



REVISTA
INVESTIGACIÓN EN SALUD
UNIVERSIDAD DE BOYACÁ

ISSN: 2389 - 7325 Versión impresa
ISSN: 2539-2018 Versión electrónica en línea

PRÓXIMA PUBLICACIÓN EN LÍNEA

El Comité Editorial de la Revista de Investigación en Salud de la Universidad de Boyacá ha aprobado para publicación este manuscrito, teniendo en cuenta los conceptos de los pares evaluadores y la calidad del proceso de revisión. Se publica esta versión en forma provisional, como avance en línea de la última versión del manuscrito vinculada al sistema de gestión, previa a la estructura y composición de la maquetación y diagramación, como elementos propios de la producción editorial de la revista.

Esta versión se puede descargar, usar, distribuir y citar como versión preliminar tal y como lo indicamos, por favor, tenga presente que esta versión y la versión final digital e impresa pueden variar.

Diagnóstico convencional y molecular de leishmaniasis cutánea y mucocutánea. Una revisión Narrativa

Martínez-Barrera, Dayana Katherin¹. Cuervo-Alza, Lina Valeria². Torres-Martínez, Dayana Sofia^{3*}. Monroy-Díaz, Angela Liliana⁴

1. Estudiante, Bacteriología y Laboratorio Clínico. Universidad de Boyacá, Tunja. Colombia. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1555-022X>.
2. Estudiante, Bacteriología y Laboratorio Clínico. Universidad de Boyacá. Tunja, Colombia. ORCID: <https://orcid.org/0009-0001-1383-6769>.
3. Universidad de Boyacá, Tunja. Colombia. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002->

4013-7656.

4. Universidad de Boyacá. Facultad de Ciencias de la Salud, Tunja. Colombia.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3420-9123>.

***Autor de correspondencia:** Dayana Sofía Torres Martínez. Universidad de Boyacá, Tunja. Colombia. Correo electrónico: daysoftorres@uniboyaca.edu.co

Resumen

Introducción: La leishmaniasis tiene diversas presentaciones clínicas entre ellas la leishmaniasis cutánea (LC) y mucocutánea (LMC) la cuales son enfermedades infecciosas que afectan la piel y las mucosas, causadas por protozoos del género *Leishmania* y transmitida por vectores. Su diagnóstico se centra en la observación del parásito mediante microscopía óptica. **Objetivo:** Identificar el tipo de diagnóstico convencional y molecular que se realiza para LC y LMC que permita evidenciar la evolución de las técnicas diagnósticas en los últimos 10 años. **Materiales y métodos:** Estudio de revisión descriptiva de literatura. Se realizó una búsqueda bibliográfica en diferentes bases de datos, utilizando artículos científicos publicados en los últimos 10 años escritos en español, inglés y portugués, seleccionando un total de 60 artículos. **Resultados:** En la LC el diagnóstico se realiza mediante métodos convencionales como el examen microscópico directo, que busca la presencia de amastigotes en muestras tomadas de lesiones cutáneas, mientras que en la LMC se determina la presencia de anticuerpos tipo IgG. Los métodos moleculares, como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), permiten la

detección y amplificación del ADN del parásito, siendo técnicas más sensibles y específicas que los métodos convencionales y pueden ser útiles en casos donde las cargas parasitarias son bajas. **Conclusiones:** Las técnicas moleculares incrementarían la oportunidad en el diagnóstico y tratamiento de pacientes con LC y LMC debido a su rendimiento diagnóstico.

Palabras clave: leishmaniasis, diagnóstico molecular, enfermedades transmitidas por vectores, microscopia, leishmaniasis cutánea, leishmaniasis mucocutánea

Conventional and molecular diagnosis of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. A Narrative Review

Abstract

Introduction: Cutaneous leishmaniasis (CL) and Mucocutaneous leishmaniasis (MCL) are infectious diseases that affect the skin and mucous membranes, caused by protozoa of the genus *Leishmania* and transmitted by vectors. Their diagnosis focuses on the observation of the parasite by optical microscopy. **Objective:** To identify which conventional and molecular diagnosis is applied to determine CL and MCL. **Materials and methods:** Descriptive literature review study. A bibliographic was conducted in different databases, using scientific articles published in the last 10 years written in Spanish, English, and Portuguese, selecting a total of 60 articles. **Results:** In CL, the diagnosis is made by conventional methods such as direct microscopic examination, looking for the presence of amastigotes in samples taken from skin lesions, while in MCL, the presence of IgG-type antibodies are determined.

On the other hand, molecular methods such as Polymerase Chain Reaction (PCR), allow the detection and amplification of the parasite's DNA, being more sensitive and specific techniques than conventional methods and can be useful in cases where the parasite loads are low. **Conclusions:** Molecular techniques could increase the opportunity in the diagnosis and treatment of patients with CL and MCL due to their diagnostic performance.

Keywords: leishmaniasis, molecular diagnostic techniques, vector-borne diseases, microscopy, cutaneous leishmaniasis, mucocutaneous leishmaniasis.

Diagnóstico convencional e molecular da leishmaniose cutânea e mucocutânea

Resumo

Introdução: A leishmaniose Cutânea (LC) e a Mucocutânea (LMC) são doenças infecciosas que afetam a pele e as mucosas, causadas por protozoários do gênero *Leishmania* e transmitidas por vetores. Seu diagnóstico é focado na observação do parasita por meio de microscopia óptica. **Objetivo:** Identificar o diagnóstico convencional e molecular na LC e LMC. **Materiais e Métodos:** Estudo de revisão descritiva da literatura. Foi realizada uma busca bibliográfica em diferentes bases de dados, utilizando artigos científicos publicados nos últimos 10 anos escritos em espanhol, inglês e português, selecionando um total de 60 artigos. **Resultados:** Na LC, o diagnóstico é feito por métodos convencionais, como o exame microscópico direto, que busca a presença de amastigotas em amostras retiradas de lesões

cutâneas. Adicionalmente, na LMC, são determinados anticorpos do tipo IgG. Por outro lado, os métodos moleculares, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), permitem a detecção e amplificação do DNA do parasita, sendo técnicas mais sensíveis e específicas que os métodos convencionais e podendo ser úteis em casos em que as cargas parasitárias são baixas. **Conclusões:** As técnicas moleculares aumentariam a oportunidade no diagnóstico e tratamento de pacientes com LC e LMC devido ao seu desempenho diagnóstico.

Palavras-chave: leishmaniose, técnicas de diagnóstico molecular, doenças transmitidas por vetores, microscopia.

Introducción

La leishmaniasis involucra un grupo de enfermedades parasitarias causadas por protozoos del género *Leishmania* y transmitidas por vectores del género *Lutzomyia* en el nuevo mundo, con una prevalencia de cerca de 12 millones de personas infectadas en todo el mundo y 2 millones de casos nuevos cada año (1), además del subregistro de casos por posible leishmaniasis asintomática que es hasta del 11,2% en áreas endémicas (2). En América la leishmaniasis cutánea (LC) es endémica en 18 países, donde se reportan alrededor de 54 mil casos anualmente, cerca del 80% de estos son procedentes de Colombia, Brasil, Perú, Nicaragua y Bolivia con el mayor porcentaje de casos en Brasil (3); específicamente en Colombia se reportaron para el año 2023 cerca de 4 mil casos de LC y 84 de leishmaniasis mucocutánea (LMC) (4).

Esta patología suele manifestarse en diferentes formas clínicas, que incluyen la LC, LMC y leishmaniasis visceral (LV) y es considerada como un problema de salud pública mundial, dado su variedad de factores implicados en su transmisión, entre ellos la distribución vectorial, factores ambientales y socioeconómicos (5).

El diagnóstico clínico es limitado dada la variedad de etiologías de origen parasitario, viral, bacteriano y no infeccioso que afecta la piel en las áreas endémicas, que implica un amplio análisis diferencial que debe ser confirmado con pruebas que permita la demostración del agente etiológico (6). El diagnóstico oportuno de la enfermedad es fundamental para desarrollar métodos de tratamiento específicos, limitar la progresión de la enfermedad, reactivaciones y secuelas relacionadas, pues se estima que cerca de 40 millones de personas en el mundo conviven con cicatrices y deformidad en tejidos blandos, especialmente en el rostro y su posible afectación psicológica e implicación laboral y social (7,8).

Para orientar un adecuado diagnóstico es necesario evaluar los antecedentes epidemiológicos del caso sospechoso, además de una adecuada anamnesis, que permitan involucrar las herramientas diagnósticas pertinentes según el caso. Es así que existen técnicas de diagnóstico directo, como la observación microscópica de las lesiones en busca de formas parasíticas, aislamiento de parásitos en cultivo Novy-McNeal-Nicolle (NNN), biopsia para observación histológica, Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) para identificación de género y especie, así como pruebas indirectas como la determinación inmunológica de inmunoglobulinas G, sin embargo de estas últimas las limitaciones están enfocadas en las reacciones cruzadas con otros tripanosomatideos como *Trypanosoma cruzi* (9,10).

Los métodos moleculares se han utilizado de forma fiable para detectar la presencia de ADN del parásito, por medio de muestras clínicas humanas como sangre, orina, suero, médula ósea, ganglios linfáticos, capa leucocitaria y aspiración o raspado de lesiones cutáneas, que se observa como la técnica de diagnóstico en auge dada su capacidad de identificar bajas cargas parasitarias en los tejidos que permite además realizar seguimiento del tratamiento y posibles fallas terapéuticas (11).

La problemática de la leishmaniasis además está centrada en el diagnóstico convencional (microscópico) que solamente se llega hasta el género desconociendo su especie, que aunque brindan alta especificidad no ofrecen garantías de sensibilidad pues depende de factores como: la experiencia del analista, la técnica utilizada, el procesamiento de la muestra, la localización y evolución de la lesión; mientras que, el diagnóstico molecular ofrece una sensibilidad del 90% y especificidad del 100% (12).

Por lo expuesto con anterioridad el objetivo de esta revisión es identificar el diagnóstico de tipo convencional y molecular en leishmaniasis cutánea y leishmaniasis mucocutánea que puede aportar a la actualización en los avances en el diagnóstico de esta patología dirigido a estudiantes de pregrado, posgrado y profesionales de salud en los últimos 10 años.

Materiales y métodos

El presente estudio constituye una revisión narrativa de la literatura. Para la búsqueda inicial de los artículos, se emplearon y validaron las palabras clave "*Leishmania*", "Técnicas de Diagnóstico Molecular", "leishmaniasis Cutánea", "leishmaniasis Mucocutánea" y "Diagnóstico" en Descriptores en Ciencias de la

Salud DeCS/MeSH posteriormente se emplearon combinaciones con los operadores booleanos AND y OR. Se consideraron bases de datos como PubMed, ProQuest, SciELO, MEDLINE y Scopus. Como criterio de inclusión, se seleccionaron artículos publicados entre 2013 y diciembre de 2023, disponibles en español, inglés y portugués, que abarcan los últimos 10 años de publicaciones e investigaciones en esta área que permita una aproximación a la evolución del diagnóstico en este periodo de tiempo.

Como criterios de exclusión, se descartaron los artículos relacionados con la Leishmaniasis visceral, modelos de infección *in vivo*, aquellos con problemas en la visualización del texto completo, los duplicados en la matriz de búsqueda y aquellos que no contribuían al objetivo de la revisión del tema. Para la clasificación de la información, se utilizó el diagrama de flujo Prisma (Figura 1). Se partió de un total de 2,326 artículos, a los cuales se les aplicaron los criterios de exclusión, además de la revisión del título, resumen y texto completo, resultando en un total de 60 artículos.

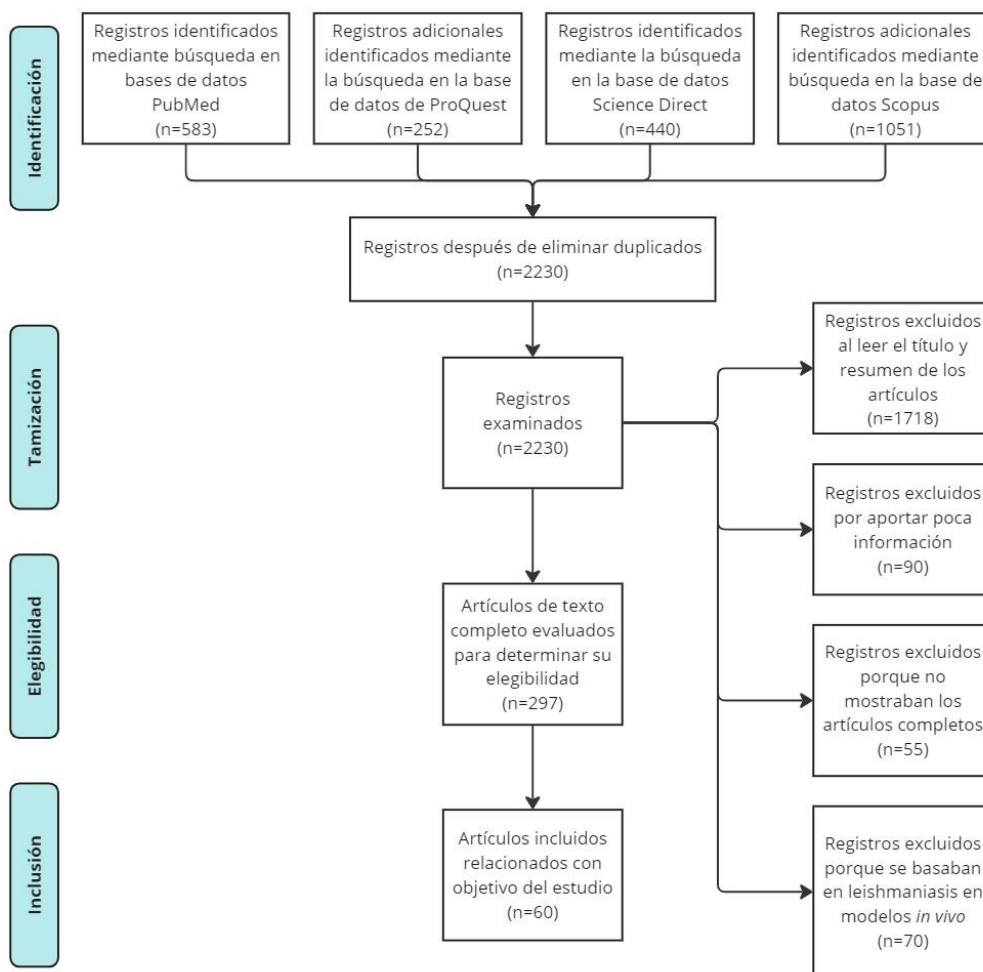


Figura 1. Algoritmo de selección de artículos

Fuente: Autores.

Resultados

1. Epidemiología

La LC es una enfermedad que se presenta en 98 países de todo el mundo ocasionando 1.2 millones de casos, alrededor de un tercio de los estos ocurren en regiones como América, la cuenca mediterránea, Asia occidental, Medio Oriente y Asia central, los diez países con más prevalencias estimadas son Afganistán,

Argelia, Colombia, Brasil, Irán, Siria, Etiopía, Sudán del Norte, Costa Rica y Perú, que representan en conjunto del 70 al 75% de la incidencia global estimada de LC (12–14).

En términos epidemiológicos la LC produce una media mundial de Años de Vida Ajustados por Discapacidad (AVAD) (15) de 0,58 por 100 mil personas, los países latinoamericanos con el AVAD más alto son Bolivia (AVAD 4,6), Haití (AVAD 4,1) y Perú (AVAD 4,0) (16). En Colombia se estiman 18,6 casos de LC por cada 100 mil habitantes en riesgo, esta forma clínica se produce en un 70% en hombres con procedencia rural en un 80% siendo el grupo más afectado entre los 20 a 29 años (17), donde departamentos como Boyacá y Santander aportan importantes cifras a esta endemia (18,19).

La leishmaniasis se ha clasificado tradicionalmente en dos tipos: leishmaniasis del viejo mundo y del nuevo mundo, pues involucran flebótomos de diferentes géneros *Phlebotomus* y *Lutzomyia* respectivamente; *Leishmania* spp. tiene hospederos selváticos como los zorros, armadillos, marsupiales y en el área doméstica los más comunes son los caninos, sumado a ello la deforestación, cambio climático y el aumento de la población humana ha facilitado la expansión de la patología a áreas donde antes no era endémica (20). En cuanto al espectro clínico este involucra la afectación de piel, mucosas y órganos, que esta relacionados con la virulencia del parásito y su especie, clasificándose de esta forma en LC, LMC y LV con periodos de incubación que oscilan entre 4 semanas hasta 6 meses (21,22).

2. Diagnóstico

El diagnóstico se basa en la sospecha epidemiológica de una persona procedente de zona endémica, además de la clínica de la LC que se relaciona con la aparición de úlceras cutáneas indoloras. Los antecedentes de estas lesiones junto con afectación de mucosas como la nariz, la boca y conjuntiva puede relacionarse con LMC (10,23). Para el diagnóstico es relevante mencionar que la forma parasítica aislada del vector corresponde a promastigotes y la forma intracelular encontrada en el huésped humano son los amastigotes (10,23).

2.1 Diagnóstico Clínico

El diagnóstico se hace inicialmente con la sospecha clínica, dada por las afectaciones en piel y mucosas. La LC simple se sospecha cuando se presenta una lesión redondeada de fondo limpio de tamaño variable que puede preceder a la picadura de un insecto y puede crecer hasta convertirse en un nódulo con ulceración central en un tiempo aproximado de 1 a 6 meses (24), estas lesiones se dan en mayor proporción en áreas descubiertas del cuerpo y es indolora salvo que este infectada con bacterias (25).

Es importante tener en cuenta que la presentación de estas lesiones puede variar según la especie involucrada, como *L. donovani*, *L. major*, *L. tropica*, *L. braziliensis*, *L. amazonensis* y *L. mexicana* (26). Además, se debe realizar un diagnóstico diferencial con infecciones por hongos como las ocasionadas por *Paracoccidioides brasiliensis*, *Histoplasma capsulatum*, (26) y por el complejo *Sporothrix schenckii*, así como con infecciones bacterianas como lepra, micobacterias atípicas, sífilis y tuberculosis cutánea, además es necesario considerar úlceras debidas a otras

causas locales, como estasis venosa o neoplasias de la piel (24,27).

En cuanto a la LC difusa, esta se caracteriza por limitada respuesta inmune celular y una consecuente diseminación del parásito por vía tisular y linfática que puede darse con la aparición de nódulos eritematosos que pueden ulcerarse, esta clase de presentación clínica puede conllevar a una LMC pues puede existir compromiso en orofaringe y nasofaringe y vías respiratoria bajas (9), estas lesiones pueden tener auto resolución por lo cual algunas personas no asisten a un centro de salud y presentan recurrencias después de años de evolución (28).

2.2 Diagnóstico por laboratorio

Los métodos utilizados para diagnosticar LC y LMC son diversos, y su utilidad y precisión diagnóstica suelen depender de la forma clínica de presentación (10,26). A continuación, se detallarán las metodologías de diagnóstico directo e indirecto para LC y LMC (ver Tabla 1).

2.3 Diagnóstico directo

El diagnóstico directo implica la detección del parásito en el tejido afectado, esto puede realizarse mediante la observación del mismo mediante técnicas microscópicas, demostración del parásito en cultivo e identificación de ADN parasitario mediante pruebas moleculares (27).

2.3.1 Microscopía óptica

Dentro de las técnicas diagnósticas de primera línea se incluye la microscopía óptica a partir de frotis del tejido afectado. Para la toma de muestra, es necesario realizar isquemia de la lesión para prevenir el sangrado, seguido de un raspado de los bordes con un bisturí quirúrgico estéril (27), donde se espera encontrar una mayor

concentración de amastigotes. Posteriormente, la muestra se fija en un portaobjetos y se tiñe con colorantes estándar para hematología como Giemsa o hematoxilina-eosina (24), en la observación microscópica se confirma la presencia del estadio que mide entre 2 a 4 μm de diámetro (10), presenta un núcleo y un cinetoplasto en forma de bastón (11). Para este procedimiento es importante indagar con la persona afectada el tiempo de evolución de la lesión, puesto que el tiempo está asociado a la presencia de los parásitos por la resolución inmune ante la infección, de otra parte, la lesión no debe estar sobre infectada con bacterias dado que limitaría la sensibilidad de la prueba (27,29).

Otra técnica es el examen de las lesiones mediante biopsia, empleando la lesión más reciente que reporte el paciente, se puede infiltrar con un anestésico local para limitar el dolor (30,31). En el proceso se realiza una punción de 2 a 3 mm del borde activo y se fija en formalina al 10%, posteriormente se adiciona parafina eosina (27) y luego es analizado mediante microscopía o inmunohistoquímica. Se ha demostrado que esta técnica es más sensible que solamente el análisis de raspado de las lesiones con una sensibilidad promedio del 60%, pues los parásitos no se distribuyen de forma homogénea en el tejido, lo cual dificulta su observación en frotis directos. Las limitaciones de estas pruebas están relacionadas con su baja sensibilidad y la identificación hasta género (30,31).

2.3.2 Cultivo

Existen técnicas de cultivo que conservan parte del procedimiento de toma de muestra que se realiza para la biopsia que pueden mejorar la sensibilidad de detección, además proporcionan la opción de identificación de género y especie,

pero su uso es limitado en la rutina, estos pueden ser de tres tipos, líquidos semisólido y bifásico; los dos últimos necesitan sangre, para la génesis de parásitos y los líquidos suero fetal bovino, que aportan factores de crecimiento. El medio más usado es el NNN (Novy, McNeal, Nicolle) (10,32), en el cual se observa el desarrollo de amastigotes a promastigotes, sin embargo, su principal limitación es que requiere largos períodos de incubación, entre 3 y 21 días, que dependen de la especie estudiada (24,27).

Se han descrito otra variedad de medios para el cultivo de *Leishmania* entre ellos el medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI), Medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), Schneider, Infusión de hígado y Triptosa (LIT) suplementados con diferentes porcentajes de suero fetal bovino; recientemente se reportó un medio llamado Nayak para el cultivo de promastigotes que conserva infectividad y morfología para posterior cultivo celular (33).

2.3.3 Técnicas moleculares

La PCR permite elevar la sensibilidad de diagnóstico para el género *Leishmania spp* (11), a partir de diversas muestras como tejido cutáneo, tejido mucocutánea, bazo y medula ósea. Las variaciones de esta técnica como PCR cuantitativa o en tiempo real (qPCR) facilita realizar estimación de cargas parasitarias, seguimiento de tratamiento y evaluar fallas terapéuticas y la PCR de polimorfismo de longitud de fragmento de restricción (PCR- RFLP) aporta a la identificación de la especie parasitaria(27, 31, 34).

Para el uso de esta técnica es necesario el conocimiento del genoma parasitario

que involucra la identificación de blancos genómicos como ADNr (*ITS-1* y *SSU rADN*), ADN de minicírculo de cinetoplasto (*ADNk*), ADN nuclear (27), miniexón líder de empalme (*SMLE*), gen de triparedoxina peroxidasa, gen de la proteína 70 de choque térmico (*HSP70*) (30), gen 18S *rARN*, gen *7SL-RNA* y enzimas del metabolismo de carbohidratos (35).

En las enfermedades mucocutáneas, el uso del *ADNk* como diana genética es altamente sensible para detectar parásitos, mientras que los genes que codifican espaciadores transcritos internos (ITS) son más útiles para la diferenciación de especies (36). En particular, está adquiriendo cada vez mayor relevancia el uso de técnicas moleculares, donde la qPCR se ha vuelto cada vez más útil debido a su rápida velocidad, su amplio rango dinámico(35). En la LC, la PCR ha demostrado ser una herramienta valiosa y su sensibilidad puede alcanzar el 100% (37).

2.3.3.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional

La PCR es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica una secuencia de ADN específica millones de veces. Esta técnica se basa en una replicación realizada por la enzima ADN polimerasa termoestable (Taq polimerasa). Para iniciar la reacción se utiliza una secuencia conocida como cebador o primer, posteriormente se siguen los pasos de desnaturalización de la cadena, hibridación y extensión seguida del número de ciclos de repetición (38). El primer paso es desnaturalizar las cadenas de ADN separadas a 95°C, el segundo paso es la hibridación donde se reduce la temperatura en un rango aproximado entre 35 a 60°C para permitir que los cebadores se unan de forma complementaria al ADN molde y finalmente en la elongación, la enzima polimerasa incorpora nucleótidos adicionales en el extremo

3' libre de la región donde se coloca el cebador híbrido (39).

Como principal ventaja, se permite la utilización de cualquier material biológico que contenga fragmentos de ADN de *Leishmania* spp., además de una alta sensibilidad y especificidad cercana al 100%. Sin embargo, es importante tener en cuenta que estos resultados podrían variar debido a la metodología desarrollada para la extracción, almacenamiento y manipulación del material genético (40).

2.3.3.2 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR)

La qPCR tiene como objetivo detectar y cuantificar secuencias específicas de ácidos nucleicos mediante la lectura de la fluorescencia emitida durante la reacción con las curvas melting, que indica la producción de amplificaciones en cada ciclo (41). La concentración inicial de ADN objetivo se puede cuantificar utilizando estándares con valores conocidos y aumentar gradualmente durante el ciclo de amplificación (42), se utilizan fluoróforos de unión a ADN no específicos como bromuro de etidio o SYBR Green I, sondas de hidrólisis, sondas de hibridación, balizas moleculares o sondas específicas de secuencia. El más utilizado es SYBR Green I, que interactúa con el surco menor de la doble cadena de ADN, emitiendo 1.000 veces más fluorescencia que cuando está libre en solución (38).

Según Gow et al., se han desarrollado kits comerciales disponibles que se basan en la amplificación por PCR y la detección de genes de *Leishmania*, como el Kit de Detección de *Leishmania* EasyScreen, Genesig Leishmania, SMART Leish, y Kit de PCR para *L. major* y *L. tropica*. Estos kits ofrecen una amplia gama de opciones con un gran potencial para ayudar en las respuestas de salud pública (43).

2.3.3.3 PCR fusión de alta resolución (PCR- HRM)

Es un método que se basa en variaciones en secuencias genéticas y utiliza colorantes que se unen al ADN bicatenario para medir la intensidad de fluorescencia durante la disociación de amplicones de ADN de doble cadena a cadena sencilla, generados a partir de un ensayo de qPCR. (39) Los principales blancos genéticos utilizados son *HSP 70*, *ITS1* y *7SL*, y más recientemente se ha empleado el gen de la permeasa de aminoácidos 3 (*aap3*) (39,44). Sus principales ventajas incluyen la reducción de algunos problemas asociados con técnicas moleculares anteriores, como la necesidad de oligonucleótidos modificados, baja precisión y aplicaciones limitadas de alto rendimiento.(44)

2.3.3.4 PCR por polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (PCR-RFLP)

Es una técnica molecular que implica la digestión de productos amplificados mediante PCR con enzimas de restricción, lo que genera fragmentos polimórficos únicos que sirven como marcadores para identificar especies de *Leishmania* (24). Esta metodología ha sido exitosamente utilizada con el análisis de los *ITS*, los cuales están altamente conservados entre las especies *L. donovani*, *L. infantum*, *L. major*, *L. tropica* y *L. aethiopica*. Además, se ha logrado una tipificación más sencilla de *L. infantum* y *L. donovani* tratada previamente con la enzima de restricción Hae III (34,41).

2.3.3.5 Electroforesis enzimática multilocus (MLEE)

Es considerado el método estándar para la caracterización de especies de *Leishmania*. Se basa en la utilización de un perfil isoenzimático mediante la

migración electroforética en gel dependiente del pH, seguido de la comparación de la muestra problema con una cepa de referencia (24,27,45). Este tipo de análisis multilocus se prefiere en la actualidad para estudios poblacionales, ya que logran una mejor resolución además de destacar su importante contribución en el desarrollo de los primeros árboles filogenéticos de este parásito (43). Sin embargo, debido a sus múltiples pasos e infraestructura requerida, se ha consolidado como una prueba engorrosa, lenta y tediosa, por lo que solo se recomienda para el seguimiento epidemiológico en centros de control y es limitado su uso (24,27,45).

2.3.3.6 Amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP)

Es un nuevo método de amplificación de ADN que se realiza en condiciones isotérmicas, se ha usado para detectar ADN de las especies *L. donovani*, *L. tropica* y *L. major*, y permite el diagnóstico rápido y confiable de diferentes formas de leishmaniasis, incluida la CL (39). Este ensayo es fácil de realizar debido a que maneja unos rangos de temperatura más bajos que las técnicas moleculares anteriormente mencionadas oscilando entre 60°C a 65°C, por lo cual no se requiere de un termociclador, es de bajo costo y la visualización de resultados se no requiere de un paso de electroforesis, sino que, puede ser visualizado mediante la adición de colorantes que se unen al ADN (24,30,39).

2.3.3.7 Droplet Digital PCR (dd PCR)

Esta técnica cuantifica la cantidad de moléculas de ADN de una muestra que involucra fluorocromos durante la amplificación del ácido nucleico, sin una curva estándar (46) posterior a ello se agrupan las particiones de la muestra en las que tienen los amplicones y las negativas (sin amplicones), mediante nanofluidos o

emulsiones de agua en aceite, cuantificándolas por métodos estadísticos como la distribución de Poisson (47).

Para el diagnóstico de LC aún es limitado su uso, pero dado que los métodos moleculares tienen mayor sensibilidad se han realizado ensayos para el uso de esta técnica para especies de *Leishmania* del Nuevo Mundo, sin embargo, dado su rendimiento diagnóstico esta técnica no se recomienda para uso rutinario además de su elevado costo sobre otras técnicas como la qPCR (48).

Por otro lado, en hospederos de leishmaniasis como los caninos se evaluó esta técnica para cuantificar la carga parasitaria del microorganismo usando como prueba de referencia la qPCR con 100% de concordancia entre las técnicas específicamente para *Leishmania infantum* (49).

2.4 Diagnóstico indirecto

El diagnóstico serológico se basa en la detección de respuestas humorales específicas, generalmente mediante la identificación de anticuerpos tipo IgG. Entre las principales ventajas de esta técnica se destaca su facilidad de uso, su utilidad en el seguimiento de la enfermedad y sus altos valores de sensibilidad y especificidad. Sin embargo, su uso está recomendado únicamente en las formas clínicas de LMC y LV dada por la especie *L. infantum* (50), ya que en la LC no se suele detectar una respuesta humoral significativa, lo que lleva a tener anticuerpos indetectables (10,43) y puede resultar en falsos negativos debido a la variación antigénica entre las especies de parásitos y a la limitada producción de anticuerpos neutralizantes (39,51).

Por otro lado, el rendimiento diagnóstico de las pruebas serológicas puede variar

según la forma clínica de la leishmaniasis y la región endémica (33), así como debido a la existencia de reacciones cruzadas con otras especies de parásitos como *Trypanosoma cruzi* y *Toxoplasma gondii* (27,29,52). Por esta razón, existen diversas técnicas inmunodiagnósticas disponibles comercialmente que buscan reducir estas limitaciones, mediante la variación de los anticuerpos conjugados y el antígeno blanco a detectar en las muestras de suero. Entre estas técnicas se incluyen la inmunofluorescencia indirecta (IFI), la prueba de aglutinación directa (DAT), el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA), la prueba de aglutinación de látex, el análisis de transferencia Western y, en menor medida, la prueba de tira inmunocromatográfica (29,39,51).

2.4.1 Prueba de Intradermorreacción de Montenegro

Esta prueba no es diagnóstica por sí sola, es orientativa y se basa en una intradermorreacción que se realiza inyectando antígenos de promastigotes de *Leishmania* (29,34), el resultado se evalúa 48 horas post inoculación; se considera que un diámetro mayor a 5 mm indica una reacción positiva (27), su uso está indicado en bajas cargas parasitarias, persistencias de lesiones, o lesiones con más de dos meses de evolución, así como estudios epidemiológicos en áreas endémicas pues su positividad persiste aun tres meses después de la aparición de las lesiones cutáneas (39,53), sin embargo, se utiliza principalmente como complemento en casos de sospecha de LC y LMC, en estudios epidemiológicos de todas las formas de la enfermedad, y en ensayos de vacunas, dado que no puede distinguir entre infecciones pasadas y recientes (26).

Tabla 1. Técnicas de diagnóstico directo e indirecto para LC y LMC

TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO DIRECTO					
Técnica	Fundamento	Ventajas	Limitantes	Forma clínica	Referencias
Microscopía óptica a partir de raspado de tejido cutáneo	Es una observación microscópica de amastigotes en un portaobjetos teñido con colorantes hematológicos como Giemsa, tomada de del paciente mediante un raspado de la lesión	<ul style="list-style-type: none"> • Fácil acceso • Rápido • Económico • Alta especificidad (100%) • Prueba rápida en el punto de atención al paciente 	<ul style="list-style-type: none"> • La detección del agente etiológico depende de la experticia del personal en salud. • No permite la identificación de la especie • El tiempo de evolución de la lesión disminuye la carga parasitaria dificultando su visualización 	LC	(11,21,24,27,39,52)
Microscopía óptica a partir de Biopsia de piel	Permite la observación de amastigotes mediante la tinción hematoxilina- eosina en un corte histopatológico de la zona afectada	<ul style="list-style-type: none"> • Permite descartar otras posibles causas, principalmente enfermedades malignas • Señala la ubicación de los parásitos en el tejido y permite visualizar la respuesta inmune celular 	<ul style="list-style-type: none"> • Técnica invasiva • No permite la identificación de la especie • Presenta baja sensibilidad (60%) • La detección del agente etiológico depende de la experticia del personal en salud. 	LC, LMC	(21,24)
Cultivo	Se utiliza parte del material de biopsia para la inoculación de un medio de cultivo	<ul style="list-style-type: none"> • Su sensibilidad es de 47%– 91,2% • Dependiendo de la especie del parásito las tecnologías de 	<ul style="list-style-type: none"> • Se requiere de personal capacitado para la manipulación del medio y mantenimiento de condiciones estériles 	LC, LMC	(10,21,24,27,29,39)

		<p>microcultivo suelen ser menos costosas debido al menor volumen requerido</p> <ul style="list-style-type: none"> Fácil de usar y buena sensibilidad 	<ul style="list-style-type: none"> Puede contaminarse con bacterias u hongos, ya que, su crecimiento es lento (7-21 días) Los resultados pueden variar dependiendo de la carga y especie parasitaria. 		
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional	Se trata de una reacción enzimática <i>in vitro</i> que amplifica una secuencia de ADN específica millones de veces. La técnica se basa en la replicación por un ADN polimerasa termoestable.	<ul style="list-style-type: none"> Alta sensibilidad (92%-98%) y especificidad (100%) con resultados precisos. Tiene fácil interpretación diagnóstica. Permite la utilización de diferentes muestras. El gen diana más utilizado es el <i>ADNk</i> debido al alto número de copias de los mini círculos (10.000 por célula) 	<ul style="list-style-type: none"> Rango de detección limitado. Dependiendo del marcador genético permite la identificación de género más no especie. La sensibilidad puede verse afectada por el diseño de primers. La sensibilidad puede verse afectada dependiendo del método de extracción empleado. Requiere de un protocolo estandarizado. 	LC, LMC	(10,24,27,29,31,34,38,40,54)
PCR en tiempo real (qPCR)	Se trata de una reacción enzimática <i>in vitro</i> que amplifica un fragmento específico de ADN y este puede ser medido de forma cuantitativa por la sonda de fluorescencia empleada.	<ul style="list-style-type: none"> Alta sensibilidad (90%-98%) Proceso de estandarización más simple Se obtienen resultados rápidos y confiables Es útil para el 	<ul style="list-style-type: none"> La sensibilidad puede verse afectada dependiendo del método de extracción empleado. La sensibilidad puede verse afectada por el diseño de primers. Requiere de un 	LC, LMC	(29,30,38,39,41,43,55,56)

		<p>diagnóstico y seguimiento de los pacientes.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Permite la tipificación de parásitos a nivel de subgénero, complejo o especie. • Se puede usar en estudios epidemiológicos. • El gen diana más utilizado es el <i>ADNk</i> o <i>HSP 70</i> 	<p>protocolo estandarizado.</p>		
<p>PCR fusión de alta resolución (PCR- HRM)</p>	<p>El método implica la utilización de la técnica de PCR en tiempo real para amplificar secuencias de ADN. Luego, se añaden colorantes fluorescentes con el propósito de que se integren.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Obtención de resultados en un tiempo corto. • Baja probabilidad de contaminación. • Emplea los genes <i>HSP 70</i>, <i>ITS1</i>, <i>7SL</i> y <i>aap3</i>. 	<ul style="list-style-type: none"> • Se requiere de personal capacitado. • Se requiere de equipos especializados. • Técnica relativamente costosa. • Se requieren cultivos puros para la estandarización de la técnica 	<p>LC, LMC</p>	<p>(29,39,44)</p>
<p>PCR por polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (PCR- RFLP)</p>	<p>El patrón de bandas del producto puede ser utilizado para identificar una especie particular, basándose en la presencia o ausencia de un sitio de enzima de restricción en el producto de PCR de origen objetivo.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Alta sensibilidad, especificidad y capacidad para descartar un diagnóstico de LC (95%-100%) • Económica a comparación de la PCR en tiempo real. • Se puede utilizar los genes <i>HSP 70</i>, la glicoproteína (gp) 	<ul style="list-style-type: none"> • Los perfiles obtenidos pueden ser difíciles de interpretar debido a la presencia de isoformas, que son variaciones entre copias del mismo parásito, lo que implica que la secuenciación dirigida del objetivo GP63 no sea práctica. 	<p>LC, LMC</p>	<p>(24,29,39)</p>

		63, el ADNk, la cisteína proteasa B, el miniexón o la subunidad 7 de la NADH deshidrogenasa.	<ul style="list-style-type: none"> Limitada reproducibilidad de la técnica entre laboratorios 		
Electroforesis enzimática multilocus (MLEE)	Se basa en la comparación de un perfil de proteínas de la cepa problema y cepa control.	<ul style="list-style-type: none"> Método que permite discriminar las especies de <i>Leishmania</i> de acuerdo al perfil de proteínas del parásito. 	<ul style="list-style-type: none"> Se requiere de una infraestructura adecuada y personal capacitado. Su uso se encuentra limitado a un número restringido de laboratorios en todo el mundo. 	LC, LMC	(24,27,39,43,45)
Amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP)	Se basa en la amplificación de secuencias de ácidos nucleicos empleando una ADN polimerasa de <i>Bacillus stearothermophilus</i> y un conjunto de primers para el reconocimiento del fragmento objetivo de ADN	<ul style="list-style-type: none"> Buena sensibilidad (92-100%) No requiere un termociclador Es relativamente económico y fácil de ejecutar, Empleada en el estudio de insectos vectores. Podría usarse en regiones endémicas donde los recursos médicos son limitados. Permite el diagnóstico rápido y fiable de diferentes formas de leishmaniasis. Resultado se obtiene en un 	<ul style="list-style-type: none"> La sensibilidad puede verse afectada por el diseño de primers. La contaminación residual de las muestras podría arrojar resultados falso positivos. Se requiere de una infraestructura adecuada y personal capacitado. 	LC, LMC	(24,29,30,38,39,57)

		<p>tiempo promedio de 30 minutos.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Se pueden emplear blancos genéticos como <i>18s RNA</i> y <i>ADNk</i>. 			
Droplet Digital PCR (dd PCR)	<p>Se presenta como una alternativa a la qPCR, en esta técnica se permite la cuantificación del ADN dada la partición del material genético en múltiples reacciones que se realizan en paralelo, posteriormente se realizará la amplificación con sondas marcadas con fluoróforos.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • La cuantificación de ADN se logra sin depender de una curva de calibración. • Es posible amplificar blancos genéticos con mayor precisión. • Es útil para la cuantificación de variantes raras. • Puede detectar cantidades pequeñas del blanco genético. 	<ul style="list-style-type: none"> • Cada partición no debe contener más de una molécula objetivo. • Muestras clínicas requieren entre 10.000 a 100.000 particiones aproximadamente. • Se requiere de una infraestructura adecuada y personal capacitado. • Costoso y requiere de controles internos. • Riesgo de contaminación. • No se recomienda su uso rutinario. 	LC	(46–49)
TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO INDIRECTO					
Técnica	Fundamento	Ventajas	Limitantes	Forma clínica	Referencias
Intradermorreacción de Montenegro	<p>Se basa en una reacción de hipersensibilidad de tipo retardado a los antígenos totales de los promastigotes en leishmaniasis</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Tiene valores elevados de sensibilidad y especificidad (86%-100%) 	<ul style="list-style-type: none"> • Limitación a la hora de distinguir entre infecciones actuales y anteriores • Requiere de instalaciones especializadas para la producción del antígeno parasitario. • Puede indicar 	LC, LMC	(10,21,27,29,34,52,58)

			<p>resultados falso negativos en pacientes con LC de menos de 1 mes de duración.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Puede indicar resultados falso positivos en personas de zonas endémicas por infecciones subclínicas. 		
Test de Aglutinación directa (DAT)	Es una redacción de aglutinación entre un antígeno y un anticuerpo siendo <i>L. aethiopica</i> el microorganismo más usado.	<ul style="list-style-type: none"> • Tiene una alta sensibilidad (90,5%) y especificidad (91,8%) 	<ul style="list-style-type: none"> • Para la especie <i>L. donovani</i> tiene una baja sensibilidad. • Falta de valor predictivo para determinar la curación de la enfermedad, ya que se presentan resultados positivos incluso después de años de tratamiento. • Requiere de diluciones seriadas. 	LMC	(29)
Prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI)	Se basa en la detección de anticuerpos anti- <i>Leishmania</i> mediante el uso de antígenos específicos (forma promastigote) y anticuerpos secundarios conjugados con colorantes fluorescentes.	<ul style="list-style-type: none"> • Tiene una alta sensibilidad (96%) y especificidad (98%) 	<ul style="list-style-type: none"> • No correlaciona los niveles de anticuerpos circulantes con el estadio de la enfermedad. • Es costoso • Requiere de un nivel de habilidad técnica y profesionales capacitados. • Pueden presentarse reacciones cruzadas con otros 	LMC	(24,29,30,39,51)

Western blot	Esta técnica permite la identificación de proteínas. Comienza con la extracción de estas, seguida de su separación mediante electroforesis, y luego se transfieren a una membrana donde se expone un anticuerpo específico contra la proteína en estudio junto con un segundo anticuerpo conjugado con fluorescencia.	<ul style="list-style-type: none"> Alta sensibilidad (98%) y especificidad (100%) 	<p>Trypanosomátidos.</p> <ul style="list-style-type: none"> Múltiples pasos para la emisión de resultados por lo cual es lenta y costosa. Necesita de profesionales cualificados. 	LMC	(24,27,39)
Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA)	Es una técnica en la que se detecta un antígeno inmovilizado mediante la unión de un anticuerpo específico y un segundo anticuerpo conjugado con una enzima generando un cambio de color visible.	<ul style="list-style-type: none"> Permite la utilización de una gran cantidad de muestras con diferentes antígenos. Tiene una especificidad cercana a 94% Existe una variedad de antígenos para su uso, estos pueden ser extractos completos o solubles de promastigotes o amastigotes, proteínas recombinantes y proteínas purificadas. 	<ul style="list-style-type: none"> Tiempos de incubación prolongados Baja sensibilidad (58) No discrimina si la enfermedad es activa o el paciente se encuentra en fase de recuperación La sensibilidad de la técnica depende del antígeno usado. 	LMC	(24,29,50)

Fuente: Autores

Discusión

Las técnicas convencionales, como la observación de amastigotes a partir de muestras de raspado de lesión y la biopsia, son necesarias para identificar el parásito en muestras clínicas, lo que facilita un tratamiento temprano para la leishmaniasis. Sin embargo, estas técnicas pueden tener limitaciones en cuanto a sensibilidad y especificidad. Por ello, se han desarrollado nuevas técnicas moleculares que son herramientas útiles en el diagnóstico de LC y la LMC. Entre estas técnicas se encuentran la PCR, que permite la detección del genoma del parásito, la PCR-RFLP, la PCR-HRM que ayuda a identificar las especies de *Leishmania* y la LAMP, una técnica eficaz debido a su alta sensibilidad, especificidad, rapidez, simplicidad y facilidad de uso (29,39,40,59).

En relación a la PCR-HRM es útil para el diagnóstico e identificación de especies de *Leishmania* con un porcentaje del 100% de concordancia con la tipificación obtenida por PCR-RFLP, incluso se logró detectar la presencia de estos parásitos en muestras negativas diagnosticadas por métodos convencionales. Teniendo en cuenta, que presentó una tasa de confianza superior al 95%, logrando identificar 91 muestras de 98, de los cuales, el 81,63% de los casos fueron *L. panamensis*, el 11,22% fueron *L. braziliensis* y el 7,14% de los casos fueron desconocidos (60).

Las técnicas moleculares ofrecen una sensibilidad superior a las técnicas convencionales, lo que se traduce en beneficios significativos para lograr un diagnóstico más preciso y menos invasivo. Es importante tener en cuenta que la PCR es una prueba mucho más rápida y eficaz en la identificación de las especies de *Leishmania*. Por lo tanto, resulta crucial para determinar un tratamiento oportuno, dado

que cada agente etiológico tiene un comportamiento diferente frente a esta enfermedad. La combinación de ambos enfoques mejora la precisión del diagnóstico, optimiza la atención médica y contribuye a un manejo más efectivo de la enfermedad (40,51,60).

Es importante mencionar que, para el diagnóstico de LMC, se utilizan técnicas convencionales acompañadas de serología para detectar anticuerpos específicos contra *Leishmania*. Esta forma clínica de la enfermedad se caracteriza por presentar lesiones más profundas y menos ulcerativas que otras, lo que dificulta su detección mediante la microscopía óptica. Por ello, es fundamental conocer la sensibilidad y especificidad de cada una de estas pruebas para poder detectar la enfermedad en sus distintas formas. No obstante, no se deben descartar estas técnicas convencionales, ya que son esenciales como apoyo diagnóstico no solo para la LMC, sino también para muchas otras enfermedades parasitarias (10,21,43,53).

Con la llegada de la era post-genómica, ha surgido un interés en la inmunoproteómica, que abarca una serie de técnicas enfocadas en la separación, identificación y cuantificación de proteínas. Estas técnicas han permitido mejorar las pruebas de diagnóstico de la leishmaniasis mediante la evaluación del potencial uso de reconocimiento de anticuerpos (30). Además, la combinación de herramientas bioinformáticas como TritypDB o SignalP ha contribuido a la identificación de algunos péptidos sintéticos para el serodiagnóstico biológico (51).

Conclusiones

Cuando se aborda el diagnóstico de las infecciones causadas por LC y LMC, es de suma importancia para garantizar una adecuada gestión de estas enfermedades.

Tanto los métodos moleculares como los convencionales ofrecen varias ventajas al personal de salud durante su aplicación.

El diagnóstico molecular, que incluye técnicas como la PCR proporciona una sensibilidad y especificidad excepcionales, que garantiza resultados más precisos; estos métodos permiten la detección directa del material genético del parásito a partir de diferentes muestras, lo que aumenta las capacidades de diagnóstico en comparación con los métodos tradicionales, que es particularmente valioso en entornos clínicos donde se requiere una respuesta rápida para iniciar el tratamiento adecuado para el paciente.

Por otra parte, es importante reconocer que, a pesar de sus grandes ventajas, los métodos moleculares presentan altos costos, requieren de un personal de laboratorio capacitado además de una infraestructura y equipos especializados. En contraste, los métodos convencionales que, si bien tienen desventajas en cuanto a su sensibilidad, son técnicas menos costosas, asequibles y de fácil manejo lo que las convierte en una de las primeras opciones; estas técnicas permiten una visualización morfológica directa de los parásitos en la muestra, lo que es valioso para confirmar el diagnóstico. Además, permiten el aislamiento y la caracterización de las cepas de *Leishmania*, lo que resulta esencial para la investigación epidemiológica y contribuye a las estrategias de prevención y promoción de esta enfermedad.

Finalmente, esta revisión de las técnicas de diagnóstico ofrece perspectivas que aportan utilidad como base de futuros estudios.

Declaración de Conflictos: Los autores declaran que no existe conflicto de interés a nivel personal, académico, político o financiero.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Oryan A, Akbari M. Worldwide risk factors in leishmaniasis. *Asian Pac J Trop Med*. 2016 Oct 1;9(10):925-32. <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2016.06.021>
2. Mannan S Bin, Elhadad H, Loc TTH, Sadik M, Mohamed MYF, Nam NH, et al. Prevalence and associated factors of asymptomatic leishmaniasis: a systematic review and meta-analysis. *Parasitol Int*. 2021;81:102229. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2020.102229>
3. Herrera G, Barragán N, Luna N, Martínez D, De Martino F, Medina J, et al. An interactive database of Leishmania species distribution in the Americas. *Scientific Data* 2020; 7(1):1-7. <https://doi.org/10.1038/s41597-020-0451-5>
4. Instituto Nacional de Salud. Comportamiento epidemiológico de la leishmaniasis en Colombia la semana epidemiológica 24 de 2023 [Internet]. 2023 Jun [cited 2024 Apr 24]. Disponible en: https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/BoletinEpidemiologico/2023_Bolet%C3%ADn_epidemiologico_semana_25.pdf
5. Okwor I, Uzonna J. Social and Economic Burden of Human Leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 2016 Mar 3 [cited 2024 Apr 24];94(3):489. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.15-0408>

6. Ortega-Moreno ME, Terán-Ángel GA, Hernández MM, Belizario D, Galindo W, Guevara JR. Leishmaniasis cutánea: principales diagnósticos diferenciales. *Dermatología Venezolana* [Internet]. 2019 [cited 2024 Apr 24];57(1). Disponible en: <https://revista.svderma.org/index.php/ojs/article/view/1427>
7. Bailey F, Mondragon-Shem K, Hotez P, Ruiz-Postigo JA, Al-Salem W, Acosta-Serrano Á, et al. A new perspective on cutaneous leishmaniasis-Implications for global prevalence and burden of disease estimates. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2017 Aug 1 [cited 2024 Apr 24];11(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005739>
8. Bilgic-Temel A, Murrell DF, Uzun S. Cutaneous leishmaniasis: A neglected disfiguring disease for women. *Int J Womens Dermatol* [Internet]. 2019 Jul 1 [cited 2024 Apr 24];5(3):158. <https://doi.org/10.1016/j.ijwd.2019.01.002>
9. Arenas R, Torres-Guerrero E, Quintanilla-Cedillo MR, Ruiz-Esmenjaud J. Leishmaniasis: a review. *F1000Res* [Internet]. 2017 [cited 2024 Apr 24];6. <https://doi.org/10.12688/f1000research.11120.1>
10. de Vries HJC, Reedijk SH, Schallig HDFH. Cutaneous Leishmaniasis: Recent Developments in Diagnosis and Management. *Am J Clin Dermatol* [Internet]. 2015 Mar 18 [cited 2024 Apr 24];16(2):99. <https://doi.org/10.1007/s40257-015-0114-z>
11. Aronson NE, Joya CA. Cutaneous Leishmaniasis: Updates in Diagnosis and

Management. *Infect Dis Clin North Am* [Internet]. 2019 Mar 1 [cited 2024 Apr 24];33(1):101-17. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2018.10.004>

12. Isaza-Jaimes A, Rodríguez JE, Chacón G. Una visión acerca de la Leishmaniasis americana y de su comportamiento epidemiológico. 2018 [cited 2024 Apr 24]. Disponible: <https://www.redalyc.org/journal/559/55963208004/55963208004.pdf>

13. Organización Mundial de la Salud. Leishmaniasis in high-burden countries: an epidemiological update based on data reported in 2014 [Internet]. 2016 [cited 2024 Apr 24]. p. 1-10. Disponible: <https://www.who.int/publications/i/item/who-wer9122>

14. Maia-Elkhoury ANS, E. Yadón Z, Idali Saboyá Díaz M, de Fátima de Araújo Lucena F, Gerardo Castellanos L, J. Sanchez-Vazquez M. Exploring Spatial and Temporal Distribution of Cutaneous Leishmaniasis in the Americas, 2001-2011. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2016 Nov 8 [cited 2024 Apr 24];10(11):e0005086. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005086>

15. Antonio M, Choque G. Leishmaniasis con afectación de vía aérea inferior y superior, sin compromiso cutáneo. *Revista americana de medicina respiratoria* [Internet]. 2015 [cited 2024 Apr 24];15(3):241-6. Disponible en: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1852-236X2015000300013&lng=es&nrm=iso&tlng=es

16. Karimkhani C, Wanga V, Coffeng LE, Naghavi P, Dellavalle RP, Naghavi M. Global burden of cutaneous leishmaniasis: a cross-sectional analysis from the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet Infect Dis.* 2016 May 1;16(5):584-91. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)00003-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)00003-7)

17. Instituto Nacional de Salud. Leishmaniasis [Internet]. Vol. 8, *Current Tropical Medicine Reports*. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH; 2022 Jun [cited 2024 Apr 24]. Disponible en: https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/BoletinEpidemiologico/2022_Bolet%C3%ADn_epidemiologico_semana_25.pdf

18. Picón-Jaimes YA, Abril-Sánchez LASR, Ruíz-Rodríguez ERRJ, Jiménez-Peña OM. Comportamiento epidemiológico de la Leishmaniasis cutánea en Boyacá 2012-2015. *Revista Investigación en Salud Universidad de Boyacá* [Internet]. 2017 Jul 24 [cited 2024 Apr 24];4(1):69-85. <https://doi.org/10.24267/23897325.197>

19. Fábregas-Calao RF, González-Roa EK, Sánchez-Neira Y. Microfocalización y estratificación epidemiológica de la leishmaniasis cutánea en el departamento de Santander, periodo 2010 - 2020. *Revista Investigación en Salud Universidad de Boyacá* [Internet]. 2023 Jul 31 [cited 2024 Apr 24];10(2). Disponible en: <https://revistasdigitales.uniboyaca.edu.co/index.php/rs/article/view/734>

20. Alemayehu B, Alemayehu M. Leishmaniasis: A Review on Parasite, Vector and

Reservoir Host. Health Science Journal [Internet]. 2017 [cited 2024 Apr 24];11(4):0-0.
<https://doi.org/10.21767/1791-809X.1000519>

21. Ching Chacón A, Villalobos Romero B, Jiménez Vargas MF. Leishmaniasis: evaluación clínica y diagnóstico. Revista Médica Sinergia [Internet]. 2022 Apr 1 [cited 2024 Apr 24];7(4):e781-e781. <https://doi.org/10.31434/rms.v7i4.781>

22. Mathison BA, Bradley BT. Review of the Clinical Presentation, Pathology, Diagnosis, and Treatment of Leishmaniasis. Lab Med [Internet]. 2023 Jul 5 [cited 2024 Apr 24];54(4):363-71. <https://doi.org/10.1093/labmed/lmac134>

23. Mann S, Frasca K, Scherrer S, Henao-Martínez AF, Newman S, Ramanan P, et al. A Review of Leishmaniasis: Current Knowledge and Future Directions. Curr Trop Med Rep [Internet]. 2021 Jun 1 [cited 2024 Apr 24];8(2):121. <https://doi.org/10.1007/s40475-021-00232-7>

24. Piyasiri SB, Dewasurendra R, Samaranayake N, Karunaweera N. Diagnostic Tools for Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania donovani*: A Narrative Review. Diagnostics 2023, Vol 13, Page 2989 [Internet]. 2023 Sep 18 [cited 2024 Apr 24];13(18):2989. <https://doi.org/10.3390/diagnostics13182989>

25. Mcgwire BS, Satoskar AR. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. QJM: An International Journal of Medicine [Internet]. 2014 Jan 1 [cited 2024 Apr 24];107(1):7.

<https://doi.org/10.1093/qjmed/hct116>

26. Ana Montalvo CM, Fraga J, Lianet Monzote C, García M, Fonseca L. Diagnóstico de la leishmaniasis: de la observación microscópica del parásito a la detección del ADN Leishmaniasis diagnosis: going from microscopic observation of parasite to DNA detection. *Rev Cubana Med Trop* [Internet]. 2012 [cited 2024 Apr 24];64(2):108-31. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602012000200002&lng=es.

27. Masmoudi A, Hariz W, Marrekchi S, Amouri M, Turki H. Old World cutaneous leishmaniasis: diagnosis and treatment. *J Dermatol Case Rep* [Internet]. 2013 Jun 6 [cited 2024 Apr 24];7(2):31. <https://doi.org/10.3315/jdcr.2013.1135>

28. Abadías-Granado I, Cerro P.A AD, Palma-Ruiz AM, Gilaberte Y. Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis. *Actas Dermo-Sifiliográficas (English Edition)* [Internet]. 2021 Jul 1 [cited 2024 Apr 24];112(7):601-18. <https://doi.org/10.1016/j.adengl.2021.05.011>

29. Thakur S, Joshi J, Kaur S. Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of parasitological, immunological and molecular methods. *J Parasit Dis* [Internet]. 2020 Jun 1 [cited 2024 Apr 24];44(2):253. <https://doi.org/10.1007/s12639-020-01212-w>

30. De Brito RCF, Aguiar-Soares RD de O, Cardoso JM de O, Coura-Vital W, Roatt

BM, Reis AB. Recent advances and new strategies in Leishmaniasis diagnosis. *Appl Microbiol Biotechnol* [Internet]. 2020 Oct 1 [cited 2024 Apr 24];104(19):8105-16. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10846-y>

31. Sánchez-Romero C, Júnior HM, Matta VLRD, Freitas LM, Soares CM, Mariano FV, de Almeida OP, Nascimento de Aquino S. Immunohistochemical and Molecular Diagnosis of Mucocutaneous and Mucosal Leishmaniasis. *Int J Surg Pathol*. 2020 Apr;28(2):138-145. <https://doi.org/10.1177/1066896919876706>

32. Saleem Mohammed Ali N. In Vitro new experimentally culture media for Leishmania species cultivation. *Tikrit J. Pharm. Sci.* [Internet]. 2023 Apr. 26 [cited 2024 Apr. 27];13(1):30-6. <https://doi.org/10.25130/tjphs.2018.13.1.5.30.36>

33. Nayak A, Akpunarlieva S, Barrett M, Burchmore R. A defined medium for Leishmania culture allows definition of essential amino acids. *Exp Parasitol* [Internet]. 2018 Feb [cited 2024 Apr 24];185:39-52. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2018.01.009>

34. De Paiva-Cavalcanti M, de Moraes RCS, Pessoa-e-Silva R, Trajano-Silva LAM, Gonçalves-de-Albuquerque S da C, Tavares D de HC, et al. Leishmaniasis diagnosis: An update on the use of immunological and molecular tools. *Cell Biosci* [Internet]. 2015 Jun 17 [cited 2024 Apr 24];5(1):1-10. <https://doi.org/10.1186/s13578-015-0021-2>

35. Tello Armijos VS. Estudio comparativo de métodos moleculares para el diagnóstico

de Leishmaniasis Cutánea [Internet]. Quito : UCE; 2021 [cited 2024 Apr 24]. Disponible en: <https://www.dspace.uce.edu.ec/entities/publication/0c67a5c0-948b-4ae4-9127-a08c8d6a5027>

36. Contreras E. Desarrollo de una prueba de PCR basada en el ADNk, para la identificación de especies en el subgénero *Viannia* en el diagnóstico de la leishmaniosis cutánea americana [Internet]. [Caracas, Venezuela]: Universidad central de Venezuela, Facultad de Ciencias ; 2013 [cited 2024 Apr 24]. Disponible en: <http://saber.ucv.ve/bitstream/10872/15556/4/TEG%20Enrique%20Contreras.pdf>

37. Marin J, Urrea D, Muskus C, Echeverry MC, Mejía AM, Triana O. Curvas de fusión de regiones genómicas específicas: una herramienta prometedora para el diagnóstico y tipificación de las especies causantes de la leishmaniasis cutánea en Colombia. *Biomédica* [Internet]. 2017 Dec 1 [cited 2024 Apr 24];37(4):538-47. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v37i4.3634>

38. León Ramos CM. Evaluación del desempeño analítico del diagnóstico molecular de leishmaniasis cutánea [Internet]. 2017 [cited 2024 Apr 24]. Disponible en: <https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/60290/CieloM.Le%C3%B3nRamos.2017.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

39. Reimão JQ, Coser EM, Lee MR, Coelho AC. Laboratory Diagnosis of Cutaneous and Visceral Leishmaniasis: Current and Future Methods. *Microorganisms* [Internet].

2020 Nov 1 [cited 2024 Apr 24];8(11):1-30.

<https://doi.org/10.3390/microorganisms8111632>

40. Pietrzaki Cerutti PH, Gonçalves Lopes C, Gonçalves Lopes Filho F, Ribeiro Guedes V. Métodos diagnósticos da leishmaniose tegumentar americana: uma revisão de literatura. Revista de patologia do Tocantins [Internet]. 2017 [cited 2024 Apr 25];4(4):55-9. <https://doi.org/10.20873/uft.2446-6492.2017v4n4p55>

41. Méndez Bejarano cp. Cuantificación de la carga parasitaria en leishmaniasis cutánea por medio de PCR en tiempo real [Internet]. Bogotá D.C; 2014 Oct [cited 2024 Apr 24]. Disponible en: <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/15452/MendezBejaranoClaudiaPatricia2014.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

42. Hernández Sánchez MJ. Exactitud de la PCR convencional y el examen directo microscópico como métodos diagnósticos de leishmaniasis cutánea a partir de muestras directas. Revisión [Internet]. [Bogotá D.C]: Pontificia Universidad Javeriana; 2021 [cited 2024 Apr 24]. Disponible en: <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/58153/Exactitud%20de%20la%20PCR%20convencional%20y%20el%20examen%20directo%20microsc%C3%B3pico%20como%20m%C3%A9todos%20diagn%C3%B3sticos%20de%20leishmaniasis%20cut%C3%A1nea%20a%20partir%20de%20muestras%20directas.%20Revisi%C3%B3n.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

43. Gow I, Smith NC, Stark D, Ellis J. Laboratory diagnostics for human Leishmania infections: a polymerase chain reaction-focussed review of detection and identification methods. *Parasites & Vectors* 2022 15:1 [Internet]. 2022 Nov 5 [cited 2024 Apr 24];15(1):1-24. <https://doi.org/10.1186/s13071-022-05524-z>

44. Hernández C, Alvarez C, González C, Ayala MS, León CM, Ramírez JD. Identification of Six New World Leishmania species through the implementation of a High-Resolution Melting (HRM) genotyping assay. *Parasit Vectors* [Internet]. 2014 [cited 2024 Apr 25];7(1):1-7. <https://doi.org/10.1186/s13071-014-0501-y>

45. Jaramillo Antillón O, Espinoza Aguirre A, Calvo Fonseca N, Mata Somarribas C, Wasserman H. La leishmaniosis cutánea en Costa Rica: prevención, diagnóstico y tratamiento [Internet]. 2018 [cited 2024 Apr 24]. Disponible en: http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-60022018000300103&lng=en.

46. Kuypers J, Jerome KR. Applications of Digital PCR for Clinical Microbiology. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2017 Jun 1 [cited 2024 Jun 24];55(6):1621. <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2016.05.002>

47. Whale AS, Huggett JF, Tzonev S. Fundamentals of multiplexing with digital PCR. *Biomol Detect Quantif* [Internet]. 2016 Dec 1 [cited 2024 Jun 24];10:15.

<https://doi.org/10.1016/j.bdq.2016.05.002>

48. Ramírez JD, Herrera G, Muskus C, Mendez C, Duque MC, Butcher R. Development of a Digital Droplet Polymerase Chain Reaction (ddPCR) assay to detect Leishmania DNA in samples from Cutaneous Leishmaniasis patients. *International Journal of Infectious Diseases* [Internet]. 2019 Feb 1 [cited 2024 Jun 25];79:1-3. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2018.10.029>

49. Andrade Pereira D, Gonçalves Teixeira-Neto R, Valadares Lopes V, Pena H, Fontes Paz G, Xavier Custodio C, et al. Development of quantitative PCR and digital PCR for the quantification of *Leishmania infantum* in dogs. *Mol Cell Biochem* [Internet]. 2023 [cited 2024 Jun 24];478:2445-50. <https://doi.org/10.1007/s11010-023-04672-9>

50. Solano-Gallego, L., Villanueva-Saz, S., Carbonell, M. et al. Serological diagnosis of canine leishmaniosis: comparison of three commercial ELISA tests (Leiscan®, ID Screen® and Leishmania 96®), a rapid test (Speed Leish K®) and an in-house IFAT. *Parasites Vectors* 7, 111 (2014). <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-111>

51. Pagniez J, Petitdidier E, Parra-Zuleta O, Pissarra J, Bras-Gonçalves R. A systematic review of peptide-based serological tests for the diagnosis of leishmaniasis. *Parasite* [Internet]. 2023 [cited 2024 Apr 24];30(6). <https://doi.org/10.1051/parasite/2023011>

52. López Domínguez DM, García Delgado JL, Guerrero Caicedo RG, Hernández Bandera N. Gestión de diagnóstico de leishmaniasis cutánea y mucocutánea en Ecuador 2019- 2020. 2021 Jul [cited 2024 Apr 24];LXI(3):461-7. <https://doi.org/10.52808/bmsa.7e5.613.011>
53. Espir TT, Guerreiro TS, Naiff M de F, Figueira L de P, Soares FV, da Silva SS, et al. Evaluation of different diagnostic methods of American Cutaneous Leishmaniasis in the Brazilian Amazon. *Exp Parasitol.* 2016 Aug 1;167:1-6. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2016.04.010>
54. Neitzke-Abreu HC, Venazzi MS, Bernal MVZ, Reinhold-Castro KR, Vagetti F, Mota CA, et al. Detection of DNA from *Leishmania* (*Viannia*): Accuracy of Polymerase Chain Reaction for the Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis. *PLoS One* [Internet]. 2013 Apr 23 [cited 2024 Apr 24];8(7):e62473. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062473>
55. Toz SO, Culha G, Zeyrek FY, Ertabaklar H, Alkan MZ, Vardarli AT, et al. A Real-Time ITS1-PCR Based Method in the Diagnosis and Species Identification of *Leishmania* Parasite from Human and Dog Clinical Samples in Turkey. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2013 [cited 2024 Apr 24];7(5):2205. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002205>
56. Galluzzi L, Ceccarelli M, Diotallevi A, Menotta M, Magnani M. Real-time PCR applications for diagnosis of leishmaniasis. *Parasites & Vectors* 2018 11:1 [Internet].

2018 May 2 [cited 2024 Apr 24];11(1):1-13. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2859-8>

57. Nzelu CO, Kato H, Peters NC. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): An advanced molecular point-of-care technique for the detection of Leishmania infection. PLoS Negl Trop Dis [Internet]. 2019 [cited 2024 Apr 24];13(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007698>

58. Skraba CM, de Mello TFP, Pedroso RB, Ferreira EC, Demarchi IG, Aristides SMA, et al. Evaluation of the reference value for the Montenegro skin test. Rev Soc Bras Med Trop [Internet]. 2015 Jul 1 [cited 2024 Apr 24];48(4):437-44. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0067-2015>

59. Guale Martínez DG, Murillo Zavala AM. Comparación de la sensibilidad y especificidad de las técnicas de laboratorio para el diagnóstico de Leishmaniasis. Revista científica Arbitrada multidisciplinaria PENTACIENCIAS [Internet]. 2023 [cited 2024 Apr 24];5(3):379-412. Disponible en: <https://www.editorialalema.org/index.php/pentaciencias/article/view/557/747>
<https://doi.org/10.59169/pentaciencias.v5i3.557>

60. Villarreal Julio RG, Herrera G, Muskus López CE. Identificación de especies de Leishmania mediante PCR en tiempo real acoplada a curvas de fusión de alta resolución. Rev cuba med trop [Internet]. 2021 [cited 2024 Apr 24]; Disponible en:

http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-
07602021000300007&lng=en&nrm=iso&tlng=en



VERSIÓN PRELIMINAR ACEPTADA