ISUB

ARTÍCULO DE REVISIÓN

REVISTA DE INVESTIGACIÓN EN SALUD. UNIVERSIDAD DE BOYACÁ
2024;11 (1): 118-143. doi: https://doi.org/10.24267/23897325.1139

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

Dayana Katherin Martínez-Barrera[1], Lina Valeria Cuervo-Alza[1], Dayana Sofía Torres-Martínez[1], Ángela Liliana Monroy-Díaz[1]

RESUMEN

Introducción: La leishmaniasis tiene diversas presentaciones clínicas, entre ellas la leishmaniasis cutánea (LC) y la mucocutánea (LMC), ambas 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 microscopia óptica. **Objetivo:** Identificar el tipo de diagnóstico convencional y molecular que se realiza para LC y LMC que evidencie la evolución de las técnicas diagnósticas en los últimos diez años. **Materiales y métodos:** Estudio de revisión descriptiva de literatura. Se realizó una búsqueda bibliográfica en diferentes bases de datos, enfocada en artículos científicos publicados entre enero de 2013 y diciembre de 2023, escritos en español, inglés y portugués. Se seleccionaron un total de 60 artículos. **Resultados:** En la LC, esta se diagnostica 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 inmunoglobulina G. Los métodos moleculares, como la reacción en cadena de la polimerasa, permiten detectar y amplificar el ADN del parásito, que constituyen técnicas más sensibles y específicas que los métodos convencionales y pueden ser útiles en casos en los cuales son bajas las cargas parasitarias. **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.

[1] Universidad de Boyacá (Tunja, Colombia).

Autora de correspondencia: Dayana Sofía Torres Martínez. Correo electrónico: daysoftorres@uniboyaca.edu.co

Citar este artículo así:

Martínez-Barrera DK, Cuervo-Alza LV, Torres-Martínez DS, Monroy-Díaz ÁL. Diagnóstico convencional y molecular de leishmaniasis cutánea y mucocutánea: una revisión narrativa. Rev Investig Salud Univ Boyacá. 2024;11(1):118-143. https://doi.org/10.24267/23897325.1139

Fecha de recibido: 06/12/2023 **Fecha de aceptación:** 10/06/2024

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 search was conducted across various databases, focusing on scientific articles published between January 2013 and December 2023, written in Spanish, English, and Portuguese. A total of 60 articles were selected.

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.

Diagnostico convencional e molecular da leishmaniose cutânea e mococutânea. Uma revisão narrativa.

RESUMO

Introdução: A leishmaniose tem diversas apresentações clínicas, entre elas a leishmaniose cutânea (LC) e a mucocutânea (LMC), ambas doenças infecciosas que afetam a pele e as mucosas, causadas por protozoários do gênero Leishmania e transmitidas por vetores. Seu diagnóstico se concentra na observação do parasita por meio da microscopia óptica.

Objetivo: Identificar o tipo de diagnostico convencional e molecular realizado para LC e LMC que evidencie a evolução das técnicas diagnosticas nos últimos dez anos.

Materiais e métodos: Estudo de revisão descritiva da literatura. Foi realizada uma busca bibliográfica em diferentes bases de dados, focada em artigos científicos publicados entre janeiro de 2013 e dezembro de 2023, escritos em espanhol, inglês e português. Foram selecionados um total de 60 artigos.

Resultados: Na LC, o diagnóstico é realizado por meio de métodos convencionais como o exame microscópico direto, que busca a presença de amastigotas em amostras coletadas de lesões cutâneas; enquanto na LMC, determina-se a presença dos anticorpos do tipo imunoglobulina G. Os métodos moleculares, como a reação em cadeia da polimerase, permitem detectar e amplificar o DNA do parasita, constituindo técnicas mais sensíveis e especificas do que os métodos convencionais e podendo ser úteis em casos de baixa carga parasitaria.

Conclusões: As técnicas moleculares aumentariam a oportunidade de diagnóstico e tratamento de pacientes com LC e LMC, devido a seu desempenho diagnóstico.

Palavras-chave: leishmaniose; diagnóstico molecular; doenças transmitidas por vetores; microscopia; leishmaniose cutânea; leishmaniose muco cutânea.

Introducción

La leishmaniasis involucra un grupo de enfermedades parasitarias causadas por protozoos del género *Leishmania* y son transmitidas por vectores del género *Lutzomyia*, con una prevalencia de cerca de 12 000 000 de personas infectadas en todo el mundo y 2 000 000 de casos nuevos cada año (1). Además, está el 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 54 000 casos anualmente, y cerca del 80 % de estos son procedentes de Colombia, Brasil, Perú, Nicaragua y Bolivia, aun cuando el mayor porcentaje de casos está Brasil (3). En Colombia se reportaron para el 2023 cerca de 4000 casos de LC, y 84 de leishmaniasis mucocutánea (LMC) (4).

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

El diagnóstico clínico es limitado, por la variedad de etiologías de origen parasitario, viral, bacteriano y no infeccioso que afectan la piel en las áreas endémicas. Ello implica un amplio análisis diferencial que debe confirmarse con pruebas que permitan hallar el agente etiológico (6). El diagnóstico oportuno de la enfermedad es fundamental para desarrollar métodos de tratamiento específicos y limitar la progresión de la enfermedad, las reactivaciones y las secuelas relacionadas, pues se estima que cerca de 40 000 000 de personas en el mundo conviven con cicatrices y deformidad en sus tejidos blandos, especialmente en el rostro, y con 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 llevar a cabo una adecuada anamnesis que permita involucrar las herramientas diagnósticas pertinentes según el caso. Así, existen técnicas de diagnóstico directo, como la observación microscópica de las lesiones, que buscan formas parasíticas; aislamiento de parásitos en cultivo Novy-McNeal-Nicolle (NNN); biopsia para observación histológica, o reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para identificar género y especie. También existen 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, por ejemplo, *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 y porque que permite realizar seguimiento del tratamiento y posibles fallas terapéuticas (11).

La problemática de la leishmaniasis, además, está centrada en el diagnóstico convencional (microscópico), que solamente llega hasta el género y desconoce su especie. Aun cuando brinda alta especificidad, no ofrece 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 una especificidad del 100 % (12).

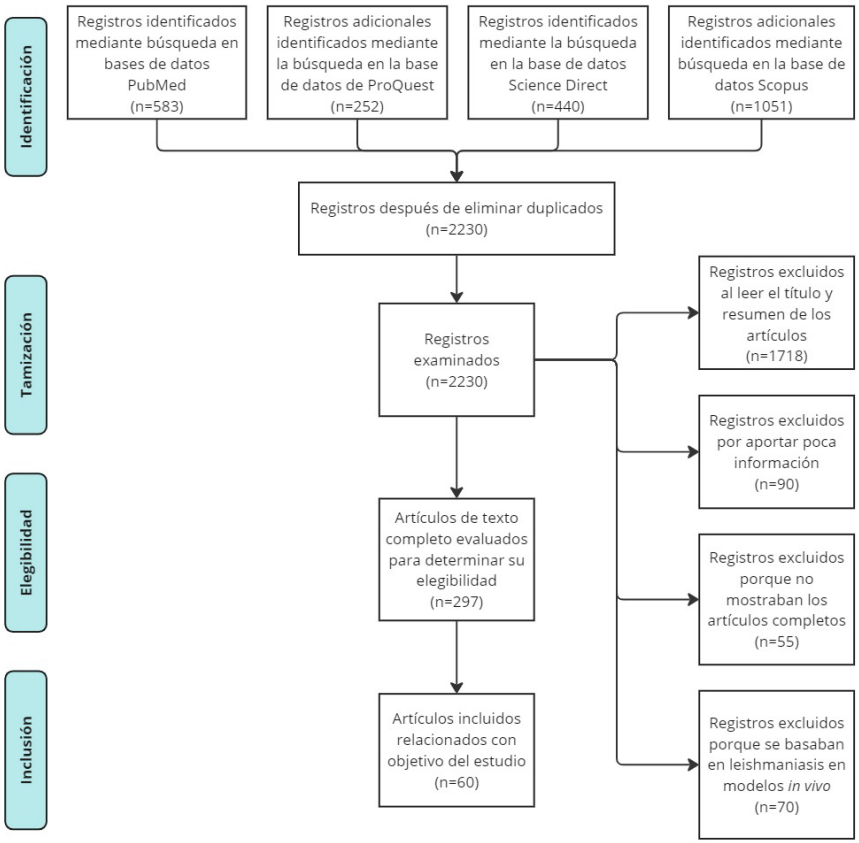
Por lo expuesto antes, el objetivo de esta revisión fue identificar el diagnóstico de tipo convencional y molecular en LC y LMC en los últimos 10 años, porque aporta a la actualización en los avances en el diagnóstico de esta patología y se dirige a estudiantes de pregrado, posgrado y profesionales de salud.

MATERIALES Y MÉTODOS

El artículo es 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* de los Descriptores en Ciencias de la Salud (DeCS/MeSH). Posteriormente, se emplearon combinaciones con los operadores boléanos AND y OR. Se consideraron bases de datos como Pubmed, ProQuest, SciELO, Medline y Scopus. Como criterio de inclusión, se seleccionaron artículos publicados entre enero de 2013 y diciembre de 2023, disponibles en español, inglés y portugués, que abarcan publicaciones e investigaciones en esta área que permiten una aproximación a la evolución del diagnóstico en este periodo.

Como criterios de exclusión, se descartaron los artículos relacionados con la LV, 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 clasificar la información, se utilizó el diagrama de flujo PRISMA (figura 1). Se partió de un total de 2326 artículos, a los cuales se les aplicaron los criterios de exclusión, además de la revisión del título, resumen y texto completo. De ello, resultaron 60 artículos.

Figura 1. Algoritmo de selección de artículos



RESULTADOS

Epidemiología

La LC es una enfermedad que se presenta en 98 países de todo el mundo y que ocasiona 1,2 millones de casos. Alrededor de un tercio de 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) de 0,58 por 100 000 personas (15). 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 100 000 habitantes en riesgo. Esta forma clínica se produce en un 70 % en hombres con procedencia rural, y en quienes el grupo más afectado está entre los 20 y los 24 años (17). Departamentos como Boyacá y Santander aportan importantes cifras a esta endemia (18,19).

Tradicionalmente, la leishmaniasis se ha clasificado en dos tipos: leishmaniasis del viejo mundo y del nuevo mundo, pues involucran flebótomos de diferentes géneros *Phlebotomus* y *Lutzomyia*, respectivamente. La *Leishmania* spp. tiene hospederos selváticos, como zorros, armadillos, marsupiales, y en el área doméstica los más comunes son los caninos. Sumado a ello, la deforestación, el 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 relacionado ello con la virulencia del parásito y su especie. De esta forma, se ha clasificado en LC, LMC y LV, con periodos de incubación que oscilan entre 4 semanas y 6 meses (21,22).

Diagnóstico

El diagnóstico se basa en la sospecha epidemiológica de una persona procedente de alguna 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 la conjuntiva, pueden 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).

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 varía según la especie involucrada, como *L. donovani, L. major, L. tropica, L.*

braziliensis, L. amazonensis y *L. mexicana* (26). Además, es preciso 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 posiblemente se dé con la aparición de nódulos eritematosos que pueden ulcerarse. A veces, esta clase de presentación clínica lleva a una LMC, pues puede afectarse la orofaringe, la nasofaringe y las vías respiratoria bajas (9). Estas lesiones tiene autorresolución, por lo cual algunas personas no asisten a un centro de salud y presentan recurrencias después de años de evolución (28).

Diagnóstico por laboratorio

Son diversos los métodos utilizados para diagnosticar LC y LMC, y su utilidad y precisión suelen depender de la forma clínica de presentación (10,26). A continuación, se detallan las metodologías de diagnóstico directo e indirecto para LC y LMC (véase tabla 1).

Diagnóstico directo

El diagnóstico directo implica detectar el parásito en el tejido afectado. Esto puede realizarse mediante técnicas microscópicas, demostración del parásito en cultivo e identificación del ADN parasitario con pruebas moleculares (27).

Microscopia óptica

Dentro de las técnicas diagnósticas de primera línea se incluye la microscopia óptica, a partir de frotis del tejido afectado. En la toma de muestra, es necesario realizarle una isquemia a la lesión para prevenir el sangrado, seguido de un raspado de los bordes con un bisturí quirúrgico estéril (27). Así, 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 y 4 μm de diámetro (10) y 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 está asociado con la presencia de los parásitos, por la resolución inmune ante la infección. Por otra parte, la lesión no debe estar sobreinfectada 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 se analiza mediante microscopia 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 están relacionadas con su baja sensibilidad y la identificación hasta género (30,31).

Cultivo

Existen técnicas de cultivo que conservan parte del procedimiento de toma de muestra que se realiza para la biopsia, capaces de mejorar la sensibilidad de detección; además, proporcionan la opción de identificar género y especie, pero su uso es limitado en la rutina. Estos pueden ser de tres tipos: líquido, 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 Novy, McNeal, Nicolle (NNN) (10,32), en el cual se observa el desarrollo de amastigotes a promastigotes; sin embargo, su principal limitación es que requiere largos periodos de incubación (entre 3 y 21 días), que dependen de la especie estudiada (24,27).

Se ha 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 e infusión de hígado y triptosa (LIT), suplementados con diferentes porcentajes de suero fetal bovino. En 2018 se reportó un medio llamado Nayak, para el cultivo de promastigotes, que conserva la infectividad y la morfología para un posterior cultivo celular (33).

Técnicas moleculares

La PCR eleva la sensibilidad de diagnóstico para el género *Leishmania* spp. (11), a partir de diversas muestras, como tejido cutáneo, tejido mucocutáneo, bazo y medula ósea. Las variaciones de esta técnica —PCR cuantitativa o en tiempo real (qPCR)— facilitan estimar cargas parasitarias, hacerle seguimiento al tratamiento y evaluar fallas terapéuticas; mientras que la PCR de polimorfismo de longitud de fragmento de restricción (PCR-RFLP) aporta a identificar la especie parasitaria (27,31,34).

Para usar esta técnica, es necesario conocer el 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 más útil, debido a su rápida velocidad y su amplio rango dinámico (35). En la LC, la PCR ha demostrado ser una herramienta valiosa y su sensibilidad puede alcanzar el 100 % (37).

PCR convencional. La PCR es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia de ADN específica. Esta técnica se basa en una replicación hecha 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 °C y 60 °C, para permitir que los cebadores se unan de forma complementaria al ADN molde. 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).

Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real. La qPCR tiene como objetivos 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, que

emite 1000 veces más fluorescencia que cuando está libre en solución (38).

Según Gow et al. (43), 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 ofrecen amplias opciones con un gran potencial para ayudar en las respuestas de salud pública.

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).

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. Ello genera fragmentos polimórficos únicos que sirven como marcadores para identificar especies de *Leishmania* (24). Esta metodología se ha usado exitosamente 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).

Electroforesis enzimática multilocus (MLEE). Es considerado el método estándar para caracterizar 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). En la actualidad, este tipo de análisis *multilocus* se prefiere 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).

Amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP). Es un nuevo método de amplificación de

ADN que se realiza en condiciones isotérmicas; que se ha usado para detectar ADN de las especies *L. donovani*, *L. tropica* y *L. major*, y que permite el diagnóstico rápido y confiable de diferentes formas de leishmaniasis, incluida la LC (39). Este ensayo es fácil de llevar a cabo, debido a que maneja unos rangos de temperatura más bajos que las técnicas moleculares mencionadas, pues oscilan entre 60°C y 65°C. Por ello, no se requiere un termociclador, es de bajo costo y la visualización de resultados no precisa un paso de electroforesis, sino que se puede visualizar mediante la adición de colorantes que se unen al ADN (24,30,39).

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. Se cuantifican 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 microrganismo usando como prueba de referencia la qPCR, con un 100 % de concordancia entre las técnicas específicamente para *Leishmania infantum* (49).

Diagnóstico indirecto

Diagnóstico serológico

El diagnóstico serológico se basa en la detección de respuestas humorales específicas, generalmente mediante la identificación de anticuerpos tipo inmunoglobulina G. 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, está recomendada ***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. Ello 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 que se busca 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).

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 posinoculación. 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 en 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).

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 detectar el 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 con 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

Tabla 1. Técnicas de diagnóstico directo e indirecto para leishmaniasis cutánea y leishmaniasis monocutánea

Técnica	Fundamento	Ventajas	Limitantes	Forma clínica
Microscopia óptica a partir de raspado de tejido cutáneo (11,21,24,27,39,52)	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	Fácil acceso Rápido Económico Alta especificidad (100 %) Prueba rápida en el punto de atención al paciente	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
Microscopia óptica a partir de biopsia de piel (21,24)	Permite la observación de amastigotes mediante la tinción hematoxilina-eosina en un corte histopatológico de la zona afectada	Permite descartar otras posibles causas, principalmente enfermedades malignas Señala la ubicación de los parásitos en el tejido y permite visualizar la respuesta inmune celular	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
Cultivo (10,21,24,27,29,39)	Se utiliza parte del material de biopsia para la inoculación de un medio de cultivo	Su sensibilidad es del 47 %-91,2 % Dependiendo de la especie del parásito, las tecnologías de microcultivo suelen ser menos costosas, debido al menor volumen requerido Fácil de usar y buena sensibilidad	Se requiere personal capacitado para la manipulación del medio y mantenimiento de condiciones estériles 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	LC, LMC

Técnica	Fundamento	Ventajas	Limitantes	Forma clínica
Reacción en cadena de la polimerasa convencional (10,24,27,29, 31,34,38,40,54)	Se trata de una reacción enzimática in vitro que amplifica una secuencia de ADN específica millones de veces. La técnica se basa en la replicación por un ADN polimerasa termoestable	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 ADNk, debido al alto número de copias de los minicírculos (10 000 por célula)	Rango de detección limitado Dependiendo del marcador genético permite la identificación de género, mas no especie La sensibilidad puede verse afectada por el diseño de primers. La sensibilidad puede verse afectada dependiendo del método de extracción empleado Requiere un protocolo estandarizado	LC, LMC
PCR en tiempo real (qPCR) (29,30,38,39,41, 43,55,56)	Se trata de una reacción enzimática in vitro que amplifica un fragmento específico de ADN y este puede ser medido de forma cuantitativa por la sonda de fluorescencia empleada	Alta sensibilidad (90 %-98 %) Proceso de estandarización más simple Se obtienen resultados rápidos y confiables Es útil para el diagnóstico y seguimiento de los pacientes 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 ADNk o HSP 70	La sensibilidad puede verse afectada dependiendo del método de extracción empleado La sensibilidad puede verse afectada por el diseño de primers. Requiere un protocolo estandarizado	LC, LMC
PCR fusión de alta resolución (PCR-HRM) (29,39,44)	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	Obtención de resultados en un tiempo corto Baja probabilidad de contaminación Emplea los genes HSP 70, ITS1, 7SL y aap3	Se requiere personal capacitado. Se necesitan equipos especializados Técnica relativamente costosa Se requieren cultivos puros para la estandarización de la técnica	LC, LMC

Técnica	Fundamento	Ventajas	Limitantes	Forma clínica
PCR por polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (PCR-RFLP) (24,29,39)	El patrón de bandas del producto puede usarse 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	Alta sensibilidad, especificidad y capacidad para descartar un diagnóstico de LC (95 %-100 %) Económica en comparación con la PCR en tiempo real Se pueden utilizar los genes HSP 70, la glucoproteína (gp) 63, el ADNk, la cisteína proteasa B, el miniexón o la subunidad 7 de la NADH deshidrogenasa	Los perfiles obtenidos pueden ser difíciles de interpretar, debido a la presencia de isoformas, que son variaciones entre copias del mismo parásito. Esto implica que no sea práctica la secuenciación dirigida del objetivo GP63 Limitada reproducibilidad de la técnica entre laboratorios	LC, LMC
Electroforesis enzimática multilocus (MLEE) (24,27,39,43,45)	Se basa en la comparación de un perfil de proteínas de la cepa problema y cepa control	Método que permite discriminar las especies de Leishmania según el perfil de proteínas del parásito	Se requiere una infraestructura adecuada y personal capacitado Su uso se encuentra limitado a un número restringido de laboratorios en todo el mundo	LC, LMC
Amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) (24,29,30,38,39,57)	Se basa en la amplificación de secuencias de ácidos nucleicos empleando una ADN polimerasa de Bacillus stearothermophilus y un conjunto de primers para el reconocimiento del fragmento objetivo de ADN	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 El resultado se obtiene en un tiempo promedio de 30 minutos Se pueden emplear blancos genéticos como 18s RNA y ADNk	La sensibilidad puede verse afectada por el diseño de primers. La contaminación residual de las muestras podría arrojar resultados falso positivos Se requiere una infraestructura adecuada y personal capacitado	LC, LMC

Técnica	Fundamento	Ventajas	Limitantes	Forma clínica
Droplet Digital PCR (dd PCR) (46-49)	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	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	Cada partición no debe contener más de una molécula objetivo Muestras clínicas requieren entre 10 000 y 100 000 particiones aproximadamente Se requiere una infraestructura adecuada y personal capacitado Costoso y requiere controles internos Riesgo de contaminación No se recomienda su uso rutinario	LC
Intradermorreacción de Montenegro (10,21,27,29, 34,52,58)	Se basa en una reacción de hipersensibilidad de tipo retardado a los antígenos totales de los promastigotes en leishmaniasis	Tiene valores elevados de sensibilidad y especificidad (86 %-100 %)	Limitación a la hora de distinguir entre infecciones actuales y anteriores Requiere instalaciones especializadas para la producción del antígeno parasitario Puede indicar resultados falso negativos en pacientes con LC de menos de un mes de duración Puede indicar resultados falso positivos en personas de zonas endémicas por infecciones subclínicas	LC, LMC
Test de aglutinación directa (DAT) (29)	Es una redacción de aglutinación entre un antígeno y un anticuerpo. L. aethiopica es el microrganismo más usado	Tiene una alta sensibilidad (90,5 %) y especificidad (91,8 %)	Para la especie L. donovani 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 diluciones seriadas	LMC

Técnica	Fundamento	Ventajas	Limitantes	Forma clínica
Prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI) (24,29,30,39,51)	Se basa en la detección de anticuerpos anti- Leishmania mediante el uso de antígenos específicos (forma promastigote) y anticuerpos secundarios conjugados con colorantes fluorescentes	Tiene una alta sensibilidad (96 %) y especificidad (98 %)	No correlaciona los niveles de anticuerpos circulantes con el estadio de la enfermedad Es costoso Requiere un nivel de habilidad técnica y profesionales capacitados Pueden presentarse reacciones cruzadas con otros trypanosomátidos	LMC
Western blot (24,27,39)	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	Alta sensibilidad (98 %) y especificidad (100 %)	Múltiples pasos para la emisión de resultados por lo cual es lenta y costosa Necesita de profesionales cualificados	LMC
Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA) (24,29,50)	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	Permite la utilización de una gran cantidad de muestras con diferentes antígenos Tiene una especificidad cercana al 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	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

muestras negativas diagnosticadas por métodos convencionales. Teniendo en cuenta que presentó una tasa de confianza superior al 95% y logró identificar 91 muestras de 98, de las cuales el 81,63% fueron de *L. panamensis*, el 11,22% fueron *L. braziliensis* y el 7,14% fueron casos 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 microscopia 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 posgenómica, 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 TritrypDB 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 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. Esto 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 un personal de laboratorio capacitado, además de una infraestructura y equipos especializados. En contraste, los métodos convencionales, 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, aíslan y caracterizan 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.

FINANCIACIÓN

Centro de investigaciones para el desarrollo CIPADE - Universidad de boyacá

CONFLICTOS DE INTERESES

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses en los ámbitos personal, académico, político o financiero.

REFERENCIAS

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 [citado 2024 abr 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. 2016 Mar 3;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 [citado 2024 abr 24];57(1). Disponible en: https://revista.svderma.org/index.php/ojs/article/view/1427

7. Bailey F, Mondragón-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. 2017 Aug 1;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. 2019 Jul 1;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. 2017;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. 2015 Mar 18;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. 2019 Mar 1;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 [internet]. 2018. Disponible en: 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. p. 1-10. Disponible en: 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 LJ, Sanchez-Vazquez M. Exploring spatial and temporal distribution of cutaneous Leishmaniasis in the Americas, 2001-2011. PLoS Negl Trop Dis. 2016 Nov 8;10(11):e0005086. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005086

15. Antonio M, Choque G. Leishmaniasis con afectación de vía aérea inferior y superi-

or, sin compromiso cutáneo. Rev Am Med Resp [internet]. 2015 [citado 2024 abr 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

17. Instituto Nacional de Salud. Informe de evento leishmaniasis cutánea, mucosa y visceral, Colombia 202 [internet]. 2019 [citado 2024 abr 24]; 1-23 Disponible en: https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informesdeevento/LEISHMANIASIS_2020.pdf

18. Picón-Jaimes YA, Abril-Sánchez LASR, Ruiz-Rodríguez ERRJ, Jiménez-Peña OM. Comportamiento epidemiológico de la Leishmaniasis cutánea en Boyacá 2012-2015. Rev Investig Salud Univ Boyacá. 2017 Jul 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. Rev Investig Salud Univ Boyacá [internet]. 2023 Jul 31 [citado 2024 abr 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 Sci J. 2017;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. Rev Méd Sinergia. 2022 Apr 1;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. 2023 Jul 5;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. 2021 Jun 1;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;13(18):2989. https://doi.org/10.3390/diagnostics13182989

25. Mcgwire BS, Satoskar AR. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. QJM: Int J M. 2014 Jan 1;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. Rev Cubana Med Trop [internet]. 2012 [citado 2024 abr 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. 2013 Jun 6;7(2):31. https://doi.org/10.3315/jdcr.2013.1135

28. Abadías-Granado I, Diago A, Cerro PA, Palma-Ruiz AM, Gilaberte Y. Cutaneous and mucocutaneous Leishmaniasis. Actas Dermo-Sifiliográficas (English Edition). 2021 Jul 1;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. 2020 Jun 1;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. 2020 Oct 1;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):138-45. 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. 2023 Apr. 26 [citado 2024 abr 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. 2018 Feb;185:39-52. https://doi.org/10.1016/j.exppara.2018.01.009

34. De Paiva-Cavalcanti M, de Morais RCS, Pessoa-e-Silva R, Trajano-Silva LAM, Gonçalves--de-Albuquerque S da C, Tavares D de HC, et al. Leishmaniases diagnosis: an update on the use of immunological and molecular tools. Cell Biosci. 2015 Jun 17;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 [citado 2024 abr 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 [citado 2024 abr 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. 2017 Dec 1;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 [tesis de maestría en internet]. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia; 2017. 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. 2020 Nov 1;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. Rev Patol Tocantins. 2017;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 [tesis de maestría en internet]. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana; 2014 [citado 2024 abr 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 [tesis de grado en internet]. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana; 2021 [citado 2024 abr 24]. Disponible en: http://hdl.handle.net/10554/58153

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. Parasit Vectors. 2022;15(1):1-24. https://doi.org/10.1186/s13071-022-05524-z

44. Hernández C, Álvarez 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. 2014;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. Acta Méd Costarric [internet]. 2018 [citado 2024 abr 24];60(3). 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. 2017 Jun 1;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. 2016 Dec 1;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. Int J Infect Dis. 2019 Feb 1;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. 2023;478:2445-50. https://doi.org/10.1007/s11010-023-04672-9

50. Solano-Gallego L, Villanueva-Saz S, Carbonell M, Trotta M, Furlanello T, Natale A. 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. Parasit Vectors. 2014;7:111. 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. 2023;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;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. 2013 Apr 23;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. 2013;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. Parasit Vectors. 2018;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. 2019;13(11). https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007698

58. Skraba CM, de Mello TFP, Pedroso RB, Ferreira ÉC, Demarchi IG, Aristides SMA, et al. Evaluation of the reference value for the Montenegro skin test. Rev Soc Bras Med Trop. 2015 Jul 1;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. Pentaciencias. 2023;5(3):379-412. 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 [citado 2024 abr 24];73(3):e660. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602021000300007&lng=en&nrm=iso&tlng=en

Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional