



Evaluación de las variables de rendimiento analítico de la PCR convencional del gen ribosomal 12S-9S del maxicirculo para la tipificación de especies de leishmania subgénero Viannia y su concordancia respecto al algoritmo actual de tipificación de PCR-RFLP miniexon-hsp70.

Hospital Universitario Centro Dermatológico Federico Lleras Acosta E.S.E

Grupo de Investigación en Dermatología Tropical

Línea de Investigación en leishmaniasis

Estudiante Yasaldis Arias Pabón

Asesor Externo

MSc Andrés Camilo González Gómez

Hospital Universitario Centro Dermatológico Federico Lleras Acosta E.S.E

Asesor Interno

MSc Diana Marcela Parra Muñoz Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

Bogotá. Noviembre de 2024

Dedicatoria

Primero dar gracias a Dios por permitirme culminar este proyecto, a pesar de todas las dificultades que se presentaron. Dedico este triunfo a mi Abuela "Linda" quien me enseñó a luchar por los sueños y siempre me motivo a seguir adelante. Y toda mi familia que de una u otra forma me apoyaron y dieron ánimos en los momentos de adversidades.

Agradecimientos

Agradezco a Dios que me dio el entendimiento para alcanzar esta meta.

A todas esas personas que siempre me han apoyado, han confiado en mí y me han enseñado a seguir luchando por los sueños, a mis compañeros y amigos.

A mi universidad Colegio Mayor de Cundinamarca y a cada uno de sus profesores que aportaron en mi formación integral como persona y profesional.

A Marcela Parra y Andrés González más que mis directores de tesis han sido grandes personas en mi vida. Me enseñaron muchas cosas, depositaron su confianza, tiempo y conocimientos en mí. Tuvieron la paciencia de guiarme y dejar en mí el amor por la investigación principalmente por la Leishmaniasis.

A la Dra. Claudia Colorado quien siempre estuvo allí para apoyar nuestro proyecto y se involucró en el mismo.

Al Laboratorio de Investigación de la E.S.E Hospital Universitario Centro Dermatológico Federico Lleras Acosta que me permitió todas las herramientas para desarrollar este proyecto de investigación. Y a cada uno de sus colaboradores que estuvieron presente para mí.

Y en especial a la Dra. María Clara Echeverry de la Universidad Nacional de Colombia y al Dr. Daniel Urrea de la Universidad del Tolima por permitirme aportar y seguir con sus investigaciones, así como todos sus aportes para tratar las enfermedades desatendidas en el país.

Contenido

1. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO	6
1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y SU JUSTIFICACIÓN.	6
2. MARCO TEORICO	8
2.1 Leishmaniasis un problema en salud pública	10
2.3 Tipificación de especies	11
2.3.1 Tipificación por perfiles isoenzimáticos	11
2.3.2 Tipificación Molecular	11
2.3.2.1 Tipificación por PCR –RFLP	12
3. ESTADO DEL ARTE	12
3.1 Diagnóstico de la leishmaniasis por PCR	12
3.2 Gen Ribosomal 12S-9S del <i>kDNA</i> de los maxicirculos de Leishmania	14
4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	15
Tomando en cuenta:	15
Se planteó la siguiente pregunta de investigación:	15
5. OBJETIVOS	16
5.1 OBJETIVO GENERAL	16
5.1.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	16
6. METODOLOGÍA	16
16	
6.1 Evaluación insilico del gen 12S-9S	17
6.2 Estandarización in vitro de la PCR 12S-9S	17
6.2.1 Perfil Térmico de la PCR 12S-9S	17
6.2.3 Visualización de los Productos de la PCR 12S-9S	17
6.3 Variables del rendimiento analítico	18
6.3.1 Sensibilidad -Ensayo de Límite de detección	18
6.3.2 Sensibilidad Analítica (Ase) - ensayo de Repetibilidad	18
6.3.3 Especificidad Analítica (ASp)	18
6.4 Evaluación de la concordancia para la tipificación de especies	19
7. Resultados	20
7.1 Evaluación insilico del gen 12S-9S	20
7.3 Resultados de las Variables del rendimiento analítico	22
7. 3.1 Resultados Validación Analítica – Sensibilidad; Ensayo de Límite de detección	22
7.3.2 Resultados Sensibilidad Analítica (Ase) - ensayo de Repetibilidad	23
7.3.3 Resultados Especificidad Analítica (ASp); Selectividad, Inclusividad y exclusividad.	

	24
7.4 Concordancia algoritmo Ovalle y colaboradores Vs algoritmo Arias y colaboradores.	25
8. Discusión	27
9. Conclusiones	31
10. Recomendaciones	32
12. ANEXOS.	33
13. Bibliografía	34

Lista de Figuras

Figura 1 "Ilustración de la forma topológica del ADN mitocondrial Kinetoplasto de los Tripanosomatidos" .	14
Figura 2 Genes de los maxicirculos del Kinetoplasto de Leishmania spp.	15
Figura 3 Flujograma diseño experimental. Fuente: Elaboración propia	16
Figura 4 Amplificación insilico de la PCR 12S-9S	20
Figura 5 Amplificación invitro de la PCR 12S-9S.	25
Figura 6 Resultados del ensayo de límite de detección de la PCR 12S-9S.	22
Figura 7 Resultados de selectividad, inclusividad y exclusividad.	25

Lista de Imágenes

Tabla 1 Resultados del ensayo de repetibilidad realizado por dos analistas independientes.	23
Tabla 2 Resultados del ensayo de especificidad analítica, selectividad, inclusividad y exclusividad.	24
Tabla 3 anexos	33

1. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y SU JUSTIFICACIÓN.

En Colombia las leishmaniasis son enfermedades endémicas en todo el territorio nacional excepto en San Andrés y Providencia y constituyen un problema creciente en salud pública (1,2). La Organización Mundial de la salud recomienda la confirmación por laboratorio ante la sospecha de la leishmaniasis, debido a que la presentación clínica de la enfermedad no es específica y el tratamiento es costoso, difícil y tóxico (3).

El método de laboratorio más utilizado para el diagnóstico de la leishmaniasis es la visualización microscópica del parásito a partir del frotis de la lesión, esta metodología tiene grandes bondades como bajo costo, fácil ejecución y una infraestructura de baja complejidad. La sensibilidad de la prueba varía entre el 54 y el 94% (3–8) y se puede ver afectada por el tiempo de evolución de la infección, el sitio de la toma de la muestra (3,9), el número de parásitos en la lesión, la técnica de la toma de la muestra (10) y la sobreinfección de la ulcera (11). En los casos en que no es posible lograr la comprobación parasitológica por el examen directo, la alternativa más usual es el estudio histopatológico, que tiene varias ventajas: establece un diagnóstico concluyente al demostrar los parásitos y puede orientar diagnósticos diferenciales (12). La sensibilidad de la biopsia como método de comprobación parasitológica se reporta entre el 69 y el 82% (3,4)

El otro método utilizado en laboratorios de referencia es el cultivo, que tiene una especificidad del 100% y sensibilidad entre el 45% y el 85% (4,6,13), sin embargo, para lograr el aislamiento del parásito y su tipificación es necesario esperar entre 4 y 6 semanas (6,14,15). Así, este método es poco utilizado en la actualidad debido que para su óptimo desarrollo requiere ser suplementado con sangre de conejo, que en Colombia presenta diversas limitaciones, entre estas, la carencia de registro INVIMA que avale su uso en el diagnóstico de la enfermedad. Por lo cual esta técnica es poco utilizada en la actualidad.

Una alternativa diagnóstica desde hace más de una década son los métodos moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en sus diferentes modalidades, esta prueba tiene la ventaja de ser altamente sensible y permitir a partir de una misma muestra el diagnóstico y la tipificación de especies en un tiempo reducido.

En Colombia y en otros países de América Latina la respuesta al tratamiento de acuerdo con la especie infectante está muy poco documentada, debido a que no se cuenta en la

mayoría de los casos con la información de la especie (16,17). La OMS recomienda orientar el tratamiento de la leishmaniasis de acuerdo con la forma clínica de la enfermedad y la especie infectante (18). En Colombia esto no es posible porque la tipificación de especies, de una parte, está limitada a centros de investigación y además en la literatura no se encuentran reportes de validación de pruebas diagnósticas para la leishmaniasis que permitan el diagnóstico y la tipificación de especies a partir de muestras no invasivas orientando de esta manera la decisión del clínico en el tratamiento del paciente. Esta posibilidad es limitada a las zonas apartadas del país y el lograr disponer de esta prueba permitiría apoyar a población vulnerable con un diagnóstico más integral de esta patología (19–21).

El grupo de Dermatología Tropical – Línea Leishmaniasis del Hospital Universitario Centro Dermatológico Federico Lleras Acosta E.S.E ha realizado aproximaciones buscando alternativas a la problemática previamente descrita proponiendo la validación de una prueba molecular que, a partir de cualquier tipo de muestra, permita el diagnóstico y la tipificación de especies en pacientes con leishmaniasis en un periodo corto. Estudio que han acercado desde la tipificación de especies de la leishmaniasis cutánea, mediante la optimización de PCR-RFLP distribución de especies en Colombia, PCR-anidada-RFLP, frecuencia de especies en pacientes atendidos en el CDFLLA hasta llegar al 2018 en donde Ovalle y colaboradores proponen un algoritmo basado en la combinación de genes e isoenzimas denominado *miniexon/hsp70* (22).

Los resultados obtenidos hasta ahora en el grupo para la prueba validada con el gen *miniexon* son satisfactorios. Con el blanco molecular utilizado (*miniexon*), se pueden diferenciar todas las especies del subgénero *Leishmania* y *L. braziliensis*, sin embargo, no es posible diferenciar *L. (V.) panamensis* de *L.(V.) guyanensis*. En un trabajo colaborativo con la Universidad Nacional se estandarizó la *PCR-RFLP* gen *hsp70* la cual permite diferenciar estas dos especies, a partir de aspirados, láminas y biopsias, sin embargo, la prueba no ha sido validada como método diagnóstico (23). Asimismo, en la literatura se reportan diversos blancos moleculares que, al ser usados en técnicas moleculares combinadas, pueden realizar un diagnóstico con tipificación de especie (24).

Aunque el diagnóstico de la enfermedad se ve considerablemente mejorado con el uso de métodos moleculares, los desafíos persisten al realizar la tipificación de la especie infectante (25). Esto se debe a la necesidad de emplear técnicas combinadas de biología

molecular, como PCR-RFLP y PCR-secuenciación, que presentan diversas dificultades. Entre estas, destaca la problemática de la concentración de DNA en la muestra, requiriendo cantidades significativas (14,26). Además, el aumento en los costos de ejecución y la necesidad de contar con equipos especializados para llevar a cabo estas técnicas (26).

Debido a esto, se hace necesario identificar un gen o marcador molecular dentro del genoma de *Leishmania*, que permita un diagnóstico eficiente con tipificación de especie por medio de la PCR convencional sin necesidad de procedimientos técnicos adicionales.

Estudios adicionales del grupo de parasitología de la Universidad Nacional, en conjunto con la Universidad del Tolima, de genómica de parásitos de *Leishmania* se han desarrollado con el objetivo de identificar regiones candidatas para la tipificación de especies por medio del abordaje de qPCR – HRM (High Resolution melting) (27), el cual permite la identificación las especies por diferencias en los picos de temperatura melting (TM) de los genes evaluados (28). De esta manera, se ha mapeado una región *ITS* (espaciador transcrito interno) de las subunidades ribosomales *12S* y *9S* del DNA de los maxicirculos (*kDNA*) en los parásitos, las cuales en ensayos computacionales de PCR *insilico* muestran diferencias en el tamaño del amplicon para las especies *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) panamensis* y *L. (V.) guyanensis*, por lo cual el grupo estandarizó la amplificación de dicha región y evaluó su comportamiento *in vitro* con DNA de cepas de referencia de las especies de *Leishmania* previamente mencionadas, permitiendo una identificación de especie por diferencias en el tamaño de banda con un solo ensayo de PCR de punto final.

El objetivo de este trabajo es evaluar las variables del rendimiento analítico (validación analítica) de la PCR convencional sobre la región *ITS* de las subunidades ribosomales *12S* y *9S* presentes en los maxicirculos de *Leishmania* con el fin de validar el uso de dicho marcador molecular en el diagnóstico y tipificación de especies de *Leishmania* del subgénero *Viannia*.

2. MARCO TEORICO

Las Leishmaniasis son un grupo de enfermedades con manifestaciones muco-cutaneas y viscerales causadas por un parásito protozoo perteneciente a la familia de los Tripanosomatidos y al género *Leishmania*, presentes en el viejo y nuevo mundo, es una zoonosis que afecta principalmente la piel, las mucosas o las vísceras, es transmitido por la picadura de un insecto flebótomo de la familia *Psychodidae* del cual se conocen cerca de 150

especies circulantes en Colombia, reportándose 22 como transmisoras de la enfermedad (29,30). En Colombia las leishmaniasis son enfermedades endémicas en todo el territorio nacional, excepto en San Andrés y Providencia, constituyen un problema creciente en salud pública (2).

Según la Organización Panamericana de la Salud (OPS). *“A nivel mundial, la leishmaniasis se encuentra entre las diez enfermedades tropicales desatendidas con más de 12 millones de personas infectadas, 99 países son endémicos para leishmaniasis, siendo 89 para LC, 80 endémicos para LV y 71 endémicos para las dos formas clínicas: LC y LV.*

De los 9 países que reportan 85% de los casos de LC, 3 están en las Américas: Brasil, Colombia y Perú”. (31).

El método de laboratorio más utilizado para el diagnóstico de la leishmaniasis es la visualización microscópica del parásito a partir del frotis de la lesión, esta metodología tiene grandes bondades como el bajo costo, fácil de realizar y requiere infraestructura de baja complejidad. La sensibilidad de la prueba varía entre el 54 y el 94% (1–6) y se puede ver afectada por el tiempo de evolución de la infección, el sitio de la toma de la muestra (1,13).

El número de parásitos en la lesión, la técnica de la toma de la muestra (8) y la sobreinfección de la ulcera (9). En los casos en que no es posible lograr la comprobación parasitológica por el examen directo, la alternativa más usual es el estudio histopatológico, que tiene varias ventajas: establece un diagnóstico concluyente al demostrar los parásitos y puede orientar diagnósticos diferenciales (10). La sensibilidad de la biopsia como método de comprobación parasitológica se reporta entre el 69 y el 82% (1,32).

El otro método utilizado en laboratorios de referencia es el cultivo, que tiene una especificidad del 100% y sensibilidad entre el 45% y el 85% (4,5,32). Sin embargo, para lograr el aislamiento del parásito y su tipificación es necesario esperar entre 4 y 6 semanas (4,11,12).

Una alternativa diagnóstica desde hace más de una década son los métodos moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en sus diferentes modalidades, esta prueba tiene la ventaja de ser altamente sensible y permitir a partir de una misma muestra el diagnóstico y la tipificación de especies en un tiempo muy corto.

En Colombia y en otros países de América Latina la respuesta al tratamiento de acuerdo con la especie infectante está muy poco documentada, dado que no se cuenta en la mayoría de los casos con la información de la especie (13). La OMS recomienda orientar el tratamiento de la leishmaniasis de acuerdo con la forma clínica de la enfermedad y la especie infectante

(10). En Colombia esto no es posible debido a que la tipificación de especies, de una parte, está limitada a centros de investigación y además en la literatura revisada no se encontraron reportes de validación de pruebas diagnósticas para la leishmaniasis que permitan el diagnóstico y la tipificación de especies a partir de muestras no invasivas de tal forma que impacte la decisión del clínico en el tratamiento del paciente. Esta posibilidad es poco accesible a las zonas apartadas del país y disponer de estas pruebas permitiría apoyar a población vulnerable con esta patología (22,33,34).

2.1 Leishmaniasis un problema en salud pública

Debido al cambio en el patrón epidemiológico por la aparición de nuevos focos, en el proceso de domiciliación y urbanización del ciclo de transmisión, por el número de casos existentes en el país y la población en riesgo de adquirir la enfermedad la leishmaniasis continúa siendo un problema de salud pública (35). En el periodo epidemiológico IX del año 2024 se notificaron al sistema de información (SIVIGILA) 3.454 casos de leishmaniasis, de los cuales, 3.392 fueron de leishmaniasis cutánea, 58 casos de leishmaniasis mucosa y 4 casos de la confirmados de leishmaniasis visceral (36).

2.2 Respuesta terapéutica y especies infectantes

La relación entre la especie de *Leishmania* y la respuesta terapéutica ha sido un tema importante en la investigación de la leishmaniasis, el cual se puede ver desde la perspectiva de la susceptibilidad intrínseca de las especies a los medicamentos y la respuesta clínica asociada a la especie infectante. En un estudio realizado por Arévalo y colaboradores en el 2007 (31), en el cual evaluaron la respuesta al antimonio pentavalente en pacientes infectados por diferentes especies de *Leishmania*, se demostró que la respuesta al tratamiento estaba asociada a la especie infectante. Los pacientes infectados por *L. (V.) braziliensis* y *L. (V.) peruviana* presentaron fallas al tratamiento en el 30,4 y 24,5% respectivamente, mientras que los infectado por *L. (V.) guyanensis* del 8,3% (38). Resultados similares han sido reportados en otros estudios (6,38,39).

La diferencia en la respuesta al medicamento puede estar dada por factores del hospedero, características del parásito o la farmacocinética. Llanos y colaboradores en el 2007 realizaron un estudio en el cual se evaluaron los factores de riesgo para el desarrollo de falla al tratamiento por antimonios en pacientes con leishmaniasis cutánea.

Los resultados obtenidos en el modelo multivariado evidenciaron que los factores asociados con la falla terapéutica fueron la edad, tiempo de permanecía en la región donde se adquirió la enfermedad, duración de la enfermedad, número de lesiones y la especie del parásito (40).

La asociación entre la especie infectante y la respuesta al tratamiento también ha sido estudiada con miltefosina. Por ejemplo, Soto y colaboradores encontraron una mejor respuesta al tratamiento en pacientes infectados con *L. braziliensis* procedentes de Bolivia comparado con pacientes procedentes Guatemala (41). Con base en este estudio los autores recomiendan evaluar la quimioterapia en cada región endémica (41). En contraste, Vélez y colaboradores evaluaron la eficacia de Miltefosina y Antimoniato de meglumina y no encontraron asociación entre la eficacia del tratamiento y la especie infectante (42,43).

Desde el punto de vista de la sensibilidad intrínseca, a nivel molecular, es conocido que los antimonios pentavalentes actúan como pro-droga la cual es convertida a una forma trivalente más activa (*Sb(III)*), un estudio reciente demostró que la sensibilidad al antimonio trivalente varía entre las especies de *Leishmania*. En general las especies causantes de leishmaniasis cutánea son más sensibles a *Sb(III)* que las especies responsables de la leishmaniasis visceral. Los autores explican los hallazgos, con base a la diferencia en la acumulación del osmoregulador aquaglyceroporin (AQP1) entre las especies (44–46).

2.3 Tipificación de especies

Entre los métodos actualmente más utilizados para tipificar especies de *Leishmania* están los perfiles isoenzimáticos.

2.3.1 Tipificación por perfiles isoenzimáticos

La técnica más utilizada para la tipificación de especies de *Leishmania* es el método bioquímico, electroforesis de enzima multilocus (MLEE), sin embargo, al igual que los anticuerpos monoclonales, una de sus limitantes es la necesidad de realizar el cultivo de promastigotes para poder realizar la tipificación lo que lo vuelve costoso y laborioso. En el nuevo mundo, esta técnica ha permitido evidenciar una gran diversidad entre las diferentes especies del subgénero *Viannia*, al punto que se han descritos nuevos locus con modelos heterocigotos que soportan la hipótesis de que *Leishmania* es un organismo diploide (47).

En Colombia el MLEE ha sido utilizado en centros de investigación para la identificación de

especies (48). La diferenciación de especies del subgénero *Viannia* mediante isoenzimas se realiza mediante el análisis de la migración electroforética de diferentes sistemas enzimáticos entre ellos: nucleósido hidrolasa (NH), fosfoglucomutasa (PGM), fosfogluconato deshidrogenasa (6PGD), glucosa- 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) y superóxido dismutasa (SOD) (49). Cabe resaltar que a pesar de que todas las cepas que muestran exactamente el mismo perfil electroforético para todos los sistemas enzimáticos en estudio son clasificadas dentro del mismo zimodema; se han demostrado diferencias a nivel de infectividad y patogenicidad en cepas pertenecientes a un mismo zimodema (44–47).

2.3.2 Tipificación Molecular

Las técnicas moleculares tienen la ventaja frente a la tipificación perfiles isoenzimáticos que pueden ser aplicadas directamente a la muestra biológica, prescindiendo del cultivo de parásitos. La utilización de marcadores a nivel molecular facilita la diferenciación de las especies cercanas o de híbridos.

Las pruebas moleculares posibilitan la implementación de técnicas capaces de realizar el diagnóstico y la tipificación de especies de manera simultánea, a partir de una misma muestra (53–55). Entre las técnicas moleculares que se utilizan con más frecuencia para estudiar la diversidad genética en estos parásitos se incluyen los análisis RFLP (restriction fragment length polymorphisms) (56), (57), RAPD (random amplified polymorphic DNA) (58,59), y Multilocus Sequence Typing (MLST), (60,61).

Entre los marcadores moleculares que se han evaluado para diferenciar las especies de *Leishmania* se encuentra el gen *miniexon* (62); *cpb* (62), marcadores de microsatélites (63), *rDNA ITS* genómico (64), *kDNA* (6,65,66) y *hsp70* (67,68).

2.3.2.1 Tipificación por PCR –RFLP

Mediante la PCR-RFLP es posible detectar variaciones menores en un gen causado por cambios en nucleótidos que ocasionan modificaciones en el sitio de corte de una enzima de restricción. Esta metodología es simple, rápida y diferencia varias especies de *Leishmania* con importancia clínica, a partir de una variedad de muestras. En el estudio de *Leishmania* esta técnica se ha utilizado para analizar varios blancos moleculares como los del gen de la proteína *gp63*, la proteinasa B de cisteína (*cpb*), secuencias del gen *miniexon*, las regiones ITS de ARN ribosomal y el gen *hsp70* (69–72), por lo cual es útil en estudios

taxonómicos, ecológicos y epidemiológicos. La aplicación de esta técnica requiere el conocimiento previo de las secuencias a analizar para poder hacer un buen diseño de iniciadores que garanticen el éxito de la prueba (73).

3. ESTADO DEL ARTE

3.1 Diagnóstico de la leishmaniasis por PCR

La estandarización y validación de la prueba de PCR y qPCR para el diagnóstico de la leishmaniasis ha sido objeto de estudio en varios grupos de investigación; se han utilizado diferentes tipos de muestras tales como, raspado de borde de lesión, muestras recolectadas en papel filtro, aspirados, muestras recolectadas con hisopos y láminas coloreadas con Giemsa.

En varios estudios como los de Hommel et al.1978, Garcia et al. 2006, Alves da Silva et al.2010, Montalvo et al.2011 se ha incluido además del diagnóstico, la tipificación de especies causantes de leishmaniasis. Con el objetivo de conocer a nivel de género y especie concreto la especie implicada para que con ellos el clínico pueda orientar mejor la terapia farmacológica (74–77).

En el 2009 se desarrolló un estudio para la identificación de especies de *Leishmania* a partir de muestras contenidas en papel de filtro, aspirados y raspados de lesión utilizando tres ensayos diferentes de PCR, los blancos moleculares utilizados fueron el gen *Cpb* para diferenciar especies de *L.(V.). braziliensis*, un segundo ensayo de PCR se realizó para el gen *hsp70* con el fin de diferenciar especies de *L. (V). guyanensis* y por último con el gen *MPI* para distinguir entre *L. (V.). braziliensis* y *L. (V.). peruviana*; los productos de PCR obtenidos para *Cpb* y *hsp70* fueron digeridos con las enzimas *TaqI* y *HaeIII*, respectivamente. Dentro de los resultados obtenidos se evidencio una alta sensibilidad y especificidad para los ensayos de PCR y en 18 de las 19 muestras utilizadas para la tipificación se logró la identificación de la especie causante (78).

En el 2012 se realizó un estudio por Nicolas Veland y colaboradores donde proponen un algoritmo para la identificación de especies de *Leishmania* del subgénero *Viannia* en pacientes de Perú, para esto el DNA fue aislado de papel de filtro impregnado de la lesión. El diagnostico de leishmaniasis se realizó con un ensayo de PCR empleando *primers* para kDNA, las muestras positivas para la PCR fueron clasificadas en tres grupos según la

intensidad de la banda del producto de amplificado, de estas muestras 70 fueron sometidas a tipificación, de las cuales en 53 (76%) se pudo establecer la especie infectante después de aplicar tres ensayos consecutivos con los blancos moleculares *MPI*, *Cpb* y *hsp70*. Dentro de las especies aisladas estaba *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) peruviana*, *L. (V.) guyanensis* y *L. (V.) lainsoni*. Los autores discuten que la mayoría de las muestras fueron diagnosticadas y tipificadas *antes* de las 24 horas, siguiendo el algoritmo propuesto en este trabajo (79). Los mismos blancos moleculares fueron utilizados por Braulio Mark y colaboradores en su trabajo 2012 (80). Para el diagnóstico de la leishmaniasis y la identificación de especies a partir de muestras no invasivas, se logró la identificación de la especie en el 92.4% de las muestras en estudio de Valencia, Veland et al. 2012 (81).

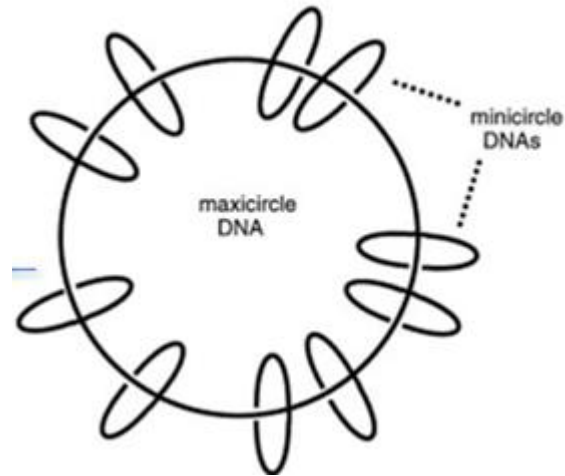
En el 2012, Jorge D Marco y colaboradores realizaron un estudio en donde se extrajo DNA de los raspados de borde de lesión y se les realizó PCR con 3 diferentes pares de *primers* dirigidos contra las especies más prevalentes asociadas a *L. cutánea*, de las muestras examinadas 34 fueron positivas para la PCR y de estas en 31 se pudo establecer la especie de *Leishmania*. Las especies que se pudieron diferenciar fueron *L. (V.) braziliensis* *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (L.) amazonensis* y el complejo *L. mexicana*. El estudio implicó 6 ensayos de PCR (82).

Farnaz y colaboradores, en el 2013 tenían como objetivo identificar especies de *Leishmania* por medio de un ensayo de PCR empleando *primers* para el gen *ITS*, usando DNA extraído a partir de extendidos coloreados con Giemsa, para esto utilizaron 178 láminas de casos confirmados de leishmaniasis y según el tamaño de los productos de PCR se podían distinguir a *L. (L.) major* y *L. (V.) tropica*, de las muestras analizadas el 72.47% tenían producto de PCR del tamaño esperado para *L. (V.) tropica* y el 27.53% una banda del tamaño esperado para *L. (V.) major* (83).

3.2 Gen Ribosomal 12S-9S del kDNA de los maxicirculos de Leishmania

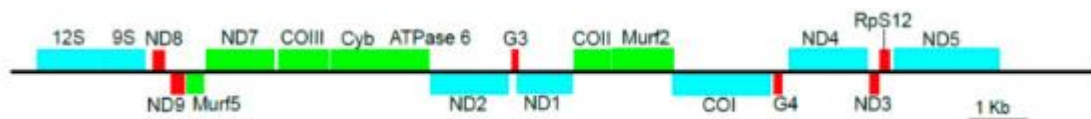
La *leishmania* cuenta con aproximadamente 35 cromosomas donde se condensa su información genética, con estos se forma una estructura extra nuclear conocida como kinetoplastos que según la especie representa de un 10 a 20 % del DNA total de la célula (38–40).

Figura 1 "Ilustración de la forma topológica del DNA mitocondrial Kinetoplasto de los *Tripanosomatidos*" (84).



Dentro de estos se forma una gran red entrelazada que forma dos estructuras principales; Los maxicirculos que tiene entre 20-50 copias por kinetoplastos los cuales a su vez contiene otras redes o estructuras secundaria conocidas como minicirculos que tiene entre 5.000 a 50.000 copias según la especie (85). Estas estructuras circulares enlazadas entre sí. Conforman gran parte de la energía celular, por lo que pensar en mutaciones significativas seria la muerte del parasito. Dentro del gen ribosomal kDNA de los maxicirculos el set de primers reconoce la región 12S-ITS-9S.

Figura 2 Genes de los maxicirculos del Kinetoplasto de *Leishmania spp.*



Dentro de los maxicirculos se concentran aproximadamente 20 genes dentro de los cuales hay genes involucrados en procesos de generación energética para el protozoario, el rastreo de fuentes de ingestas de este hasta la respiración del protozoario (86).

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

Tomando en cuenta:

- La importancia del estudio de la tipificación de especies de *Leishmania* para el conocimiento de la patogénesis de la enfermedad.
- El conocimiento existente sobre las herramientas de tipificación para llegar a discriminar a nivel de género y especie del parásito.
- La propuesta de nuevos blancos moleculares para la tipificación en un menor tiempo y con una menor capacidad instalada.
- Los escasos estudios de blancos que permitan tipificar especies de *Leishmania* en una sola corrida, bajo una PCR convencional puntualmente las especies *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) panamensis* y *L.(V.) guyanensis* por su mayor circulación en el país.
- La identificación de una nueva región candidata en el genoma del kinetoplasto de los parásitos que en un solo ensayo de PCR realice un diagnóstico sensible y específico con tipificación de especie infectante

Se planteó la siguiente pregunta de investigación:

¿Cuál es el comportamiento de las variables del rendimiento analítico de la PCR convencional de los espaciadores transcritos internos - *ITS* de las subunidades ribosomales 12S-9S presentes en los maxicirulos de *Leishmania* para la tipificación de especies del subgénero *Viannia*?

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

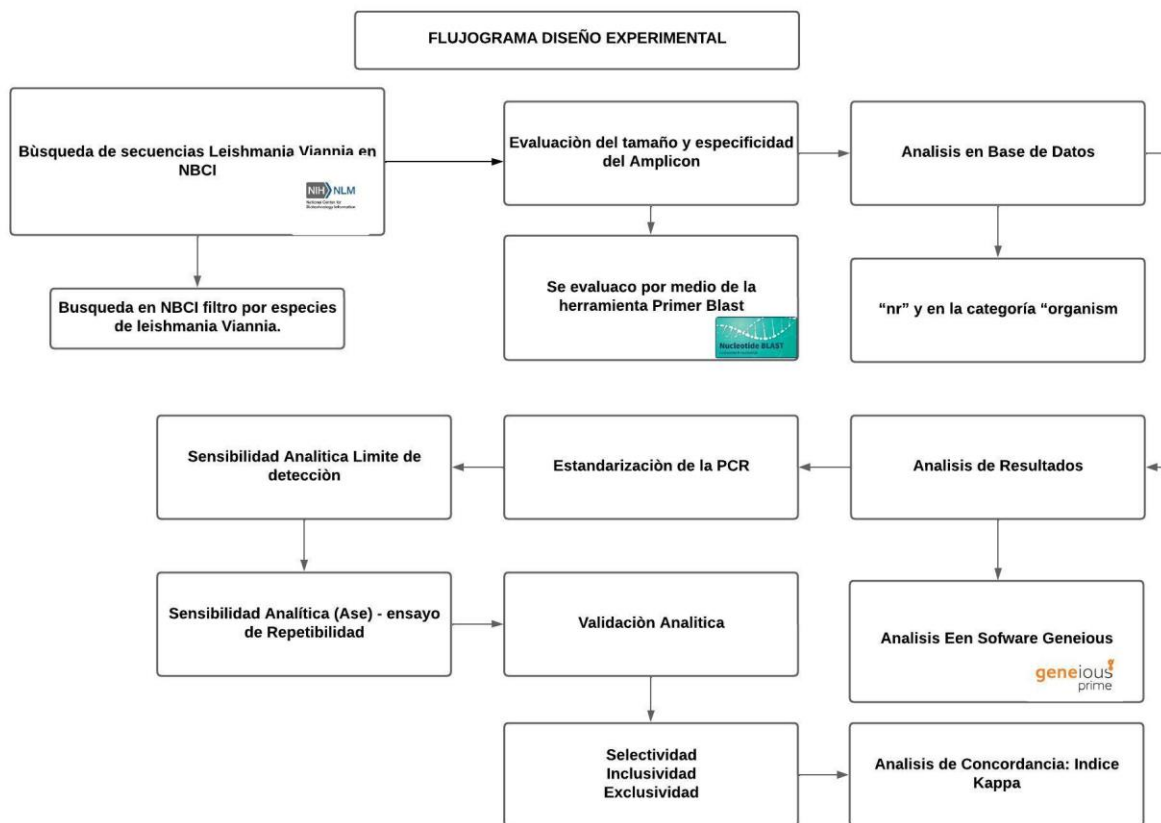
Evaluar las variables del rendimiento analítico de la PCR convencional de los espaciadores transcritos internos - *ITS* de las subunidades ribosomales 12S-9S presentes en los maxicirculos de *Leishmania* para la tipificación de especies del subgénero Viannia.

5.1.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Determinar la sensibilidad analítica de la prueba PCR convencional de los espaciadores transcritos internos - *ITS* de las subunidades ribosomales 12S-9S para la tipificación de especies de *Leishmania*.
2. Determinar la especificidad analítica de la prueba PCR convencional de los espaciadores transcritos internos - *ITS* de las subunidades ribosomales 12S-9S para la tipificación de especies de *Leishmania*.
3. Establecer la concordancia entre la PCR convencional de los espaciadores transcritos internos - *ITS* de las subunidades ribosomales 12S-9S con el algoritmo actual de tipificación de PCR-RFLP *miniexon-hsp70*.

5. METODOLOGÍA

Figura 3 Flujoograma diseño experimental. Fuente: Elaboración propia



6.1 Evaluación insilico del gen 12S-9S

El análisis *insilico* de los primers FW_12S-9S; Primers RV_12S-9S propuestos por Urrea y colaboradores en 2018 (87). con el fin de evaluar el tamaño del amplicon y su especificidad dentro de ejemplares del género *Leishmania* de la familia Trypanosomatidae.

Se utilizó la herramienta Primer BLAST dentro de la base de datos del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Para el análisis se utilizó la base de datos "nr" y en la categoría "organism" se definieron las cepas de *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) panamensis* y *L. (V.) guyanensis*, como controles positivos y se incluyó a *Trypanosoma cruzi*, como control negativo. Los resultados obtenidos se analizaron en el software Geneious prime (<https://www.geneious.com/>).

6.2 Estandarización in vitro de la PCR 12S-9S

Para la implementación de la PCR convencional en el laboratorio de investigación del E.S.E

Hospital Universitarios Federico Lleras Acosta se utilizó las cepas de referencias *L. (V.) braziliensis* MHOM/BR/75/M2903, *L. (V.) panamensis* MHOM/PA/71/LS94, *L. (L.) guyanensis* MHOM/BR/73/M4147, *L. (L.) amazonensis* MHOM/BR/73/M2269 y *L. (L.) mexicana* MHOM/BZ/82/BEL21 disponibles en el BioBanco de la Institución. Utilizando los Primers FW_12S-9S; Primers RV_12S-9S propuestos por Urrea y colaboradores en 2018 (87).

Bajo las siguientes condiciones de amplificación; con una mix de 19 µl de una mezcla de reacción que contenía tampón de amplificación 1X (Tris-HCl 20 mM (pH 8,4), MgCl₂ 2 mM; 0.2 mM dNTPs; 0.3 µM de cada cebador FW_12S-9S; Primers RV_12S-9S propuestos por Urrea y colaboradores en 2018 (87). GenTaq Polimerasa 1.25U (Laboratorio de Genética y Biología Molécula, Bogotá, Colombia,) y 1 µl del DNA de cada cepa de referencia, de acuerdo con el rango dinámico que se muestra en la Figura 6. En el tratamiento de las muestras se garantizó que las misma se encontraran dentro del rango dinámico obtenido en el anexo 7, para un volumen final de 20 µl.

6.2.1 Perfil Térmico de la PCR 12S-9S

Luego de ello se estandarizo el siguiente perfil térmico: 1 ciclo de desnaturalización del DNA a 95°C durante 3 minutos; 30 ciclos de amplificación de 95°C por 30 s, 53°C por 30 s y 72°C por 60 s, así como un ciclo final de extensión a 72°C por 5 minutos en el C1000 Touch Thermal Cyclers (Hercules, California, US)

6.2.3 Visualización de los Productos de la PCR 12S-9S

Posterior al proceso de amplificación se evaluó el resultado por medio de geles de agarosa inicialmente al 2.5 % a 80 Voltios durante 65 min en cámara Bio Rad PAC HC (Hercules, California, US). Los geles se tiñeron con SyBr Safe 2 µl. En cada corrida electroforética fueron sembrados 10 µl del producto de amplificación con 2 µl de buffer de carga.

Y el tamaño de los productos se comparó con un marcador de peso molecular de la casa Invitrogen 50 pb. Y finalmente el resultado se foto documento utilizando Gel Doc XR+ Gel Documentation System (Hercules, California, US).

6.3 Variables del rendimiento analítico

6.3.1 Sensibilidad -Ensayo de Límite de detección

La sensibilidad analítica evaluó el cambio de resultado del ensayo al variar la cantidad del analito (DNA). El límite de detección es la cantidad mínima de analito necesario para la amplificación del gen de interés, (kDNA 12S-9S).

El ensayo de límite de detección se realizó usando 3 aislamientos de las cepas de referencia *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) panamensis* y *L. (V.) guyanensis*. Se evaluaron 6 diluciones en base 10 de cada DNA con el fin de identificar la cantidad mínima en la cual la PCR presenta una amplificación (88).

6.3.2 Sensibilidad Analítica (Ase) - ensayo de Repetibilidad

El ensayo de repetibilidad pretende evaluar la reproducción de la amplificación del gen ribosomal 12S-9S de DNA de cepas de referencia de *Leishmania*.

Se usarán 30 aislamientos de cepas de referencia de las especies *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) panamensis* y *L. (V.) guyanensis* (el ensayo se realizará de manera individual por cepa), quince positivas y quince negativas. Cada muestra biológica se analizó por duplicado en el ensayo de PCR (replicas técnica) bajo las condiciones de amplificación del gen de interés (88).

El ensayo se realizó durante 3 días por dos analistas independientes, se evaluó la repetibilidad interobservador comparando los resultados del analista 1 respecto al analista 2 y la repetitividad intraobservador comparando los resultados por analista independiente durante los 3 días de ejecución. El acuerdo intra e interobservador se determinó por medio del índice de concordancia kappa.

6.3.3 Especificidad Analítica (ASp)

La especificidad analítica es la capacidad del ensayo de medir confiablemente el analito de interés, distinguiéndolo de otros componentes que puedan ser detectados en la prueba. Se evalúa mediante la selectividad, inclusividad y exclusividad de los ensayos (88).

6.3.3.1 Selectividad

Es el grado en que el método puede detectar y/o cuantificar con exactitud el analito en cuestión, en presencia de: interferentes, productos de degradación, entre otros, que puedan causar falsos resultados en la prueba que afectarán negativamente su especificidad. Para lo anterior, se utilizaron 30 aislamiento de DNA de las cepas de referencia de *Leishmania* que se conocen de antemano si son positivas o no a la presencia del parásito (88).

6.3.3.2 Inclusividad

Es la capacidad del ensayo de detectar varias cepas o variantes de una especie, varias especies de un género, o una agrupación similar de microorganismos estrechamente

emparentados. La capacidad de la prueba para detectar varias especies del género *Leishmania* (88).

La inclusividad de los ensayos se evaluó amplificando el gen ribosomal 12S-9S bajo las condiciones del gen en las 3 especies de *Leishmania* de importancia clínica circulantes en Colombia. En este estudio se utilizaron con el DNA de las cepas de referencia *L.(V.) braziliensis*, *L.(V.) panamensis*, *L.(V.) guyanensis*, *L. (L.) mexicana*, *L. (L.) amazonensis* y *L.(L.) chagasi*.

6.3.3.3 Exclusividad

Es la capacidad del método de detectar un analito o secuencia genómica que es propia del microorganismo buscado y excluir todos los demás microorganismos que pudieran dar una reacción cruzada (88).

Esta variable se evaluó por medio de la amplificación del gen ribosomal 12S-9S usando como molde DNA de las bacterias *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Sporothrix schenckii* como agentes asociados al microbiota de la piel y diagnóstico diferencial. Y *T. Cruzi* por su cercanía taxonómica.

La especificidad analítica fue evaluada por dos analistas independientes en ciego y la concordancia del ensayo se determinó por el índice de concordancia Kappa.

6.4 Evaluación de la concordancia para la tipificación de especies

La concordancia de la amplificación y tipificación de especies de *Leishmania* con el gen ribosomal 12S-9S, se evaluó usando un total de 30 aislamientos de DNA de las especies referencia *L.(V.) braziliensis*, *L.(V.) panamensis*, *L.(V.) guyanensis*, las cuales se procesaron en ciego. Dichos resultados se compararon con el algoritmo de tipificación de especies de *Leishmania* propuesto por Ovalle y colaboradores en estudios previos de la E.S.E Hospital Universitario Centro Dermatológico Federico Lleras Acosta, en el cual utilizan los marcadores moleculares *hsp70* y *miniexon*. El acuerdo entre los dos algoritmos se determinó por medio del índice de concordancia kappa (89).

6.4.1 Aspectos Éticos

El proyecto no incluye experimentación con animales ni seres humanos, sin embargo, está concebido de acuerdo con las consideraciones contenidas en la Declaración de Helsinki (90). Adicionalmente, el proyecto está planteado de conformidad con la normatividad

Nacional, específicamente la Resolución 8430 de 1993 (91), en lo referente a la investigación con microorganismos patógenos o material biológico que pueda contenerlos, según la cual el presente estudio corresponde a una Investigación sin riesgo. “Son estudios que emplean técnicas y métodos de investigación documental retrospectivos y aquellos en los que no se realiza ninguna intervención o modificación intencionada de las variables biológicas, fisiológicas, psicológicas o sociales de los individuos que participan en el estudio, entre los que se consideran: revisión de historias clínicas, entrevistas, cuestionarios y otros”.

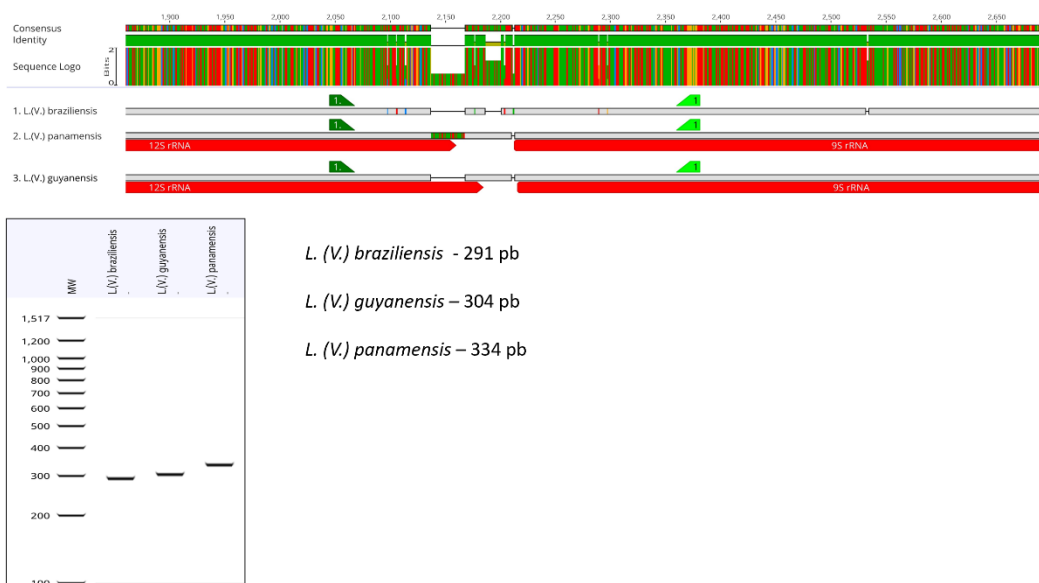
Los aislamientos incluidos en el estudio cuentan con sus respectivos consentimientos informados según la legislación vigente para ello. Se conservará el anonimato y la confidencialidad de la información personal identificable y de contacto (nombre, dirección, teléfono) de cada paciente. Solamente los investigadores del presente proyecto tendrán acceso a esta información. En el caso de existir excedentes de las muestras utilizadas al final del proyecto, este material biológico será regresado al banco biológico del HUCDFLLA.

7. Resultados

7.1 Evaluación insilico del gen 12S-9S

Los resultados obtenidos mediante los análisis *insilico* se muestran en la Figura 4.

Figura 4 Amplificación *insilico* de la PCR 12S-9S



Los resultados obtenidos mediante los análisis Bioinformático se muestran en la Figura 4; Para el set de primers FW_12S-9S; Primers RV_12S-9S diseñados por Urrea y colaboradores

en 2018 (87). Fueron evaluados mediante el software Geneious prime.

Se observan diferencias en el tamaño del amplicon entre las especies *L. (V.) braziliensis* con 291 pb, *L. (V.) guyanensis* con 304 pb y *L. (V.) panamensis* con 334 pb sugiriendo que esta región del DNA del kinetoplasto es una buena candidata para la tipificación de especies de *Leishmania*.



Figura 5 Amplificación invitro de la PCR 12S-9S.

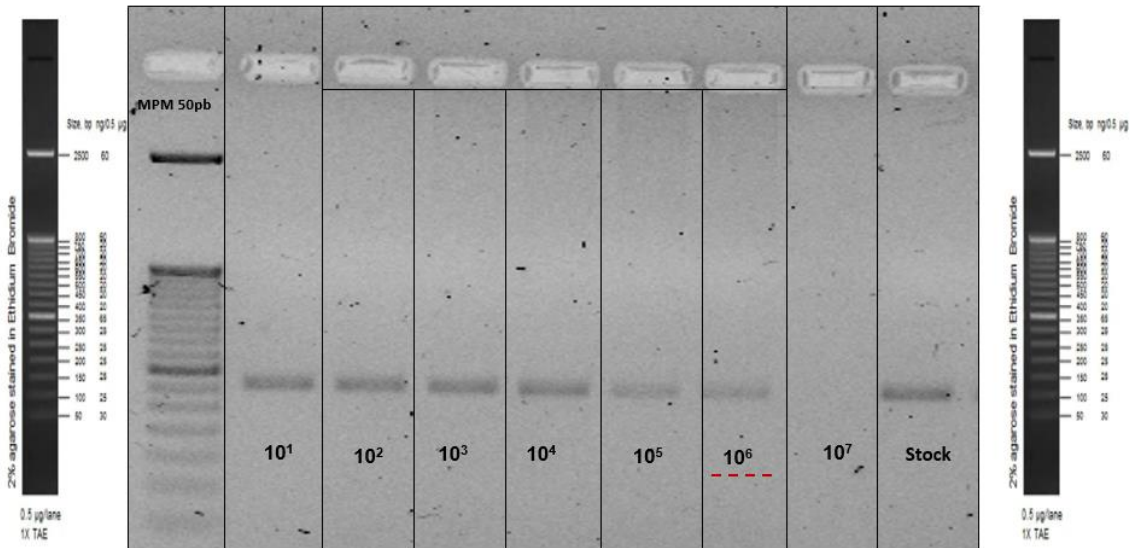
7.2 Estandarización de la PCR del gen Ribosomal 12S-9S del kDNA de los Maxicirculos.

El análisis de los productos de PCR genómica en gel de agarosa reveló bandas para las cepas del subgénero Viannia *L. (V.) braziliensis* MHOM/BR/75/M2903 y MHOM/BR/84/LTB300 de 300 pb, para *L. (V.) panamensis* MHOM/PA/71/LS94 de 330 pb, para *L. (V.) guyanensis* MHOM/GF/79/LEM85, MHOM/BR/75/M4147 de 350 pb. Por su parte todas las cepas del subgénero *Leishmania* evaluadas presentaron un amplicon de 300 pb (Figura 5).

1: MPM 50pb; 2: cepa *L.(V.) braziliensis* MHOM/BR/75/M2903 300pb; 3: cepa *L.(V.) braziliensis* MHOM/BR/75/M2903 300pb; 4: cepa *L.(V.) braziliensis* MHOM/BR/84/LTB300 300pb; 5: cepa *L.(V.) braziliensis* MHOM/BR/84/LTB300 300 pb; 6: cepa *L.(V.) panamensis* MHOM/PA/71/LS94 330 pb; 7: cepa *L.(V.) panamensis* MHOM/PA/71/LS94 330 pb; 8: *L.(V.) guyanensis* MHOM/BR/75/M4147 350 pb; 9: *L.(V.) guyanensis* MHOM/GF/79/LEM85 350 pb; 10: cepa *L. (L.) Mexicana* MHOM/BZ/82/BEL21 300 pb; 11: cepa *L. (L.) Mexicana* MHOM/BZ/82/BEL21 300 pb; 12: cepa *L.(L.) amazonensis* MHOM/ BR/73/M2269 300 pb; 13: cepa *L.(L.) amazonensis* MHOM/ BR/73/M2269 300 pb; 14: cepa *L.(L.) chagasi* MHOM/BR/74/PP75 300 pb; 15: cepa *L.(L.) chagasi* MHOM/BR/74/PP75 300 pb; 16: cepa *L.(L.) amazonensis* aislamiento CIDEIM 300 pb; 17: cepa *L.(L.) mexicana* aislamiento INS 300 pb; 18 y 19: NTC; 20: MPM 50pb.

Se evidencia que el marcador permite la tipificación de especies del subgénero *Viannia*, que a su vez constituyen las especies de mayor importancia clínica del país. Así mismo, cabe resaltar que la prueba no pueda tipificar las especies del subgénero *Leishmania* debido a que, algunas de estas circulan en el país se ve la necesidad de seguir usando el blanco *miniexon* con el cual discrimina entre los subgéneros *Viannia* y *Leishmania* y a su vez todas las especies dentro de este subgénero (*Leishmania*).

Figura 6 Limite de detección PCR 12S-9S.



7.3 Resultados de las Variables del rendimiento analítico

7.3.1 Resultados Validación Analítica – Sensibilidad; Ensayo de Límite de detección

En el ensayo de límite de detección se identificó que la cantidad mínima de DNA con la cual se puede obtener un resultado positivo para la PCR 12S-9S fue de 0,00001 ng para cada cepa de referencia (Figura 6). De acuerdo con el rango dinámico que se muestra en la Figura 6. En el tratamiento de las muestras se garantizó que las mismas se encontraran dentro del rango dinámico. En el anexo 7 se muestran las cantidades de cada aislamiento.

Figura 6 Resultados del ensayo de límite de detección de la PCR 12S-9S.

Los resultados obtenidos muestran una sensibilidad adecuada del marcador molecular 12S-9S debido a las concentraciones bajas con las cuales se logra obtener amplificación, este marcador podría usarse en muestras biológicas que tengan bajas cargas parasitarias.

7.3.2 Resultados Sensibilidad Analítica (Ase) - ensayo de Repetibilidad

Los resultados del ensayo de repetibilidad se describen en la tabla 1.

Muestras	Analista 1			Analista 2		
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 1	Día 2	Día 3
1.1	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva
1.2	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva
2.1	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva
2.2	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva
3.1	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa
3.2	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa
4.1	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa
4.2	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa
5.1	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa
5.2	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa
6.1	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva
6.2	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva
7.1	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa
7.2	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa
8.1	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva
8.2	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva
9.1	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva
9.2	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva
10.1	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa
10.2	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa

Tabla 1 Resultados del ensayo de repetibilidad realizado por dos analistas independientes.

Resultados del ensayo de repetibilidad realizado por dos analistas independientes.

Como se observa en los resultados de la tabla 1, los resultados obtenidos durante los tres días de ejecución de cada analista demuestran una concordancia del 100%. El análisis del índice de concordancia Kappa refleja un valor de 1,00 que acorde a la escala de Landis y Koch la fuerza de la concordancia es “*casi perfecta*”. Mismo resultado cuando se analiza los resultados obtenidos entre los dos analistas, Lo que sugiere que la PCR 12S-9S es reproducible sin importar el operario en la técnica.

7.3.3 Resultados Especificidad Analítica (ASp); Selectividad, Inclusividad y exclusividad.

Los resultados del ensayo de especificidad analítica se describen en la tabla 2.

Tabla 2 Resultados del ensayo de especificidad analítica, selectividad, inclusividad y exclusividad.

Muestras	Analista 1	Analista 2	Acuerdo entre analistas	Definición real de la muestra
A1	Positiva	Positiva	Acuerdo	Positiva
A2	Negativa	Negativa	Acuerdo	Negativa
A3	Positiva	Negativa	No acuerdo	Positiva
A4	Positiva	Positiva	Acuerdo	Positiva
A5	Positiva	Positiva	Acuerdo	Positiva
A6	Negativa	Negativa	Acuerdo	Negativa
A7	Negativa	Negativa	Acuerdo	Negativa
A8	Negativa	Negativa	Acuerdo	Negativa
A9	Negativa	Negativa	Acuerdo	Negativa
A10	Positiva	Positiva	Acuerdo	Positiva
A11	Negativa	Negativa	Acuerdo	Negativa
A12	Negativa	Negativa	Acuerdo	Negativa
A13	Negativa	Negativa	Acuerdo	Negativa
A14	Negativa	Negativa	Acuerdo	Negativa
A15	Positiva	Positiva	Acuerdo	Positiva
A16	Negativa	Negativa	Acuerdo	Negativa
A17	Negativa	Negativa	Acuerdo	Negativa
A18	Positiva	Positiva	Acuerdo	Positiva
A19	Positiva	Positiva	Acuerdo	Positiva
A20	Positiva	Positiva	Acuerdo	Positiva
A21	Negativa	Negativa	Acuerdo	Negativa
A22	Negativa	Negativa	Acuerdo	Negativa
A23	Negativa	Negativa	Acuerdo	Negativa
A24	Positiva	Positiva	Acuerdo	Positiva
A25	Positiva	Positiva	Acuerdo	Positiva
A26	Positiva	Positiva	Acuerdo	Positiva
A27	Positiva	Positiva	Acuerdo	Positiva
A28	Negativa	Negativa	Acuerdo	Negativa
A29	Positiva	Positiva	Acuerdo	Positiva
A30	Positiva	Positiva	Acuerdo	Positiva
M01 – <i>S. aureus</i>	Negativa	Negativa	Acuerdo	Negativa
M02 – <i>S. epidermidis</i>	Negativa	Negativa	Acuerdo	Negativa

M03 – <i>Sporothrix schenckii</i>	Negativa	Negativa	Acuerdo	Negativa
M04 – <i>Trypanosoma cruzi</i>	Negativa	Negativa	Acuerdo	Negativa
<i>L. (V.) braziliensis</i>	Positiva	Positiva	Acuerdo	Positiva
<i>L. (V.) panamensis</i>	Positiva	Positiva	Acuerdo	Positiva
<i>L. (V.) guyanensis</i>	Positiva	Positiva	Acuerdo	Positiva

Como se observa en la tabla 2, la prueba tiene un alto grado de selectividad ya que permitió detectar con exactitud las muestras que realmente contenían DNA de *Leishmania*. Así mismo, se obtuvo que el método tiene una alta capacidad de ser inclusiva ya que pudo identificar correctamente diversas cepas de *Leishmania* inclusive cepas pertenecientes al subgénero *Leishmania* como se mostró en la **Figura 5**. Se obtuvo que la prueba es 100 % exclusiva en este análisis ya que solo amplificó las cepas de referencia y no se amplificaron las muestra de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y el hongo *Sporothrix schenckii* como agentes asociados al microbiota de la piel; por su parte no amplifica a *Trypanosoma cruzi* como agente cercano filogenéticamente a *Leishmania*, evitando sesgos en la prueba y tener falsos positivos (**Tabla 2 y figura 5**).

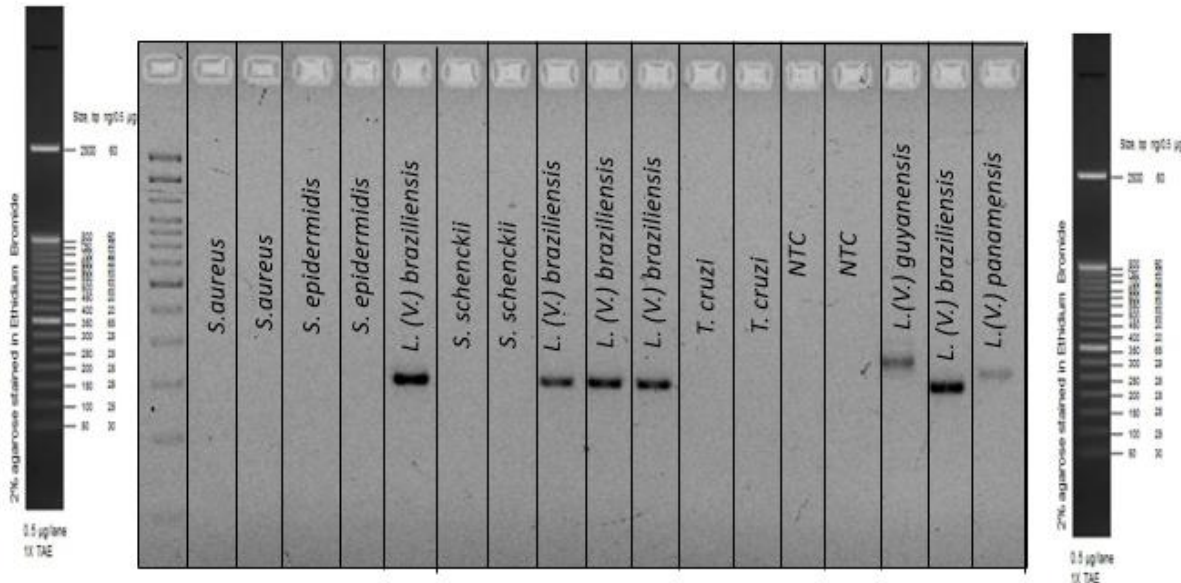


Figura 7 Resultados de selectividad, inclusividad y exclusividad.

Como se observa en los resultados de la tabla 2, los resultados obtenidos por los dos analistas demuestran una alta concordancia, en donde solo hubo desacuerdo en una de las muestras evaluadas. El análisis del índice de concordancia Kappa refleja un valor de 1,00 que acorde a la escala de Landis y Koch la fuerza de la concordancia es “casi perfecta”.

Los valores de sensibilidad y especificidad analítica fueron del 93% y 100% respectivamente. Las demás variables del rendimiento analítico se describen en la tabla 2, Figura 6 y 7. La demás evidencia se encuentran en el Anexo 2 Geles de Validación.

7.4 Concordancia algoritmo Ovalle y colaboradores Vs algoritmo Arias y colaboradores.

La concordancia de la amplificación y tipificación de especies de *Leishmania* con el gen ribosomal 12S-9S, se evaluó usando un total de 30 aislamientos de *leishmania* provenientes del Biobanco-CDFLLA, las cuales se encontrarán en ciego para evitar sesgos en la prueba. Dichos resultados se compraron con el algoritmo de tipificación de especies de *Leishmania* propuesto por Ovalle y colaboradores en 2018 (22), en el cual utilizan los marcadores moleculares *hsp70*, *miniexon* y las Enzimas *HaeIII* y *Bccl* respectivamente.

El acuerdo entre los dos algoritmos se determinó por medio del índice de concordancia kappa (89).

Una vez corridos ambos algoritmos se obtuvo que; Los resultados obtenidos en el análisis de concordancia Kappa para la tipificación de tres especies de *Leishmania* revela un acuerdo de 0.806, que acorde a la escala de Landis y Koch la fuerza de la concordancia es “*acuerdo sustancial*”

Este resultado se obtuvo cuando se realizó el análisis de las tres especies por separado *L.(V.) Braziliensis*, *L.(V.) panamensis* y *L.(V.) guyanensis*. Por lo cual se decidió calcular un nuevo Kappa *L.(V.) Braziliensis* Vs. *L.(V.) panamensis/guyanensis* Ya que esta primera es acusada de generar un tipo de “metástasis” de su forma cutánea a mucocutánea (92–94) y presenta una mayor su resistencia farmacológica respecto al comportamiento del complejo (95–98).

Una vez calculado dicho índice se obtuvo que:

Los resultados obtenidos en el análisis de concordancia Kappa para la tipificación de especies de *Leishmania* revela un acuerdo de 0,933, que acorde a la escala de Landis y Koch la fuerza de la concordancia es “*casi perfecto*”

Los resultados obtenidos permiten un adecuado diagnóstico de la leishmaniasis y una probable posibilidad para mejorar la identificación de especies para con ello se pueda orientar nueva terapia farmacológica más orientada a especie y disminuir los riesgos de exponer a

los pacientes a fármacos citotóxicos.

Nuestro trabajo se realizó con aislamientos principalmente de la región andina; por ello es necesario ampliar este y conocer con mayor certeza el desempeño de la prueba y evitar sesgos en la misma.

8. Discusión

Las diversas manifestaciones de la leishmaniasis se encuentran ampliamente distribuidas en el territorio nacional, principalmente la leishmaniasis cutánea por la mayor exposición corporal que se tiene de forma natural (99). En Colombia desde la última década se ha presentado una disminución en los casos de leishmaniasis en todo el país (100). Pese a ello, esta disminución no ha sido significativa. Ha habido cambios en el patrón epidemiológico, el reporte de nuevos focos, las diversas dinámicas sociales que han llevado a cambios y migraciones, la industrialización que ha llevado a nuevas poblaciones en entornos rurales, la deforestación y el movimiento constante de las fuerzas militares por eventos socio políticos del país, la explotación a gran escala de los recursos naturales y la gran desigualdad del país; donde más del 90 % de los casos de CL notificados ante el INS son aportados por las fuerzas militares una de las poblaciones más expuestas dada su labor(100,101). La población campesina dada su ocupación y el apoyo que tiene al país “seguridad nutricional” que a su vez estas poblaciones se encuentran en zonas de mayor riesgo de infección. Si bien es cierto durante los últimos 5 años los casos en general han disminuido frente a los históricos, la leishmaniasis sigue siendo un problema en salud pública, pie de fuerza militar limitado, costos para el sistema de salud, elevación de reporte en salud mental “pacientes con manifestaciones severas de LM y LMC” que al final se traduce en la limitación de la calidad de vida de los pacientes (102–104).

Dado que hasta la fecha no existe un blanco molecular validado que en un solo paso permita la correcta tipificación de especies y teniendo en cuenta la importancia de esto en la clínica

del paciente y los altos niveles de resistencia farmacología reportados, así como medicamentos limitados para tratar la enfermedad sin dejar de mencionar su alta citotoxicidad (95,96,105,106). Esta prueba se convierte en una herramienta prometedora.

En cuanto a la metodología utilizada en este proyecto, la PCR 12S-9S kDNA demostró una concordancia moderada con un Kappa de 0,806 y 0,933 respecto al Gold estándar utilizado "Ovalle y colaboradores 2018" (22). Cabe resaltar que con este nuevo protocolo se acortan los tiempos, se utilizan menos reactivos y materiales, así como capacidad instalada para conocer a nivel de subgénero y especie involucrados en la enfermedad. Es de anotar que esta metodología acorta significativamente los tiempos en comparación con técnicas que parten de cultivo (107–110). Así como la utilización de mínimas cantidades de material genético para su amplificación.

En otros estudios como los de Cabrera 2010 (111), en donde se han descrito métodos como la PCR-OL que también pertenece al kDNA en donde han podido identificar al género, pero no segregar en un solo paso las especies de pertenecientes al subgénero *Viannia*. En estudios como los de Weigle 2002 (112); en donde se logra identificar cuatro especies del subgénero *Viannia*, pero no ninguna del subgénero *Leishmania*; por lo cual nuestros resultados demuestran ser mucho más promotores al ser mucho más incluidos que blancos propuestos anteriormente (111–113)

La robustez de la prueba puede verse afectada al ser una metodología abierta (114,115) y requerir de un paso extra para su lectura como lo son los geles de agarosa, en donde se limita su poder discriminatorio. Siendo este el primer paso de validación de esta herramienta en ensayos futuros se debe continuar con ensayos de validación diagnóstica, así como la inclusión de diferentes tipos de muestras como; laminas, biopsia y aspirados de bazo o médula ósea. Así, como también ampliar la diagnóstico diferencial con más agentes involucrados en el diagnóstico diferencial de la enfermedad.

En el diagnóstico y tipificación de leishmaniasis en Colombia ha sido ampliamente estudiado dada la falta de una prueba validada que en un solo paso permita alcanzar ambos objetivos, que sea rápida y costo eficiente. Con alta sensibilidad y especificidad que se pueda establecer como el método estándar en el país (114,116,117). Se ha descrito la comprobación parasitológica mediante cualquier método como estándar de referencia, bien sea convencionales o moleculares (118–121). Debido a la baja sensibilidad de los métodos convencionales o de requerir diversos pasos para lograr tipificar se ha evidenciado la

necesidad de proponer una técnica que supere estos obstáculos sin perder su robustez, en los últimos años se han propuesto como método diagnóstico e identificación de las especies de leishmania causante de las diversas manifestaciones clínicas, como lo es la utilización de isoenzimas o técnica como la reacción en cadena de la polimerasa conocida como PCR.

En este trabajo se estandarizó y desarrolló una PCR convencional que amplifica una región conservada, pero con cierto polimorfismo muy puntuales que le permite hacerla tipificación de las tres especies de importancia clínica en el país. Puntualmente la región 12S-9S del kDNA de los Maxicirculos. Con primers diseñados por Urrea y colaboradores (87). En donde se realizó un robusto trabajo Bioinformático para analizar si cumplían con todos los índices descritos actualmente en la literatura.

Así como también realizamos ensayos de validación analítica para especificidad, median el uso de cepas de referencia pertenecientes al subgénero *Viannia* y *leishmania*, así como también microorganismos asociados al diagnóstico diferencial de la enfermedad como lo son *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Sporothrix schenckii* *T. Cruzi* por su cercanía taxonómicamente. Microorganismo causante de lesiones cutáneas y mucosas similares a las que ocasiona la leishmaniasis, por lo cual cobra vital importancia en no tener reacciones cruzadas de estas enfermedades que puedan ocultar la enfermedad o complicar el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad en diversas coinfecciones.

Se evidenció la especificidad la PCR convencional 12S-9S kDNA en la amplificación del blanco, demostrando la presencia del parásito. Pese que los aislamientos provenían del BioBanco-CDFLLA para evitar sesgos en el estudio contábamos con muestras totalmente anonimadas. De esta forma la prueba permite el diagnóstico y tipificación de especies del subgénero *Viannia* en el territorio nacional. Pese a ello, cabe mencionar que ya que en Colombia circulan especies del subgénero *leishmania* también la prueba no es capaz de segregar a estas ya que muestras un perfil de amplificación similar al de *L. (V.) braziliensis* por lo cual, existe la necesidad de introducir en nuestro algoritmo de tipificación al gen miniexon ya que este pese a su comportamiento en el laboratorio nos permite segregar a los dos grandes subgéneros. Cuando solo se analizó la capacidad de la prueba de identificar las muestras positivas con leishmaniasis se obtuvo una identidad de 100 % (107/107) de los aislamientos analizados. Así también cuando se ejecutaron ejercicios de repetibilidad por dos analistas durante tres días consecutivos se obtuvo de igual forma una identidad de 100 % (30/30) de los aislamientos utilizados. Por lo cual el blanco se postula como una herramienta prometedora también desde el diagnóstico de la enfermedad.

La tipificación de especies de leishmaniasis cobra entonces una gran utilidad en el pronóstico de la enfermedad, ya que los tratamientos con los que se cuentan actualmente son altamente citotóxicos y los mismo no sirven de forma eficiente para todas las especies. Las altas tasas de complicaciones y resistencia hacen sin duda alguna que antes de inicio de la terapia farmacología de conozca a nivel de género y especie implicada en la manifestación clínica del paciente, con ello también conocer de cierta forma más accesible la epidemiología de la enfermedad en el territorio nacional, así como también su distribución. Con ello evitar someter a los pacientes a terapias farmacologías altamente tóxicas y dolorosa y así también la tasa de adherencia sea mucho mayor. En la actualidad se han considerado diversas técnicas como los análisis de isoenzimas (MLEE), propuesto como el gol estándar desde la OMS (122), poco útil en la práctica clínica diaria y aún más teniendo en cuenta las limitaciones que presentan los diversos laboratorios que hacen diagnóstico de leishmaniasis actualmente en el territorio nacional.

Dada su complejidad, costos y tiempos; requiere de cultivo y el aislamiento del parásito previamente lo que le proporciona múltiples limitaciones en su uso. Aun así, en esta era molecular que nos encontramos y teniendo en cuenta los eventos de salud pública que han ocurrido en los últimos años y como estos han robustecido la capacidad diagnóstica de videos laboratorios al largo de todo el territorio nacional, ha permitido una puesta en marcha de este tipo de pruebas para el diagnóstico y tipificación de especies de leishmania. Así diversos centros de investigación a nivel mundial entre los cuales Colombia ha hecho grandes aportes al ver la necesidad que se tiene con la enfermedad y al ser un país endémico que proporciona todos los ejes para que la enfermedad se desarrolle. Diversos autores como estudios previos del Hospital Universitario Centro Dermatológico Federico Lleras Acosta de Ovalle y colaboradores en 2018 (22), proponen métodos pasados en PCR-RFLP con diferentes blancos como lo es miniexon y HSP70. Como en este caso, la necesidad de varias enzimas de restricción que son necesarias para garantizar la tipificación correcta somete a caer en mayores tiempos y costos lo que se traduce en demoras para la instauración un tratamiento farmacológico especie-específico. La configuración genómica del parásito impresionante y muy amplia, por lo cual es de vital importancia la búsqueda, estandarización y validación de una prueba molecular que permita el diagnóstico y tipificación de especies en donde se puedan ofrecer resultados con una alta confiabilidad, sensibilidad, especificidad, rapidez, sencillas y accesibles que sirvan como el uno gol estándar del país.

Desarrollando este proyecto de investigación se ha propuesto un nuevo blanco molecular

para el diagnóstico y tipificación de especies de *leishmania* en Colombia (87), desde el laboratorio de investigación de Hospital Universitario Federico Lleras Acosta, donde se estandarizaron las condiciones de la PCR convencional propuesta para el diagnóstico y tipificación de la enfermedad (123). Como apoyo diagnóstico en casos de sospecha de resistencia en pacientes y aunque se llevó a cabo el primer paso de validación analítica, apoya a diferentes investigaciones futuras de la línea de leishmaniasis que se puedan apoyar en esta metodología y en pro de llegar a ser una prueba diagnóstica abalada para tal fin.

Con los resultados obtenidos en el proyecto se observó que el blanco molecular se convierte una herramienta prometedora en el diagnóstico y tipificación de especies de *leishmania* en el país. Así como ser una herramienta a nivel de repetibilidad y robusta. Que permite la amplificación de material genético a muy bajas cargas parasitaria y con una exclusividad de amplificar solo el subgénero de interés impresionante evitando con ello que se den falsos positivos por microorganismos que se encuentren relacionados la diagnóstico diferencial de la enfermedad o cercana a la misma taxonómicamente.

Así como demostrar un gran desempeño con diferentes muestras de diferentes ubicaciones geográficas lo cual la convierte en una prueba aún más robusta siendo capaz de amplificar muestras de diferentes ubicaciones geográficas como se demuestra en la figura X Mapa de distribución d especies empleadas del BioBanco-CDFLLA.

9. Conclusiones

1. Este estudio evaluó la sensibilidad analítica de la PCR del gen ribosomal *12S-9S* donde se obtuvo un resultado positivo de 0,00001 ng/ul como se muestra en la Figura 6. Demostrando una sensibilidad adecuada del marcador, debido a las concentraciones bajas con las cuales se logra obtener amplificación, este marcador podría usarse en muestras biológicas que tengan bajas cargas parasitarias.
2. Este estudio revelo una especificidad analítica de la PCR del gen ribosomal *12S-9S* de forma positiva ya que se obtuvo un alto grado de selectividad, inclusividad y exclusividad. Lo que da al método robustez y evita caer en los falsos positivos o falsos negativos como se demostró en la Figura 5 y la tabla 2.

3. La PCR *12S-9S* kDNA demostró una muy buena concordancia con un Kappa de 0,806 y 0,933 respecto a algol estándar utilizado; que acorde a la escala de Landis y Koch la fuerza de la concordancia es “sustancial y casi perfecta” permiten un adecuado diagnóstico de la leishmaniasis y una probable posibilidad para mejorar la identificación de especies para con ello se pueda orientar nueva terapia farmacológica más orientada a especie y disminuir los riesgos de exponer a los pacientes a fármacos citotóxicos.
4. Se evidencio la necesidad de proponer nuevas herramientas moleculares para el diagnóstico y tipificación de la leishmaniasis con metodologías mucha más rápidas y eficientes que las propuestas actualmente en la comunidad científica. Ya que el diagnostico convencional presenta muchas limitaciones y técnicas que requieran de cultivo toman mucho más tiempo y dinero. Por todo lo expuesto anteriormente se trabajó en la estandarización y validación analítica de la PCR convencional *12S-9S* del kDNA de los Maxicirculos.
5. La PCR convencional *12S-9S* del kDNA de los maxicirculos demostró tener un gran poder en el diagnóstico de la leishmaniasis y ser una herramienta prometedora en la tipificación de especies, una prueba altamente sensible, repetible y exclusiva de la leishmaniasis. Fue un primer estudio que propone a los maxicirculos como blancos moleculares prometedores. Y al ser una PCR convencional permite que se pueda implementar más fácilmente que otras metodologías en el país.
6. El diagnóstico y tipificación del parasito se ha primordial ante las dificultades que afrontaran los pacientes con tratamientos farmacológicos disponibles para tratar la enfermedad. Siendo indispensable para evitar fallas terapéuticas por diferentes índoles. En la actualidad existen diversos métodos que pueden apoyar este proceso, pero en su gran mayoría los validados parten de cultivos lo que retrasa drásticamente el tratamiento del paciente. Teniendo en cuenta estas metodologías se estandarizo y valido analíticamente una técnica molecular convencional que parte del gen ribosomal *12S-9S* del kDNA de los maxicirculos que permite la identificación del parasito en el 100 % de los aislamientos utilizados (30) y se establece como una herramienta prometedora a la hora de segregar la especie *L.(V.) braziliensis* del complejo *L.(V.) panamensis/guyanensis*.

10. Recomendaciones

1. Estudiar metodologías cerradas como qPCR pueden mejorar la sensibilidad a la hora de tipificar especies con el blanco molecular propuesto. Así como también, disminuir los tiempos en la ejecución de la técnica y costos a no tener que revelar la prueba mediante electroforesis. También realizar validación con geles de poliacrilamida que puedan aportar una mayor resolución teniendo presente las contraindicaciones de estos. Así, mejorando la concordancia del blanco molecular frente a otras propuestas como los de Ovalle y colaboradores en 2018.
2. Recomendar el uso de la PCR convencional 12S-9S del kDNA de los maxicirculos PCR como ayuda diagnóstica ante un resultado negativo por frotis directo, teniendo en cuenta su prometedor desempeño no sin desconocer la etapa inicial en la cual se encuentra la validación de esta, puede ser de gran ayuda en el manejo clínico del paciente con sospecha de leishmaniasis.
3. Se recomendable realizar charlas de educación y capacitación a todos los actores que se encuentran involucrados con la leishmaniasis en la importancia de la tipificación de especies, con el fin de implementar nuevos protocolos, con el fin de disminuir la tasa de falla terapéutica y le resistencia parasitaria que se ha convertido en nuestro nuevo reto.

11. Limitaciones

1. Se hace necesario aclarar que este tipo de Tecnologías al requerir un paso adicional para la lectura de los productos de amplificación “electroforesis” limitan la prueba por ello se proponen implementar su validación diagnostica bajo metodologías cerradas como lo sería la qPCR.
2. Es necesarios implementar un número mayor de muestras, así como un mayor número de tipos de muestras como laminas, hisopados, biopsias, aspirados de medula ósea y bazo. Ya que nuestro trabajo se realizó con aislamientos principalmente de la región andina; por ello es necesario ampliar este y conocer con mayor certeza el desempeño de la prueba y evitar sesgos en la misma.
3. Para evitar sesgos se sugiere realizar ensayos con un mayor número de microorganismos de diagnóstico diferencial que le aporten mayor robustez a la

técnica con ello evitar falsos positivos.

12. ANEXOS.

1. Glosario	Terminología clave utilizada en el estudio que facilitan la comprensión del estudio
2. Geles de Validación	Presentación PowerPoint, donde se ilustran los soportes del proceso de validación del estudio.
3. Mapa de Distribución de Especies	Mapa que da a conocer la distribución de los aislamientos utilizados en el estudio.
4. Certificado participación XII semana de Investigación. FABA-UDES – Modalidad Oral 4.1 Presentación	Incluye presentación PowerPoint y certificado como ponente oral.
5. IX Reunión ChagasLeish y XIX Simposio PECET 5.1 Presentación	Incluye presentación PowerPoint y certificado como ponente oral.
6. Base de Datos Análisis de concordancia	Incluye la ubicación, resultados algoritmo <i>miniexon/hsp70</i> Vs <i>miniexon/kDNA</i>

Tabla 3 *anexos*

13. Bibliografía

1. Dirección de Vigilancia y Análisis del Riesgo en Salud Pública. Protocolo de vigilancia en salud pública de Leishmaniasis [Internet]. Instituto Nacional de Salud; 2024 may [citado 7 de octubre de 2024]. Disponible en: https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Lineamientos/Pro_Leishmaniasis.pdf
2. Directrices para el tratamiento de las leishmaniasis en la Región de las Américas. Segunda edición [Internet]. Second. Pan American Health Organization; 2022 [citado 7 de octubre de 2024]. Disponible en: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/56121>
3. Ramírez JR, Agudelo S, Muskus C, Alzate JF, Berberich C, Barker D, et al. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis in Colombia: the sampling site within lesions influences the sensitivity of parasitologic diagnosis. *J Clin Microbiol.* octubre de 2000;38(10):3768-73.
4. Faber WR, Oskam L, van Gool T, Kroon NCM, Kneegt-Junk KJ, Hofwegen H, et al. Value of diagnostic techniques for cutaneous leishmaniasis. *J Am Acad Dermatol.* julio de 2003;49(1):70-4.
5. Wortmann G, Sweeney C, Houg H, Aronson N, Stiteler J, Jackson J, et al. Rapid diagnosis of Leishmaniasis by fluorogenic polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg.* 1 de noviembre de 2001;65:583-7.
6. Bensoussan E, Nasereddin A, Jonas F, Schnur LF, Jaffe CL. Comparison of PCR assays for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *J Clin Microbiol.* abril de 2006;44(4):1435-9.
7. Boggild AK, Ramos AP, Valencia BM, Veland N, Calderon F, Arevalo J, et al. Diagnostic Performance of Filter Paper Lesion Impression PCR for Secondarily Infected Ulcers and Nonulcerative Lesions Caused by Cutaneous Leishmaniasis ∇ . *J Clin Microbiol.* marzo de 2011;49(3):1097-100.
8. Marco JD, Barroso PA, Mimori T, Locatelli FM, Tomatani A, Mora MC, et al. Polymorphism-specific PCR enhances the diagnostic performance of American tegumentary leishmaniasis and allows the rapid identification of *Leishmania* species from Argentina. *BMC Infect Dis.* 15 de agosto de 2012;12:191.
9. Almazán MC, Hoyos CL, Krolewiecki AJ, Cajal SP, Copa GN, Fleitas PE, et al. Molecular Identification of *Leishmania* spp. DNA from Archived Giemsa-Stained Slides of Patients from Salta, Argentina. *Am J Trop Med Hyg.* noviembre de 2018;99(5):1156-61.
10. Hajjaran H, Mohebbali M, Mamishi S, Vasigheh F, Oshaghi MA, Naddaf SR, et al. Molecular Identification and Polymorphism Determination of Cutaneous and Visceral Leishmaniasis Agents Isolated from Human and Animal Hosts in Iran. *BioMed Res Int.* 2013;2013:789326.

11. Retraso en el diagnóstico: leishmaniasis cutánea relacionada con traumatismos y coinfecciones debido a infección por *Leishmania guyanensis* - Mulvaney - 2009 - Journal of Cutaneous Pathology - Wiley Online Library [Internet]. [citado 7 de octubre de 2024]. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1600-0560.2007.00925.x>
12. Dueñas PG. INFORME FINAL DEL EVENTO LEISHMANIASIS, AÑO 2010. (2012).
13. Boggild AK, Ramos AP, Valencia BM, Veland N, Calderon F, Arevalo J, et al. Diagnostic Performance of Filter Paper Lesion Impression PCR for Secondarily Infected Ulcers and Nonulcerative Lesions Caused by Cutaneous Leishmaniasis. *J Clin Microbiol.* marzo de 2011;49(3):1097-100.
14. Montalvo AM, Fraga J, Rodríguez O, Blanco O, Llanos-Cuentas A, García AL, et al. Detección de *Leishmania* spp. en base al gen que codifica la proteína HSP20. *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* octubre de 2014;31(4):635-43.
15. 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.* 5 de julio de 2013;8(7):e62473.
16. Maia-Elkhoury ANS, Magalhães Lima D, Salomón OD, Buzanovsky LP, Saboyá-Díaz MI, Valadas SYOB, et al. Interacción entre los determinantes medioambientales y socioeconómicos para el riesgo para leishmaniasis cutánea en América Latina. *Rev Panam Salud Pública.* 28 de abril de 2021;45:e49.
17. González U, Pinart M, Rengifo-Pardo M, Macaya A, Alvar J, Tweed JA. Interventions for American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Cochrane Database Syst Rev.* 15 de abril de 2009;(2):CD004834.
18. Leishmaniasis [Internet]. [citado 7 de octubre de 2024]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>
19. Herramientas diagnósticas para la leishmaniasis cutánea causada por *Leishmania donovani*: una revisión narrativa [Internet]. [citado 9 de octubre de 2024]. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2075-4418/13/18/2989>
20. Leishmaniasis cutánea del Viejo Mundo: diagnóstico y tratamiento - PubMed [Internet]. [citado 9 de octubre de 2024]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23858338/>
21. Jaramillo-Antillón O, Espinoza-Aguirre A, Calvo-Fonseca N, Mata-Somarribas C, Wasserman H, Jaramillo-Antillón O, et al. La leishmaniosis cutánea en Costa Rica: prevención, diagnóstico y tratamiento. *Acta Médica Costarric.* septiembre de 2018;60(3):103-14.
22. Ovalle-Bracho C, Camargo C, Díaz-Toro Y, Parra-Muñoz M. Molecular typing of *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* and species of the subgenus *Viannia* associated with cutaneous and mucosal leishmaniasis in Colombia: A concordance study. *Biomédica.* 15 de marzo de 2018;38(1):86-95.
23. Cruz-Barrera ML, Ovalle-Bracho C, Ortegón-Vergara V, Pérez-Franco JE, Echeverry MC. Improving *Leishmania* Species Identification in Different Types of Samples from

- Cutaneous Lesions. *J Clin Microbiol.* abril de 2015;53(4):1339-41.
24. Montalvo AM, Monzote L, Fraga J, Montano I, Muskus C, Marín M, et al. RFLP y RAPD para la tipificación de *Leishmania neotropical*. *Biomédica.* diciembre de 2008;28(4):597-606.
 25. Montalvo AM, Fraga J, El Safi S, Gramiccia M, Jaffe CL, Dujardin JC, et al. Direct *Leishmania* species typing in Old World clinical samples: evaluation of 3 sensitive methods based on the heat-shock protein 70 gene. *Diagn Microbiol Infect Dis.* septiembre de 2014;80(1):35-9.
 26. Nateghi Rostami M, Darzi F, Farahmand M, Aghaei M, Parvizi P. Performance of a universal PCR assay to identify different *Leishmania* species causative of Old World cutaneous leishmaniasis. *Parasit Vectors.* 27 de agosto de 2020;13:431.
 27. la tipificación de especies por medio del abordaje de qPCR – HRM (High Resolution melting) echeverry - Buscar con Google [Internet]. [citado 9 de octubre de 2024]. Disponible en:
https://www.google.gg/search?q=la+tipificaci%C3%B3n+de+especies+por+medio+del+abordaje+de+qPCR+%E2%80%93+HRM+%28High+Resolution+melting%29+echeverry+%sca_esv=609f3e555a5e0eba&biw=1366&bih=599&ei=p1QHZ4ycC-ySwbkP9J-tmAg&ved=0ahUKEwjMi9Db-YKJAXVsSTABHfRPC4MQ4dUDCA8&uact=5&oq=la+tipificaci%C3%B3n+de+especies+por+medio+del+abordaje+de+qPCR+%E2%80%93+HRM+%28High+Resolution+melting%29+echeverry+%gs_lp=Egxnd3Mtd2l6LXNlcnAiaGxhIHRpcGlmaWNhY2nDs24gZGUgZXNwZWNPZXMgcG9yIG1IZGlvIGRlCBhYm9yZGFqZSBkZSBxUENSIOKAKyBIUk0gKEhpZ2ggUmVzb2x1dGlubiBtZWx0aW5nKSBIY2hldmVycnkgSABQAFgAcAB4AZABAJgBAKABA KoBALgBA8gBAPgBAZgCAKACAJgDAJIHAKAHAA&sclient=gws-wiz-serp
 28. 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. *Biomed Rev Inst Nac Salud.* 1 de diciembre de 2017;37(4):538-47.
 29. *Leishmania* (Viannia): análisis genético de cepas cutáneas y mucosas aisladas del mismo paciente - ScienceDirect [Internet]. [citado 7 de octubre de 2024]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0014489404001225>
 30. Adams ER, Gomez MA, Scheske L, Rios R, Marquez R, Cossio A, et al. Sensitive diagnosis of cutaneous leishmaniasis by lesion swab sampling coupled to qPCR. *Parasitology.* diciembre de 2014;141(14):1891-7.
 31. Velez ID, Hendrickx E, Robledo SM, Agudelo S del P. Leishmaniasis cutánea en Colombia y género. *Cad Saúde Pública.* febrero de 2001;17:171-80.
 32. Directrices para el tratamiento de las leishmaniasis en la Región de las Américas. Segunda edición [Internet]. Second. Pan American Health Organization; 2022 [citado 7 de octubre de 2024]. Disponible en: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/56121>
 33. Monzote Fidalgo L, Ordeñana Pilotos R, Fraga Nodarse J, Montalvo Álvarez AM, Montano Goodrige I. Identificación de especies de *Leishmania* por la técnica de amplificación al azar del ADN polimórfico. *Rev Cubana Med Trop.* agosto de

2009;61(2):0-0.

34. Fleta Zaragozano J, Rodríguez Martínez G, Clavel Parrilla A. Leishmaniasis visceral y cutaneomucosa: aspectos epidemiológicos y clínicos. *Med Integral*. 1 de octubre de 2001;38(6):264-9.
35. Saravia NG, Nicholls RS. Leishmaniasis: un reto para la salud pública que exige concertación de voluntades y esfuerzos. *Biomédica*. octubre de 2006;26:8-9.
36. Mogollón LEM. Correo electrónico: Imayorga@ins.gov.co Grupo de vigilancia y control de enfermedades transmisibles endoepidémicas y relacionadas con salud sexual. Dirección de Vigilancia y Análisis del Riesgo en Salud Pública.
37. Arevalo I, Tulliano G, Quispe A, Spaeth G, Matlashewski G, Llanos-Cuentas A, et al. Role of imiquimod and parenteral meglumine antimoniate in the initial treatment of cutaneous leishmaniasis. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 15 de junio de 2007;44(12):1549-54.
38. Arevalo J, Ramirez L, Adauí V, Zimic M, Tulliano G, Miranda-Verástegui C, et al. Influence of *Leishmania* (*Viannia*) Species on the Response to Antimonial Treatment in Patients with American Tegumentary Leishmaniasis. *J Infect Dis*. 15 de junio de 2007;195(12):1846-51.
39. Factores de riesgo clínicos y de especies parasitarias para el fracaso del tratamiento con antimonial pentavalente en leishmaniasis cutánea en Perú | Enfermedades infecciosas clínicas | Oxford Academic [Internet]. [citado 7 de octubre de 2024]. Disponible en: <https://academic.oup.com/cid/article/46/2/223/455584?login=false>
40. Llanos-Cuentas A, Tulliano G, Araujo-Castillo R, Miranda-Verastegui C, Santamaria-Castrellon G, Ramirez L, et al. Clinical and Parasite Species Risk Factors for Pentavalent Antimonial Treatment Failure in Cutaneous Leishmaniasis in Peru. *Clin Infect Dis*. 15 de enero de 2008;46(2):223-31.
41. Soto J, Rea J, Balderrama M, Toledo J, Soto P, Valda L, et al. Short Report: Efficacy of Miltefosine for Bolivian Cutaneous Leishmaniasis.
42. López-Jaramillo P, Rincón MY, García RG, Silva SY, Smith E, Kampeerapappun P, et al. A Controlled, Randomized-Blinded Clinical Trial to Assess the Efficacy of a Nitric Oxide Releasing Patch in the Treatment of Cutaneous Leishmaniasis by *Leishmania* (*V.*) *panamensis*. *Am J Trop Med Hyg*. julio de 2010;83(1):97-101.
43. Vélez I, López L, Sánchez X, Mestra L, Rojas C, Rodríguez E. Efficacy of Miltefosine for the Treatment of American Cutaneous Leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*. 5 de agosto de 2010;83(2):351-6.
44. Mandal G, Mandal S, Sharma M, Charret KS, Papadopoulou B, Bhattacharjee H, et al. Species-Specific Antimonial Sensitivity in *Leishmania* Is Driven by Post-Transcriptional Regulation of AQP1. *PLoS Negl Trop Dis*. 25 de febrero de 2015;9(2):e0003500.
45. Mallick S, Dey S, Mandal S, Dutta A, Mukherjee D, Biswas G, et al. A novel Triterpene from *Astraeus Hygrometricus* Induces Reactive Oxygen Species Leading to death in *Leishmania Donovanii*. *Future Microbiol*. 1 de mayo de 2015;10(5):763-89.

46. Reconfiguración metabólica del metabolismo central de la glucosa: una estrategia crucial de *Leishmania donovani* para su supervivencia durante el estrés oxidativo - Ghosh - 2015 - The FASEB Journal - Wiley Online Library [Internet]. [citado 7 de octubre de 2024]. Disponible en: <https://faseb.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1096/fj.14-258624>
47. Polimorfismo genético y epidemiología molecular de *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* de diferentes hospedadores y áreas geográficas en Brasil | Revista de Microbiología Clínica [Internet]. [citado 7 de octubre de 2024]. Disponible en: <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/jcm.41.7.3126-3132.2003>
48. Heterogeneidad, distribución geográfica, y patogenicidad de los serodemas de *Leishmania viannia* en Colombia. [Internet]. [citado 7 de octubre de 2024]. Disponible en: <https://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.2002.66.738>
49. Rodríguez-Barraquer I, Góngora R, Prager M, Pacheco R, Montero LM, Navas A, et al. Etiologic Agent of an Epidemic of Cutaneous Leishmaniasis in Tolima, Colombia. *Am J Trop Med Hyg.* febrero de 2008;78(2):276-82.
50. Botilde Y, Laurent T, Quispe Tintaya W, Chicharro C, Cañavate C, Cruz I, et al. Comparación de marcadores moleculares para la tipificación de cepas de *Leishmania infantum*. *Infect Genet Evol.* 1 de noviembre de 2006;6(6):440-6.
51. Diferenciación y flujo genético entre poblaciones europeas de *Leishmania infantum* MON-1 | PLOS Neglected Tropical Diseases [Internet]. [citado 7 de octubre de 2024]. Disponible en: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0000261>
52. Oshaghi MA, Ravasan NM, Hide M, Javadian EA, Rassi Y, Sedaghat MM, et al. Desarrollo de ensayos de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción por PCR y PCR específicos de especie para la discriminación de *L. infantum* / *L. donovani*. *Exp Parasitol.* 1 de mayo de 2009;122(1):61-5.
53. Enfoques moleculares para una mejor comprensión de la epidemiología y la genética poblacional de *Leishmania* | Parasitología | Cambridge Core [Internet]. [citado 7 de octubre de 2024]. Disponible en: <https://www.cambridge.org/core/journals/parasitology/article/abs/molecular-approaches-for-a-better-understanding-of-the-epidemiology-and-population-genetics-of-leishmania/A0AA0B017D4C7384118AE3394F8BCF9A>
54. Montalvo Álvarez AM, Monzote Fidalgo L. *Leishmania* y leishmaniasis. Veinte años de estudio en el Instituto de Medicina Tropical «Pedro Kourí»: aportes y perspectivas. *Rev Cubana Med Trop.* diciembre de 2017;69(3):1-19.
55. Europe PMC [Internet]. [citado 7 de octubre de 2024]. Disponible en: <https://europepmc.org/article/med/23424791>
56. Uso del análisis de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción mediante PCR para identificar las principales especies de *Leishmania* del Nuevo Mundo y analizar sus propiedades taxonómicas y polimorfismos mediante la aplicación del ensayo a muestras clínicas | Journal of Clinical Microbiology [Internet]. [citado 7 de octubre de 2024]. Disponible en: <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/jcm.44.2.459-467.2006>
57. de Andrade HM, Reis AB, dos Santos SL, Volpini ÂC, Marques MJ, Romanha AJ. Uso de PCR-RFLP para identificar especies de *Leishmania* en perros infectados

- naturalmente. *Vet Parasitol.* 10 de septiembre de 2006;140(3):231-8.
58. Cuervo P, Cupolillo E, Nehme N, Hernandez V, Saravia N, Fernandes O. *Leishmania* (*Viannia*): análisis genético de cepas cutáneas y mucosas aisladas del mismo paciente. *Exp Parasitol.* 1 de septiembre de 2004;108(1):59-66.
 59. Baptista C, Schubach AO, Madeira MF, Leal CA, Pires MQ, Oliveira FS, et al. *Genotipos de Leishmania (Viannia) braziliensis* identificados en lesiones de pacientes con manifestaciones atípicas o típicas de leishmaniasis tegumentaria: evaluación mediante dos marcadores moleculares. *Exp Parasitol.* 1 de abril de 2009;121(4):317-22.
 60. Mauricio IL, Yeo M, Baghaei M, Doto D, Pralong F, Zemanova E, et al. Hacia la tipificación de secuencias multilocus del complejo *Leishmania donovani*: resolución de genotipos y haplotipos para cinco enzimas metabólicas polimórficas (ASAT, GPI, NH1, NH2, PGD). *Int J Parasitol.* 1 de junio de 2006;36(7):757-69.
 61. Un ensayo de PCR en tiempo real basado en FRET para identificar los principales agentes causales de la leishmaniasis tegumentaria del Nuevo Mundo | *PLOS Neglected Tropical Diseases* [Internet]. [citado 7 de octubre de 2024]. Disponible en: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0001956>
 62. Identificación y diferenciación de especies de *Leishmania* en muestras clínicas mediante amplificación por PCR de la secuencia del miniexón y posterior análisis del polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción | *Journal of Clinical Microbiology* [Internet]. [citado 7 de octubre de 2024]. Disponible en: <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/jcm.41.7.3147-3153.2003>
 63. Desarrollo de un método de tipificación de microsatélites multilocus para discriminar cepas de especies de *Leishmania* (*Viannia*) | *Revista de microbiología clínica* [Internet]. [citado 7 de octubre de 2024]. Disponible en: <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/jcm.00645-09>
 64. Cuervo P, Cupolillo E, Nehme N, Hernandez V, Saravia N, Fernandes O. *Leishmania* (*Viannia*): análisis genético de cepas cutáneas y mucosas aisladas del mismo paciente. *Exp Parasitol.* 1 de septiembre de 2004;108(1):59-66.
 65. Motazedian H, Karamian M, Noyes HA, Ardehali S. DNA extraction and amplification of *Leishmania* from archived, Giemsa-stained slides, for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis by PCR. *Ann Trop Med Parasitol.* 1 de enero de 2002;96(1):31-4.
 66. Motazedian H, Karamian M, Noyes HA, Ardehali S. DNA extraction and amplification of *Leishmania* from archived, Giemsa-stained slides, for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis by PCR. *Ann Trop Med Parasitol.* 1 de enero de 2002;96(1):31-4.
 67. Tipificación de especies de *Leishmania* neotropical independiente del cultivo para la validación clínica de un ensayo basado en PCR dirigido a los genes de la proteína de choque térmico 70 | *Journal of Clinical Microbiology* [Internet]. [citado 7 de octubre de 2024]. Disponible en: <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/jcm.42.5.2294-2297.2004>
 68. Montalvo Alvarez AM, Nodarse JF, Goodridge IM, Fidalgo LM, Marin M, Van Der Auwera G, et al. Differentiation of *Leishmania* (*Viannia*) *panamensis* and *Leishmania* (*V.*) *guyanensis* using Bccl for hsp70 PCR-RFLP. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1 de mayo de 2010;104(5):364-7.

69. Rotureau B, Ravel C, Couppié P, Pratlong F, Nacher M, Dedet JP, et al. Use of PCR-restriction fragment length polymorphism analysis to identify the main new world *Leishmania* species and analyze their taxonomic properties and polymorphism by application of the assay to clinical samples. *J Clin Microbiol.* febrero de 2006;44(2):459-67.
70. leishmania Montalvo, Monzote et al. 2008 - Buscar con Google [Internet]. [citado 7 de octubre de 2024]. Disponible en: https://www.google.gg/search?q=leishmania+Montalvo%2C+Monzote+et+al.+2008&sca_esv=4ab666ac1a92460f&ei=3awEZ-muFsaOwbkP2--cCA&ved=0ahUKEwipkdO18f2lAxVGRzABHds3BwEQ4dUDCA8&uact=5&oq=leishmania+Montalvo%2C+Monzote+et+al.+2008&gs_l=lp=Egxn3Mtd2l6LXNlcnAiKGxlaXNobWFuaWEgTW9udGFsdm8sIE1vbnpvdGUgZXQgYWwulDIwMDgyCBAAGIAEGKIEMggQABiABBiBDIIEAAYgAQYogQyCBAAGIAEGKIEMggQABiABBiiBEjsBIAAWPYBcAB4AJABAjgBqwGgAbMCqgEDMC4yuAEDyAEA-AEB-AECmAICoALWAsICChAuGIAEGEMYigXCAgoQABiABBhDGloFwgIFEAAYgATCAgUQLhiABMICGRAuGIAEGEMYigUYlwUY3AQY3gQY3wTYAQGYAwC6BgYIARABGBSSBwMwLjKgB_wT&sclient=gws-wiz-serp
71. Oddone R, Schweynoch C, Schönian G, de Sousa C dos S, Cupolillo E, Espinosa D, et al. Development of a multilocus microsatellite typing approach for discriminating strains of *Leishmania* (*Viannia*) species. *J Clin Microbiol.* septiembre de 2009;47(9):2818-25.
72. Fraga J, Montalvo AM, De Doncker S, Dujardin JC, Van der Auwera G. Phylogeny of *Leishmania* species based on the heat-shock protein 70 gene. *Infect Genet Evol J Mol Epidemiol Evol Genet Infect Dis.* marzo de 2010;10(2):238-45.
73. Bañuls AL, Hide M, Prugnolle F. *Leishmania* and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Adv Parasitol.* 2007;64:1-109.
74. Adhya S, Chatterjee M, Hassan MQ, Mukherjee S, Sen S. Detección de *Leishmania* en la sangre de pacientes con kala azar en etapa temprana con ayuda de la reacción en cadena de la polimerasa. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1 de noviembre de 1995;89(6):622-4.
75. Dujardin JC. Risk factors in the spread of leishmaniasis: towards integrated monitoring? *Trends Parasitol.* 1 de enero de 2006;22(1):4-6.
76. de Araujo-Pereira T, de Pita-Pereira D, Boité MC, Melo M, da Costa-Rego TA, Fuzari AA, et al. First description of *Leishmania* (*Viannia*) infection in *Evandromyia saulensis*, *Pressatia* sp. and *Trichophoromyia auraensis* (Psychodidae: Phlebotominae) in a transmission area of cutaneous leishmaniasis in Acre state, Amazon Basin, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* enero de 2017;112(1):75-8.
77. Torres-Guerrero E, Quintanilla-Cedillo MR, Ruiz-Esmenjaud J, Arenas R. Leishmaniasis: a review. *F1000Research* [Internet]. 2017 [citado 7 de octubre de 2024];6. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5464238/>
78. Boggild AK, Ramos AP, Valencia BM, Veland N, Calderon F, Arevalo J, et al. Diagnostic Performance of Filter Paper Lesion Impression PCR for Secondarily Infected Ulcers and Nonulcerative Lesions Caused by Cutaneous Leishmaniasis ▽. *J Clin*

Microbiol. marzo de 2011;49(3):1097-100.

79. Veland N, Boggild AK, Valencia C, Valencia BM, Llanos-Cuentas A, Van der Auwera G, et al. Leishmania (Viannia) species identification on clinical samples from cutaneous leishmaniasis patients in Peru: assessment of a molecular stepwise approach. *J Clin Microbiol.* febrero de 2012;50(2):495-8.
80. Valencia BM, Veland N, Alba M, Adai V, Arevalo J, Low DE, et al. Non-invasive cytology brush PCR for the diagnosis and causative species identification of American cutaneous leishmaniasis in Peru. *PLoS One.* 2012;7(11):e49738.
81. Non-Invasive Cytology Brush PCR for the Diagnosis and Causative Species Identification of American Cutaneous Leishmaniasis in Peru | PLOS ONE [Internet]. [citado 7 de octubre de 2024]. Disponible en: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0049738>
82. Marco JD, Barroso PA, Mimori T, Locatelli FM, Tomatani A, Mora MC, et al. Polymorphism-specific PCR enhances the diagnostic performance of American tegumentary leishmaniasis and allows the rapid identification of Leishmania species from Argentina. *BMC Infect Dis.* 15 de agosto de 2012;12:191.
83. KHEIRANDISH F, CHEGENI SHARAFI A, KAZEMI B, MOHEBALI M, SARLAK A, TARAH MJ, et al. Identification of Leishmania Species Using PCR Assay on Giemsa-Stained Slides Prepared From Cutaneous Leishmaniasis Patients. *Iran J Parasitol.* 2013;8(3):382-8.
84. Kool ET. 7.10 - Topological Modification of DNA: Circles, Loops, Knots, and Branches. En: Barton SD, Nakanishi K, Meth-Cohn O, editores. *Comprehensive Natural Products Chemistry* [Internet]. Oxford: Pergamon; 1999 [citado 7 de octubre de 2024]. p. 341-69. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780080912837000655>
85. Simpson L. The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication, and evolution. *Annu Rev Microbiol.* 1987;41:363-82.
86. Anuntasomboon P, Siripattanapipong S, Unajak S, Choowongkamon K, Burchmore R, Leelayoova S, et al. Identification of a conserved maxicircle and unique minicircles as part of the mitochondrial genome of Leishmania martiniquensis strain PCM3 in Thailand. *Parasit Vectors.* 12 de diciembre de 2022;15(1):459.
87. Urrea DA, Duitama J, Imamura H, Álzate JF, Gil J, Muñoz N, et al. Genomic Analysis of Colombian Leishmania panamensis strains with different level of virulence. *Sci Rep.* 26 de noviembre de 2018;8(1):17336.
88. OMSA - Organización Mundial de Sanidad Animal [Internet]. [citado 7 de octubre de 2024]. Acceso en línea al Manual Terrestre. Disponible en: <https://www.woah.org/es/que-hacemos/normas/codigos-y-manuales/acceso-en-linea-al-manual-terrestre/>
89. Guía: Medidas de concordancia: el índice Kappa - Fisterra [Internet]. [citado 8 de octubre de 2024]. Disponible en: <https://www.fisterra.com/formacion/metodologia-investigacion/medidas-concordancia-indice-kappa/>
90. WMA - The World Medical Association-Declaración de Helsinki de la AMM –

Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos [Internet]. [citado 9 de octubre de 2024]. Disponible en: <https://www.wma.net/es/polices-post/declaracion-de-helsinki-de-la-amm-principios-eticos-para-las-investigaciones-medicas-en-seres-humanos/>

91. RFLP y RAPD para la tipificación de *Leishmania neotropical* [Internet]. [citado 9 de octubre de 2024]. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-41572008000400014
92. Vargas León CM. Identificación y asociación de polimorfismos de Toll-Like Receptor 3 con el desarrollo de Leishmaniasis mucosa frente a la coinfección *Leishmania* spp. – *Leishmania* RNA Virus 1 [Internet] [Trabajo de grado - Maestría]. Universidad Nacional de Colombia; 2021 [citado 10 de octubre de 2024]. Disponible en: <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/80802>
93. Gencel Augusto J. Asociación entre la presencia del virus de ARN de *Leishmania* (LRV1) y la susceptibilidad de aislados clínicos de *Leishmania braziliensis* a estímulos de estrés oxidativo y nitrosativo. 2017 [citado 10 de octubre de 2024]; Disponible en: <https://repositorio.upch.edu.pe/handle/20.500.12866/858>
94. Rodríguez N. Factores de virulencia en *Leishmania* y su relación con el desarrollo de la leishmaniasis. *Dermatol Venez* [Internet]. 2003 [citado 10 de octubre de 2024];41(3). Disponible en: <https://revista.svderma.org/index.php/ojs/article/view/284>
95. Padrón-Nieves M, Ponte-Sucre A. Marcadores de resistencia en *Leishmania*: Susceptibilidad in vitro a drogas leishmanicidas vs. retención de calceína en aislados de pacientes. *Arch Venez Farmacol Ter*. junio de 2013;32(2):29-33.
96. Osorio EJ, Robledo SM, Arango GJ, Muskus CE. *Leishmania*: papel de la glicoproteína P en la mediación de resistencia a medicamentos y estrategias de reversión. *Biomédica*. junio de 2005;25(2):242-60.
97. Navarrete-Dechent C, Cevallos C, Jercic MI, Saldías-Fuentes C, González S, Labarca J, et al. Leishmaniasis cutánea causada por *Leishmania braziliensis* y uso de anfotericina B liposomal. Comunicación de un caso clínico importado. *Rev Chil Infectol*. 2018;35(5):612-6.
98. Abadías-Granado I, Diago A, Cerro PA, Palma-Ruiz AM, Gilaberte Y. Leishmaniasis cutánea y mucocutánea. *Actas Dermo-Sifiliográficas*. 1 de julio de 2021;112(7):601-18.
99. Wortmann GW, Romero LI, Paz HM, Ortega-Barria E, Bayard V, Hochberg LP, et al. Real-time polymerase chain reaction diagnosis of leishmaniasis in Panama from both fresh and frozen tissue. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. marzo de 2004;98(3):148-51.
100. Ortega LCG. INSTITUTO NACIONAL DE SALUD.
101. 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*. junio de 2021;8(2):121-32.
102. Vásquez Trujillo A. Variación estacional de la abundancia y la infección con *leishmania* spp. en flebotomos de un área rural de Villavicencio, Meta. 2011 [citado 8 de octubre de 2024]; Disponible en: <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/8503>

103. SciELO - Brasil - Leishmaniosis cutánea en Colombia y género *Leishmaniosis* cutánea en Colombia y género [Internet]. [citado 8 de octubre de 2024]. Disponible en: <https://www.scielo.br/j/csp/a/4vKfrDPjnQC6nhK6VPR88nR/>
104. Lee HG, Duarte HGG, Araujo GKL. Leishmaniasis cutánea en la provincia del Magdalena Centro, Cundinamarca, Colombia. Una serie de casos. *Univ Medica* [Internet]. 31 de agosto de 2017 [citado 8 de octubre de 2024];58(2). Disponible en: <https://revistas.javeriana.edu.co/index.php/vnimedica/article/view/19908>
105. Henao HH, Osorio Y, Saravia NG, Gómez A, Travi B. Eficacia y toxicidad de los antimoniales pentavalentes (Glucantime® y Pentostam®) en un modelo animal de leishmaniasis cutánea americana: aplicación de la luminometría. *Biomédica*. diciembre de 2004;24(4):393-402.
106. Arévalo Y, Robledo S, Muñoz L, Granados-Falla D, Cuca LE, Delgado G. Evaluación in vitro de la actividad de aceites esenciales de plantas colombianas sobre *Leishmania braziliensis*. *Rev Colomb Cienc Quím - Farm*. junio de 2009;38(2):131-41.
107. C OB, C C, Y DT, M PM. [Molecular typing of *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* and species of the subgenus *Viannia* associated with cutaneous and mucosal leishmaniasis in Colombia: A concordance study]. *Biomed Rev Inst Nac Salud* [Internet]. 15 de marzo de 2018 [citado 10 de octubre de 2024];38(1). Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29668138/>
108. Ovalle-Bracho C, Camargo C, Díaz-Toro Y, Parra-Muñoz M. Tipificación molecular de *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* y especies del subgénero *Viannia* asociadas a la leishmaniasis cutánea y la mucosa en Colombia: un estudio de concordancia. *Biomédica*. enero de 2018;38(1):86-95.
109. Tibayrenc M, Ayala FJ. *Leishmania* and the Model of Predominant Clonal Evolution. *Microorganisms* [Internet]. noviembre de 2021 [citado 10 de octubre de 2024];9(11). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8620605/>
110. Salazar-Mejía PG, Tejeda-Aguirre CR, López-Moreno HS. Reacción de antígenos de *Leishmania* (*Leishmania*) *mexicana* con sueros de pacientes con leishmaniosis cutánea de Sinaloa, México. *Salud Pública México*. abril de 2010;52(2):165-9.
111. Cabrera OL, Munstermann LE, Cárdenas R, Gutiérrez R, Ferro C. Definición de las condiciones de temperatura y almacenamiento adecuadas en la detección de ADN de *Leishmania* por PCR en flebotominos. *Biomédica*. 2002;22(3):296-302.
112. Weigle KA, Labrada LA, Lozano C, Santrich C, Barker DC. PCR-Based Diagnosis of Acute and Chronic Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania* (*Viannia*). *J Clin Microbiol*. febrero de 2002;40(2):601-6.
113. Deborggraeve S, Laurent T, Espinosa D, Auwera GV der, Mbuchi M, Wasunna M, et al. A Simplified and Standardized Polymerase Chain Reaction Format for the Diagnosis of Leishmaniasis. *J Infect Dis*. 11 de noviembre de 2008;198(10):1565.
114. Identificación de especies de *Leishmania* mediante PCR en tiempo real acoplada a curvas de fusión de alta resolución [Internet]. [citado 10 de octubre de 2024]. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602021000300007

115. Santamaría E, Ponce N, Puerta C, Ferro C. Validación de la PCR en la detección de parásitos de Leishmania (Viannia) spp. en Lutzomyia (Diptera: Psychodidae) como herramienta en la definición de especies vectores. Biomédica. junio de 2005;25(2):271-9.
116. Manotas-Berdugo H, Toro-Maldonado J, Rodríguez-Rodríguez J, Salgado-García D, Manotas-Berdugo H, Toro-Maldonado J, et al. Brote urbano de leishmaniasis en Colombia. Rev Salud Pública. febrero de 2018;20(1):89-93.
117. Romero Peñuela MH, Sánchez Valencia JA. EVALUACIÓN DE FACTORES DE RIESGO DE LA LEISHMANIASIS VISCERAL EN SEIS MUNICIPIOS ENDÉMICOS COLOMBIANOS. Hacia Promoc Salud. diciembre de 2009;14(2):67-75.
118. Manual MSD versión para profesionales [Internet]. [citado 10 de octubre de 2024]. Leishmaniasis - Enfermedades infecciosas. Disponible en: <https://www.msdmanuals.com/es/professional/enfermedades-infecciosas/protozoos-extraintestinales/leishmaniasis>
119. Fleta Zaragoza J, Rodríguez Martínez G, Clavel Parrilla A. Leishmaniasis visceral y cutaneomucosa: aspectos epidemiológicos y clínicos. Med Integral. 1 de octubre de 2001;38(6):264-9.
120. Cuba Cuba C. Diagnóstico Parasitológico de la Leishmaniasis Tegumentaria Americana. Rev Peru Med Exp Salud Publica. 2000;17(1-4):39-52.
121. Cannova D, Brito E, Simons MI. Evaluación de técnicas de coloraciones para el diagnóstico de la Leishmaniasis cutánea. Salus. agosto de 2016;20(2):24-9.
122. Leishmaniasis [Internet]. [citado 8 de octubre de 2024]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>
123. Reyes J, Viettri M, Rivas A, Lares M, Herrera L, Aguilar CM, et al. Estandarización de la técnica de PCR para la detección de ADN de Leishmania sp. en muestras de sangre de caninos. Rev Fac Cienc Vet. julio de 2015;56(2):72-

