





## ORIGINAL BREVE

# IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE *Leishmania* EN PACIENTES DERIVADOS AL INSTITUTO NACIONAL DE SALUD DEL PERÚ

Aidé Sandoval-Juárez <sup>1,a</sup>, Gloria Minaya-Gómez <sup>1,b</sup>, Nyshon Rojas-Palomino <sup>1,c</sup>, Omar Cáceres <sup>2,3,d</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Referencia Nacional de Leishmaniasis, Instituto Nacional de Salud, Lima, Perú.

<sup>2</sup> Laboratorio de Biotecnología y Biología Molecular, Instituto Nacional de Salud, Lima, Perú.

<sup>3</sup> Escuela de Medicina Humana, Facultad de Ciencias de la Vida, Universidad Científica del Sur, Lima, Perú.

<sup>a</sup> Bióloga, magister en Salud Pública; <sup>b</sup> bióloga, máster en Medicina Tropical y Salud Internacional; <sup>c</sup> biólogo; <sup>d</sup> biólogo, magister en Bioquímica y Biología Molecular.

## RESUMEN

En el Perú, la leishmaniasis es una enfermedad metaxénica que representa un serio problema de salud pública, debido a su amplia distribución y al número de personas en riesgo de contraer la enfermedad, siendo la población vulnerable principalmente las personas de bajos recursos económicos. El estudio se realizó a partir de pacientes que fueron derivados al Instituto Nacional de Salud entre el 2006 y el 2011 para que se les realizara el diagnóstico especializado. La identificación de la especie de *Leishmania* infectante se desarrolló mediante el análisis de las curvas de disociación (HRMA) obtenidas a partir del ADN genómico de promastigotes y amastigotes, lo que permitió identificar las especies de *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (V.) guyanensis*, *Leishmania (V.) peruviana* como las más prevalentes, además de *Leishmania (V.) lainsoni* y *Leishmania (L.) amazonensis*.

**Palabras clave:** Leishmaniasis Cutánea; Minicirulos de ADN Cinetoplasto; Tipificación Molecular; Reacción en Cadena en Tiempo Real de la Polimerasa; Perú (fuente DeCS BIREME).

## IDENTIFICATION OF *Leishmania* SPECIES IN PATIENTS DERIVED TO THE NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH, PERU

## ABSTRACT

In Peru, leishmaniasis is a metaxenic disease that represents a serious public health problem, due to its wide distribution and the number of people in danger of contracting the disease, being the vulnerable population mainly those with low economic resources. The study was conducted from patients who were derived to Peru's National Institute of Health between 2006 and 2011 so that the specialized diagnosis could be carried out. The identification of the species of infectious *Leishmania* was developed through the analysis of the High-Resolution Melting Analysis obtained from the genomic DNA of promastigotes and amastigotes, which allows to identify the species of *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (V.) guyanensis*, *Leishmania (V.) peruviana* as more prevalent, in addition to *Leishmania (V.) lainsoni* and *Leishmania (L.) amazonensis*.

**Keywords:** Cutaneous Leishmaniasis; kDNA minicircles; Molecular Typing; Real-Time PCR; Peru (source: MeSH NLM).

**Citar como:** Sandoval-Juárez A, Minaya-Gómez G, Rojas-Palomino N, Cáceres O. Identificación de especies de *Leishmania* en pacientes derivados al Instituto Nacional de Salud del Perú. Rev Peru Med Exp Salud Publica. 2019;37(1):87-92. Doi: <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2020.371.4514>

**Correspondencia:** Aide Sandoval Juarez; Jr. Capac Yupanqui 1400, Jesus María, Lima, Perú; [aidesandoval5@gmail.com](mailto:aidesandoval5@gmail.com)

**Recibido:** 03/05/2019

**Aprobado:** 15/12/2019

**En línea:** 23/03/2020

## INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis es una enfermedad metaxénica desatendida. En los últimos cinco años, se ha reportado en todo el mundo, aproximadamente, un millón de casos de leishmaniasis cutánea, con un estimado de 220 mil casos por año y más de 399 millones de personas en riesgo de infección <sup>(1,2)</sup>. En Perú, la leishmaniasis tegumentaria americana (LTA) es considerada un problema de salud pública por afectar predominantemente a la población más pobre, debido a su amplia distribución geográfica <sup>(3)</sup> y la diversidad de especies circulantes. Las especies más prevalentes son *Leishmania (Viannia) braziliensis* y *Leishmania (V.) guyanensis*, principalmente en las regiones de Madre de Dios, Ucayali y San Martín; *Leishmania (V.) peruviana* en Lima, Ancash, La Libertad y Cajamarca; mientras que *Leishmania (L.) amazonensis* ha sido poco reportada, principalmente en las regiones de Junín, Amazonas y Ucayali. Otras especies como *Leishmania (V.) lainsoni*, *Leishmania (V.) shawi*, *Leishmania (V.) panamensis*, *Leishmania (V.) colombiense* y la especie híbrida

*Leishmania braziliensis/peruviana* han sido esporádicamente reportadas<sup>(4-7)</sup>.

Entre el 2000 y el 2018, el Ministerio de Salud (MINSA) del Perú reportó 135 233 casos confirmados, con un promedio de 7117 casos anuales, de los cuales aproximadamente el 94% (6685 casos) fueron cutáneos y el 6% (432) fueron de la forma cutáneo-mucosa. Asimismo, en 2018 las regiones de Madre de Dios y Cusco conglomeraron al 25% del total de los casos reportados<sup>(3)</sup>.

La identificación de las especies de *Leishmania* se realiza mediante el secuenciamiento de múltiples locus (MLST), electroforesis de isoenzimas (MLEE), anticuerpos monoclonales, secuenciamiento de marcadores moleculares específicos<sup>(8,9)</sup> y por amplificación de múltiples marcadores en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional<sup>(10)</sup>. Por otro lado, el análisis de las curvas de disociación o *high resolution melting analysis* (HRMA) es un método molecular posterior al PCR en tiempo real que permite, mediante el análisis de las curvas de disociación del ADN, la identificación molecular a nivel de especie<sup>(11)</sup>, de poblaciones, así como mutaciones puntuales (SNP)<sup>(12)</sup>.

El Instituto Nacional de Salud (INS) es un organismo público ejecutor del MINSA adonde se refieren pacientes con sospecha clínica de leishmaniasis, derivados principalmente de hospitales nacionales, Fuerzas Armadas y Sanidad Policial procedentes de diferentes áreas endémicas del Perú. El INS realiza el diagnóstico confirmatorio de la enfermedad. En casos cutáneos de reciente evolución, el diagnóstico se logra principalmente mediante métodos parasitológicos, como el examen microscópico directo o frotis, ampliamente usado debido a su bajo costo, y el cultivo *in vitro*. Mientras que para el diagnóstico inmunoserológico de la forma cutánea crónica y mucosa de la enfermedad se usa la inmunofluorescencia indirecta (IFI) y la prueba intradermoreacción de Montenegro (IDRM). Por otro lado, a pesar de la eficiencia de los métodos moleculares como el PCR para la detección del parásito, su implementación está restringido a centros especializados con equipamiento, infraestructura y presupuesto adecuado, además de personal especializado que garantice la continuidad del servicio.

El objetivo del presente estudio fue identificar las especies de *Leishmania* infectante en pacientes derivados al INS en el periodo 2006-2011, mediante el análisis de las curvas de disociación del ADN.

## EL ESTUDIO

El presente estudio fue de tipo observacional, descriptivo y retrospectivo. La población estuvo conformada por pacientes con sospecha clínica de LTA acudieron al INS entre el 2006 al 2011, derivados de hospitales nacionales por presentar lesiones cutáneas ulcerosas de bordes elevados, nodulares o en placas o a nivel de mucosas, y que fueron confirmados

## MENSAJES CLAVE

**Motivación para realizar el estudio:** Contribuir en la descripción, actualización y distribución geográfica de las especies de *Leishmania* en el Perú.

**Principales hallazgos:** La identificación de *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) peruviana*, como especies con mayor prevalencia en el país, además de *Leishmania (V.) lainsoni* y *L. (L.) amazonensis*, este último identificado en una paciente procedente de Huánuco, área sin antecedente de su circulación.

**Implicancias:** El análisis de las curvas de disociación por HRMA, permite la identificación rápida y oportuna de la especie de *Leishmania* infectante, importante para determinar el pronóstico de la enfermedad, así como para el desarrollo de estudios que permitan conocer las distintas especies de *Leishmania* que circulan en el Perú.

por métodos parasitológicos en el Laboratorio de Referencia Nacional de Leishmaniasis del INS.

La identificación de *Leishmania* se realizó a partir del ADN genómico extraído de amastigotes obtenidos mediante raspado de la lesión cutánea con lanceta estéril, conservados en alcohol de 70° y de promastigotes a partir del cultivo *in vitro*. Las muestras se obtuvieron como parte del desarrollo de la rutina diagnóstica para la confirmación del caso. La extracción del ADN se realizó empleando las recomendaciones del kit comercial PureLink Genomic DNA (Invitrogen, Life-technologies). Las muestras de ADN fueron eluidas en un volumen de 60 µl y conservadas en congelación hasta su posterior uso.

El estudio fue realizado mediante la amplificación de una región del ADN del kinetoplasto (kDNA) en un termociclador RotorGene Q (Qiagen), en un volumen de reacción de 10 µl; se empleó 2 µl (5 ng/µl) de ADN parasitario, 0,7 µM de los cebadores A1: 5'-CCG CCC CTA TTT TAC ACC AAC CCC-3 y A2: 5'-GGG GAG GGG CGT TCT GCG AA-3'<sup>(13)</sup> y 1X de la solución HRM-PCR Master Mix (Kit Tipe-it HRM PCR, Qiagen).

La identificación de las especies de *Leishmania* se desarrolló mediante el análisis de las curvas de disociación empleando cepas referenciales como muestras control, los códigos OMS se detallan en el Anexo 1. La identificación por HRMA de una muestra problema se logró por comparación del perfil obtenido frente a un control y expresado en porcentaje de similitud o semejanza por el programa Rotor Gene Q Series Software versión 2.3.1.

Asimismo, con la finalidad de confirmar los hallazgos encontrados en la identificación de *Leishmania* por HRMA, se determinó la concordancia con 14 muestras seleccionadas aleatoriamente por secuenciamiento del gen citocromo B de *Leishmania*

spp, según metodología descrita por Foulet *et al.* (8). Los cebadores empleados fueron Lei-CytB09: 5'-TTATGGGTGTAGGTTTATAGTYTAGGTT-3' y Lei-CytB12: 5'-TGCTAAAAAACCCTCA-TAAATATACT-3'. Las secuencias obtenidas fueron analizadas y comparadas con la base de datos del GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>).

Se determinó la frecuencia de las variables edad, sexo, ocupación, procedencia, tiempo de enfermedad, número de lesiones, tipo de lesiones, localización y superficie total comprometida de la lesión. Además, usando las variables del lugar probable de infección (a nivel regional) y la especie de *Leishmania* identificada, se elaboró un mapa de distribución con el sistema de información geográfica Quantum GIS versión 3.8.

El estudio contó con la aprobación del Comité de Ética en Investigación del INS. También se solicitó la autorización de uso y análisis de las cepas al Laboratorio de Referencia Nacional de Leishmaniasis.

## RESULTADOS

Entre enero del 2006 a diciembre del 2011, 262 pacientes con sospecha clínica de leishmaniasis fueron derivados al INS, sólo 101 pacientes cumplieron los criterios para el diagnóstico parasitológico de la enfermedad, 69 (68,3%) de los cuales fueron

confirmados para LTA y 32 (31,7%) fueron negativos en el diagnóstico parasitológico e inmunoserológico, siendo descartados para la enfermedad.

De los pacientes confirmados, mediante HRMA y por comparación con las muestras control, se logró la identificación de *Leishmania* en 45 pacientes; mientras que, en los 24 restantes no se logró determinar la especie de *Leishmania* infectante, debido al valor de similitud encontrado frente a los controles por debajo del valor de corte establecido.

De las 45 muestras de los pacientes confirmados por HRMA, el 40% se identificó como *Leishmania (V.) braziliensis*, el 28,9% como *Leishmania (V.) guyanensis*, el 17,8% como *Leishmania (V.) peruviana*, el 6,7% como *Leishmania (L.) amazonensis*, y el 6,7% como *Leishmania (V.) lainsoni* (Figura 1).

Para la identificación de las especies, se asumió una similitud  $\geq 98\%$  como valor de corte, a excepción de las muestras identificadas como *Leishmania (V.) lainsoni* cuyo valor de corte fue  $\geq 78\%$ . Con este criterio se identificó la especie de *Leishmania* infectante en un total de 45 pacientes, 42 de los cuales presentaron una similitud  $\geq 98\%$  y los tres restantes una similitud  $\geq 78\%$ .

De los 45 pacientes identificados, 43 (96%) presentaron la forma cutánea, de los cuales 17 (38%) fueron causados por *Leishmania (V.) braziliensis* procedentes de Amazonas, Cajamarca, Cusco, Huánuco, Loreto, Madre de Dios y San Martín;



**Figura 1.** Lesiones causadas por (A) *Leishmania (V.) guyanensis*, (B) *Leishmania (V.) braziliensis*, (C) *Leishmania (L.) amazonensis*, (D) *Leishmania (V.) lainsoni*, y (E) *Leishmania (V.) peruviana*

12 (27%) por *Leishmania (V.) guyanensis* procedentes de Amazonas, Cusco, Huánuco, La Libertad, Lima y San Martín 8 (18%) por *Leishmania (V.) peruviana* procedentes de Amazonas, Ayacucho, Huánuco, Junín, Lambayeque y Lima; 3 (7%) por *Leishmania (V.) lainsoni* procedentes de las provincias de La Convención, Satipo y Huaura en las regiones de Cusco, Junín y Lima, respectivamente; y 3 (7,0%) por *Leishmania (L.) amazonensis* procedentes de las provincias de La Mar y Huanta en la región de Ayacucho y Churubamba en Huánuco (Anexo 2).

En esta última localidad se logró identificar la especie descrita a partir de una paciente que tenía la forma cutánea diseminada. Por otro lado, el 4% estuvo conformado por dos pacientes procedentes de las provincias de Puerto Inca y Huánuco afectados por la forma cutáneo-mucosa, en quienes se logró identificar *Leishmania (V.) braziliensis* y *Leishmania (V.) guyanensis*, respectivamente.

Asimismo, los resultados identificados por HRMA y las 14 muestras secuenciadas aleatoriamente permitieron determinar una concordancia del 100%.

Las características clínico epidemiológicas de los 45 pacientes, en quienes se logró la identificación de la especie de *Leishmania* infectante se detalla en la Tabla 1.

## DISCUSIÓN

En la presente investigación, se desarrolló la identificación de *Leishmania* en 45 pacientes confirmados para LTA, mediante el análisis de las curvas de disociación del kDNA, lográndose la identificación de *Leishmania (V.) braziliensis*, *Leishmania (V.) guyanensis*, *Leishmania (V.) peruviana*, *Leishmania (V.) lainsoni* y *Leishmania (L.) amazonensis*, especies reportadas en estudios previos<sup>(4,14)</sup>.

Para la identificación de las especies de *Leishmania* se estableció un valor de corte relacionado con el grado de divergencia genética, la estrecha relación entre *Leishmania (L.) amazonensis* y *Leishmania (L.) mexicana* en el subgénero *Leishmania* y *Leishmania (V.) braziliensis*, *Leishmania (V.) peruviana*, *Leishmania (V.) guyanensis* y *Leishmania (V.) panamensis* en el subgénero *Viannia*, ha motivado la elección del  $\geq 98\%$  de similitud como valor de corte, a diferencia del  $\geq 78\%$  de similitud asumido para *Leishmania (V.) lainsoni*, debido a que esta especie presenta características particulares a nivel de kDNA, que difiere de las demás especies del subgénero *Viannia*<sup>(15,16)</sup>. En nuestro estudio, esta especie fue identificada en muestras de tres pacientes procedentes de Cusco, Junín y Lima, en esta última se logró la confirmación por secuenciamiento del gen citocromo B, mientras que las muestras procedentes de Cusco y Junín fueron confirmadas mediante análisis de fragmentos de restricción de longitud polimórfica (PCR-RFLP)<sup>(17)</sup>. Por el contrario, las muestras de pacientes que no alcanzaron el valor de corte no fueron consideradas debido a que la identificación podría no ser correcta.

**Tabla 1.** Características sociodemográficas y epidemiológicas de casos confirmados de leishmaniasis, 2006-2011 (n=45)

VARIABLES DEMOGRÁFICAS	n (%)
Edad (años)	
0-4	5 (11,1)
5-16	7 (15,6)
17-26	10 (22,2)
27-64	18 (40)
>65	5 (11,1)
Sexo	
Femenino	18 (40)
Masculino	27 (60)
Ocupación	
Agricultura	17 (37,8)
Minería	1 (2,2)
Estudiantes	8 (17,8)
Policía y fuerzas militares	4 (8,9)
Profesionales de la salud	2 (4,4)
Actividad intradomiliaria (amas de casa, etc.)	8 (17,8)
Otros <sup>a</sup>	5 (11,1)
Procedencia	
Andina	18 (40,0)
Selvática	27 (60,0)
VARIABLES CLÍNICAS	
Forma clínica	
Cutánea <sup>b</sup>	43 (95,6)
Cutáneo-mucosa	2 (4,4)
Tiempo de la enfermedad (meses)	
<1	5 (11,1)
1-2	19 (42,2)
3-6	15 (33,3)
>6	6 (13,3)
Número de lesiones	
1	31 (68,9)
2	5 (11,1)
3 o más	9 (20,0)
Tipo de lesión	
Úlcera	40 (88,9)
Úlcera y nódulos	2 (4,4)
Solo nódulos	3 (6,7)
Lugar de la lesión	
Cabeza <sup>c</sup>	16 (35,6)
Tronco <sup>d</sup>	1 (2,2)
Extremidades superiores o inferiores <sup>e</sup>	28 (62,2)
Superficie comprometida (mm)	
<10	8 (17,8)
11-20	17 (37,8)
21-30	10 (22,2)
>30	10 (22,2)

<sup>a</sup> Comerciante, albañil, ingeniero, profesor, empleado público, obrero; <sup>b</sup> incluye un caso de Leishmaniasis cutánea diseminada; <sup>c</sup> pierna, pantorrilla, pie, rodilla, tobillo, muslo, mano, dedo, brazo, antebrazo, codo; <sup>d</sup> pecho, espalda, cadera; <sup>e</sup> fosas nasales, labios, orejas, mejillas, frente, mentón, cabeza, cuello

Asimismo, de las 45 muestras identificadas, el 61% fue aislado de pacientes de procedencia selvática y el 39% de procedencia andina, principalmente de la vertiente occidental de los andes y valles interandinos, lo cual permitió determinar a *Leishmania (V.) braziliensis* seguido por *Leishmania (V.) guyanensis* y *Leishmania (V.) peruviana* como las especies más prevalentes, ampliamente reportadas en nuestro país <sup>(7,18)</sup>. No obstante, la posición ordinal de las mismas puede variar dependiendo de la procedencia de la población, tal como se evidencia en el estudio realizado por Lucas *et al.* en el cual, a partir de una población selvática se determinó a *Leishmania (V.) braziliensis*, seguido por *Leishmania (V.) peruviana* y *Leishmania (V.) guyanensis* como las más prevalentes.

Del mismo modo, estudios de Arévalo *et al.* y Kato *et al.* en poblaciones predominantemente andinas, donde circula principalmente *Leishmania (V.) peruviana*, determinaron a esta especie como la más prevalente seguido por *Leishmania (V.) braziliensis* y *Leishmania (V.) guyanensis*. Otras especies reportadas en la vertiente occidental de los Andes y valles interandinos fueron *Leishmania (V.) braziliensis* en Ancash y Lima <sup>(18)</sup>, y *Leishmania (V.) guyanensis* en Lambayeque, Lima <sup>(19)</sup> y La Libertad <sup>(14)</sup>.

Con respecto a la forma cutáneo-mucosa, a partir de parásitos obtenidos de dos pacientes procedentes de Huánuco, se logró identificar a *Leishmania (V.) braziliensis* y *Leishmania (V.) guyanensis* como las especies infectantes, ambas con reconocida capacidad para desarrollar metástasis y evolucionar a formas agresivas de la enfermedad <sup>(20,21)</sup>. Para la forma clínica cutáneo-mucosa se ha reportado una ocurrencia entre el 5% al 20% del total de casos de leishmaniasis, dependiendo de la región geográfica <sup>(21)</sup>. En Perú, se reporta aproximadamente el 6% de la forma cutáneo-mucosa del total de casos anuales <sup>(3)</sup>. Asimismo, se logró identificar a *Leishmania (L.) amazonensis* como agente causal de leishmaniasis cutánea diseminada en una paciente proveniente de Huánuco, los casos de leishmaniasis con esta forma clínica diseminada, son inusuales y generalmente son comunicados como reportes de casos.

La concordancia de 100% obtenida entre el secuenciamiento por método Sanger y el HRMA, nos permite afianzar la capacidad de este último, y del kDNA empleado como marcador en la identificación de las especies de *Leishmania*

infectante y, a diferencia del secuenciamiento, con menor consumo de tiempo y recursos económicos.

Las limitaciones del presente estudio están referidas al periodo en que se tomaron las muestras (2006-2011), a la desigual distribución geográfica de los pacientes, predominantemente de la región selva, a la falta de identificación del total de las muestras confirmadas debido a la baja carga parasitaria lo que no permitió alcanzar el valor de corte establecido para la identificación por HRMA, a los altos costos de la identificación por secuenciamiento mediante el método Sanger, por lo que no fue posible confirmar las 31 muestras restantes identificadas.

En conclusión, del análisis de las curvas de disociación del ADN o HRMA de 45 pacientes, se lograron identificar las especies de *Leishmania (V.) guyanensis*, *Leishmania (V.) peruviana*, *Leishmania (V.) braziliensis*, *Leishmania (V.) lainsoni* y *Leishmania (L.) amazonensis*, circulantes en 13 regiones de Perú con transmisión autóctona de leishmaniasis. Asimismo, reportamos por primera vez la circulación de *Leishmania (V.) amazonensis* en la región Huánuco, identificada a partir de un caso con leishmaniasis cutánea diseminada. La continuación de estudios relacionados a la identificación de especies de *Leishmania* con un número mayor de muestras, permitirá contar con un mejor conocimiento acerca de la distribución y dispersión de las especies de *Leishmania* spp, considerando el desplazamiento del vector, las variaciones climatológicas, migraciones, actividades extractivas, entre otros factores.

**Contribuciones de los autores:** ASJ conceptuó la investigación, realizó la colecta de datos, proceso y analizó los datos, redactó el manuscrito. GMG realizó el análisis de datos, redacción del manuscrito y revisión crítica. NRP desarrolló el análisis molecular, redactó el manuscrito y realizó la revisión crítica. OC redactó el manuscrito y revisión crítica. Todos los autores aprobaron la versión final del manuscrito.

**Financiamiento:** Este trabajo fue financiado por el Centro Nacional Salud Pública del Instituto Nacional de Salud de Perú.

**Conflictos de interés:** Ninguno

**Material suplementario:** Disponible en la versión electrónica de la RPMESP

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, *et al.* Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. PLoS One. 2012;7(5):e35671. doi: 10.1371/journal.pone.0035671
- The World Health Organization. Leishmaniasis in high-burden countries: an epidemiological update based on data reported in 2014. Relev épidémiologique Hebd. 2016;22(91):285–96.
- Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y control de Enfermedades. Sala de Situación de Salud. Semana Epidemiológica N° 04– 2019 [Internet]. Lima: Ministerio de Salud; 2019. Disponible en: [https://www.dge.gob.pe/portal/index.php?option=com\\_content&view=article&id=664:sala-situacional-2019&catid=2&Itemid=197](https://www.dge.gob.pe/portal/index.php?option=com_content&view=article&id=664:sala-situacional-2019&catid=2&Itemid=197)
- Kato H, Cáceres AG, Mimori T, Ishimaru Y, Sayed ASM, Fujita M, *et al.* Use of FTA cards for direct sampling of patients' lesions in the ecological study of cutaneous leishmaniasis. J Clin Microbiol. 2010;48(10):3661–5 doi: 10.1128/JCM.00498-10
- Urbano J, Minaya-Gómez GS, Sanchez-Moreno M, Gutiérrez-Sánchez R, Marín C. Molecular characterization and geographical distribution of leishmaniasis aethiological agents in Peru. Rev Ibero-Latinoam Parasitol. 2011;70(2):145–56.

6. Tsukayama P, Lucas CM, Bacon DJ. Typing of four genetic loci discriminates among closely related species of New World *Leishmania*. *Int J Parasitol*. 2009;39(3):355-62. doi: 10.1016/j.ijpara.2008.08.004
7. Lucas CM, Franke ED, Cachay MI, Tejada A, Cruz ME, Kreutzer RD, *et al*. Geographic distribution and clinical description of leishmaniasis cases in Peru. *Am J Trop Med Hyg*. 1998;59(2):312-7. doi: 10.4269/ajtmh.1998.59.312
8. Foulet F, Botterel F, Buffet P, Morizot G, Rivollet D, Deniau M, *et al*. Detection and identification of *Leishmania* species from clinical specimens by using a real-time PCR assay and sequencing of the cytochrome b gene. *J Clin Microbiol*. 2007;45(7):2110-5 doi: 10.1128/JCM.02555-06
9. Van der Auwera G, Dujardin J-C. Species typing in dermal leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev*. 2015;28(2):265-94.
10. Castilho TM, Shaw JJ, Lucile M, Floeter-Winter LM. New PCR Assay Using Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase for Identification of *Leishmania* Species New PCR Assay Using Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase for Identification of *Leishmania* Species. *J Clin Microbiol*. 2003;41(2):540-6.
11. Hernandez C, Álvarez C, Gonzales C, Ayala MS, León CM, Ramirez JD. Identification of Six New World *Leishmania* species through the implementation of a High-Resolution Melting (HRM) genotyping assay. *Parasit Vectors*. 2014;7:501-7. doi:10.1186/s13071-014-0501-y.
12. Galarza M, Fasabi M, Levano KS, Castillo E, Barreda N, Rodriguez M, *et al*. High-resolution melting analysis for molecular detection of multidrug resistance tuberculosis in Peruvian isolates. *BMC Infect Dis*. 2016;16(1):260. doi: 10.1186/s12879-016-1615-y
13. Sierra Romero GA, Guerra MV, Paes M, Cupolillo E, Bentin Toaldo C, Macêdo VO, *et al*. Sensitivity of the polymerase chain reaction for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis*. *Acta Trop* 2001;79(3):225-9. doi: 10.1016/s0001-706x(01)00140-1
14. Córdova O, Vargas F, Hashiguchi Y, Kato H, Gómez E. Identificación de especies de *Leishmania* en pacientes y flebotominos en áreas de transmisión en una región del Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Pública*. 2011;28(3):446-53.
15. Corrêa JR, Brazil RP, Soares MJ. *Leishmania* (*Viannia*) *lainsoni* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), a divergent *Leishmania* of the *Viannia* subgenus - A mini review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005;100(6):587-592. doi: 10.1590/S0074-02762005000600014
16. Kocher A, Valière S, Bañuls AL, Muriene J. High-throughput sequencing of kDNA amplicons for the analysis of *Leishmania* minicircles and identification of Neotropical species. *Parasitology*. 2017;1-8. doi: 10.1017/S0031182017002013
17. Fraga J, Veland N, Montalvo Alvarez AM, Praet N, Boggild AK, Valencia BM, *et al*. Accurate and rapid species typing from cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis lesions of the New World. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2012;74(2):142-50. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2012.06.010
18. Arevalo J, Ramirez L, Adauí V, Zimic M, Tulliano G, Miranda-Verástegui C, *et al*. Influence of *Leishmania* (*Viannia*) Species on the Response to Antimonial Treatment in Patients with American Tegumentary Leishmaniasis. *J Infect Dis*. 2007;195(12):1846-51. doi: 10.1086/518041
19. Victoir K, De Doncker S, Cabrera L, Alvarez E, Arévalo J, Llanos-Cuentas A, *et al*. Direct identification of *Leishmania* species in biopsies from patients with American tegumentary leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2003;97(1):80-7 doi:10.1016/S0035-9203(03)90031-9
20. de Oliveira Guerra JA, Prestes SR, Silveira H, Raposo Camara Coelho LI de A, Gama P, Moura A, *et al*. Mucosal Leishmaniasis Caused by *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis* in the Brazilian Amazon. Carvalho EM, editor. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(3):doi: 10.1371/journal.pntd.0000980
21. Di Lella F, Vincenti V, Zennaro D, Afeltra A, Baldi A, Giordano D, *et al*. Mucocutaneous leishmaniasis: report of a case with massive involvement of nasal, pharyngeal and laryngeal mucosa. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2006;35(9):870-872 doi:10.1016/j.ijom.2006.02.015