples: skin, spleen and blood. Of the 24 hedgehogs tested, *Leishmania* DNA was detected in 2 *P. aethiopicus* (40%) and in 1 *A. algirus* (5.3%). The three infected hedgehogs were from the north of M'sila region, in Ouled Mansour, Souamaa and Selmane, between 476 and 528 m of altitude, where most of the individuals were captured. In all these positive animals, *Leishmania* DNA was detected in non-injured skin;

Table 3

Results of serology and qPCR studies of skin and spleen samples from the two hedgehog species studied: *A. algirus* and *P. aethiopicus*.

Species	Serology		qPCR		Contact evidence ^a
	ELISA	Western blot	Skin sample	Spleen sample	
<i>A. algirus</i> 95% CI	5/19 (26.3%)11.45–49.14	6/19 (31.6%)15.16–54.20	1/19 (5.3%) 0.0–26.48	1/19 (5.3%) 0.0–26.48	7/19 (36.8%)19.05–59.06
<i>P. aethiopicus</i> 95% CI	0/5 (0.0%) 0.0–48.91	1/5 (20.0%) 2.03–64.04	2/5 (40.0%)11.60–77.09	1/5 (20.0%)2.03–64.04	2/5 (40.0%) 11.60–77.09
Total 95% CI	5/24 (20.8%) 8.80–40.91	7/24 (29.2%)14.71–49.37	3/24 (12.5%)3.51–31.84	2/24 (8.3%)1.16–27.00	9/24 (37.5%)21.09–57.36

Results expressed as number of positives/total studied; CI: confidence interval.

^a Positive either for serology or qPCR.

and in two of them, in the spleen sample as well. Quantitative results indicated a higher parasite load in the ear skin than in the spleen samples. All blood samples analyzed were qPCR-negative, which is not unexpected as only one blood sample of a positive animal was analyzed, one *P. aethiopicus* with *Leishmania* DNA detected only in the skin. The detection of *Leishmania* DNA in the skin and spleen of the hedgehogs studied and the significant parasite load observed suggest genuine proliferation of *Leishmania*, which could indicate a reservoir capacity for these animals.

Prior studies of *P. obesus*, the main reservoir host of *L. major*, by microscopy and/or PCR methods on ear skin samples showed high prevalence, with 51.1% in spring and winter seasons in Israel (Wasserberg et al., 2002), similar to the 65% infestation for *P. obesus* observed in the north of Africa also by PCR analysis of ear skin samples (Boudrissa et al., 2011). In our case, the samples were mainly obtained from April to June, with only one from September that was *Leishmania*-positive. This suggests that greater prevalence of infection might have been found if the study had been conducted in late summer months or autumn, which are more favorable for *Leishmania* infection detection. It cannot be ruled out that hedgehogs could be suffering a transient infection episode at the sand flies transmission period. In addition, the low numbers of desert hedgehogs (*P. aethiopicus*) analyzed, accounting for the positivity observed, might also misrepresent the real positivity.

Given the different species of *Leishmania* present in Algeria, molecular techniques were used to identify the species involved in the infected hedgehogs studied. The ITS PCR-RFLP and PCR-FFL methods, often used for species identification, allowed the identification of *L. major* in the skin sample of the *A. algirus* infected, which is related to the important parasite number observed by qPCR. The other *Leishmania* DNA-positive samples, with a lower parasite load observed, could not be identified by the cited techniques. The more sensitive nested PCR performed with the five *Leishmania* DNA-positive samples identified all of them as *L. major*. The results obtained with these techniques confirmed the infection of the hedgehogs with *L. major*, which was reported in prior studies in Algeria as the principal *Leishmania* species responsible for the ZCL recorded in this semi-arid area (Harrat et al., 1996).

Twenty-three of the 24 hedgehogs included in this study showed no lesions on their exposed skin (ears, nose or eyelids) and only one case (H40) had a lesion on the snout, which unfortunately could not be studied. This hedgehog was PCR-positive in non-injured skin and seropositive by WB analysis. Prior studies of natural hosts' infection with *L. major* gave as a valid indicator of infection the presence of ear lesions, but they concluded that it is not a definitive sign because 35% of the proven infected specimens had no skin lesions (Fichet-Calvet et al., 2003).

Control programs of the main reservoir host, *P. obesus*, in the endemic *L. major* area of M'sila, recorded a decrease in CL cases from 1391 in 2003 to 965 in 2004 (31% reduction), achieved by removing the Chenopodiaceae plants that are the exclusive feed of these gerbils in 3600 hectares (Cherif et al., 2012). In Tunisia, Derbali et al. (2013) showed that insecticide-treated rodent baits could be used to reduce the population of *Ph. papatasi* in ZCL endemic areas. The decrease in a main reservoir host in the area usually promotes the increase of other reservoir hosts, like *M. shawi* (Ben Salah et al., 2007; Ghawar et al., 2011). It also could have favored the adaptation of *L. major* to new reservoirs, like hedgehogs, which are not affected by the destruction of this kind of vegetation, because they feed mainly on arthropods and a few mollusks, with Formicidae and Coleoptera as their most appreciated prey (Derdoukh et al., 2012). Hedgehogs are abundant in rural areas between stones, rocks and cactus, in our case they were captured close to human settlements in gardens, palm groves, olive groves, and apricot orchards. Our results indicate the importance of the identification of the reservoir

hosts of *L. major* in the area as key to establishing a more efficient control strategy.

In conclusion, the number of seropositive hedgehogs, together with the detection of *L. major* in the skin and spleen of the hedgehog species *A. algirus* and *P. aethiopicus* in the *L. major* endemic area studied, suggest for the first time the involvement of these hedgehog species in the life cycle of this parasite. Our results indicated that both hedgehog species could be reservoir hosts of leishmaniasis in the area, playing a role in the epidemiology of ZCL and interacting with the wild cycle maintained basically by the rodents *P. obesus* and *M. shawi*. To confirm the role of hedgehogs as reservoir hosts of the parasite is necessary to investigate the ability of sand flies to get infected through feeding on hedgehogs. Furthermore, it would be interesting to increase the number of hedgehogs in future studies. The serology and molecular test used in this study are good methods to continue, in future research, the search for reservoirs and for species identification.

Acknowledgments

M. K. thanks everyone who took part in the sampling of hedgehogs in the M'sila region. We are especially grateful to Mr. Radouane Alouani and Mr. Abdelkrim Moussei (agronomists in the agricultural services of M'sila), who helped design the sampling map. We also thank Mr. Ivan Chicharro, student of the Laboratori de Parasitologia at the Universitat de Barcelona for his contribution in the study. Finally, we thank T. Evans from the Universitat de Barcelona for English revision of the manuscript and the Unitat de Genòmica of the CCITUB (Parc Científic, Universitat de Barcelona) for their collaboration.

References

- Abranches, P., Conceição-Silva, F.M., Silva-Pereira, M.C., 1984. Kala-Azar in Portugal. The sylvatic cycle in the enzootic endemic focus of Arrabida. *J. Trop. Med. Hyg.* 87, 197–200.
- Achour Barchiche, N., Madiou, M., 2009. Outbreak of cutaneous leishmaniasis: about 213 cases in the wilaya of Tizi-Ouzou. *Pathol. Biol.* 57, 65–70.
- Aulagnier, S., Thévenot, M., 1986. Catalogue des mammifères sauvages du Maroc. *Trav. Inst. Sci. Série Zool.* 41 (Rabat).
- Aulagnier, S., Haffner, P., Mitchell-Jones, A.J., Moutou, F., Zima, J., 2008. Guide des mammifères d'Europe, d'Afrique du Nord et du Moyen-Orient. Delachaux et Niestlé S.A., Paris.
- Belazzoug, S., 1982. Une épidémie de leishmaniose cutanée dans la région de M'sila (Algérie). *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 75, 497–504.
- Belazzoug, S., 1983. Isolation of *Leishmania major* Yakimoff, Schokhor, 1914 from *Psammomys obesus* Gretschmar, 1828 (Rodentia: Gerbillidae) in Algeria. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 77, 876.
- Belazzoug, S., 1986. *Leishmania infantum*, causative organism of visceral leishmaniasis at Biskra (Algeria). *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 80, 1002–1003.
- Ben Salah, A., Kamarianaki, Y., Chlif, S., Ben Alaya, N., Prastacos, P., 2007. Zoonotic cutaneous leishmaniasis in central Tunisia: spatio temporal dynamics. *Int. J. Epidemiol.* 36, 991–1000.
- Benikhlef, R., Harrat, Z., Toudjine, M., Djerbouh, A., Bendali-Braham, S., Belkaid, M., 2004. Detection of *Leishmania infantum* MON-24 in the dog. *Med. Trop.* 64, 381–383.
- Boubidi, S.C., Benallal, K., Boudrissa, A., Bouiba, L., Bouchareb, B., Garni, R., Bouratine, A., Ravel, C., Dvorak, V., Votycka, J., Volf, P., Harrat, Z., 2011. *Phlebotomus sergenti* (Parrot, 1917) identified as *Leishmania killicki* host in Ghardaïa, south Algeria. *Microbes Infect.* 13, 691–696.
- Boudrissa, A., Cherif, K., Kherrachi, I., Benbetka, S., Bouiba, L., Boubidi, S.C., Benikhlef, R., Arrar, L., Hamrioui, B., Harrat, Z., 2011. Spread of *Leishmania major* to the north of Algeria. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 105, 30–35.
- Cherif, K., Boudrissa, A., Cherif, M.H., Harrat, Z., 2012. A social program for the control of zoonotic cutaneous leishmaniasis in M'Sila, Algeria. *Santé Publique* 24, 511–522.
- Chitimia, L., Muñoz-García, C.I., Sánchez-Velasco, D., Lizana, V., Del Río, L., Murcia, L., Fisa, R., Riera, C., Giménez-Font, P., Jiménez-Montalbán, P., Martínez-Ramírez, A., Meseguer-Meseguer, J.M., García-Bacete, I., Sánchez-Isarria, M.A., Sanchis-Monsonís, G., García-Martínez, J.D., Vicente, V., Segovia, M., Berriatua, E., 2011. Cryptic *Leishmaniasis* by *Leishmania infantum*, a feature of canines only? A study of natural infection in wild rabbits, humans and dogs in southeastern Spain. *Vet. Parasitol.* 181, 12–16.
- Derbali, M., Chelbi, I., Cherni, S., Barhoumi, W., Boujaâma, A., Raban, R., Poché, R., Zhioua, E., 2013. Laboratory field evaluation of an imidacloprid treated rodent

- oral bait for a systemic control *Phlebotomus papatasi* Scopoli, 1786 (Diptera: Psychodidae). Bull. Soc. Pathol. Exotique 106, 54–58.
- Derdoukh, W., Guertzou, A., Baziz-neffah, F., Khoudour, A., Dahou, M., Abdelmalek, M., Doumandji, S., 2012. Selection of preys by *Atelexis algirus* in two stations of Mitidja (Algeria). Int. J. Biotechnol. Res. 2, 51–62.
- Di Bella, C., Vitale, F., Russo, G., Greco, A., Milazzo, C., Aloise, G., Cagnin, M., 2003. Are rodents a potential reservoir for *Leishmania infantum* in Italy? J. Mt. Ecol. 7, 125–129.
- Faizulin, F.G., Kon'shina, L.N., Abdullaev, I.V., Ummatov, A.M., 1975. The natural carriers of the agent of zoonotic cutaneous leishmaniasis in the foci of infection in the Uzbek SSR. Aktual'nye problemy meditsinskoi parazitologii Vypusk 2, 97–101.
- Fichet-Calvet, E., Jomâa, I., Ben-Ismaïl, R., Ashford, R.W., 2003. *Leishmania major* infection in the fat sand rat *Psammomys obesus* in Tunisia: interaction of host and parasite populations. Ann. Trop. Med. Parasitol. 97, 593–603.
- Fisa, R., Gállego, M., Castillejo, S., Aisa, M.J., Serra, T., Riera, C., Carrió, J., Gállego, J., Portús, M., 1999. Epidemiology of canine leishmaniasis in Catalonia (Spain). The example of the Priorat focus. Vet. Parasitol. 83, 87–97.
- Ghawar, W., Toumi, A., Snoussi, M.A., Chlif, S., Zâatour, A., Boukthir, A., Bel Haj Hamida, N., Chemkhi, J., Diouani, M.F., Ben-Salah, A., 2011. *Leishmania major* infection among *Psammomys obesus* and *Meriones shawi*: reservoirs of zoonotic cutaneous leishmaniasis in Sidi Bouzid (Central Tunisia). Vector Borne Zoonotic Dis. 11, 1561–1568.
- Harrat, Z., Pralong, F., Belazzoug, S., Dereure, J., Deniau, M., Rioux, J.A., Belkaid, M., Dedet, J.P., 1996. *Leishmania infantum* and *L. major* in Algeria. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 90, 625–629.
- Harrat, Z., Boubidi, S.C., Pralong, F., Benikhlef, R., Selt, B., Dedet, J.P., Ravel, C., Belkaid, M., 2009. Description of a dermatotropic *Leishmania* close to *L. killicki* (Rioux Lanotte & Pralong, 1986) in Algeria. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 103, 716–720.
- Hasbaia, M., Hedjazi, A., Benayada, L., 2012. Variabilité de l'érosion hydrique dans le bassin du Hodna: Cas du sous-bassin versant de l'oued elham. Rev. Mar. Sci. Agron. Vét. 1, 28–32.
- Izri, M.A., Belazzoug, S., Pralong, F., Rioux, J.A., 1992. Isolement de *Leishmania major* MON 25 de *Phlebotomus papatasi* à Biskra, Algérie. Ann. Parasitol. Hum. Comp. 67, 31–32.
- Izri, M.A., Belazzoug, S., 1993. *Phlebotomus (Larroussius) perfiliewi* naturally infected with dermatotropic *Leishmania infantum* at Tenes (Algeria). Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 87, 399.
- Jaouadi, K., Haouas, N., Chaaara, D., Gorcii, M., Chargui, N., Augot, D., Pralong, F., Dedet, J.P., Ettlijani, S., Mezhoud, H., Babba, H., 2011. First detection of *Leishmania killicki* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) in *Ctenodactylus gundi* (Rodentia: Ctenodactylidae), a possible reservoir of human cutaneous leishmaniasis in Tunisia. Parasit. Vectors 4, 159.
- Khalidi, M., Socolovschi, C., Benyettou, M., Barech, G., Biche, M., Kernif, T., Raoult, D., Parola, P., 2012a. Rickettsiae in arthropods collected from the North African Hedgehog (*Atelexis algirus*) and the desert hedgehog (*Paraechinus aethiopicus*) in Algeria. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 35, 117–122.
- Khalidi, M., Torres, J., Samsó, B., Miquel, J., Biche, M., Benyettou, M., Barech, G., Benelkadi, H.A., Ribas, A., 2012b. Endoparasites (Helminths and Coccidians) in the hedgehogs *Atelexis algirus* and *Paraechinus aethiopicus* from Algeria. Afr. Zoo. 47, 48–54.
- Lemaire, G., Sergent, E., L'Héritier, A., 1913. Recherches sur la leishmaniose du chien d'Alger. Bull. Soc. Pathol. Exot. 6, 579–581.
- Martín-Ezquerro, G., Fisa, R., Riera, C., Rocamora, V., Fernández-Casado, A., Baranco, C., Serra, T., Baró, T., Pujol, R.M., 2009. Role of *Leishmania* spp. infestation in nondiagnostic cutaneous granulomatous lesions: report of a series of patients from a Western Mediterranean area. Br. J. Dermatol. 161, 320–325.
- Mihoubi, I., Picot, S., Hafirassou, N., de Monbrison, F., 2008. Cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania tropica* in Algeria. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 102, 1157–1159.
- Millán, J., Zanet, S., Gomis, M., Trisciuglio, A., Negre, N., Ferroglio, E., 2011. An investigation into alternative reservoirs of canine leishmaniasis on the endemic island of Mallorca (Spain). Transbound Emerg. Dis. 58, 352–357.
- Muñoz-Madrid, R., Belinchón-Lorenzo, S., Iniesta, V., Fernández-Cotrino, J., Parejo, J.C., Serrano, F.J., Monroy, I., Baz, V., Gómez-Luque, A., Gómez-Nieto, L.C., 2013. First detection of *Leishmania infantum* kinetoplast DNA in hair of wild mammals: application of qPCR method to determine potential parasite reservoirs. Acta Trop. 128, 706–709.
- 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. J. Clin. Microbiol. 36, 2877–2881.
- Petrisceva, P.A., 1971. The natural focality of leishmaniasis in the USSR. Bull. World Health Organ. 44, 567–576.
- Reeve, N., 1994. Hedgehogs. Poyser Natural History, T. and A. D. Poyser.
- REM (Relevé Épidémiologique Annuel), 2003. Institut National de la Santé Publique d'Algérie (INSP) 15, 13.
- REM (Relevés Épidémiologiques Mensuels), 2009. Institut National de la Santé Publique d'Algérie (INSP) 20, 18.
- Riera, C., Valladares, J.E., Gállego, M., Aisa, M.J., Castillejo, S., Fisa, R., Ribas, N., Carrió, J., Alberola, J., Arboix, M., 1999. Serological and parasitological follow-up in dogs experimentally infected with *Leishmania infantum* and treated with meglumine antimoniate. Vet. Parasitol. 84, 33–47.
- Sastre, N., Francino, O., Ramírez, O., Enseñat, C., Sánchez, A., Altet, L., 2008. Detection of *Leishmania infantum* in captive wolves from Southwestern Europe. Vet. Parasitol. 158, 117–120.
- 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. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 47, 349–358.
- 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. Am. J. Trop. Med. Hyg. 88, 586–591.
- Wasserberg, G., Abramsky, Z., Anders, G., El-Fari, M., Schoenian, G., Schnur, L., Kotler, B.P., Kabalo, I., Warburg, A., 2002. The ecology of cutaneous leishmaniasis in Nizzana Israel: infection patterns in the reservoir host, and epidemiological implications. Int. J. Parasitol. 32, 133–143.

3.3. ARTÍCULO 3:

“Multilocus Microsatellite Typing of *Leishmania infantum*
in monitored *Leishmania*/HIV coinfecting patients”

**TIPADO DE *LEISHMANIA INFANTUM* EN AISLADOS PROCEDENTES DE
LA MONITORIZACIÓN DE PACIENTES CO-INFECTADOS CON
LEISHMANIA/VIH MEDIANTE EL ESTUDIO DE MICROSATÉLITES**

**Míriam Tomás Pérez, Mallorie Hide, Cristina Riera, Liliana Montoya,
Anne-Laure Bañuls, Esteve Ribera, Montserrat Portús y Roser Fisa**

Parasites & Vectors

[En proceso de revisión]

Factor de impacto: 3,25

RESUMEN

La co-infección *Leishmania*/VIH, con *Leishmania infantum* como agente causal de ambas formas clínicas, visceral y cutánea, de leishmaniosis en el área del Mediterráneo, está caracterizada por la aparición de numerosas recaídas clínicas. El análisis mediante microsatélites (MLMT) es una herramienta útil para los estudios genéticos de *Leishmania*, que ha permitido detectar un elevado polimorfismo en cepas procedentes de reservorios y vectores. En este estudio mediante MLMT se han analizados los perfiles genéticos de 25 muestras de *L. infantum* obtenidas de 8 pacientes co-infectados con *Leishmania*/VIH que han sufrido sucesivas recaídas clínicas, los cuales fueron monitorizados de 2 a 7 veces antes y después del tratamiento. Los 20 microsatélites estudiados produjeron electroforegramas claros con sólo uno o dos alelos en cada locus. Un total de 18 microsatélites fueron polimórficos, siendo LiBTG el más polimórfico con 7 alelos distintos. El MLMT permitió estudiar las características genéticas de 25 muestras de *L. infantum* diferenciando 18 genotipos distintos, 15 de éstos fueron únicos entre el total analizados, mientras que sólo 3 fueron repetidos, 2 de éstos detectados en distintos pacientes. El análisis filogenético realizado ha permitido observar las distancias genéticas entre aislados, con 13 de ellos, procedentes de 5 pacientes distintos, presentado distancias genéticas próximas. Los 12 aislados restantes de los otros 3 pacientes mostraron distancias genéticas mayores, sugiriendo distintas fuentes de infección. El análisis de los aislados de *Leishmania* procedentes de 10 recaídas clínicas indicaron que sólo 2 compartían el mismo genotipo con los aislados correspondientes a

la primo-infección, constituyendo de ésta manera casos confirmados de recaídas. En las otras recaídas clínicas, los resultados revelaron o bien pequeñas o importantes variaciones genéticas, sugiriendo o bien la evolución del parásito en el paciente, o una infección mixta en la primo-infección, o la reinfección causada por otro genotipo de *Leishmania*. El análisis de aislados procedentes de pacientes co-infectados con *Leishmania*/VIH mediante MLMT ha permitido el estudio del parásito desde un punto de vista genético y clínico, ayudando a diferenciar entre reinfecciones y recaídas.

Multilocus microsatellite typing of *Leishmania infantum* in monitored *Leishmania*/HIV coinfected patients

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	Multilocus microsatellite typing of <i>Leishmania infantum</i> in monitored <i>Leishmania</i> /HIV coinfected patients
Article Type:	Research
Abstract:	<p>Background: <i>Leishmania</i>/HIV coinfection, with <i>Leishmania infantum</i> as the main etiological agent of both visceral and cutaneous clinical forms of leishmaniasis in the Mediterranean area, is characterized by the occurrence of numerous clinical relapses. Multilocus Microsatellite Typing (MLMT) is a useful tool for <i>Leishmania</i> genetic studies, since high intraspecific polymorphism has been described in strains isolated from hosts and vectors.</p> <p>Methods: In this study, we analysed the MLMT profiles of 25 <i>L. infantum</i> samples from 8 <i>Leishmania</i>/HIV co-infected patients suffering clinical relapses, who were monitored 2 to 7 times before and after treatment.</p> <p>Results: There were 20 microsatellite loci studied that produced clear electrophoregrams with only one or two alleles at each locus. A total of 18 microsatellite markers were polymorphic, the most polymorphic being LiBTG with 7 different alleles. MLMT enabled us to study the genetic characteristics of the 25 <i>L. infantum</i> samples, differentiating 18 genotypes. Fifteen of them were unique in the total sample set and only 3 were repeated, 2 of which were detected in different patients. Both clustering and phylogenetic analyses provided insights into the genetic links between the samples; 13 out of the 25 isolates from 5 different patients were clustered together, revealing low genetic distances. The 12 remaining isolates from the 3 other patients showed greater genetic distances, suggesting different sources of infection. Analysis of the <i>Leishmania</i> isolates from 10 clinical relapses indicated that only two shared an identical genotype with corresponding samples taken during the primo infection, and therefore constituted two confirmed relapses. In the other relapse cases, the results revealed either slight or important genetic variation, suggesting either an evolution of the parasites in the patient, or a mixed infection in the first infection stage or a reinfection by another <i>Leishmania</i> genotype.</p> <p>Conclusions: The analysis of different isolates taken from <i>Leishmania</i>/HIV positive coinfected patients with multilocus microsatellite markers allowed us to study the parasite from a genetic and clinical point of view, helping to differentiate between re-infections and relapses.</p>
Corresponding Author:	Roser Fisa Saladrigas SPAIN
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Miriam Tomás-Pérez
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Miriam Tomás-Pérez Mallorie Hide Cristina Riera

RESULTADOS ARTÍCULO 3	Liliana Montoya
	Anne-Laure Bañuls
	Esteve Ribera
	Montserrat Portús
	Roser Fisa Saladrigas
Order of Authors Secondary Information:	

BACKGROUND

1
2
3 The first case of leishmaniasis associated with HIV infection was reported in
4
5 1985, since then, the cases of coinfection in southern Europe have been increasing.
6
7 Nowadays coinfection cases are reported in thirty-five countries around the world. The
8
9 four European countries mainly affected are France, Italy, Portugal and above all Spain,
10
11 the latter having the highest incidence due to a greater geographical overlap between
12
13 leishmaniasis and HIV infections [1]. *Leishmania infantum* is the main etiological agent
14
15 of both visceral and cutaneous clinical forms of human leishmaniasis in this area, which
16
17 is transmitted through vectors of the species *Phlebotomus perniciosus* and *P. ariasi* [2].
18
19 These cases of leishmaniasis/HIV coinfection usually result in visceral leishmaniasis
20
21 (VL), and are often thought to be related to the reactivation of asymptomatic infections
22
23 [1]. Acquired infection among intravenous drug users (IVDU) sharing contaminated
24
25 syringes has also been reported, which could represent an anthroponotic cycle [3]. VL
26
27 cases associated with HIV are characterized by the appearance of numerous relapses
28
29 that vary in number and average duration according to the immunological status of
30
31 patients, parasite species, and use of antileishmanial therapy [1].
32
33
34
35
36
37
38
39

40 For the epidemiological study and follow-up of these coinfection cases, highly
41
42 discriminatory methods are needed to differentiate *Leishmania* at the strain level [4],[5].
43
44 Previous research on different *Leishmania* strains of coinfecting patients in France using
45
46 isoenzymatic characterization (MLEE) revealed a low polymorphism in primo infection
47
48 as well as in relapse cases [6]. In the south of Spain, a greater polymorphism was found
49
50 by MLEE studies, but almost 50% strains in coinfecting patients were described as
51
52 zymodeme MON-1 [7],[8].
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Microsatellite markers have proved to be powerful tools for molecular typing and population genetic studies in *Leishmania*, being able to discriminate among zymodemes, even within MON-1 [4]. Microsatellites are short nucleotide fragments of 1 to 6 bp repeated in tandem and ubiquitously distributed in the genomes of eukaryotic organisms [9]. They present high rates of mutation and variability due to allelic repeat length variation [10],[11]. The Multilocus Microsatellite Typing (MLMT) approach developed for the *Leishmania donovani* complex is based on a set of 14–20 unlinked microsatellite loci [11]. The present MLMT study aimed to genetically characterize *L. infantum* samples taken from monitored *Leishmania*/HIV coinfecting patients presenting clinical relapses. The specific objective was to define the genetic links between the parasites of the 8 patients under study and between parasites from repeated samples of the same patient. Besides describing a *Leishmania* population in HIV patients, this genetic study generated data that helped to differentiate between re-infections and relapses.

MATERIAL AND METHODS

Patients. The study included 8 adults with *Leishmania*/HIV coinfection from the Barcelona metropolitan area, monitored at the Hospital Vall d'Hebron (Barcelona, Spain). They were 7 men and 1 woman, 6 of whom were IVDU, aged from 27 to 44 years at the start of the study, when the first *Leishmania* isolate was obtained (Table 1).

All patients were under HAART therapy (Highly Active AntiRetroviral Therapy). Diagnosis of VL was confirmed by culture in bone marrow or peripheral blood. After diagnosis, patients received one of the following treatments at standard doses: liposomal amphotericin B or amphotericin B lipid complex.

1 The study protocol was approved by the institutional review board of the
2 hospital, and all patients signed informed consent for their participation in this study.
3
4

5 ***Leishmania infantum* samples.** Twenty-five isolates were collected from
6 clinical episodes and monitoring of the 8 patients. Two to seven isolates per patient
7 were taken before and after treatment, with time intervals of 6 days to 29 months (Table
8 1). Three isolates were obtained before treatment, fifteen during the clinical relapses and
9 seven during the monitored period. All isolates, previously cultured in Schneider's
10 insect medium and/or NNN (Novy-McNeal-Nicolle's) medium, were stored in the
11 *Leishmania* Cryobank at the Universitat de Barcelona, and were identified as *L.*
12 *infantum* by specific PCR [12],[13]. A *L. infantum* strain from Toulouse (France) was
13 used as a reference to build the neighbor-joining (NJ) tree: LEM2355 (WHO code:
14 MHOM/FR/91/LEM2355; MON-183).
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30

31 **DNA extraction.** One cryovial from each isolate was used for isolation of DNA.
32 The promastigotes were quickly thawed and DNA was extracted using a chelex resin
33 protocol: 100 µL of sterile water and 400 µL of chelex solution [1% Tween 20 (Sigma,
34 St. Louis, MO), 1% Nonidet P-40 (Sigma, St. Louis, MO) and 20% of chelex resin
35 (BioRad Laboratories, Hercules, CA)] were added to the promastigote sediment. It was
36 heated at 100°C for 20 min and then vortexed. Finally, the mixture was centrifuged for
37 10 min at 12,000 g to separate the resin and the supernatant was collected as the
38 substrate for the PCR. Amplification of the supernatant by PCR was either performed
39 immediately or after storage at -20°C.
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53

54 **Multilocus Microsatellite Typing (MLMT).** The genotyping was done using
55 20 microsatellite markers previously described for the genetic characterization of *L.*
56 *infantum* (Table 2). Amplification was performed in a volume of 30 µL containing 3 µL
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 of 10X buffer, 1 nmol of dNTP mix, and 10 pmol of each primer (the forward being
2 labeled) and 1.5 units of Taq polymerase (Taq Polymerase, 5U/ μ L, Roche Diagnostics,
3 France). We added 50 ng of extracted DNA to the mixture and incubated it in a thermal
4 cyclor under the following conditions: a denaturing step at 94°C for 2 min, followed by
5 35 cycles of denaturation for 30 sec at 94°C, annealing for 1 min at the annealing
6 temperature of each locus (Table 2) and extension for 1 min at 72°C, followed by a final
7 extension at 72°C for 30 min. The amplified products were analyzed using an automated
8 fragment analysis on an ABI Prism 3130XL genetic analyzer (Applied Biosystems,
9 France) with a Genescan 500 LIZ internal size standard. Finally, data were analyzed
10 with GeneMapper analysis software (version 4.0, Applied Biosystems, France).

25 **Genetic diversity and differentiation analysis.** Data were analyzed with
26 FSTAT Version 2.9.3.2 [14] updated from [15], which allows the calculation of
27 diversity indices such as Nei's unbiased genetic diversity index within subsamples (H_s),
28 the observed heterozygosity (H_o), as a measure of genetic diversity [16], and the
29 number of alleles per locus (N_a) measuring genetic polymorphism. The genotypic
30 diversity was calculated as the ratio of the number of genotypes per total number of
31 samples.

43 **Clustering and phenetic analyses.** The genetic characteristics of the
44 *Leishmania* samples under study were investigated with MLMT data by two different
45 methods. The first was based on genetic distances by the construction of a phenetic tree
46 according to the proportion of shared allele distances (D_{AS}). The tree was constructed by
47 the NJ method (PHYLIP software 3.67 package) and visualized with Treedyn software.
48 The second approach consisted of a model-based Bayesian clustering method
49 implemented in STRUCTURE v 2.3.1 [17]. This algorithm simultaneously estimates the
50 allele frequencies to assign individuals into genetically distinct populations (K) and each
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 probability for the identification of the most likely number of populations. The allele
 2 frequencies among populations were correlated by admixture modeling for a series of
 3 runs using a ‘burn-in’ period of 20,000 iterations and probability estimates based on
 4 200,000 of Markov chain Monte Carlo (MCMC) repeats. Ten independent runs for each
 5 K were carried out for each possible number of clusters (K) in order to quantify the
 6 variation in the likelihood of the data for a given K . The most appropriate number of
 7 populations was determined based upon *ad hoc* statistic ΔK , which evaluates the
 8 second order rate of change of the likelihood function with respect to the number of
 9 populations (K).
 10
 11
 12
 13
 14
 15
 16
 17
 18
 19
 20
 21
 22
 23
 24
 25

26 RESULTS

27
 28
 29 **Genetic diversity.** All 20 microsatellite *loci* used for the analysis of the 25 *L.*
 30 *infantum* samples produced clear electrophoregrams, with only one or two alleles at
 31 each locus. We found 18 polymorphic microsatellite markers, with LiBTG as the most
 32 polymorphic, having 7 different alleles (N_a) and two monomorphic markers, LIST7025
 33 and LIST7031. We observed 8 polymorphic microsatellites with more than 5 alleles,
 34 LIST7021, LIST7035 and Rossi2 with 6 alleles each; and Li22-35, Li45-24, LIST7033,
 35 LIST7037 and LIST7039 with 5 alleles. Markers Li72-20, LiBTA and LIST7026
 36 revealed 4 alleles; Li71-5/2, LIST7024, Rossi1 and LIST7038 3 alleles; TubCA and
 37 LIST7028 showed 2 alleles. The mean value was 4 alleles per locus (Table 2). The
 38 diversity analysis, including all the 25 strains, revealed an observed heterozygosity (H_o)
 39 between 0 and 0.411 (overall 0.095); the mean intrapopulation genetic diversity (H_s)
 40 ranged between 0 and 0.373, with an overall value of 0.196 (Table 2).
 41
 42
 43
 44
 45
 46
 47
 48
 49
 50
 51
 52
 53
 54
 55
 56
 57
 58
 59
 60
 61
 62
 63
 64
 65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Genotype analysis and phylogenetic reconstruction. A total of 18 genotypes (G) were characterized for the 25 samples belonging to the 8 monitored patients (Table 1), corresponding to a genotypic diversity of 0.72. Of these genotypes, 15 were unique in the total sample set, and only 3 (G7, G9 and G16) were repeated. The three repeated genotypes were found in four different patients: G7 in two of the three isolates of patient 7 and one of the seven isolates of patient 8; G9 in the two isolates of patient 4; and G16 in the three isolates of patient 3 and two isolates of patient 8. Only genotypes G16 and G7 were detected in two different patients.

MLMT profiles were used to calculate genetic distances and build a neighbor-joining tree. The genetic distance tree allowed us to differentiate 2 main populations or clusters C1 and C2, the latter composed of 2 well-supported subclusters C2a and C2b (Figure 1). The reference strain LEM2355 was used as the outgroup. At the top of the tree, sample 5b from patient 5 is clearly separated from the others. The first cluster (C1) is composed of the two isolates obtained from patient 2, separated from the others with a strong bootstrap value of 100%. The second cluster (C2) is defined by a bootstrap value of 84% and contains all the other 22 samples. In C2, we can detect several subclusters, but only two subclusters, representing 5 samples and designated as C2a and C2b, are supported by bootstrap values higher than 80%. C2a, with a bootstrap value of 100%, is composed of the three samples of patient 7 and one sample (8b) of patient 8; C2b is supported by a bootstrap value of 84% and includes all samples from patient 1.

Clustering analysis. The population organization of the 25 samples was analyzed with STRUCTURE software for a better visualization of the data. Using the methods of Evanno and Garnier [18],[19], the analysis indicated the existence of 6 different populations ($K = 6$) (Figures 1 and 2). Considering $K = 6$, all samples from patients 2 and 1 defined two of these six populations, corresponding to the cluster C1

1 and the subcluster C2b of the phenetic tree. A third STRUCTURE population was
2 defined by all samples from patient 7 and one sample from patient 8 (8b), corresponding
3 to the subcluster C2a. A fourth population included all other samples from C2, which
4 were all samples from patients 3 and 4, and some samples belonging to patients 5, 6 and
5 8 (5a, 6a, 6c, 8c, 8d, 8e, 8f and 8g). The two other populations were defined by the
6 outgroup and one sample from patient 5 (5b). The STRUCTURE analysis did not allow
7 the classification of two samples, 8a and 6b, which appear as mixed genotypes of NJ
8 tree populations, C2, C2a and the non-classified sample 5b from patient 5.
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22

23 DISCUSSION

24
25
26
27 *L. infantum* is the causative species of VL and CL in the northwest
28 Mediterranean area and an opportunistic parasite in HIV patients. It appears that
29 immunocompromised people may be vulnerable to parasites that either fail to survive or
30 never cause detectable morbidity in immunocompetent people. Furthermore,
31 “dermotropic” variants of *L. infantum* have been reported to cause visceral disease in
32 HIV-positive patients [1],[7],[20]. Other studies have revealed differences in parasitic
33 genotypes between *L. infantum* strains from asymptomatic carriers and HIV-positive
34 VL patients, suggesting that some genotypes are unable to cause disease [21]. Previous
35 MLMT research has also shown a corresponding polymorphism in *L. infantum* samples
36 obtained from *Leishmania*/HIV patients, even within the predominant MON-1
37 zymodeme, thus revealing the low discriminatory power of the MLEE analysis
38 [4],[10],[22].
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56

57 In the present study, MLMT characterization of the 25 *L. infantum* samples
58 showed the existence of a genetic polymorphism with a mean number of alleles per
59
60
61
62
63
64
65

1 locus (N_a) of 4. Considering that our sample set came from only 8 coinfecting patients
2 monitored over time, and also from the restricted geographical area of Barcelona, the N_a
3 is not negligible in comparison with previous studies performed in nearby areas. For
4 example, in the South of France, a mean N_a of 4.13 was found within *L. infantum*
5 samples from symptomatic humans and dogs and asymptomatic humans [21]. A similar
6 mean value of N_a : 4.57 was obtained in Portugal from human, dog, vulpine and
7 phlebotomine *L. infantum* samples [22]. Likewise, another study performed on MON-1
8 *L. infantum* samples from Spanish, Portuguese and Greek human patients, dogs and
9 phlebotomine sand flies obtained a mean N_a value of 4.6 [4].
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21

22 Furthermore, 18 different genotypes were found in the 25 analyzed samples,
23 with a low number of repeated genotypes, despite their limited geographical and human
24 origin. It is also worth emphasizing that these isolates come from only 8 relapsing
25 patients. Fifteen genotypes were unique in the total sample set, and only three (G7, G9
26 and G16) were repeated; both G7 and G16 appeared in two different patients, and G9 in
27 two isolates from the same patient. No correlation was observed between genotypes and
28 clinical manifestation, with 16 different genotypes among the 18 clinical episodes, and
29 two (G7 and G16) of the three repeated genotypes present in clinical relapse episodes
30 and in monitored asymptomatic periods. The kind of sample used in the study, bone
31 marrow or peripheral blood, was not associated with particular genotypes either, as
32 previously described by other authors [23].
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49

50 Our data indicated a high degree of heterogeneity and no predominant genotype
51 in the samples, but a more extensive study is required to assess the real variability and
52 abundance of genotypes in immunocompromised patients. The parasite heterogeneity
53 observed in our patient set is in agreement with the genetic variability described in a
54 previous MLMT study on *Leishmania* isolates from dogs and sand flies performed in a
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 rural leishmaniasis-endemic area close to Barcelona (Priorat, Tarragona) [23]. Other
2 MLMT studies performed on *Leishmania* parasites from different hosts, geographical
3 regions and clinical forms have also found a low number of repeated multilocus
4 genotypes [22]-[24]. A Portuguese study reported a generally low percentage (12%) of
5 repeated genotypes, although a higher percentage in coinfecting patients [22]. This could
6 be explained by a high number of cases due to human-to-human transmission, notably
7 between IVDU [25],[26]. The genotypic diversity registered in our study was 0.72,
8 similar to other studies performed in Europe, for example, 0.55 in Greece [27] or 0.67 in
9 Portugal [22]. However, any comparison between these results is limited by the variable
10 number of samples analyzed and loci tested.

11
12 The phylogenetic reconstruction of our data by neighbor-joining (NJ) tree and
13 STRUCTURE analysis was useful to visualize sample distribution and genetic
14 relationships. In five patients (1, 2, 3, 4 and 7), the NJ tree showed clear genetic links
15 between the different samples. Either the genotype was exactly the same, as in the
16 samples of patients 3 and 4, or slightly different, as in patients 1, 2 and 7. This suggests
17 that in some cases the population underwent an inpatient evolution over time. In
18 contrast, the samples of the other three patients (5, 6 and 8) are dispersed in different
19 clusters, suggesting either a primo infection with multiple genotypes or reinfection
20 events with different genotypes. Most remarkable is patient 8, whose 7 isolates revealed
21 6 different and distant genotypes, and whose case warrants further study.

22
23 These results are interesting because one of the main problems in treating
24 repeated leishmaniasis clinical episodes in coinfecting patients is to differentiate between
25 reinfections and relapses. Previous studies with monitored *Leishmania*/HIV coinfecting
26 patients revealed the existence of a residual parasite load after qPCR analysis, which
27 was attributed to subsequent recurrences of VL. Nevertheless, detection by qPCR did

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

not allow parasite characterization to differentiate between a relapse and reinfection [28]. In contrast, the use of MLMT analysis has proven useful in this respect and allowed some studies to detect a high percentage of relapse cases among the clinical episodes of coinfecting patients [4],[5],[22].

In our study, the percentage of relapses was low and only the isolates of two patients (patients 3 and 4) shared the same genotype, showing that these clinical episodes were due to the same *Leishmania* genotype. In these two patients, relapses occurred 6 months after treatment and were not considered as a failure of treatment by clinicians. In the other six patients, the samples showed different genotypes during clinical episodes and monitoring periods. Nevertheless, it is worth noting that those from three patients (patients 1, 2 and 7) were closely genetically related, perhaps due to the evolution of the *Leishmania* population in the patient, and thus these cases could also be due to a relapse. From a clinical point of view, because of the short time between the end of the treatment and the new clinical episode, the cases of patients 2 and 7 were considered by clinicians as a therapeutic failure, unlike the case of patient 1, with 8 and 12 months between relapse episodes.

For the isolates of patients 5, 6 and 8, which showed a high dispersion in the NJ tree, the relapse hypothesis is unlikely. The results obtained with STRUCTURE are globally in agreement with the genetic distance analysis. The analysis clearly indicates that isolates from these three patients correspond to different populations and some would be the result of mixing between populations, such as the 6b and 8a samples. These differences cannot be explained by reinfection events caused by sand fly transmission, since no transmission period occurred between the clinical episodes. The second possibility, that of a multiple infection, is thus the most probable. This could be

1 due to the inoculation of different *Leishmania* genotypes by one or several sand flies, or
2 to the multiple sharing of contaminated syringes between IVDU.
3
4

5 As already underlined, the case of patient 8 is remarkable, with seven isolates,
6 two from clinical episodes and five from monitored controls, represented by 6 different
7 genotypes. Two isolates were obtained with only a six-day interval, thus ruling out a
8 reinfection, especially as the patient was hospitalized. Furthermore, this patient
9 developed a second clinical relapse, again with a different genotype. This high genetic
10 variability clearly indicates a mixed infection, with a genotype selection during the
11 culture of the samples. The culture bias is a considerable inconvenience for the
12 interpretation of the results, as it is impossible to assess if one genotype is more
13 responsible than another for the clinical episode. To avoid culture selection, it would be
14 interesting to work directly with clinical samples, as carried out by other authors [29].
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30

31 In conclusion, the analysis of different isolates taken from *Leishmania*/HIV
32 positive coinfecting patients with multilocus microsatellite markers allowed us to study
33 the evolution of the infections. According to the results and clinical data, we had three
34 different types of cases in our study: (i) two coinfecting patients who relapse, with the
35 same genotypes in the primo infection and the second episode (25%); (ii) three
36 coinfecting patients who probably relapse, with slightly different genotypes between the
37 primo infection and the other episodes due to the evolution of the parasite population
38 inside the patient (37.5%), and (iii) three coinfecting patients infected by several distant
39 genotypes in the primo infection and a differential selection by the parasite culture
40 performed for the study (37.5%).
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

ACKNOWLEDGMENTS:

We thank the Unitat de Genòmica of the CCiTUB (Parc Científic, Universitat de Barcelona) for their collaboration on the study. We also thank Dr. M. Gállego and S. Tebar from *Leishmania* Cryobank of the Universitat de Barcelona, where strains used in this study were conserved. Data used in this work were (partly) produced through molecular genetic analysis technical facilities of the labex « Centre Méditerranéen de l'Environnement et de la Biodiversité.

REFERENCES

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
- [1] Alvar J, Aparicio P, Aseffa A, Den Boer M, Cañavate C, Dedet JP, Gradoni L, Ter Horst R, López-Vélez R, Moreno J. The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clin Microbiol Rev.* 2008;21:334-59.
- [2] WHO. Control of the Leishmaniases. Geneva, World Health Organization, 2010. WHO Technical Report Series. 2010;949.
- [3] Morales MA, Cruz I, Rubio JM, Chicharro C, Cañavate C, Laguna F, Alvar J. Relapses versus reinfections in patients coinfecting with *Leishmania infantum* and human immunodeficiency virus type 1. *J Infect Dis.* 2002;185:1533-7.
- [4] Kuhls K, Chicharro C, Cañavate C, Cortés S, Campino L, Haralambous C, Soteriadou K, Pratlong F, Dedet JP, Mauricio I, Miles M, Schaar M, Ochsenreither S, Radtke O, Schönian G. Differentiation and gene flow among European populations of *Leishmania infantum* MON-1. *PLoS Negl Trop Dis.* 2008;2:e261.
- [5] Gelanew T, Kuhls K, Hurissa Z, Weldegebreal T, Hailu W, Kassahun A, Abebe T, Hailu A, Schönian G. Inference of population structure of *Leishmania donovani* strains isolated from different Ethiopian visceral leishmaniasis endemic areas. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010;4:e889.
- [6] Pratlong F, Dereure J, Deniau M, Marty P, Faraut-Gambarelli F, Dedet JP. Enzymatic polymorphism during *Leishmania*/HIV co-infection: a study of 381 *Leishmania* strains received between 1986 and 2000 at the international cryobank in Montpellier France. *Ann Trop Med Parasitol.* 2003;97:47-56.
- [7] Chicharro C, Jiménez MI, Alvar J. Izo-enzymatic variability of *Leishmania infantum* in Spain. *Ann Trop Med Parasitol.* 2003a;97:57-64.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
- [8] Martín-Sánchez J, Gramiccia M, Di Muccio T, Ludovisi A, Morillas-Márquez F. Isoenzymatic polymorphism of *Leishmania infantum* in southern Spain. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2004;98:228-32.
- [9] Toth G, Gaspari Z, Jurka J. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome Res.* 2000;10:967–81.
- [10] Ochsenreither S, Kuhls K, Schaar M, Presber W, Schönian G. Multilocus microsatellite typing as a new tool for discrimination of *Leishmania infantum* MON-1 strains. *J Clin Microbiol.* 2006;44:495-503.
- [11] Schönian G, Kuhls K, Mauricio IL. Molecular approaches for a better understanding of the epidemiology and population genetics of *Leishmania*. *Parasitology* 2011;138:405-25.
- [12] Piarroux R, Azaiez R, Lossi AM, Reynier P, Muscatelli F, Gambarelli F, Fontes M, Dumon H, Quilici M. Isolation and characterization of a repetitive DNA sequence from *Leishmania infantum*: development of a visceral leishmaniasis polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg.* 1993;49:364-9.
- [13] Fisa R, Riera C, Ribera E, Gállego M, Portús M. A nested polymerase chain reaction for diagnosis and follow-up of human visceral leishmaniasis patients using blood samples. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2002;96:191-4.
- [14] Goudet J, Perrin N, Waser P. Tests for sex-biased dispersal using bi-parentally inherited genetic markers. *Mol Ecol.* 2002;11:1103-14.
- [15] Goudet J. FSTAT (Version 1.2): a computer program to calculate F-statistics. *J Hered.* 1995;86:485-6.
- [16] Nei M, Chesser RK. Estimation of fixation indices and gene diversities. *Ann Hum Genet.* 1983;47:253-9.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
- [17] Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. 2000;155:945-59.
- [18] Evanno G, Regnaut S, Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol Ecol*. 2005;14:2611-20.
- [19] Garnier S, Alibert P, Audiot P, Prieur B, Rasplus JY. Isolation by distance and sharp discontinuities in gene frequencies: implications for the phylogeography of an alpine insect species, *Carabus solieri*. *Mol Ecol*. 2004;13:1883-97.
- [20] Chicharro C, Alvar J. Lower trypanosomatids in HIV/AIDS patients. *Ann Trop Med Parasitol*. 2003b;97:75-8.
- [21] Hide M, Marion E, Pomares C, Fisa R, Marty P, Bañuls AL. Parasitic genotypes appear to differ in leishmaniasis patients compared with asymptomatic related carriers. *Int J Parasitol*. 2013;43:389-97.
- [22] Cortés S, Maurício IL, Kuhls K, Nunes M, Lopes C, Marcos M, Cardoso L, Schönian G, Campino L. Genetic diversity evaluation on Portuguese *Leishmania infantum* strains by multilocus microsatellite typing. *Infect Genet Evol*. 2014;26:20-31.
- [23] Montoya L, Gállego M, Gavignet B, Piarroux R, Rioux JA, Portús M, Fisa R. Application of microsatellite genotyping to the study of a restricted *Leishmania infantum* focus: different genotype compositions in isolates from dogs and sand flies. *Am J Trop Med Hyg*. 2007;76:888-95.
- [24] Rogers MB, Downing T, Smith BA, Imamura H, Sanders M, Svobodova M, Volf P, Berriman M, Cotton JA, Smith DF. Genomic confirmation of hybridisation and recent inbreeding in a vector-isolated *Leishmania* population. *PLoS Genet*. 2014;10:e1004092.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
- [25] Campino L, Santos-Gomes G, Pratlong F, Dedet JP, Abranches P. The isolation of *Leishmania donovani* MON-18, from an AIDS patient in Portugal: possible needle transmission. *Parasite*. 1994;1:391-2.
- [26] Cruz I, Morales MA, Noguer I, Rodríguez A, Alvar J. *Leishmania* in discarded syringes from intravenous drug users. *Lancet*. 2002;359:1124-5.
- [27] Gouzelou E, Haralambous C, Antoniou M, Christodoulou V, Martinković F, Živičnjak T, Smirlis D, Pratlong F, Dedet JP, Özbel Y, Toz SÖ, Presber W, Schönian G, Soteriadou K. Genetic diversity and structure in *Leishmania infantum* populations from southeastern Europe revealed by microsatellite analysis. *Parasit Vectors*. 2013;5:342.
- [28] Molina I, Fisa R, Riera C, Falcó V, Elizalde A, Salvador F, Crespo M, Curran A, López-Chejade P, Tebar S, Pérez-Hoyos S, Ribera E, Pahissa A. Ultrasensitive real-time PCR for the clinical management of visceral leishmaniasis in HIV-Infected patients. *Am J Trop Med Hyg*. 2013;89:105-10.
- [29] Motoie G, Ferreira GE, Cupolillo E, Canavez F, Pereira-Chioccola VL. Spatial distribution and population genetics of *Leishmania infantum* genotypes in São Paulo State, Brazil, employing multilocus microsatellite typing directly in dog infected tissues. *Infect Genet Evol*. 2013;18:48-59.
- [30] Bulle B, Millon L, Bart JM, Gállego M, Gambarelli F, Portús M, Schnur L, Jaffe CL, Fernandez-Barredo S, Alunda JM, Piarroux R. Practical approach for typing strains of *Leishmania infantum* by microsatellite analysis. *J Clin Microbiol*. 2002;40:3391-7.
- [31] Jamjoom MB, Ashford RW, Bates PA, Kemp SJ, Noyes HA. Towards a standard battery of microsatellite markers for the analysis of the *Leishmania donovani* complex. *Ann Trop Med Parasitol*. 2002;96:265-70.

[32] Rossi V, Wincker P, Ravel C, Blaineau C, Pages M, Bastien P. Structural organization of microsatellite families in the *Leishmania* genome and polymorphisms at two (CA)_n loci. Mol Biochem Parasitol. 1994;65:271-82.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

P	Patient stocks	Sex	Age	Risk factor	CD4	Viral charge	Date of specimen (in months)*	Clinical Episode	Sample Type	WHO Code	Genotype (G)	Cluster (C)
1	1a	Man	30	IVDU	364	330	June '00	R	PBMC	MHOM/ES/00/BCN-278	G14	C2b
	1b				297	5300	8m	R	PBMC	MHOM/ES/01/BCN-376	G13	C2b
	1c				187	50	20m	R	PBMC	MHOM/ES/02/BCN-464	G15	C2b
2	2a	Man	44	IVDU	20	nd	July '00	R	BM	MHOM/ES/00/BCN-284	G3	C1
	2b				54	<80	2m	R	BM	MHOM/ES/00/BCN-289	G2	C1
	3a	Man	36	nd	36	80	May '01	F	BM	MHOM/ES/01/BCN-404	G16	C2
3	3b				40	80	7m	M	PBMC	MHOM/ES/01/BCN-455	G16	C2
	3c				39	80	12m	R	BM	MHOM/ES/02/BCN-492	G16	C2
	4a	Man	34	IVDU	24	290000	April '02	R	BM	MHOM/ES/02/BCN-475	G9	C2
4	4b				15	2000000	6m	R	BM	MHOM/ES/02/BCN-508	G9	C2
	5a	Man	36	IVDU	nd	nd	September '94	F	BM	MHOM/ES/94/BCN-123	G10	C2
	5b				nd	nd	5m	R	BM	MHOM/ES/95/BCN-130	G1	-
6	6a	Man	33	IVDU	nd	nd	October '00	R	BM	MHOM/ES/00/BCN-298	G11	C2
	6b				nd	nd	6m	R	BM	MHOM/ES/01/BCN-400	G5	C2
	6c				nd	nd	17m	R	BM	MHOM/ES/02/BCN-470	G12	C2
7	7a	Man	41	nd	200	0	October '01	R	PBMC	MHOM/ES/01/BCN-430	G7	C2a
	7b				200	0	3m	M	BM	MHOM/ES/02/BCN-460	G7	C2a
	7c				200	nd	4m	R	PBMC	MHOM/ES/02/BCN-472	G6	C2a
8	8a	Woman	27	IVDU	72	50000	October '00	F	PBMC	MHOM/ES/00/BCN-293	G4	C2
	8b				169	nd	1m	M	PBMC	MHOM/ES/00/BCN-306	G7	C2a
	8c				nd	nd	1m+6days	M	PBMC	MHOM/ES/01/BCN-307	G8	C2
8d				126	22000	3m	M	PBMC	MHOM/ES/01/BCN-369	G16	C2	
8e				70	80	7m	R	PBMC	MHOM/ES/01/BCN-405	G18	C2	
8f				33	nd	9m	M	PBMC	MHOM/ES/01/BCN-422	G17	C2	
8g				315	nd	29m	M	PBMC	MHOM/ES/03/BCN-561	G16	C2	

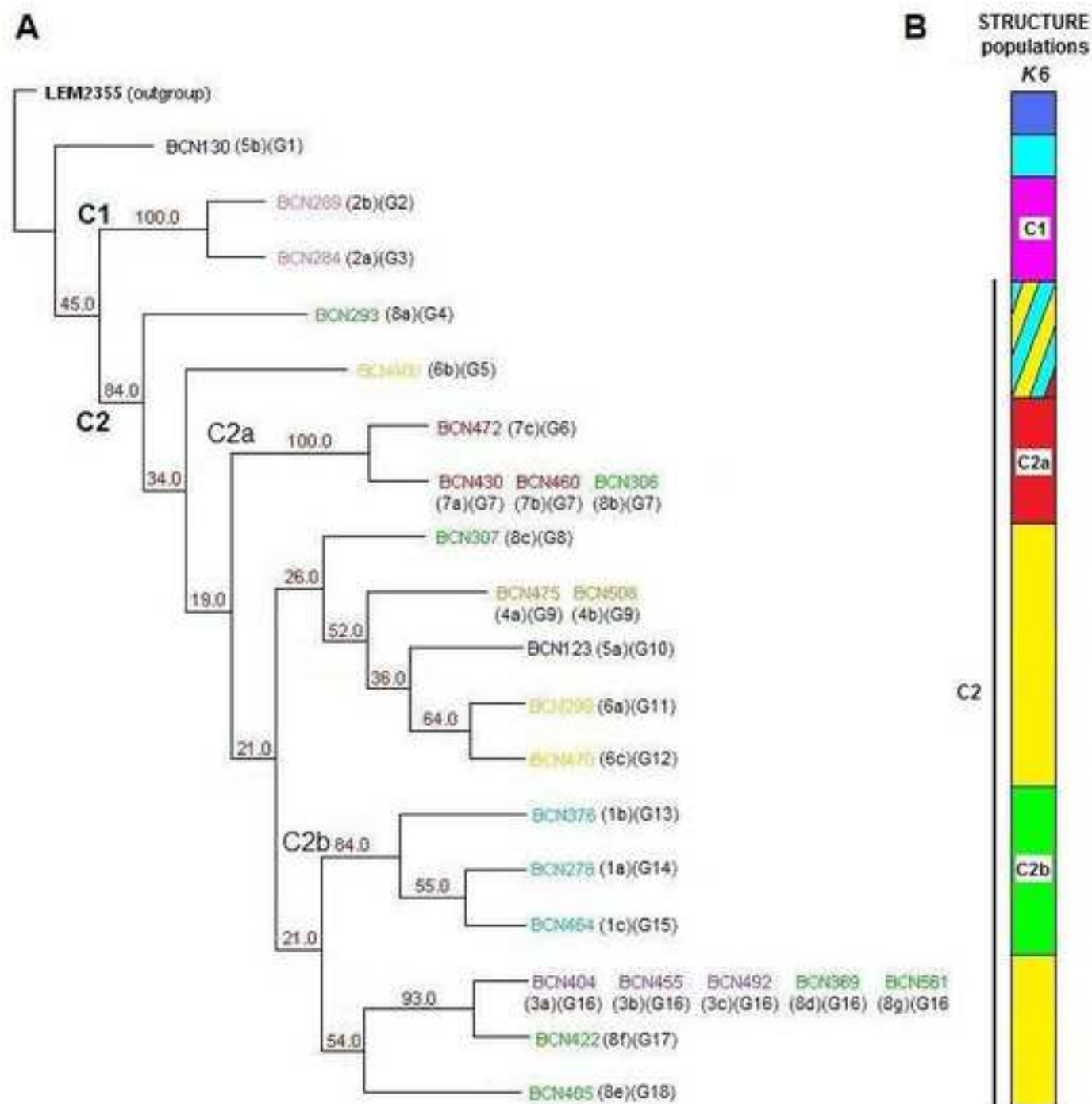
* Time from first specimen; IVDU: intravenous drug user; nd: not determined; VL: visceral leishmaniasis; CL: cutaneous leishmaniasis; M: monitoring non relapsing episode; R: clinical relapse episode; PBMC: peripheral blood mononuclear cell; BM: bone marrow.

Table 1. Identification of the 25 *Leishmania* isolates used in this study from 8 *Leishmania/HIV* co-infected patients obtained during VL first episode, clinical relapse episode or monitoring period, from bone marrow or peripheral blood mononuclear cell samples; and their genotyping and clustering analysis results.

Locus	GenBank accession no.	Allele size (bp)	Dye label	T_a (°C)	N_a	H_s	H_o
Li22-35 §	AM050045	90-106	VIC	58	5	0.191	0.042
Li45-24 §	AM050048	88-108	NED	58	5	0.208	0.060
Li71-5/2 §	AM050050	104-108	VIC	54	3	0.280	0.042
Li72-20 §	AM050057	87-95	VIC	50	4	0.275	0.042
LiBTA *	nd	226-246	VIC	58	4	0.316	0.167
LiBTG *	nd	219-257	6-FAM	58	7	0.340	0.104
LIST7021 ◇	AF427869	228-246	6-FAM	54	6	0.338	0.143
LIST7024 ◇	AF427872	198-224	VIC	59	3	0.049	0.000
LIST7025 ◇	AF427873	171-179	6-FAM	56	1	0.000	0.000
LIST7026 ◇	AF427874	201-231	NED	56	4	0.089	0.000
LIST7028 ◇	AF427876	104-108	VIC	58	2	0.049	0.000
LIST7031 ◇	AF427879	166-174	PET	54	1	0.000	0.000
LIST7033 ◇	AF427881	196-226	6-FAM	58	5	0.349	0.411
LIST7035 ◇	AF427883	188-202	PET	56	6	0.373	0.146
LIST7037 ◇	AF427885	178-194	6-FAM	58	5	0.320	0.411
LIST7038 ◇	AF427886	122-130	NED	56	3	0.088	0.000
LIST7039 ◇	AF427887	199-215	PET	58	5	0.128	0.143
Rossi1 ■	X76394	104-110	6-FAM	59	3	0.100	0.000
Rossi2 ■	X76393	140-160	VIC	57	6	0.335	0.185
TubCA §	nd	74-84	6-FAM	58	2	0.100	0.000
Mean value					4	0.196	0.095

T_a : annealing temperature (thermocycling conditions); N_a : number of alleles; H_s : Nei's unbiased genetic diversity within subsamples; H_o : observed heterozygosity (Nei & Chesser, 1983); *Bulle, 2002 [30]; Hide, 2013 [21]; ◇Jamjoon, 2002 [31]; § Ochsenreither, 2006 [10]; ■ Rossi, 1994 [32].

Table 2. Characteristics of the 20 microsatellite loci used in this study for *Leishmania infantum* genotyping.



RESULTADOS ARTÍCULO 3

Figure 1. Phylogenetic analysis of *Leishmania* samples from HIV/*Leishmania* patients, by neighbor-joining tree inferred from the D_{AS} distances calculated from the data of 20 microsatellite markers performed on 25 *Leishmania infantum* samples. Two main populations or clusters (C1 and C2) were detected between *Leishmania* samples from 8 analyzed patients.

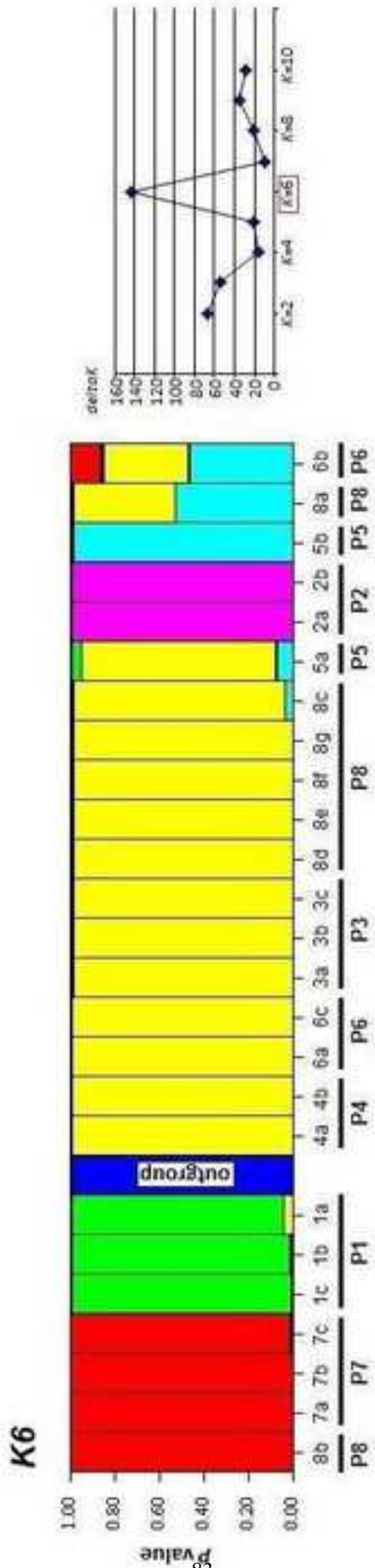


Figure 2. Population structure of the 25 *L. infantum* samples coming from HIV/*Leishmania* co-infected patients as inferred by STRUCTURE software on the basis of 20 microsatellite data. The peak at $K=6$ represents the most probable number of populations; vertical bars represent each analyzed stock divided into K colors.

4. DISCUSIÓN

4. DISCUSIÓN

Los trabajos presentados en esta tesis doctoral se han basado en el uso, diseño y optimización de herramientas moleculares para facilitar el diagnóstico de las leishmaniosis humanas y de reservorios animales, así como para favorecer el conocimiento del agente causal a nivel interespecífico e intraespecífico. En los últimos años, las técnicas moleculares han revolucionado el mundo del diagnóstico de las enfermedades parasitarias, y a su vez, han permitido avanzar en el conocimiento de los parásitos y su genética de poblaciones ofreciendo grandes ventajas sobre las técnicas clásicas por su rapidez, especificidad y sensibilidad.

Las técnicas moleculares basadas en la PCR se han mostrado útiles para la caracterización de *Leishmania* a nivel de especie mediante variantes como la PCR-RFLP o las técnicas qPCR con cebadores y/o sondas específicas. El primer objetivo de nuestro estudio ha ido dirigido a mejorar el diagnóstico de las leishmaniosis cutáneas del área Mediterránea diseñando herramientas moleculares para el genotipado interespecífico de *Leishmania* spp, que faciliten la tipación a nivel de especie, fundamentalmente sobre muestras biológicas de pacientes de zonas endémicas dónde distintas especies de *Leishmania* pueden coexistir.

La caracterización mediante isoenzimas o MLEE ha sido la metodología más utilizada para el genotipado de *Leishmania* spp, técnica capaz de tipar a nivel de especie y también de cepa, aunque su alcance a nivel intraespecífico ha resultado ser poco discriminativo (Pratlong *et al.*, 2003; Schönian *et al.*, 2011). Sin embargo, el desarrollo de técnicas basadas en la PCR ha presentado ventajas respecto al MLEE, entre ellas la facilidad y rapidez en el desarrollo del análisis, ya que no precisan del aislamiento del parásito por cultivo debido a su mayor sensibilidad. Entre ellas encontramos PCRs específicas a nivel de especie, que utilizan cebadores y/o sondas específicas (Salotra *et al.*, 2001; Fisa *et al.*, 2002; Jirkù *et al.*, 2006; Laurent *et al.*, 2009); técnicas de HRM, que realizan la caracterización interespecífica basándose en diferencias en las temperaturas de disociación, temperaturas que se han mostrado muy próximas para todas las especies de *Leishmania*, por lo que deben analizarse cuidadosamente para evitar errores de interpretación de los resultados (Nasereddin y Jaffe, 2010; Talmi-Frank

et al., 2010; Schönian *et al.*, 2011); o técnicas PCR-RFLP que por su simplicidad y fácil aplicabilidad en los laboratorios, y aplicadas a distintas secuencias como el gen ribosómico 7SL (Azmi *et al.*, 2010; Nasereddin y Jaffe, 2010), los genes gp63 y hsp70 (Victoir *et al.*, 1998; García *et al.*, 2004; Zelazny *et al.*, 2005; Fraga *et al.*, 2010) y la secuencia ribosómica ITS-1 (Schönian *et al.*, 2003; 2011; Kuhls *et al.*, 2005; Dweik *et al.*, 2007) han resultado sensibles y específicas.

En nuestro estudio (**3.1. Artículo 1: Tomás-Pérez *et al.*, 2013**), se ha optimizado un método para el tipado interespecífico de *Leishmania* spp basado en la lectura del tamaño de fragmentos marcados con fluorescencia para facilitar la discriminación de especies, metodología que ha sido denominada PCR-FFL (*PCR-Fluorescent Fragment Length Analysis*), y que había sido utilizada en el diagnóstico diferencial de otros tripanosomátidos y de diferentes organismos, como algas o larvas de anisákidos (Adams *et al.*, 2008; Hamilton *et al.*, 2008; Espiñeira *et al.*, 2010; Herrero *et al.*, 2010). En nuestro trabajo se ha evaluado la metodología PCR-FFL y se ha comparado con la metodología PCR-RFLP. Las secuencias diana seleccionadas han sido las secuencias ribosómicas ITS-1 y 7SL, previamente utilizadas por diversos autores mediante PCR-RFLP en el diagnóstico diferencial de *Leishmania* spp (Zelazny *et al.*, 2005; Nasereddin y Jaffe, 2010).

La optimización de la técnica de PCR-FFL para su uso sobre ambas secuencias se ha realizado utilizando cepas de *Leishmania* previamente tipadas a nivel de especie. Como han indicado los resultados obtenidos, la metodología ha permitido diferenciar las especies de *Leishmania* estudiadas obteniendo un patrón definido para cada especie, que corresponde al tamaño del fragmento analizado en pares de bases (pb) y que se ha expresado en forma de un rango de valores para cada una de las especies analizadas. La metodología PCR-FFL ha presentado una serie de ventajas importantes a nivel metodológico, como son la simplicidad y exactitud en la lectura de los resultados, gracias a la automatización del análisis, en comparación con el uso de geles de agarosa usados en la PCR-RFLP. La capacidad de la metodología PCR-FFL de discriminar a nivel de una sola base nos ha indicado, además, el posible potencial de la técnica de permitir diferenciar a nivel de aislados de *Leishmania*.

El estudio de las secuencias ITS-1 y 7SL mediante PCR-FFL nos ha permitido separar las principales especies presentes en el área Mediterránea: *L. major*, *L. tropica* y *L.*

infantum. Sin embargo, no han permitido la diferenciación entre *L. infantum* y *L. donovani*, observación que ha coincidido con la de otros autores aplicando PCR-RFLP (Schönian *et al.*, 2003; Zelazny *et al.*, 2005). La secuencia 7SL no ha permitido diferenciar *L. tropica* de las demás especies del Nuevo Mundo, mientras que la secuencia ITS-1 ha presentado una mayor capacidad discriminadora en este sentido. Ninguna de las dos secuencias ha podido separar las especies del Nuevo Mundo entre ellas, por lo que en el caso de realizarse el análisis de las especies presentes en estas zonas endémicas sería preciso buscar otras dianas.

Las muestras con las que habitualmente se realiza el diagnóstico de la LC son la biopsia de la lesión (procedimiento habitual aunque presenta inconvenientes al tratarse de un método invasivo) o bien el raspado o aspirado del exudado de la lesión cutánea. Sin embargo, en diferentes estudios se han señalado las ventajas de recoger muestras de lesiones cutáneas obtenidas a partir del exudado de la lesión sobre papel de filtro. La obtención de exudado es un procedimiento fácil, no cruento ni doloroso, que evita la necesidad de biopsiar la lesión, siendo ésta especialmente difícil en niños y pudiendo dejar cicatrices. La aplicación de técnicas de PCR para el diagnóstico sobre muestras recogidas en papel de filtro ha sido ensayada por diferentes autores indicando resultados similares en sensibilidad a los registrados con el uso de biopsias, validando su utilización. Por otra parte, las muestras han presentado la ventaja de su gran estabilidad, ya que permiten ser guardadas a temperatura ambiente sin condiciones especiales de conservación (Schönian *et al.*, 2003; Boggild *et al.*, 2011; Pujol *et al.*, 2012).

La aplicación de la metodología PCR-FFL sobre muestras biológicas ha permitido observar su utilidad diagnóstica y su capacidad discriminadora. En este primer trabajo, una vez optimizada la metodología PCR-FFL y con el objetivo de determinar su aplicabilidad sobre muestra biológica, se ha realizado el estudio en paralelo con la PCR-RFLP utilizando ambas secuencias dianas en ambas técnicas. Los ensayos se han realizado con biopsias de piel (fresca o incluida en bloque de parafina) y papeles de filtro impregnados con el exudado de las lesiones obtenidas de pacientes con LC de Barcelona y Mallorca y de otras zonas geográficas (Marruecos, Israel, Jordania y Mauritania). El estudio ha señalado de forma global una mayor sensibilidad con la tecnología PCR-FFL (94,4% para 7SL y 83,3% para ITS-1) respecto a la PCR-RFLP (80,6% 7SL y 75% ITS-1), siendo la PCR-FFL en 7SL el método que ha aportado una

mayor sensibilidad, por lo que la técnica diseñada mejora la sensibilidad del diagnóstico además de simplificar la metodología.

De este estudio, se puede concluir que el uso de la PCR-FFL con ambas dianas sobre biopsia de piel o bien utilizando papeles de filtro impregnados con exudado de la lesión representa una buena metodología para el diagnóstico y tipado interespecífico de las LC en la cuenca Mediterránea por su especificidad, exactitud, objetividad, elevada sensibilidad y rapidez en la obtención de los resultados, ya que no requiere de un cultivo *in vitro* previo de la muestra para aislar el parásito.

El uso conjunto de técnicas moleculares cuantitativas de alta sensibilidad, como la qPCR, para el diagnóstico de *Leishmania*, y de técnicas moleculares que permiten el tipado interespecífico del parásito sobre muestras biológicas, ha facilitado la detección de la infección en los individuos parasitados, la cuantificación de la carga parasitaria y la identificación específica del agente causal. Estas metodologías se han presentado adecuadas para mejorar el conocimiento de los hospedadores y los vectores implicados en el ciclo biológico de *Leishmania* en las distintas áreas endémicas.

En los focos de leishmaniosis zoonótica, además del reservorio principal, para una determinada especie de *Leishmania* pueden verse involucrados otros mamíferos, que pueden actuar como huéspedes secundarios y participar en el mantenimiento del foco endémico. Los estudios dirigidos a la detección de posibles nuevos reservorios han sido de gran interés por la nueva información aportada en la ecoepidemiología de la enfermedad. La mayoría de estudios epidemiológicos se han realizado mediante análisis serológicos que posibilitan detectar la presencia de anticuerpos específicos indicando contacto con el parásito, pero no permiten diferenciar si se trata de una infección actual o pasada, ni conocer la especie causante de la respuesta inmune. Por esta razón, en los últimos años los estudios epidemiológicos han ido encaminados, también, a la confirmación de la infección mediante métodos directos o de biología molecular (Boudrissa *et al.*, 2011). Las técnicas moleculares han mostrado ser una herramienta fundamental por su elevada sensibilidad y especificidad. Varias técnicas diagnósticas basadas en la PCR y en sus variantes, como la PCR anidada, la PCR-ELISA, la OC-PCR o la qPCR, se han utilizado en el diagnóstico tanto de las formas sintomáticas

como asintomáticas de leishmaniosis en el hombre (Fisa *et al.*, 2002; Riera *et al.*, 2004b; 2008), así como en estudios epidemiológicos para la detección del parásito en el reservorio y el vector. Estos métodos moleculares no sólo han servido para confirmar la infección, sino que también han permitido realizar una identificación del parásito a nivel específico (ver 3.1. Artículo 1) y conocer qué reservorios o vectores se encuentran implicados en el ciclo biológico de una especie parásita en concreto.

En la región de M'sila, situada en Argelia, existe actualmente un foco importante de LC causado por *L. major*, cuya epidemiología está siendo aún estudiada (Belazzoug, 1982; Harrat *et al.*, 1996; Achour Barchiche y Madiou, 2009). Los reservorios conocidos en esta área son roedores de las especies *Psammomys obesus* y *Meriones shawi* (Belazzoug, 1983; 1986), aunque el aumento de los casos de LC en los últimos años ha hecho sospechar la probable implicación de otros animales, entre ellos los erizos, como posibles reservorios del parásito. Los erizos están ampliamente distribuidos por todo el Norte de África incluyendo la zona de M'sila (Khaldi *et al.*, 2012), por lo que podrían estar implicados en la epidemiología de este foco de LC zoonótica. Las principales especies presentes son el erizo norafricano *Atelerix algirus* y el erizo del desierto *Paraechinus aethiopicus*. El papel de los erizos como posibles reservorios de *Leishmania* había sido denunciado en trabajos anteriores en la ex-URSS (Petrisceva, 1971; Faizulin *et al.*, 1975), y recientemente en España con la detección de ADN de *L. infantum* en el pelo de un erizo (Muñoz-Madrid *et al.*, 2013). Posteriormente a la publicación de nuestro artículo (Tomás-Pérez *et al.*, 2014), otros autores también han podido confirmar la parasitación por *L. major* en ejemplares de erizos en Irán (Rouhani *et al.*, 2014).

El desconocimiento existente respecto al papel de los erizos en el ciclo de *Leishmania* en esta zona endémica ha motivado estudiar la presencia de anticuerpos específicos en estos animales y determinar la presencia de *Leishmania* aplicando técnicas moleculares altamente sensibles de cuantificación mediante qPCR, y tipificación molecular a nivel de especie por PCR-FFL (ver 3.1. Artículo 1). Paralelamente, el estudio de seroprevalencia se ha realizado mediante una técnica ELISA *in house* y la técnica de *Western Blot* (WB) con antígeno total de *Leishmania*, ambos métodos utilizados en estudios anteriores sobre el reservorio canino y otros reservorios (Aisa *et al.*, 1998; Riera *et al.*, 1999; Sobrino *et al.*, 2008), para determinar el contacto de estos animales con el parásito.

Los datos de este estudio quedan reflejados en el apartado **3.2. Artículo 2: Tomás-Pérez *et al.*, 2014**. Se ha podido observar la presencia de una elevada seroprevalencia tanto por ELISA (20,8%) como por WB (29,2%) en las dos especies de erizos presentes en la zona, lo que ha indicado la existencia de contacto pasado o presente de estos animales con *Leishmania*. Por otra parte, los estudios de detección de ADN de *Leishmania* en muestras de sangre, piel sana de oreja y bazo de estos erizos, nos han indicado mediante qPCR que en un 12,5% de las muestras de piel y bazo se encontraba presente el parásito, permitiendo confirmar la infección activa de los erizos en el momento del estudio, mientras que no se ha podido detectar su presencia en sangre. Se ha observado que sólo en uno de los animales qPCR positivos se detectó la presencia de anticuerpos específicos, siendo esta baja respuesta humoral probablemente debida a la cepa infectante y/o a la propia respuesta inmune de los erizos. Este comportamiento ha sido ya denunciado anteriormente en estudios con perros considerados portadores asintomáticos (Berrahal *et al.*, 1996; Iniesta *et al.*, 2002), así como en humanos en población sana de área endémica que también habían mostrado esta discordancia entre serología y PCR (Riera *et al.*, 2008; Michel *et al.*, 2011).

Los resultados globales han hallado infección en ambas especies estudiadas, siendo *P. aethiopicus* la especie que ha registrado una mayor positividad por qPCR a pesar de que disponíamos de un bajo número de ejemplares, siendo ésta una posible variable que ha podido influir en los resultados obtenidos. Podemos suponer que los porcentajes de positividad habrían sido mayores si los animales hubieran sido capturados después de la época de transmisión vectorial septiembre-octubre. Por el contrario, en nuestro estudio los animales han sido capturados entre los meses de abril y junio, con sólo una captura en el mes de septiembre que ha sido positiva en piel y bazo mediante qPCR. La detección y cuantificación de ADN del parásito en diferentes tejidos del animal ha indicado que *Leishmania* visceraliza en estos animales infectados, detectándose la mayor concentración del parásito en piel sana. La falta de datos sobre la carga parasitaria en tejidos de los reservorios conocidos *P. obesus* y *M. shawi* de la misma zona endémica no ha permitido realizar comparaciones en este sentido.

El genotipado de *Leishmania* es importante para conocer el papel de los erizos en el foco. En Argelia coexisten cuatro especies del parásito causantes de LC: *L. infantum*, *L. major*, *L. tropica* y una especie de *Leishmania* próxima a *L. killicki* (Belazzoug 1982; 1983; Harrat *et al.*, 1996; 2009; Benikhlef *et al.*, 2004; Mihoubi *et al.*, 2008), siendo *L.*

major la especie detectada anteriormente en estudios epidemiológicos de LC realizados en nuestra zona de estudio, y por tanto, la que se esperaba detectar en los erizos estudiados mediante la identificación interespecífica (Belazzoug 1982; 1983). Para el análisis de genotipado se ha escogido la técnica de PCR-FFL previamente optimizada (3.1. Artículo 1: Tomás-Pérez *et al.*, 2013). La metodología ha permitido identificar la especie *L. major* directamente sobre muestra de piel sana de un ejemplar de *A. algirus* que presentaba una carga parasitaria significativa registrada mediante qPCR. Sin embargo, en las muestras con bajas tasas de ADN del parásito, como las detectadas en bazo, ha sido necesario aplicar técnicas más sensibles basadas en una doble amplificación del ADN. La presencia de tasas bajas de ADN ya había sido citada en otros reservorios silvestres en este tipo de muestras (Chitimia *et al.*, 2011, Millán *et al.*, 2011). Con el objetivo de aumentar la sensibilidad del análisis y llegar a tipar todas las muestras, se ha realizado una nested-PCR de la región ADN_k altamente sensible (Noyes *et al.*, 1998), que ha permitido la identificación de *L. major* en todas las muestras restantes tanto de piel como de bazo.

Controles sobre el roedor *P. obesus*, principal reservorio de *L. major*, realizados con anterioridad en la zona endémica de M'sila, habían conseguido reducir hasta un 31% los casos de LC en humanos retirando las quenopodiáceas, plantas que constituyen el único alimento de estos roedores (Cherif *et al.*, 2012). Como habían señalado diferentes estudios, una reducción del número de ejemplares del reservorio principal en una zona podría favorecer un aumento de la parasitación de otros reservorios en ésta, como *M. shawi* (Salah *et al.*, 2007; Ghawar *et al.*, 2011). Dado que los erizos se alimentan de artrópodos y moluscos, siendo las hormigas y los coleópteros su alimento preferido (Derdoukh *et al.*, 2012), las medidas de control realizadas sobre la vegetación de M'sila no deberían afectar a la población de estos animales en la zona, que junto a la disminución del reservorio principal, ha podido contribuir a la infección de estos erizos por *L. major*, con su posible participación en el ciclo biológico y en el mantenimiento del parásito.

Otros factores a tener en cuenta en los estudios epidemiológicos son las características climáticas y del terreno de la zona estudiada, que deben favorecer la coexistencia del vector y del reservorio. La infección detectada no necesariamente implica su capacidad para infectar al flebótomo vector, siendo necesarios estudios de xenodiagnóstico para evaluar la capacidad real del vector implicado en la transmisión en el foco endémico

para alimentarse e infectarse sobre estos animales. Sin embargo, cabe destacar que estudios realizados en Túnez permitieron detectar flebótomos en las madrigueras de estos animales, poniendo de manifiesto su coexistencia en un mismo nicho ecológico, lo que favorecería el contacto entre los erizos y los vectores (Dubrovsky, 1975); además, de la misma manera que en el vector, la mayor actividad observada en los erizos se produce al anochecer (Hoefler, 1994). Por ello, el estrecho contacto con las especies vectoras puede ayudar a explicar la infección detectada en estos erizos.

La detección de anticuerpos específicos en erizos del foco de M'sila ha mostrado que había existido contacto entre el parásito y el animal, pudiéndose confirmar la infección por la identificación de ADN de *Leishmania* mediante técnicas moleculares. De esta manera, se pone de manifiesto la importancia del uso combinado de diferentes técnicas moleculares y serológicas en estudios epidemiológicos sobre reservorios. El genotipado de *Leishmania* spp ha sido de gran utilidad en este estudio epidemiológico, permitiendo conocer el comportamiento y distribución del agente causal de LC zoonótica en este foco. La detección de *L. major* en los erizos estudiados representa la primera cita que incrimina los erizos como posibles reservorios de *L. major* en los focos de LC zoonótica. El conocimiento de los animales implicados en el ciclo biológico del parásito debe facilitar el control de la enfermedad con actuaciones dirigidas sobre éstos, y su detección e identificación es un primer paso importante para lograr frenar el avance de la parasitación.

Las técnicas moleculares permiten el análisis de marcadores de ADN específicos que facilitan la caracterización de *Leishmania* a nivel de cepa. Numerosas han sido las metodologías moleculares usadas que han permitido observar la elevada variabilidad intraespecífica existente (Schönian *et al.*, 2011). La caracterización de las cepas circulantes de *Leishmania infantum* en nuestra zona endémica es importante para mejorar el conocimiento sobre la dinámica de nuestros focos, así como para comprender la relación existente entre el agente causal y la clínica que pueden ocasionar en los individuos parasitados.

Durante los últimos veinticinco años, los estudios de variabilidad intraespecífica sobre aislados humanos se han realizado principalmente mediante técnicas de tipación

isoenzimática, pero su utilización presenta limitaciones como su bajo poder de discriminación, que suele dar lugar a una población mayormente MON-1 en el caso concreto de *L. infantum* (Pratlong *et al.*, 2003). El análisis de microsatélites polimorfos MLMT que ha sido utilizado en estudios genéticos y filogenéticos sobre diversas especies de tripanosomátidos de los géneros *Trypanosoma* y *Leishmania* (Rossi *et al.*, 1994; Oliveira *et al.*, 1999) ha conseguido separar diferentes poblaciones dentro de un mismo zimodema (Hide *et al.*, 2001; Bulle *et al.*, 2002; Ochsenreither *et al.*, 2006; Schönian *et al.*, 2011), derivando en un mayor uso de estos nuevos métodos en sustitución de la metodología clásica del MLEE (Pratlong *et al.*, 2003; Chicharro *et al.*, 2003; Martín-Sánchez *et al.*, 2004).

Estudios moleculares previos habían puesto de manifiesto la elevada variabilidad de genotipos de *L. infantum* que se encuentran en los aislados de pacientes con la co-infección *Leishmania*/VIH de la cuenca Mediterránea, en comparación con la poca variabilidad hallada en pacientes inmunocompetentes de la misma área geográfica (Kuhls *et al.*, 2008). Estos datos sugirieron que esta gran diversidad de genotipos podría estar relacionada con la patología, la tendencia a recaer de estos pacientes, y con la aparición de resistencias a los tratamientos convencionales, a pesar de seguir el tratamiento correctamente (Gramiccia *et al.*, 1995; Gramiccia, 2003; Pratlong *et al.*, 2003; Alvar *et al.*, 2008). La infección por VIH ha aumentado el riesgo de padecer LV en nuestras áreas endémicas. La introducción de la terapia HAART en Europa ha permitido observar un descenso de los casos de co-infección, además de un aumento de la supervivencia entre estos pacientes. Sin embargo, la terapia HAART no ha resultado ser tan efectiva en relación a la prevención de las recaídas de la enfermedad, detectándose entre un 38% y 70% de recaídas 24 meses después del tratamiento anti-*Leishmania* (Cruz *et al.*, 2006).

El objetivo de nuestro trabajo (**3.3. Artículo 3: Tomás-Pérez *et al.*, En revisión**) ha consistido en analizar la diversidad intraespecífica de *L. infantum* en nuestra zona endémica, mediante el estudio de sucesivos aislados del parásito obtenidos de pacientes co-infectados con *Leishmania*/VIH del área metropolitana de Barcelona que han presentado recaídas clínicas después del tratamiento. El análisis de esta variabilidad intraespecífica ha servido para caracterizar las cepas de *L. infantum* que circulan entre pacientes co-infectados de nuestra área endémica, y para estudiar la relación del agente etiológico con la evolución de la enfermedad.

Nuestro estudio se ha basado en la aplicación de la metodología MLMT sobre 25 aislados de *L. infantum* procedentes de 8 pacientes co-infectados, controlados entre 6 días y 29 meses, a partir del análisis de 20 microsatélites considerados polimorfos para *L. infantum* (Bulle *et al.*, 2002; Hide *et al.*, 2013). Los resultados han mostrado una gran diversidad entre los aislados, detectándose 18 genotipos distintos. Del estudio ha destacado la presencia de un bajo número de genotipos repetidos, con 15 genotipos únicos y sólo 3 repetidos en varias ocasiones, a pesar de tratarse de aislados procedentes de recaídas clínicas y seguimientos post-tratamiento de pacientes que presentaban como factor de riesgo la adicción a drogas por vía parenteral. Diferentes autores han asociado la elevada variabilidad de genotipos detectada en pacientes co-infectados con la posible transmisión de *Leishmania* de humano a humano mediante el uso compartido de jeringas contaminadas, dando lugar a una transmisión antroponótica dentro de un ciclo artificial del parásito (Campino *et al.*, 1994; Cruz *et al.*, 2002; Cortés *et al.*, 2014).

Como se ha comentado en apartados anteriores, es conocida la gran diversidad de genotipos de *Leishmania* en pacientes co-infectados con VIH, sin embargo, para conocer la variabilidad y abundancia genotípica real en nuestra zona endémica sería necesario ampliar el número de aislados de *Leishmania* analizados, no sólo de pacientes coinfectados, sino también de aislados de pacientes inmunocompetentes con LV, de aislados de pacientes con LC, y de aislados de los reservorios y del vector. Estudios realizados mediante MLMT en aislados del reservorio canino y del vector en la zona rural endémica de leishmaniosis del Priorat (Tarragona), no lejana de Barcelona, ya habían puesto de manifiesto una importante variabilidad con una distribución heterogénea entre el reservorio canino y los vectores (Montoya *et al.*, 2007).

Uno de los principales problemas que se suelen plantear durante la aparición de nuevos episodios clínicos en estos enfermos es confirmar si se trata de una nueva infección (reinfección) o de una recaída, debida a fallos terapéuticos o a la reactivación de otras cepas a causa de la existencia de infecciones múltiples. Estudios previos sobre pacientes co-infectados habían destacado la utilidad del análisis de microsatélites polimorfos para ayudar en la diferenciación entre reinfección y recaída, detectando en general un elevado porcentaje de recaídas entre estos pacientes (Kuhls *et al.*, 2008; Gelanew *et al.*, 2010; Cortés *et al.*, 2014). El análisis de los aislados de *Leishmania* y la clínica observada en los 8 pacientes co-infectados estudiados que recayeron clínicamente durante el periodo de estudio ha precisado un análisis individualizado de cada caso. La

detección de un elevado número de genotipos únicos podría ser interpretada de forma simple como reinfecciones por cepas distintas. Sin embargo, la variabilidad de genotipos observada debe ser interpretada de forma conjunta teniendo en cuenta otros criterios, entre ellos la proximidad genética entre genotipos y el tiempo transcurrido entre la obtención de los diferentes aislados. También es importante tener en cuenta las épocas de transmisión de la leishmaniosis en nuestra área endémica, la posible adicción a drogas por vía parenteral de los pacientes estudiados o la selección que puede conllevar el cultivo *in vitro* del parásito.

La determinación de la estructura filogenética mediante el análisis de las distancias genéticas para la construcción de un árbol filogenético y utilizando el modelo Bayesiano para el análisis poblacional, han permitido observar la distribución y asociación de los aislados entre ellos. De esta manera, en algunos pacientes se ha detectado una agrupación homogénea en el análisis de la estructura genética de sus aislados, que han sido idénticos, confirmando la existencia de recaídas producidas por una misma cepa. En otro grupo de pacientes se ha detectado una agrupación homogénea de sus aislados, siendo clasificados todos ellos dentro de una misma población con distancias genéticas muy próximas. Estos casos han llevado a considerar los episodios clínicos estudiados como probables recaídas en las que el parásito ha evolucionado en el interior del paciente. Por último, otro grupo de pacientes ha mostrado genotipos diversos con una distribución no homogénea del análisis de su estructura genética, cuya variabilidad entre los aislados de las recaídas clínicas no ha podido ser explicada por reinfecciones mediante la picada del flebótomo vector, ya que entre las fechas de sus aislados no ha existido ninguna época de transmisión, que en nuestra zona geográfica se produce entre finales de septiembre y principios de octubre (Morillas-Márquez *et al.*, 1991; Suárez *et al.*, 2012). Otra posibilidad de reinfección sería a través de jeringas contaminadas mediante el uso compartido de éstas entre los ADVP, mecanismo que otros autores habían descrito como una posible transmisión antroponótica del parásito (Morales *et al.*, 2002). Esta posibilidad podría haberse producido en nuestros pacientes ya que, según su historial clínico, la mayoría eran drogadictos por vía parenteral. Además deben considerarse otras posibilidades, como la inoculación inicial de varias cepas de *L. infantum* por parte del vector que han podido ser seleccionadas en el paciente por la respuesta inmunitaria o por la presión farmacológica, o bien ser tan sólo el reflejo de la selección que el cultivo "*in vitro*" puede conllevar (Zingales *et al.*, 2012). Destaca el

caso de un paciente ADVP en el que se han detectado 6 genotipos diferentes entre 8 aislados, en algunos casos con muy pocos días de diferencia durante su monitorización, hecho que podría explicarse por la selección que se puede llegar a producir durante el cultivo *in vitro*. Recientemente ha sido citada la posibilidad de realizar los estudios filogenéticos directamente sobre muestras de tejidos en perros infectados con *Leishmania* (Motoie *et al.*, 2013).

El análisis intraespecífico mediante MLMT de los aislados de *Leishmania* obtenidos de pacientes co-infectados ha indicado la gran diversidad de genotipos circulantes en nuestra zona endémica y ha permitido evidenciar que son diversas las posibilidades que permiten explicar las recaídas clínicas que aparecen en este tipo de pacientes. De los 25 aislados estudiados sólo en un bajo número de casos se ha podido confirmar la existencia de verdaderas recaídas por la detección del mismo genotipo. Sin embargo, en los casos en que se presenta una variabilidad genotípica no podemos señalar a las reinfecciones como la única hipótesis alternativa de esta variabilidad, sino que debemos contemplar la posibilidad de infecciones múltiples por diferentes genotipos, el propio comportamiento del parásito en el hospedador y la selección que se puede realizar a través del cultivo. La influencia que el cultivo podría tener en la selección de diferentes clones debería solventarse mediante la aplicación de técnicas más sensibles que nos permitieran realizar estos estudios de MLMT directamente sobre muestra biológica humana, de manera que se pudiera obviar esta previa selección.

5. CONCLUSIONS

5. CONCLUSIONS

The use of PCR-FFL for interspecific characterization of *Leishmania*.

- The PCR-FFL developed with ITS-1 and 7SL ribosomal sequences enabled the interspecific differentiation of the main *Leishmania* species in the Mediterranean area: *L. infantum*, *L. major* and *L. tropica*.
- The high sensitivity observed by PCR-FFL with both sequences on cutaneous lesions indicated that the methodology developed could be applied directly on biopsies or filter paper lesion impressions, without the need for strain isolation by *in vitro* culture.
- PCR-FFL based on the length analysis of DNA fluorescent fragments is a simple, quick, sensitive and easily standardized method, with a high reproducibility between different laboratories. Its automatized results, compared with the use of agarose gels in the PCR-RFLP, proved easier and faster to read, avoiding interpretation mistakes.

Epidemiological study of hedgehogs as possible new reservoir hosts of *Leishmania*.

- The detection of *Leishmania*-specific antibodies by ELISA (20.8%) and Western Blot (29.2%) indicated present or past contact of hedgehogs with the parasite; current infection was confirmed by qPCR in 12.5% of hedgehogs studied.
- *Paraechinus aethiopicus* registered a higher rate of infection, with 2/5 positives detected by qPCR, although this species only represented 26% of the total studied hedgehogs; the other species *Atelerix algirus* registered 1/19 positive individuals.
- The molecular methods for species identification, PCR-FFL and nested-PCR, identified the parasite as *L. major* in all qPCR positive healthy skin and spleen samples of both hedgehog species.

- Serological and molecular results confirm, for the first time, *L. major* infection in hedgehogs, and suggest that the hedgehog species *A. algirus* and *P. aethiopicus* play an epidemiological role as natural reservoir hosts of the parasite in the studied cutaneous leishmaniasis endemic area of Algeria.

MLMT intraspecific analysis of *L. infantum* samples in co-infected *Leishmania*/HIV patients.

- MLMT enabled the genetic characterization of the 25 *Leishmania infantum* samples belonging to 8 co-infected *Leishmania*/HIV patients and the follow-up isolates, showing 18 genotypes for the 20 loci studied.
- Clear electrophoregrams were obtained at all 20 loci investigated, with only one or two alleles per sample at each locus. 18 polymorphic microsatellite markers were found, with a mean number of alleles per locus (N_a) of 4.
- Of the 18 genotypes, 15 were unique in the total sample set, and only 3 (G7, G9 and G16) were repeated genotypes. G7 and G16 were the only genotypes that appeared in two different patients.
- The phylogenetic reconstruction by neighbor-joining tree and STRUCTURE analysis were useful to visualize sample distribution and genetic relationship.
- The analysis of *L. infantum* isolates and clinical data from ten clinical relapses allowed the evolution of the infection to be studied. Only two shared an identical genotype with corresponding samples taken during the primo infection, and therefore constituted confirmed relapse cases. In the other clinical relapses, the results revealed either slight or important genetic variation, suggesting either an evolution of the parasites in the patient, a mixed infection in the first infection stage with a differential selection by the parasite culture performed for the study, or a reinfection by another parasite.

6. BIBLIOGRAFÍA

6. BIBLIOGRAFÍA

- Abranches P., Silva-Pereira M.C., Conceição-Silva F.M., Santos-Gomes G.M., Janz J.G., 1991.** Canine leishmaniasis: pathological and ecological factors influencing transmission of infection. *J. Parasitol.*, **77**: 557-561.
- Achour Barchiche N., Madiou M., 2009.** Outbreak of cutaneous leishmaniasis: about 213 cases in the wilaya of Tizi-Ouzou. *Pathol. Biol.*, **57**: 65-70.
- Adams E., Hamilton P.B., Malele I., Gibson W.C., 2008.** The identification, diversity and prevalence of trypanosomes in field caught tsetse in Tanzania using ITS-1 primers and fluorescent fragment length barcoding. *Infect. Genet. Evol.*, **8**: 439-444.
- Adams E.R., Schoone G.J., Ageed A.F., Safi S.E., Schallig H.D., 2010.** Development of a reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the sensitive detection of *Leishmania* parasites in clinical samples. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **82**: 591-596.
- Aisa M.J., Castillejo S., Gallego M., Fisa R., Riera M.C., de Colmenares M., Torras S., Roura X., Sentis J., Portus M., 1998.** Diagnostic potential of Western blot analysis of sera from dogs with leishmaniasis in endemic areas and significance of the pattern. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **58**: 154-159.
- Akhavan A., Yaghoobi-Ershadi M., Mirhendi H., Alimohammadian M., Rassi Y., Shareghi N., Jafari R., Arandian M., Abdoli H., Ghanei M., Jalali-Zand N., Khamesipour A., 2010.** Molecular epizootiology of rodent leishmaniasis in a hyperendemic area of Iran. *Iran J. Public Health*, **39**: 1-7.
- Akman L., Aksu H.S., Wang R.Q., Ozensoy S., Ozbel Y., Alkan Z., Ozel M.A., Culha G., Ozcan K., Uzun S., Memisoglu H.R., Chang K.P., 2000.** Multi-site DNA polymorphism analyses of *Leishmania* isolates define their genotypes predicting clinical epidemiology of leishmaniasis in a specific region. *J. Eukaryot. Microbiol.*, **47**: 545-554.
- Akopyants N.S., Kimblin N., Secundino N., Patrick R., Peters N., Lawyer P., Dobson D.E., Beverley S., Sacks D.L., 2009.** Demonstration of genetic exchange during cyclical development of *Leishmania* in the sand fly vector. *Science*, **324**: 265-268.
- Al-Jawabreh A., Schnur L.F., Nasereddin A., Schwenkenbecher J.M., Abdeen Z., Barghuthy F., Khanfar H., Presber W., Schönian G., 2004.** The recent emergence of *Leishmania tropica* in Jericho (A'riha) and its environs, a classical focus of *L. major*. *Trop. Med. Int. Health*, **9**: 812-816.
- Al-Jawabreh A., Diezmann S., Müller M., Wirth T., Schnur L.F., Strelkova M.V., Kovalenko D.A., Razakov S.A., Schwenkenbecher J., Kuhls K., Schönian G., 2008.** Identification of geographically distributed sub-populations of *Leishmania (Leishmania) major* by microsatellite analysis. *BMC Evol. Biol.*, **8**: 183.
- Alam M.Z., Haralambous C., Kuhls K., Gouzou 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 Infect.*, **11**: 707-715.
- 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. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **73**: 276-280.
- Alvar J., Cañavate C., Molina R., Moreno J., Nieto J., 2004.** Canine leishmaniasis. *Adv. Parasitol.* **57**: 1-88.

- Alvar J., Aparicio P., Aseffa A., Den Boer M., Cañavate C., Dedet J.P., Gradoni L., Ter Horst R., López-Vélez R., Moreno J., 2008.** The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clin. Microbiol. Rev.*, **21**: 334-359.
- Amela C., Suarez B., Isidoro B., Sierra M.J., Santos S., Simón F., 2012.** Evaluación del riesgo de transmisión de *Leishmania infantum* en España. Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias sanitarias (CCAES), Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad, Madrid.
- Antinori S., Calattini S., Longhi E., Bestetti G., Piolini R., Magni C., Orlando G., Gramiccia M., Acquaviva V., Foschi A., Corvasce S., Colomba C., Titone L., Parravicini C., Cascio A., Corbellino M., 2007.** Clinical use of polymerase chain reaction performed on peripheral blood and bone marrow samples for the diagnosis and monitoring of visceral leishmaniasis in HIV-infected and HIV-uninfected patients: a single-center, 8-year experience in Italy and review of the literature. *Clin. Infect. Dis.*, **44**: 1602-1610.
- 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. *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**: 1933-1938.
- Aransay A.M., Testa J.M., Morillas-Marquez F., Lucientes J., Ready P.D., 2004.** Distribution of sandfly species in relation to canine leishmaniasis from the Ebro Valley to Valencia, northeastern Spain. *Parasitol. Res.*, **94**: 416-420.
- Artan R., Yilmaz A., Akçam M., Aksoy N.H., 2006.** Liver biopsy in the diagnosis of visceral leishmaniasis. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, **21**: 299-302.
- Ashford R.W., 1984.** Speculation on the origin and evolution of Old World *Leishmania* systems. In: Rioux GA, editor. *Leishmania*. Taxonomie et phylogénèse. Applications éco-épidémiologiques. Colloque International CNRS/IN-SERM/OMS 2-6 Juillet 1984. Montpellier: *IMEE*, **1986**: 257-264.
- Ashford R.W., 2000.** The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int. J. Parasitol.*, **30**: 1269-1281.
- Azmi K., Nasereddin A., Ereقات S., Schönian G., Abdeen Z., 2010.** Identification of Old World *Leishmania* species by PCR-RFLP of the 7 spliced leader RNA gene and reverse dot blot assay. *Trop. Med. Int. Health*, **15**: 872-880.
- Badaro R., Benson D., Eulalio M.C., Freire M., Cunha S., Netto E.M., Pedral-Sampaio D., Madureira C., Burns J.M., Houghton R.L., David J.R., Reed S.G., 1996.** Rk39, a cloned antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral leishmaniasis. *J. Inf. Dis.*, **173**: 758-761.
- Bandyopadhyay S., Chatterjee M., Pal S., Waller R.F., Sundar S., McConville M.J., Mandal C., 2004.** Purification, characterization of O-acetylated sialoglycoconjugates-specific IgM, and development of an enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis and follow-up of Indian visceral leishmaniasis patients. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, **50**: 15-24.
- Bañuls A.L., Bastien P., Pomares C., Arevalo J., Fisa R., Hide M., 2011.** Clinical pleiomorphism in human leishmaniasis, with special mention of asymptomatic infection. *Clin. Microbiol. Infect.*, **17**: 1451-1461.
- Barón S.D., Morillas-Márquez F., Morales-Yuste M., Díaz-Sáez V., Gállego M., Molina R., Martín-Sánchez J., 2013.** Predicting the risk of an endemic focus of *Leishmania tropica* becoming established in South-Western Europe through the presence of its main vector, *Phlebotomus sergenti* Parrot, 1917. *Parasitology*, **140**: 1413-1421.
- Basiye F.L., Mbuchi M., Magiri C., Kirigi G., Deborggraeve S., Schoone G.J., Saad A.A., El-Safi S., Matovu E., Wasunna M.K., 2010.** Sensitivity and specificity of the

- Leishmania* OligoC-TesT and NASBA-oligochromatography for diagnosis of visceral leishmaniasis in Kenya. *Trop. Med. Int. Health*, **15**: 806-810.
- Bastien P., Blaineau C., Pages M., 1992.** *Leishmania*: sex, lies and karyotype. *Parasitol. Today*, **8**: 174-177.
- Belazzoug S., 1982.** Une épidémie de leishmaniose cutanéé dans la région de M'sila (Algérie). *Bull. Soc. Pathol. Exot.*, **75**: 497-504
- Belazzoug S., 1983.** Isolation of *Leishmania major* Yakimoff, Schokhor, 1914 from *Psammomys obesus* Gretzschmar, 1828 (Rodentia: Gerbillidae) in Algeria. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **77**: 876.
- Belazzoug S., 1986.** *Leishmania infantum*, causative organism of visceral leishmaniasis at Biskra (Algeria). *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **80**: 1002-1003.
- Ben-Ismaïl R., Khaled S., Makni S., Ben Rachid M.S., 1989.** Anti-leishmanial antibodies during natural infection of *Psammomys obesus* and *Meriones shawi* (Rodentia, Gerbillinae) by *Leishmania major*. *Ann. Soc. Belg. Med. Trop.*, **69**: 35-40.
- Benikhlef R., Harrat Z., Toudjine M., Djerbouh A., Bendali-Braham S., Belkaid M., 2004.** Detection of *Leishmania infantum* MON-24 in the dog. *Med. Trop.*, **64**: 381-383.
- Berrahal F., Mary C., Roze M., Berenger A., Escoffier K., Lamouroux D., Dunan S., 1996.** Canine leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **55**: 273-277.
- Bettini S., Gradoni L., Pozio E., 1978.** Isolation of *Leishmania* strains from *Rattus rattus* in Italy. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **72**: 441-442.
- Bettini S., Gradoni L., 1986.** Canine leishmaniasis in the Mediterranean area and its implications for human leishmaniasis. *Insect. Sci. Applic.*, **7**: 241-245.
- Bhattarai N.R., Van der Auwera G., Khanal B., De Doncker S., Rijal S., Das M.L., Uranw S., Ostyn B., Praet N., Speybroeck N., Picado A., Davies C., Boelaert M., Dujardin J.C., 2009.** PCR and direct agglutination as *Leishmania* infection markers among healthy Nepalese subjects living in areas endemic for kala-azar. *Trop. Med. Int. Health*, **14**: 404-411.
- Blackwell J.M., 1992.** Leishmaniasis epidemiology: all down to the DNA. *Parasitology*, **104**: 19-34.
- Boggild A.K., Ramos A.P., Valencia B.M., Veland N., Calderon F., Arevalo J., Low D.E., Llanos-Cuentas A., 2011.** Diagnostic performance of filter paper lesion impression PCR for secondarily infected ulcers and nonulcerative lesions caused by cutaneous leishmaniasis. *J. Clin. Microbiol.*, **49**: 1097-1100.
- Boudrissa A., Cherif K., Kherrachi I., Benbetka S., Bouiba L., Boubidi S.C., Benikhlef R., Arrar L., Hamrioui B., Harrat Z., 2012.** Spread of *Leishmania major* to the north of Algeria. *Bull. Soc. Pathol. Exot.*, **105**: 30-35.
- Bourgeois N., Bastien P., Reynes J., Makinson A., Rouanet I., Lachaud L., 2010.** 'Active chronic visceral leishmaniasis' in HIV-1-infected patients demonstrated by biological and clinical long-term follow-up of 10 patients. *HIV Med.*, **11**: 670-673.
- 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. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **86**: 962-965.
- 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.

- Bulle B., Millon L., Bart J.M., Gállego M., Gambarelli F., Portús M., Schnur L., Jaffe C.L., Fernandez-Barredo S., Alunda J.M., Piarroux R., 2002.** Practical approach for typing strains of *Leishmania infantum* by microsatellite analysis. *J. Clin. Microbiol.* **40**: 3391-3397.
- Campino L., Santos-Gomes G., Pratlong F., Dedet J.P., Abranches P., 1994.** The isolation of *Leishmania donovani* MON-18, from an AIDS patient in Portugal: possible needle transmission. *Parasite*, **1**: 391-392.
- Carvalho F.A., Charest H., Tavares C.A., Matlashewski G., Valente E.P., Rabello A., 2002.** Diagnosis of American visceral leishmaniasis in humans and dogs using the recombinant *Leishmania donovani* A2 antigen. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, **43**: 289-295.
- 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. *Clin. Microbiol. Infect.*, **20**: 551-557.
- Castilho T.M., Shaw J.J., Floeter-Winter L.M., 2003.** New PCR assay using glucose-6-phosphate dehydrogenase for identification of *Leishmania* species. *J. Clin. Microbiol.*, **41**: 540-546.
- Chang K.P., Fong D., Bray R.S., 1985.** Biology of *Leishmania* and leishmaniasis. In *Leishmaniasis*, K.P. Chang and D. Bray eds. (Amsterdam: Elsevier), pp. 1-30.
- Chappuis F., Mueller Y., Nguimfack A., Rwakimari J.B., Couffignal S., Boelaert M., Cavaller P., Loutan L., Piola P., 2005.** Diagnostic accuracy of two rK39 antigen-based dipsticks and the formol gel test for rapid diagnosis of visceral leishmaniasis in northeastern Uganda. *J. Clin. Microbiol.* **43**: 5973-5977.
- Chappuis F., Rijal S., Jha U.K., Desjeux P., Karki B.M., Koirala S., Loutan L., Boelaert M., 2006.** Field validity, reproducibility and feasibility of diagnostic tests for visceral leishmaniasis in rural Nepal. *Trop. Med. Int. Health.*, **11**: 31-40.
- Cherif K., Boudrissa A., Cherif M.H., Harrat Z., 2012.** A social program for the control of zoonotic cutaneous leishmaniasis in M'Sila, Algeria [Article in French] *Sante Publique*, **24**: 511-522.
- Chicharro C., Jiménez M.I., Alvar J., 2003.** Iso-enzymatic variability of *Leishmania infantum* in Spain. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, **97**: 57-64.
- Chitimia L., Muñoz-García C.I., Sánchez-Velasco D., Lizana V., Del Río L., Murcia L., Fisa R., Riera C., Giménez-Font P., Jiménez-Montalbán P., Martínez-Ramírez A., Meseguer-Meseguer J.M., García-Bacete I., Sánchez-Isarria M.A., Sanchis-Monsonís G., García-Martínez J.D., Vicente V., Segovia M., Berriatua E., 2011.** Cryptic Leishmaniosis by *Leishmania infantum*, a feature of canines only? A study of natural infection in wild rabbits, humans and dogs in southeastern Spain. *Vet. Parasitol.*, **181**: 12-16.
- Colomba C., Saporito L., Vitale F., Reale S., Vitale G., Casuccio A., Tolomeo M., Maranto D., Rubino R., Di Carlo P., Titone L., 2009.** Cryptic *Leishmania infantum* infection in Italian HIV infected patients. *BMC Infect. Dis.*, **10**: 199.
- Cortés S., Rolao N., Ramada J., Campino L., 2004.** PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* S.L. specific kinetoplastid primers. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **98**: 12-17.
- Cortés S., Maurício I.L., Kuhls K., Nunes M., Lopes C., Marcos M., Cardoso L., Schönian G., Campino L., 2014.** Genetic diversity evaluation on Portuguese *Leishmania infantum* strains by multilocus microsatellite typing. *Infect. Genet. Evol.*, **26**: 20-31.

- Criado-Fornelio A., Gutierrez-Garcia L., Rodriguez-Caabeiro F., Reus-Garcia E., Roldan-Soriano M.A., Diaz-Sanchez M.A., 2000.** A parasitological survey of wild red foxes (*Vulpes vulpes*) from the province of Guadalajara, Spain. *Vet. Parasitol.*, **92**: 245-251.
- Cruz I., Morales M.A., Noguer I., Rodríguez A., Alvar J., 2002.** *Leishmania* in discarded syringes from intravenous drug users. *Lancet*, **359**: 1124-1125.
- Cruz I., Chicharro C., Nieto J., Bailo B., Cañavate C., Figueras M.C., Alvar J., 2006.** Comparison of new diagnostic tools for management of pediatric Mediterranean visceral leishmaniasis. *J. Clin. Microbiol.*, **44**: 2343-2347.
- Cupolillo E., Grimaldi G.Jr., Momen H., 1994.** A general classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **50**: 296-311.
- Cupolillo E., Grimaldi G.Jr., Momen H., Beverley S.M., 1995.** Intergenic region typing (IRT): a rapid molecular approach to the characterization and evolution of *Leishmania*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **73**: 145-155.
- Da Silva L.A., de Sousa Cdos S., da Graça G.C., Porrozzi 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. *Infect. Genet. Evol.*, **10**: 77-83.
- Da Silva D.T., Starke-Buzetti W.A., Alves-Martin M.F., Paixão Mdos. S., Tenório Mda. S., Lopes M.L., 2014.** Comparative evaluation of several methods for Canine Visceral Leishmaniasis diagnosis. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, **23**: 179-186.
- De Colmenares M., Portus M., Riera C., Gallego M., Aisa M.J., Torras S., Munoz C., 1995.** Short report: detection of 72-75-kD and 123-kD fractions of *Leishmania* antigen in urine of patients with visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **52**: 427-428.
- De Doncker S., Hutse V., Abdellati S., Rijal S., Singh Karki B.M., Decuypere S., Jacquet D., Le Ray D., Boelaert M., Koirala S., Dujardin J.C., 2005.** A new PCR-ELISA for diagnosis of visceral leishmaniasis in blood of HIV-negative subjects. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **99**: 25-31.
- De la Loma A., Alvar J., Martínez Galiano E., Blázquez J., Alcalá Muñoz A., Nájera R., 1985.** Leishmaniasis or AIDS? *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **79**: 421-422.
- De Vries P.J., van der Meide W.F., Godfried M.H., Schallig H.D., Dinant H.J., Faber W.R., 2006.** Quantification of the response to miltefosine treatment for visceral leishmaniasis by QT-NASBA. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **100**: 1183-1186.
- Deborggraeve S., Claes F., Laurent T., Mertens P., Leclipteux T., Dujardin J.C., Herdewijn P., Büscher P., 2006.** Molecular dipstick test for diagnosis of sleeping sickness. *J. Clin. Microbiol.*, **44**: 2884-2889.
- Del Olmo Martínez L., Aller de la Fuente R., Velayos Jiménez B., Fernández Salazar L., González Hernández J.M., 2009.** Visceral leishmaniasis diagnosed by duodenal biopsy [Article in Spanish]. *Rev. Esp. Enferm. Dig.*, **101**: 439-440.
- Derbali M., Chelbi I., Ben Hadj Ahmed S., Zhioua E., 2012.** *Leishmania major* Yakimoff et Schokhor, 1914 (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in *Meriones shawi* Duvernoy, 1842 (Rodentia: Gerbillidae): persistence of the infection in meriones and its infectivity for the sand fly vector (*Phlebotomus papatasi* Scopoli, 1786 (Diptera: Psychodidae) [Article in French]. *Bull. Soc. Pathol. Exot.*, **105**: 399-402.
- Derdoukh W., Guerzou A., Baziz-neffah F., Khoudour A., Dahou M., Abdelmalek M., Doumandji S., 2012.** Selection of preys by *Atelexis Algirus* in two stations of Mitidja (Algeria). *Int. J. Bio-Technology Research*, **2**: 51-62.
- Desjeux P., Bray R.S., Dedet J.P., Chance M., 1982.** Differentiation of canine and cutaneous leishmaniasis strains in Senegal. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **76**: 132-133.

- Desjeux P., 2004.** Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, **27**: 305–318.
- Dey A., Singh S., 2007.** Genetic heterogeneity among visceral and post-kala-azar dermal leishmaniasis strains from eastern India. *Infect. Genet. Evol.*, **7**: 219-222.
- Dikhit M.R., Moharana K.C., Sahoo B.R., Sahoo G.C., Das P., 2014.** LeishMicrosatDB: open source database of repeat sequences detected in six fully sequenced *Leishmania* genomes. *Database (Oxford)*, 2014.
- Dubrovsky Y.A., 1975.** Ecological causes of predominance of some mammals as reservoirs of *Leishmania tropica major* in Turanian deserts. *Folia Parasitol (Praha)*, **22**: 163-169.
- Dweik A., Schönian G., Mosleh I.M., Karanis P., 2007.** Evaluation of PCR-RFLP (based on ITS-1 and HaeIII) for the detection of *Leishmania* species, using Greek canine isolates and Jordanian clinical material. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, **101**: 399-407.
- El Harith A., el Mutasim M., Mansour D., Fadil Mustafa E., Arvidson H., 2003.** Use of glycerol as an alternative to freeze-drying for longterm preservation of antigen for the direct agglutination test. *Trop. Med. Int. Health*, **8**: 1025-1029.
- El Mutasim Mansour M.D., Abass E.M., Hassan W.M., el Harith A., 2006.** Evaluation of a glycerol-preserved antigen in the direct agglutination test for diagnosis of visceral leishmaniasis at rural level in eastern Sudan. *J. Med. Microbiol.*, **55**: 1343-1347.
- El-Safi S.H., Abdel-Haleem A., Hammad A., El-Basha I., Omer A., Kareem H.G., Boelaert M., Chance M., Hommel M., 2003.** Field evaluation of latex agglutination test for detecting urinary antigens in visceral leishmaniasis in Sudan. *East Mediterr. Health J.*, **9**: 844-855.
- Ellis J., Knapp T., Crampton J., 1989.** Cloning of a polymorphic DNA fragment from the genome of *Leishmania donovani*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **34**: 261-267.
- Espiñeira M., Herrero B., Vieites J.M., Santaclara F.J., 2010.** Detection and identification of anisakids in seafood by fragment length polymorphism analysis and PCR-RFLP of ITS-1 region. *Food Control*, **21**: 1051-1060.
- Espy M.J., Uhl J.R., Sloan L.M., Buckwalter S.P., Jones M.F., Vetter E.A., Yao J.D., Wengenack N.L., Rosenblatt J.E., Cockerill F.R. 3rd, Smith T.F., 2006.** Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin. Microbiol. Rev.*, **19**: 165-256.
- Ezra N., Ochoa M.T., Craft N., 2010.** Human immunodeficiency virus and leishmaniasis. *J. Glob. Infect. Dis.*, **2**: 248-257.
- Faizulin F.G., Kon'shina L.N., Abdullaev I.V., Ummatov A.M., 1975.** The natural carriers of the agent of zoonotic cutaneous leishmaniasis in the foci of infection in the Uzbek SSR. *Aktual'nye problemy meditsinskoi parazitologii*, **2**: 97-101.
- Farooq U., Choudhary S., Chacon A.H., Lebrun E., Shiman M.I., Hernandez J., Milikowski C., Kerdel F.A., Romanelli P., 2013.** Post-kala-azar dermal leishmaniasis in HIV-infected patients with AIDS: a report of two cases diagnosed in the USA. *Int. J. Dermatol.*, **52**: 1098-1104.
- Ferroglio E., Zanet S., Mignone W., Poggi M., Trisciuglio A., Bianciardi P., 2013.** Evaluation of a rapid device for serological diagnosis of *Leishmania infantum* infection in dogs as an alternative to immunofluorescence assay and Western blotting. *Clin. Vaccine Immunol.*, **20**: 657-659.
- Fisa R., Gállego M., Riera C., Aisa M.J., Valls D., Serra T., de Colmenares M., Castillejo S., Portús M., 1997.** Serologic diagnosis of canine leishmaniasis by dot-ELISA. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **9**: 50-55.

- Fisa R., Gállego M., Castillejo S., Aisa M.J., Serra T., Riera C., Carrió J., Gállego J., Portús M., 1999.** Epidemiology of canine leishmaniosis in Catalonia (Spain) the example of the Priorat focus. *Vet. Parasitol.*, **83**: 87-97.
- Fisa R., Riera C., Gállego M., Manubens J., Portús M., 2001.** Nested PCR for diagnosis of canine leishmaniosis in peripheral blood, lymph node and bone marrow aspirates. *Vet. Parasitol.*, **99**: 105-111.
- Fisa R., Riera C., Ribera E., Gállego M., Portús M., 2002.** A nested polymerase chain reaction for diagnosis and follow-up of human visceral leishmaniasis patients using blood samples. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **96**: 191-194.
- Fisa R., Riera C., López-Chejade P., Molina I., Gállego M., Falcó V., Ribera E., Portús M., 2008.** *Leishmania infantum* DNA detection in urine from patients with visceral leishmaniasis and after treatment control. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **78**: 741-744.
- 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. *Infect. Genet. Evol.*, **10**: 238-245.
- Francino O., Altet L., Sánchez-Robert E., Rodríguez A., Solano-Gallego L., Alberola J., Ferrer L., Sánchez A., Roura X., 2006.** Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. *Vet. Parasitol.*, **137**: 214-221.
- Gállego M., Pratlong F., Riera C., Fisa R., Muñoz C., Dedet J.P., Portús M., 2001.** Cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania infantum* in the northeast of Spain: the isoenzymatic analysis of parasites. *Arch. Dermatol.*, **137**: 667-668.
- Garcia L., Kindt A., Bermudez H., Llanos-Cuentas A., De Doncker S., Arevalo 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. *J. Clin. Microbiol.*, **42**: 2294-2297.
- Gelanew T., Kuhls K., Hurissa Z., Weldegebreal T., Hailu W., Kassahun A., Abebe T., Hailu A., Schönian G., 2010.** Inference of population structure of *Leishmania donovani* strains isolated from different Ethiopian visceral leishmaniasis endemic areas. *Plos. Negl. Trop. Dis.*, **4**: 889.
- Gelanew T., Hailu A., Schönian G., Lewis M.D., Miles M.A., Yeo M., 2014.** Multilocus sequence and microsatellite identification of intra-specific hybrids and ancestor-like donors among natural Ethiopian isolates of *Leishmania donovani*. *Int. J. Parasitol.*, **44**: 751-757.
- Ghatei M.A., Hatam G.R., Hossini M.H., Sarkari B., 2009.** Performance of latex agglutination test (KAtex) in diagnosis of visceral leishmaniasis in Iran. *Iran J. Immunol.*, **6**: 202-207.
- Ghawar W., Toumi A., Snoussi M.A., Chlif S., Zâatour A., Boukthir A., Hamida N.B., Chemkhi J., Diouani M.F., Ben-Salah A., 2011.** *Leishmania major* infection among *Psammomys obesus* and *Meriones shawi*: reservoirs of zoonotic cutaneous leishmaniasis in Sidi Bouzid (central Tunisia). *Vector Borne Zoonotic Dis.*, **11**: 1561-1568.
- Ghedin E., Zhang W.W., Charest H., Sundar S., Kenney R.T., Matlashewski G., 1997.** Antibody response against a *Leishmania donovani* amastigote-stage-specific protein in patients with visceral leishmaniasis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **4**: 530-535.
- Gil Collado J., Morillas Márquez F., Sanchis Marín M.C., 1989.** Los flebotomos en España. *Rev. San. Hig. Pub.*, **63**: 15-34.
- Gradoni L., 2002.** The diagnosis of canine leishmaniasis. In: Canine leishmaniasis: moving towards a solution. Proceedings of the 2nd International Canine Leishmaniasis International Forum, ed. *Intervet International* bv, pp. 7-14.

- Gramiccia M., Gradoni L., Troiani M., 1995.** Heterogeneity among zymodemes of *Leishmania infantum* from HIV-positive patients with visceral leishmaniasis in south Italy. *FEMS Microbiol. Lett.*, **128**: 33-38.
- Gramiccia M., 2003.** The identification and variability of the parasites causing leishmaniasis in HIV-positive patients in Italy. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, **97**: 65-73.
- Gramiccia M., Gradoni L., 2005.** The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *Int. J. Parasitol.*, **35**: 1169-1180.
- Guerbouj S., Victoir K., Guizani I., Seridi N., Nuwayri-Salti N., Belkaid M., Ismail R.B., Le Ray D., Dujardin J.C., 2001.** Gp63 gene polymorphism and population structure of *Leishmania donovani* complex, influence of the host selection pressure? *Parasitol.*, **122**: 25-35.
- Guessous-Idrissi N., Berrag B., Riyad M., Sahibi H., Bichichi M., Rhalem A., 1997.** Short report: *Leishmania tropica*: etiologic agent of a case of canine visceral leishmaniasis in northern Morocco. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **57**: 172-173.
- Hailu A., Schoone G.J., Diro E., Tesfaye A., Techane Y., Tefera T., Assefa Y., Genetu A., Kebede Y., Kebede T., Schallig H.D., 2006.** Field evaluation of a fast anti-*Leishmania* antibody detection assay in Ethiopia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **100**: 48-52.
- Hamad I., Forestier C.L., Peeters M., Delaporte E., Raoult D., Bittar F., 2014.** Wild Gorillas as a Potential Reservoir of *Leishmania major*. *J. Infect. Dis.*, [Epub ahead of print].
- Hamilton P.B., Adams E.R., Malele I.I., Gibson W.C., 2008.** A novel, high-throughput technique for species identification reveals a new species of tsetse-transmitted trypanosome related to the *Trypanosoma brucei* subgenus, Trypanozoon. *Infect. Genet. Evol.*, **8**: 26-33.
- Handman E., 1999.** Cell biology of *Leishmania*. *Adv. Parasitol.*, **44**: 1-39.
- Harms G., Schönián G., Feldmeier H., 2003.** Leishmaniasis in Germany. *Emerg. Infect. Dis.*, **9**: 872-875.
- Harrat Z., Pratlong F., Belazzoug S., Dereure J., Deniau M., Rioux J.A., Belkaid M., Dedet J.P., 1996.** *Leishmania infantum* and *L. major* in Algeria. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **90**: 625-629.
- Harrat Z., Boubidi S.C., Pratlong F., Benikhlef R., Selt B., Dedet J.P., Ravel C., Belkaid M., 2009.** Description of a dermatropic *Leishmania* close to *L. killicki* (Rioux, Lanotte & Pratlong, 1986) in Algeria. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **103**: 716-720.
- Harris E., Kropp G., Belli A., Rodriguez B., Agabian N., 1998.** Single-step multiplex PCR assay for characterization of New World *Leishmania* complexes. *J. Clin. Microbiol.*, **36**: 1989-1995.
- Herrero B., Madriñán M., Vieites J.M., Espiñeira M., 2010.** Rapid identification of seaweeds in food products by PCR combined with ALF-RFLP and FINS methodologies. *J. Agric. Food. Chem.*, **58**: 11586-11592.
- Hide M., Bañuls A.L., Tibayrenc M., 2001.** Genetic heterogeneity and phylogenetic status of *Leishmania (Leishmania) infantum* zymodeme MON-1: epidemiological implications. *Parasitology*, **123**: 425-432.
- Hide M., Singh R., Kumar B., Bañuls A.L., Sundar S., 2007.** A microculture technique for isolating live *Leishmania* parasites from peripheral blood of visceral leishmaniasis patients. *Acta Trop.*, **102**: 197-200.

- Hide M., Marion E., Pomares C., Fisa R., Marty P., Bañuls A.L., 2013. Parasitic genotypes appear to differ in leishmaniasis patients compared with asymptomatic related carriers. *Int. J. Parasitol.*, **43**: 389-397.
- Hoefler H.L., 1994. Hedgehogs. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*, **24**: 113-120.
- Howard M.K., Kelly J.M., Lane R.P., Miles M.A., 1991. A sensitive repetitive DNA probe that is specific to the *Leishmania donovani* complex and its use as an epidemiological and diagnostic reagent. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **44**: 63-72.
- Iniesta L., Fernández-Barredo S., Bulle B., Gómez M.T., Piarroux R., Gállego M., Alunda J.M., Portús M., 2002. Diagnostic techniques to detect cryptic leishmaniasis in dogs. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **9**: 1137-1141.
- Iovannisci D.M., Beverley S.M., 1989. Structural alterations of chromosome 2 in *Leishmania major* as evidence for diploidy, including spontaneous amplification of the mini-exon array. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **34**: 177-188.
- Islam M.Z., Itoh M., Mirza R., Ahmed I., Ekram A.R., Sarder A.H., Shamsuzzaman S.M., Hashiguchi Y., Kimura E., 2004. Direct agglutination test with urine samples for the diagnosis of visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **70**: 78-82.
- Ivens A.C., Peacock C.S., Worthey E.A., Murphy L., Aggarwal G., Berriman M., Sisk E., Rajandream M.A., Adlem E., Aert R., Anupama A., Apostolou Z., Attipoe P., Bason N., Bauser C., Beck A., Beverley S.M., Bianchetti G., Borzym K., Bothe G., Bruschi C.V., Collins M., Cadag E., Ciarloni L., Clayton C., Coulson R.M., Cronin A., Cruz A.K., Davies R.M., De Gaudenzi J., Dobson D.E., Duesterhoeft A., Fazelina G., Fosker N., Frasc A.C., Fraser A., Fuchs M., Gabel C., Goble A., Goffeau A., Harris D., Hertz-Fowler C., Hilbert H., Horn D., Huang Y., Klages S., Knights A., Kube M., Larke N., Litvin L., Lord A., Louie T., Marra M., Masuy D., Matthews K., Michaeli S., Mottram J.C., Müller-Auer S., Munden H., Nelson S., Norbertczak H., Oliver K., O'neil S., Pentony M., Pohl T.M., Price C., Purnelle B., Quail M.A., Rabbinowitsch E., Reinhardt R., Rieger M., Rinta J., Robben J., Robertson L., Ruiz J.C., Rutter S., Saunders D., Schäfer M., Schein J., Schwartz D.C., Seeger K., Seyler A., Sharp S., Shin H., Sivam D., Squares R., Squares S., Tosato V., Vogt C., Volckaert G., Wambutt R., Warren T., Wedler H., Woodward J., Zhou S., Zimmermann W., Smith D.F., Blackwell J.M., Stuart K.D., Barrell B., Myler P.J., 2005. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science*, **309**: 436-442.
- Jacobson R.L., Eisenberger C.L., Svobodova M., Baneth G., Sztern J., Carvalho J., Nasereddin A., El Fari M., Shalom U., Volf P., Votypka J., Dedet J.P., Pralong F., Schonian G., Schnur L.F., Jaffe C.L., Warburg A., 2003. Outbreak of cutaneous leishmaniasis in northern Israel. *J. Infect. Dis.*, **188**: 1065-1073.
- Jacquet D., Boelaert M., Seaman J., Rijal S., Sundar S., Menten J., Magnus E., 2006. Comparative evaluation of freeze-dried and liquid antigens in the direct agglutination test for serodiagnosis of visceral leishmaniasis (Itma-Dat/VI). *Trop. Med. Int. Health*, **11**: 1777-1784.
- Jamjoom M.B., Ashford R.W., Bates P.A., Kemp S.J., Noyes H.A., 2002. Towards a standard battery of microsatellite markers for the analysis of the *Leishmania donovani* complex. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, **96**: 265-270.
- 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.

- Jaouadi K., Haouas N., Chaara D., Gorcii M., Chargui N., Augot D., Pratlong F., Dedet J.P., Ettlijani S., Mezhoud H., Babba H., 2011.** First detection of *Leishmania killicki* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) in *Ctenodactylus gundi* (Rodentia, Ctenodactylidae), a possible reservoir of human cutaneous leishmaniasis in Tunisia. *Parasit. Vectors*, **4**: 159.
- Jiménez M., González E., Iriso A., Marco E., Alegret A., Fúster F., Molina R., 2013.** Detection of *Leishmania infantum* and identification of blood meals in *Phlebotomus perniciosus* from a focus of human leishmaniasis in Madrid, Spain. *Parasitol. Res.*, **112**: 2453-2459.
- 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? *Vet. Parasitol.*, **202**: 296-300.
- Jirkù M., Zemanová E., Al-Jawabreh A., Schönián G., Lukes J., 2006.** Development of a direct species-specific PCR assay for differential diagnosis of *Leishmania tropica*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, **55**: 75-79.
- Kato H., Uezato H., Katakura K., Calvopiña M., Marco J.D., Barroso P.A., Gomez E.A., Mimori T., Korenaga M., Iwata H., Nonaka S., Hashiguchi Y., 2005.** Detection and identification of *Leishmania* species within naturally infected sand flies in the andean areas of ecuador by a polymerase chain reaction. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **72**: 87-93.
- Khalidi M., Torres J., Samsó B., Miquel J., Biche M., Benyettou M., Barech G., Benelkadi H.A., Ribas A., 2012.** Endoparasites (Helminths and Coccidians) in the hedgehogs *Atelerix algirus* and *Paraechinus aethiopicus* from Algeria. *Afr. Zoo.*, **47**: 48-54.
- Khan M.G., Bhaskar K.R., Salam M.A., Akther T., Pluschke G., Mondal D., 2012.** Diagnostic accuracy of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for detection of *Leishmania* DNA in buffy coat from visceral leishmaniasis patients. *Parasit. Vectors*, **5**: 280.
- Killick-Kendrick R., 1990.** The life-cycle of *Leishmania* in the sandfly with special reference to the form infective to the vertebrate host. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, **65**: 37-42.
- Killick-Kendrick R., 1999.** The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clin. Dermatol.*, **17**: 279-289.
- Kuhls K., Mauricio I.L., Pratlong F., Presber W., Schönián G., 2005.** Analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences of the *Leishmania donovani* complex. *Microbes Infect.*, **7**: 1224-1234.
- Kuhls K., Keilonat L., Ochsenreither S., Schaar M., Schweynoch C., Presber W., Schönián G., 2007.** Multilocus microsatellite typing (MLMT) reveals genetically isolated populations between and within the main endemic regions of visceral leishmaniasis. *Microbes Infect.*, **9**: 334-343.
- Kuhls K., Chicharro C., Cañavate C., Cortes S., Campino L., Haralambous C., Soteriadou K., Pratlong F., Dedet J.P., Mauricio I., Miles M., Schaar M., Ochsenreither S., Radtke O.A., Schönián G., 2008.** Differentiation and gene flow among European populations of *Leishmania infantum* MON-1. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, **2**: 261.
- Kurkjian K.M., Vaz L.E., Haque R., Cetre-Sossah C., Akhter S., Roy S., Steurer F., Amann J., Ali M., Chowdhury R., Wagatsuma Y., Williamson J., Crawford S., Breiman R.F., Maguire J.H., Bern C., Secor W.E., 2005.** Application of an improved method for the recombinant k 39 enzyme-linked immunosorbent assay to detect visceral leishmaniasis disease and infection in Bangladesh. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **12**: 1410-1415.
- Lachaud L., Dereure J., Chabbert E., Reynes J., Mauboussin J.M., Oziol E., Dedet J.P., Bastien P., 2000.** Optimized PCR using patient blood samples for diagnosis and follow-

- up of visceral leishmaniasis, with special reference to AIDS patients. *J. Clin. Microbiol.*, **38**: 236-240
- Lachaud L., Bourgeois N., Kuk N., Morelle C., Crobu L., Merlin G., Bastien P., Pagès M., Sterkers Y., 2014.** Constitutive mosaic aneuploidy is a unique genetic feature widespread in the *Leishmania* genus. *Microbes Infect.*, **16**: 61-66.
- Lainson R., Ready P.D., Shaw J.J., 1979.** *Leishmania* in phlebotomid sandflies. VII. On the taxonomic status of *Leishmania peruviana*, causative agent of Peruvian 'uta', as indicated by its development in the sandfly, *Lutzomyia longipalpis*. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, **206**: 307-318.
- Lainson R., Ryan L., Shaw J.J., 1987.** Infective stages of *Leishmania* in the sandfly vector and some observations on the mechanism of transmission. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **82**: 421-424.
- Lainson R., Shaw J.J., 1987.** Evolution, classification and geographical distribution. In Peters W, Killick-Kendrick R (Eds.), *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*, Vol. 1. *Academic Press*, London, pp. 1-120.
- Latyshev N.I., Krujukova A.P., 1941.** On the epidemiology of the cutaneous leishmaniasis as cutaneous zoonotic disease of wild rodents in Turkmenia [in Russian with English summary]. *Trudy Voенno-Medskaya Akad Krasnoi Armii*, **25**: 229-242.
- Laurent T., Van der Auwera G., Hide M., Mertens P., Quispe-Tintaya W., Deborggraeve S., De Doncker S., Leclipteux T., Bañuls A.L., Büscher P., Dujardin J.C., 2009.** Identification of Old World *Leishmania* spp. by specific polymerase chain reaction amplification of cysteine proteinase B genes and rapid dipstick detection. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, **63**: 173-181.
- Le Fichoux Y., Quaranta J.F., Aueuvre J.P., Lelievre A., Marty P., Suffia I., Rousseau D., Kubar J., 1999.** Occurrence of *Leishmania infantum* parasitemia in asymptomatic blood donors living in an area of endemicity in southern France. *J. Clin. Microbiol.*, **37**: 1953-1957.
- Leontides L.S., Saridomichelakis M.N., Billinis C., Kontos V., Koutinas A.F., Galatos A.D., Mylonakis M.E., 2002.** A cross-sectional study of *Leishmania* spp. infection in clinically healthy dogs with polymerase chain reaction and serology in Greece. *Vet. Parasitol.*, **109**: 19-27.
- Levine N.D., Corliss J.O., Cox F.E., Deroux G., Grain J., Honigberg B.M., Leedale G.F., Loeblich A.R. 3rd, Lom J., Lynn D., Merinfeld E.G., Page F.C., Poljansky G., Sprague V., Vavra J., Wallace F.G., 1980.** A newly revised classification of the protozoa. *J. Protozool.*, **27**: 37-58.
- López-Vélez R., 2003.** The impact of highly active antiretroviral therapy (HAART) on visceral leishmaniasis in Spanish patients who are co-infected with HIV. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, **97**: 143-147.
- Lukes J., Hashimi H., Zíková A., 2005.** Unexplained complexity of the mitochondrial genome and transcriptome in kinetoplastid flagellates. *Curr. Genet.*, **48**: 277-299.
- Lumsden W.H., 1977.** Problems in characterization and nomenclature of trypanosome populations. *Ann. Soc. Belg. Med. Trop.*, **57**: 361-368.
- Maache M., Azzouz S., Diaz de la Guardia R., Alvarez P., Gil R., de Pablos L.M., Osuna A., 2005.** Host humoral immune response to *Leishmania* lipid-binding protein. *Parasite Immunol.*, **27**: 227-234.
- Maiden M.C., Bygraves J.A., Feil E., Morelli G., Russell J.E., Urwin R., Zhang Q., Zhou J., Zurth K., Caugant D.A., Feavers I.M., Achtman M., Spratt B.G., 1998.**

- Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**: 3140-3145.
- Mancianti F., Meciani N., 1988.** Specific serodiagnosis of canine leishmaniasis by indirect immunofluorescence, indirect hemagglutination, and counterimmunoelectrophoresis. *Am. J. Vet. Res.*, **49**: 1409-1411.
- Mandal J., Khurana S., Dubey M.L., Bhatia P., Varma N., Malla N., 2008.** Evaluation of direct agglutination test, rK39 test, and ELISA for the diagnosis of visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **79**: 76-78.
- Markert C.L., Moller F., 1959.** Multiple forms of enzymes: Tissue, ontogenetic, and species-specific patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **45**: 753-763.
- 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. *Med. Vet. Entomol.*, **27**: 123-147.
- Martín-Ezquerro G., Fisa R., Riera C., Rocamora V., Fernández-Casado A., Barranco C., Serra T., Baró T., Pujol R.M., 2009.** Role of *Leishmania* spp. infestation in nondiagnostic cutaneous granulomatous lesions: report of a series of patients from a Western Mediterranean area. *Br. J. Dermatol.*, **161**: 320-325.
- Martín Luengo F., Quiles Mora J., 1982.** Leishmaniasis in Spain [Article in Spanish]. *Rev. Sanid. Hig. Publica (Madr.)*, **56**: 699-726.
- Martín-Sánchez J., Gramiccia M., Di Muccio T., Ludovisi A., Morillas-Márquez F., 2004.** Isoenzymatic polymorphism of *Leishmania infantum* in southern Spain. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **98**: 228-232.
- 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. *Vet. Parasitol.*, **30**: 267-273.
- Mary C., Lamouroux D., Dunan S., Quilici M., 1992.** Western blot analysis of antibodies to *Leishmania infantum* antigens: potential of the 14-kD and 16-kD antigens for diagnosis and epidemiologic purposes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **47**: 764-771.
- Mary C., Faraut F., Lascombe L., Dumon H., 2004.** Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a real-time PCR assay with high sensitivity. *J. Clin. Microbiol.*, **42**: 5249-5255.
- Mauricio 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**: 263-267.
- Mauricio 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). *Int. J. Parasitol.*, **36**: 757-769.
- Maurya R., Singh R.K., Kumar B., Salotra P., Rai M., Sundar S., 2005.** Evaluation of PCR for diagnosis of Indian kala-azar and assessment of cure. *J. Clin. Microbiol.*, **43**: 3038-3041.
- Michel G., Pomares C., Ferrua B., Marty P., 2011.** Importance of worldwide asymptomatic carriers of *Leishmania infantum* (*L. chagasi*) in human. *Acta Trop.*, **119**: 69-75.
- Mihoubi I., Picot S., Hafirassou N., de Monbrison F., 2008.** Cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania tropica* in Algeria. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **102**: 1157-1159.

- Mikita K., Maeda T., Yoshikawa S., Ono T., Miyahira Y., Kawana A., 2014.** The Direct Boil-LAMP method: A simple and rapid diagnostic method for cutaneous leishmaniasis. *Parasitol. Int.*, **63**: 785-789.
- Millán J., Zanet S., Gomis M., Trisciuglio A., Negre N., Ferroglio E., 2011.** An investigation into alternative reservoirs of canine leishmaniasis on the endemic island of Mallorca (Spain). *Transbound Emerg. Dis.*, **58**: 352-357.
- Mira J.A., Corzo J.E., Rivero A., Macias J., De Leon F.L., Torre-Cisneros J., Gomez-Mateos J., Jurado R., Pineda J.A., 2004.** Frequency of visceral leishmaniasis relapses in human immunodeficiency virus-infected patients receiving highly active antiretroviral therapy. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **70**: 298-301.
- Mohapatra T.M., Singh D.P., Sen M.R., Bharti K., Sundar S., 2010.** Comparative evaluation of rK9, rK26 and rK39 antigens in the serodiagnosis of Indian visceral leishmaniasis. *J. Infect. Dev. Ctries.*, **4**: 114-117.
- Molina I., Fisa R., Riera C., Falcó V., Elizalde A., Salvador F., Crespo M., Curran A., López-Chejade P., Tebar S., Pérez-Hoyos S., Ribera E., Pahissa A., 2013.** Ultrasensitive real-time PCR for the clinical management of visceral leishmaniasis in HIV-Infected patients. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **89**: 105-110.
- Molina R., Lohse J.M., Pulido F., Laguna F., López-Vélez R., Alvar J., 1999.** Infection of sand flies by humans coinfecting with *Leishmania infantum* and human immunodeficiency virus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **60**: 51-53.
- 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. *Vet. Parasitol.*, **190**: 268-271.
- Mondain-Miton V., Toussaint-Gari M., Hofman P., Marty P., Carles M., De Salvador F., Miton F., Le Fichoux Y., Dellamonica P., 1995.** Atypical leishmaniasis in a patient infected with human immunodeficiency virus. *Clin. Infect. Dis.*, **21**: 663-665.
- 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. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **76**: 888-895.
- Morales M.A., Cruz I., Rubio J.M., Chicharro C., Cañavate C., Laguna F., Alvar J., 2002.** Relapses versus reinfections in patients coinfecting with *Leishmania infantum* and human immunodeficiency virus type 1. *J. Infect. Dis.*, **185**: 1533-1537.
- Morillas Márquez F., Benavides Delgado I., Gonzalez Castro J., Reyes Magaña A., Valero Lopez A., 1985.** Occurrence of *Leishmania* sp in *Rattus rattus* in the province of Granada. *Ann. Parasitol. hum. comp.*, **60**: 768-770.
- Morillas Márquez F., Sanchís Marín M.C., Martín Sánchez J., Acedo Sánchez C., 1991.** On *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911 (Diptera, Phlebotomidae) in the Province of Almeria in southeastern Spain. *Parasitologia*, **33**: 437-444.
- Morsy T.A., el Kady G.A., Salama M.M., Habib K.M., Ghareb M.A., 1993.** *Leishmania major* in *Meriones sacramenti* Thomas 1922 in Nakhel, North Sinai, Egypt. *J. Egypt. Soc. Parasitol.*, **23**: 373-379.
- Morsy T.A., al Dakhil M.A., el Bahrawy A.F., 1997.** Natural *Leishmania* infection in rock hyrax, *Procavia capensis* (Pallas, 1766) order: Hyracoidea, trapped in Najran, Saudi Arabia. *J. Egypt. Soc. Parasitol.*, **27**: 75-81.
- Motazedian M., Fakhar M., Motazedian M.H., Hatam G., Mikaeili F., 2008.** A urine-based polymerase chain reaction method for the diagnosis of visceral leishmaniasis in immunocompetent patients. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, **60**: 151-154.

- Motoie G., Ferreira G.E., Cupolillo E., Canavez F., Pereira-Chiocola V.L., 2013.** Spatial distribution and population genetics of *Leishmania infantum* genotypes in São Paulo State, Brazil, employing multilocus microsatellite typing directly in dog infected tissues. *Infect. Genet. Evol.*, **18**: 48-59.
- 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 Negl. Trop. Dis.*, **8**: 2841.
- Muñoz-Madrid R., Belinchón-Lorenzo S., Iniesta V., Fernández-Cotrino J., Parejo J.C., Serrano F.J., Monroy I., Baz V., Gómez-Luque A., Gómez-Nieto L.C., 2013.** First detection of *Leishmania infantum* kinetoplast DNA in hair of wild mammals: application of qPCR method to determine potential parasite reservoirs. *Acta Trop.*, **128**: 706-709.
- Nasereddin A., Bensoussan-Hermano E., Schönian G., Baneth G., Jaffe C.L., 2008.** Molecular diagnosis of Old World cutaneous leishmaniasis and species identification by use of a reverse line blot hybridization assay. *J. Clin. Microbiol.*, **46**: 2848-2855.
- Nasereddin A., Jaffe C.L., 2010.** Rapid diagnosis of Old World Leishmaniasis by high-resolution melting analysis of the 7SL RNA gene. *J. Clin. Microbiol.*, **48**: 2240-2242.
- Notomi T., Okayama H., Masubuchi H., Yonekawa T., Watanabe K., Amino N., Hase T., 2000.** Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.*, **28**: 63.
- Noyes H.A., Belli A.A., Maingon R., 1996.** Appraisal of various random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction primers for *Leishmania* identification. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **55**: 98-105.
- 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. *J. Clin. Microbiol.*, **36**: 2877-2881.
- Ochsenreither S., Kuhls K., Schaar M., Presber W., Schönian G., 2006.** Multilocus microsatellite typing as a new tool for discrimination of *Leishmania infantum* MON-1 strains. *J. Clin. Microbiol.*, **44**: 495-503.
- Oddone R., Schweynoch C., Schönian G., de Sousa Cdos S., Cupolillo E., Espinosa D., Arevalo J., Noyes H., Mauricio I., Kuhls K., 2009.** Development of a multilocus microsatellite typing approach for discriminating strains of *Leishmania* (*Viannia*) species. *J. Clin. Microbiol.*, **47**: 2818-2825.
- Oliveira D.M., Reinhold-Castro K.R., Bernal M.V., Legriffon C.M., Lonardon M.V., Teodoro U., Silveira T.G., 2011.** Natural infection of *Nyssomyia neivai* by *Leishmania* (*Viannia*) spp. in the state of Paraná, southern Brazil, detected by multiplex polymerase chain reaction. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, **11**: 137-143.
- Oliveira E., Pedras M.J., de Assis I.E., Rabello A., 2009.** Improvement of direct agglutination test (DAT) for laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis in Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **103**: 1279-1281.
- Oliveira R.P., Melo A.I., Macedo A.M., Chiari E., Pena S.D., 1999.** The population structure of *Trypanosoma cruzi*: expanded analysis of 54 strains using eight polymorphic CA-repeat microsatellites. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **94**: 65-70.
- Paredes R., Muñoz J., Diaz I., Domingo P., Gurgui M., Clotet B., 2003.** Leishmaniasis in HIV infection. *J. Postgrad. Med.*, **49**: 39-49.
- Petrisceva P.A., 1971.** The Natural Focality of Leishmaniasis in the USSR. *Bull. World Health Org.*, **44**: 567-576.

- Pilatti M.M., Ferreira Sde A., de Melo M.N., de Andrade A.S., 2009.** Comparison of PCR methods for diagnosis of canine visceral leishmaniasis in conjunctival swab samples. *Res. Vet. Sci. Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, **87**: 255-257.
- Pintado V., López-Vélez R., 2001.** Visceral leishmaniasis associated with human immunodeficiency virus infection [Article in Spanish]. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, **19**: 353-357.
- Portús M., Gállego M., Riera C., Aisa M.J., Fisa R., Castillejo S., 2002.** Wild and domestic mammals in the life cycle of *Leishmania infantum* in the Southwest Europe. A literature review and studies performed in Catalonia (Spain). *Rev. Iber. Parasitol.*, **62**: 72-76.
- Pratlong F., Dereure J., Deniau M., Marty P., Faraut-Gambarelli F., Dedet J.P., 2003.** Enzymatic polymorphism during *Leishmania*/HIV co-infection: a study of 381 *Leishmania* strains received between 1986 and 2000 at the international cryobank in Montpellier, France. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, **97**: 47-56.
- Pujol A., Fisa R., Riera C., Rocamora V., Boteller D., 2012.** Diagnóstico de la leishmaniosis cutánea. Valor de una técnica de reacción en cadena de la polimerasa para la detección de *Leishmania infantum* en muestras recogidas sobre papel de filtro versus la histología convencional y la inmunohistoquímica. *Piel*, **27**: 527-531.
- Quispe Tintaya K.W., Ying X., Dedet J.P., Rijal S., De Bolle X., Dujardin J.C., 2004.** Antigen genes for molecular epidemiology of leishmaniasis: polymorphism of cysteine proteinase B and surface metalloprotease glycoprotein 63 in the *Leishmania donovani* complex. *J. Infect. Dis.*, **189**: 1035-1043.
- Rafati S., Hassani N., Taslimi Y., Movassagh H., Rochette A., Papadopoulou B., 2006.** Amastin peptide-binding antibodies as biomarkers of active human visceral leishmaniasis. *Clin. Vacc. Immunol.*, **13**: 1104-1110.
- Rahman K.M., Islam S., Rahman M.W., Kenah E., Galive C.M., Zahid M.M., Maguire J., Rahman M., Haque R., Luby S., Bern C., 2010.** Increasing incidence of post-kala-azar dermal leishmaniasis in a population-based study in Bangladesh. *Clin. Infect. Dis.*, **50**: 73-76.
- Ravel C., Wincker P., Bastien P., Blaineau C., Pagès M., 1995.** A polymorphic minisatellite sequence in the subtelomeric regions of chromosomes I and V in *Leishmania infantum*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **74**: 31-41.
- 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*. *Int. J. Parasitol.*, **36**: 1383-1388.
- Reithinger R., Dujardin J.C., 2007.** Molecular diagnosis of leishmaniasis: current status and future applications. *J. Clin. Microbiol.*, **45**: 21-25.
- Reus M., García B., Vázquez V., Morales D., Fuster M., Sola J., 2005.** Visceral leishmaniasis: diagnosis by ultrasound-guided fine needle aspiration of an axillary node. *Br. J. Radiol.*, **78**: 158-160.
- Rhajaoui M., Nasereddin A., Fellah H., Azmi K., Amarir F., Al-Jawabreh A., Ereqat S., Planer J., Abdeen Z., 2007.** New clinico-epidemiologic profile of cutaneous leishmaniasis, Morocco. *Emerg. Infect. Dis.*, **13**: 1358-1360.
- Riera C., Valladares J.E., Gállego M., Aisa M.J., Castillejo S., Fisa R., Ribas N., Carrió J., Alberola J., Arboix M., 1999.** Serological and parasitological follow-up in dogs experimentally infected with *Leishmania infantum* and treated with meglumine antimoniate. *Vet. Parasitol.*, **84**: 33-47.
- Riera C., Fisa R., Lopez P., Ribera E., Carrió J., Falcó V., Molina I., Gállego M., Portús M., 2004a.** Evaluation of a latex agglutination test (KAtex) for detection of *Leishmania*

- antigen in urine of patients with HIV-*Leishmania* coinfection: value in diagnosis and post-treatment follow-up. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, **23**: 899-904.
- Riera C., Fisa R., Udina M., Gállego M., Portus M., 2004b.** Detection of *Leishmania infantum* cryptic infection in asymptomatic blood donors living in an endemic area (Eivissa, Balearic Islands, Spain) by different diagnostic methods. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **98**: 102-110.
- Riera C., Fisa R., López-Chejade P., Serra T., Girona E., Jiménez M., 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.
- Rijal S., Boelaert M., Regmi S., Karki B.M., Jacquet D., Singh R., Chance M.L., Chappuis F., Hommel M., Desjeux P., 2004.** Evaluation of a urinary antigen-based latex agglutination test in the diagnosis of kala-azar in eastern Nepal. *Trop. Med. Int. Health*, **9**: 724-729.
- Rioux J.A., Lanotte G., Perieres J., Croset H., 1973.** Ecology of leishmaniasis in the South of France. 6. First report of a spontaneous infestation of *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921 (author's transl) [Article in French]. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, **48**: 519-522.
- Rioux J.A., Petter F., Akalay O., Lanotte G., Ouazzani A., Seguignes M., Mohcine A., 1982.** *Meriones shawi* (Duvernoy, 1842) [Rodentia, Gerbillidae] a reservoir of *Leishmania major*, Yakimoff and Schokhor, 1914 [Kinetoplastida, Trypanosomatidae] in South Morocco (author's transl) [Article in French]. *C. R. Seances Acad. Sci. III*, **294**: 515-517.
- 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. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, **65**: 111-125.
- Rioux J.A. and Lanotte G., 1993.** Apport de la cladistique a l'analyse du genre *Leishmania* Ross, 1903 Kinetoplastida, Trypanosomatidae Corollaires eco-epidemiologiques. *Biosystema*, **8**: 79-90.
- Rodríguez-Cortés A., Ojeda A., Francino O., López-Fuertes L., Timón M., Alberola J., 2010.** *Leishmania* infection: laboratory diagnosing in the absence of a "gold standard". *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **82**: 251-256.
- Rodríguez-Cortés A., Ojeda A., Todolí F., Alberola J., 2013.** Performance of commercially available serological diagnostic tests to detect *Leishmania infantum* infection on experimentally infected dogs. *Vet. Parasitol.*, **191**: 363-366.
- Romeu J., Millà F., Batlle M., Sirera G., Ferrandiz C., Carreres A., Condom M.J., Clotet B., 1991.** Visceral leishmaniasis involving lung and a cutaneous Kaposi's sarcoma lesion. *AIDS*, **5**: 1272.
- Rossi V., Wincker P., Ravel C., Blaineau C., Pagés M., Bastien P., 1994.** Structural organisation of microsatellite families in the *Leishmania* genome and polymorphisms at two (CA)_n loci. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **65**: 271-282.
- Rougeron V., Waleckx E., Hide M., DE Meeûs T., Arevalo J., Llanos-Cuentas A., Bañuls A.L., 2008.** A set of 12 microsatellite loci for genetic studies of *Leishmania braziliensis*. *Mol. Ecol. Resour.*, **8**: 351-353.
- Rougeron V., De Meeûs T., Kako Ouraga S., Hide M., Bañuls A.L., 2010.** "Everything you always wanted to know about sex (but were afraid to ask)" in *Leishmania* after two decades of laboratory and field analyses. *PLoS Pathog.*, **6**: e1001004.
- Rouhani S., Mirzaei A., Spotin A., Parvizi P., 2014.** Novel identification of *Leishmania major* in *Hemichinus auritus* and molecular detection of this parasite in *Meriones libycus*

- from an important foci of zoonotic cutaneous leishmaniasis in Iran. *J. Infect. Public Health*, **7**: 210-217.
- Russell R., Iribar M.P., Lambson B., Brewster S., Blackwell J.M., Dye C., Ajioka J.W., 1999.** Intra and inter-specific microsatellite variation in the *Leishmania* subgenus *Viannia*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **103**: 71-77.
- Saad A.A., Ahmed N.G., Osman O.S., Al-Basheer A.A., Hamad A., Deborggraeve S., Büscher P., Schoone G.J., Schallig H.D., Laurent T., Haleem A., Osman O.F., Eltom A.M., Elbashir M.I., El-Safi S., 2010.** Diagnostic accuracy of the *Leishmania* OligoC-TesT and NASBA-oligochromatography for diagnosis of leishmaniasis in Sudan. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, **4**: 776.
- 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.
- Safjanova V.M., 1982.** Classification of the genus *Leishmania*. Protozoology, Part 7, URSS All Union Society of Protozoologists, Leningrad, pp. 219-220.
- Şakru N., Töz S.Ö., Korkmaz M., Özbel Y., 2011.** Serological monitoring of paediatric visceral leishmaniasis by IFA and ELISA methods. *Turkiye Parazitol. Derg.*, **35**: 125-128.
- Salah A.B., Kamarianakis Y., Chlif S., Alaya N.B., Prastacos P., 2007.** Zoonotic cutaneous leishmaniasis in central Tunisia: spatio temporal dynamics. *Int. J. Epidemiol.*, **36**: 991-1000.
- Salam M.A., Khan M.G., Mondal D., 2011.** Urine antigen detection by latex agglutination test for diagnosis and assessment of initial cure of visceral leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **105**: 269-272.
- 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. *J. Clin. Microbiol.*, **39**: 849-854.
- Schallig H.D., Schoone G.J., Beijer E.G., Kroon C.C., Hommers M., Ozbel Y., Ozensoy S., da Silva E.S., Cardoso L.M., da Silva E.D., 2002.** Development of a fast agglutination screening test (FAST) for the detection of anti-*Leishmania* antibodies in dogs. *Vet. Parasitol.*, **109**: 1-8.
- Schönian G., Nasereddin A., Dinse N., Schweynoch C., Schallig H.D., Presber W., Jaffe C.L., 2003.** PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, **47**: 349-358.
- Schönian G., Mauricio I., Gramiccia M., Cañavate C., Boelaert M., Dujardin J.C., 2008.** Leishmaniasis in the Mediterranean in the era of molecular epidemiology. *Trends Parasitol.*, **24**: 135-142.
- Schönian G., Kuhls K., Mauricio I.L., 2011.** Molecular approaches for a better understanding of the epidemiology and population genetics of *Leishmania*. *Parasitology*, **138**: 405-425.
- Schwenkenbecher J.M., Wirth T., Schnur L.F., Jaffe C.L., Schallig H., Al-Jawabreh A., Hamarsheh O., Azmi K., Pratlong F., Schönian G., 2006.** Microsatellite analysis reveals genetic structure of *Leishmania tropica*. *Int. J. Parasitol.*, **36**: 237-246.
- Selvapandiyan A., Stabler K., Ansari N.A., Kerby S., Riemenschneider J., Salotra P., Duncan R., Nakhasi H.L., 2005.** A novel semiquantitative fluorescence-based multiplex polymerase chain reaction assay for rapid simultaneous detection of bacterial and parasitic pathogens from blood. *J. Mol. Diagn.*, **7**: 268-275.

- Selvapandiyan A., Duncan R., Mendez J., Kumar R., Salotra P., Cardo L.J., Nakhasi H.L., 2008. A *Leishmania* minicircle DNA footprint assay for sensitive detection and rapid speciation of clinical isolates. *Transfusion*, **48**: 1787-1798.
- Shapiro T.A., Englund P.T., 1995. The structure and replication of kinetoplast DNA. *Annu. Rev. Microbiol.*, **49**: 117-143.
- Silva E.S., Schoone G.J., Gontijo C.M., Brazil R.P., Pacheco R.S., Schallig H.D., 2005. Application of direct agglutination test (DAT) and fast agglutination screening test (FAST) for sero-diagnosis of visceral leishmaniasis in endemic area of Minas Gerais, Brazil. *Kinetoplastid Biol. Dis.*, **4**: 4.
- Simpson A.G., Stevens J.R., Lukes J., 2006. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. *Trends Parasitol.*, **22**: 168-174.
- Simpson L., Neckelmann N., de la Cruz V.F., Simpson A.M., Feagin J.E., Jasmer D.P., Stuart K., 1987. Comparison of the maxicircle (mitochondrial) genomes of *Leishmania tarentolae* and *Trypanosoma brucei* at the level of nucleotide sequence. *J. Biol. Chem.*, **5**: 6182-6196.
- Singh D.P., Goyal R.K., Singh R.K., Sundar S., Mohapatra T.M., 2010. In search of an ideal test for diagnosis and prognosis of kala-azar. *J. Health Popul. Nutr.*, **28**: 281-285.
- Sivakumar R., Sharma P., Chang K.P., Singh S., 2006. Cloning, expression, and purification of a novel recombinant antigen from *Leishmania donovani*. *Protein. Expr. Purif.*, **46**: 156-165.
- Slappendel R.J., Ferrer L., 1998. Leishmaniasis. In: Greene CE, ed. *Infectious Diseases of the Dog and Cat*, 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders, 1998: 450-458.
- Sobrinho R., Ferroglio E., Oleaga A., Romano A., Millan J., Revilla M., Arnal M.C., Trisciuglio A., Gortázar C., 2008. Characterization of widespread canine leishmaniasis among wild carnivores from Spain. *Vet. Parasitol.*, **155**: 198-203.
- Solano-Gallego L., Morell P., Arboix M., Alberola J., Ferrer L., 2001. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. *J. Clin. Microbiol.*, **39**: 560-563.
- Solano-Gallego L., Fernández-Bellón H., Serra R., Gállego M., Ramis A., Fondevila D., Ferrer L., 2003. Cutaneous leishmaniasis in three horses in Spain. *Equine Vet. J.* **35**: 320-323.
- Solano-Gallego L., Rodríguez-Cortés A., Iniesta L., Quintana J., Pastor J., Espada Y., Portús M., Alberola J., 2007a. Cross-sectional serosurvey of feline leishmaniasis in ecoregions around the Northwestern Mediterranean. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **76**: 676-680.
- Solano-Gallego L., Rodríguez-Cortés A., Trotta M., Zampieron C., Razia L., Furlanello T., Caldin M., Roura X., Alberola J., 2007b. Detection of *Leishmania infantum* DNA by fret-based real-time PCR in urine from dogs with natural clinical leishmaniasis. *Vet. Parasitol.*, **147**: 315-319.
- Solano-Gallego L., Koutinas A., Miro G., Cardoso L., Pennisi M.G., Ferrer L., Bourdeau P., Oliva G., Baneth G., 2009. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniasis. *Vet. Parasitol.*, **165**: 1-18.
- Sreenivas G., Ansari N.A., Singh R., Subba Raju B.V., Bhatheja R., Negi N.S., Salotra R., 2002. Diagnosis of visceral leishmaniasis: comparative potential of amastigote antigen, recombinant antigen and PCR. *Br. J. Biomed. Sci.*, **59**: 218-222
- Srivastava P., Mehrotra S., Tiwary P., Chakravarty J., Sundar S., 2011. Diagnosis of Indian visceral leishmaniasis by nucleic acid detection using PCR. *PLoS One*, **6**: e19304.

- Srividya G., Kulshrestha A., Singh R., Salotra P., 2012.** Diagnosis of visceral leishmaniasis: developments over the last decade. *Parasitol. Res.*, **110**: 1065-1078.
- Sterkers Y., Crobu L., Lachaud L., Pagès M., Bastien P., 2014.** Parasexuality and mosaic aneuploidy in *Leishmania*: alternative genetics. *Trends Parasitol.*, **30**: 429-435.
- Strelkova M.V., 1996.** Progress in studies on Central Asian foci of zoonotic cutaneous leishmaniasis: a review. *Folia Parasitol. (Praha)*, **43**: 1-6.
- Strelkova M.V., Eliseev L.N., Ponirovsky E.N., Dergacheva T.I., Annacharyeva D.K., Erokhin P.I., Evans D.A., 2001.** Mixed leishmanial infections in *Rhombomys opimus*: a key to the persistence of *Leishmania major* from one transmission season to the next. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, **95**: 811-819.
- Suárez Rodríguez B., Isidoro Fernández B., Santos Sanz S., Sierra Moros M.J., Molina Moreno R., Astray Mochales J., Amela Heras C., 2012.** Situación epidemiológica y de los factores de riesgo de transmisión de *Leishmania infantum* en España. *Rev. Esp. Salud Publica*, **86**: 555-564.
- Sundar S., Agrawal S., Pai K., Chance M., Hommel M., 2005.** Detection of leishmanial antigen in the urine of patients with visceral leishmaniasis by a latex agglutination test. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **73**: 269-271.
- Sundar S., Singh R.K., Bimal S.K., Gidwani K., Mishra A., Maurya R., Singh S.K., Manandhar K.D., Boelaert M., Rai M., 2007.** Comparative evaluation of parasitology and serological tests in the diagnosis of visceral leishmaniasis in India: a phase III diagnostic accuracy study. *Trop. Med. Int. Health*, **12**: 284-289.
- Takagi H., Islam M.Z., Itoh M., Islam A.U., Saifuddin Ekram A.R., Hussain S.M., Hashiguchi Y., Kimura E., 2007.** Short report: production of recombinant kinesin-related protein of *Leishmania donovani* and its application in the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **76**: 902-905.
- Takagi H., Itoh M., Islam M.Z., Razzaque A., Ekram A.R., Hashighuchi Y., Noiri E., Kimura E., 2009.** Sensitive, specific, and rapid detection of *Leishmania donovani* DNA by loop-mediated isothermal amplification. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **81**: 578-582.
- Talmi-Frank D., Nasereddin A., Schnur L.F., Schönian G., Töz S.O., Jaffe C.L., Baneth G., 2010.** Detection and identification of old world *Leishmania* by high resolution melt analysis. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, **4**: e581.
- Ter Horst R., Tefera T., Assefa G., Ebrahim A.Z., Davidson R.N., Ritmeijer K., 2009.** Field evaluation of rK39 test and direct agglutination test for diagnosis of visceral leishmaniasis in a population with high prevalence of human immunodeficiency virus in Ethiopia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **80**: 929-933.
- Tibayrenc M., Ayala F.J., 2002.** The clonal theory of parasitic protozoa: 12 years on. *Trends Parasitol.*, **18**: 81-85.
- 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. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **88**: 586-591.
- Tomás-Pérez M., Khaldi M., Riera C., Mozo-León D., Ribas A., Hide M., Barech G., Benyettou M., Seghiri K., Doudou S., Fisa R., 2014.** First report of natural infection in hedgehogs with *Leishmania major*, a possible reservoir of zoonotic cutaneous leishmaniasis in Algeria. *Acta Trop.*, **135**: 44-49.
- Tsukayama P., Lucas C., Bacon D.J., 2009.** Typing of four genetic loci discriminates among closely related species of New World *Leishmania*. *Int. J. Parasitol.*, **39**: 355-362.
- Van der Meide W.F., Schoone G.J., Faber W.R., Zeegelaar J.E., de Vries H.J., Ozbel Y., Lai A., Fat R.F., Coelho L.I., Kassi M., Schallig H.D., 2005.** Quantitative nucleic acid

- sequence-based assay as a new molecular tool for detection and quantification of *Leishmania* parasites in skin biopsy samples. *J. Clin. Microbiol.*, **43**: 5560-5566.
- Van der Meide W., Guerra J., Schoone G., Farenhorst M., Coelho L., Faber W., Peekel I., Schallig H., 2008.** Comparison between quantitative nucleic acid sequence-based amplification, real-time reverse transcriptase PCR, and real-time PCR for quantification of *Leishmania* parasites. *J. Clin. Microbiol.*, **46**: 73-78.
- Verma S., Kumar R., Katara G.K., Singh L.C., Negi N.S., Ramesh V., Salotra P., 2010.** Quantification of parasite load in clinical samples of leishmaniasis patients: IL-10 level correlates with parasite load in visceral leishmaniasis. *PLoS One*, **5**: e10107.
- Verma S., Avishek K., Sharma V., Negi N.S., Ramesh V., Salotra P., 2013.** Application of loop-mediated isothermal amplification assay for the sensitive and rapid diagnosis of visceral leishmaniasis and post-kala-azar dermal leishmaniasis. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, **75**: 390-395.
- Victoir K., Bañuls A.L., Arevalo J., Llanos-Cuentas A., Hamers R., Noël S., De Doncker S., Le Ray D., Tibayrenc M., Dujardin J.C., 1998.** The gp63 gene locus, a target for genetic characterization of *Leishmania* belonging to subgenus Viannia. *Parasitology*, **117**: 1-13.
- Vilaplana C., Blanco S., Domínguez J., Giménez M., Ausina V., Tural C., Muñoz C., 2004.** Noninvasive method for diagnosis of visceral leishmaniasis by a latex agglutination test for detection of antigens in urine samples. *J. Clin. Microbiol.*, **42**: 1853-1854.
- 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 Res.*, **24**: 1688-1694.
- World Health Organization (WHO), 1984.** The leishmaniasis. *Technical report series*, 701. World Health Organization (edit.), Genève, 140 pp.
- World Health Organization (WHO), 2007.** Report of the Fifth Consultative Meeting on *Leishmania*/HIV Coinfection Addis Ababa, Ethiopia, 20–22 March 2007.
- World Health Organization (WHO), 2010.** Control of the leishmaniasis: Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22-26 March 2010. *WHO Technical Report Series*, 949.
- World Health Organization (WHO), 2013.** Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases: Second WHO report on neglected diseases. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data.
- 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. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **72**: 415-420.
- Zemanová E., Jirků M., Mauricio I.L., Miles M.A., Lukes J., 2004.** Genetic polymorphism within the *Leishmania donovani* complex: correlation with geographic origin. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **70**: 613-617.
- Zemanová E., Jirků M., Mauricio 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. *Int. J. Parasitol.*, **37**: 149-160.
- Zingales B., Miles M.A., Campbell D.A., Tibayrenc M., Macedo A.M., Teixeira M.M., Schijman A.G., Llewellyn M.S., Lages-Silva E., Machado C.R., Andrade S.G., Sturm N.R., 2012.** The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect. Genet. Evol.*, **12**: 240-253.