



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE CHIMBORAZO**

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**

**CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO E HISTOPATOLÓGICO**

Informe final de investigación previo a la obtención del título de Licenciado en Ciencias de  
la Salud en Laboratorio Clínico e Histopatológico

**TRABAJO DE TITULACIÓN**

Diagnóstico de la leishmaniasis por observación microscópica del parásito y detección del  
ADN

**Autor:** Julio Fabricio Lunavictoria Beltrán

**Tutora:** Ph.D. Luisa Carolina González Ramírez

**Riobamba – Ecuador**

**2021**

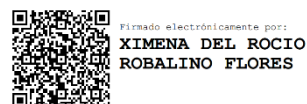
## REVISIÓN DEL TRIBUNAL

Los miembros del tribunal de graduación del proyecto de investigación de título: **“Diagnóstico de la leishmaniasis por observación microscópica del parásito y detección del ADN”**. Presentado por Julio Fabricio Lunavictoria Beltrán, dirigido por Ph.D. Luisa Carolina González Ramírez, una vez escuchada la defensa oral y realizado el informe final del proyecto de revisión bibliográfica con fines de graduación, escrito en el cual se ha constatado el cumplimiento de las observaciones realizadas, remite la presente para el uso y custodia de la biblioteca de la Facultad de Ciencias de Salud de la UNACH.

Para la constancia de lo expuesto firman:

Mgs. Ximena Robalino Flores

**Presidenta del tribunal**



Mgs. Eliana Martínez Durán

**Miembro del Tribunal**



Mgs. Iván Peñafiel Méndez

**Miembro del Tribunal**



## CERTIFICADO DEL TUTOR

Yo, Luisa Carolina González Ramírez, docente de la Carrera de Laboratorio Clínico e Histopatológico en calidad de Tutora del Proyecto de Investigación titulado: **“Diagnóstico de la leishmaniasis por observación microscópica del parásito y detección del ADN”**, propuesto por **Julio Fabricio Lunavictoria Beltrán**, egresado de la Carrera de Laboratorio Clínico e Histopatológico de la Facultad Ciencias de la Salud, luego de haber realizado las debidas correcciones, certifico que se encuentra apto para la defensa pública del proyecto.

Riobamba, 01 de junio de 2021



.....

Dra. Luisa Carolina González Ramírez

**Docente tutor de la carrera de Laboratorio Clínico e Histopatológico**

## **DERECHOS DE AUTORÍA**

Yo, Julio Fabricio Lunavictoria Beltrán soy responsable del contenido expuesto en el presente trabajo de investigación y el patrimonio intelectual pertenece a la prestigiosa Universidad Nacional de Chimborazo.



Julio Fabricio Lunavictoria Beltrán

0605898790

## **DEDICATORIA**

En honor a Dios, ser omnipotente, sabio y eterno. Señor gracias por haberme dado la oportunidad de la vida y las facultades para cumplir mis metas. Dedico y agradezco infinitamente y desde lo más profundo de mi corazón a mis abuelitos, padres y tías por su apoyo a pesar de mis tropiezos y faltas.

*"In te Domine, speravi"*

*Julia Lunavictoria*

# ÍNDICE

|  |    |
|--|----|
| CAPÍTULO I.....  | 1  |
| INTRODUCCIÓN .....   | 1  |
| Descripción de la leishmaniasis .....                      | 9  |
| Distribución geográfica de leishmaniasis.....              | 10 |
| Clasificación Taxonómica.....                              | 10 |
| Características del parásito.....                          | 11 |
| Vectores.....  | 12 |
| Ciclo de Vida.....   | 13 |
| Tipos de leishmaniasis .....                               | 13 |
| Diagnóstico de leishmaniasis en el laboratorio .....       | 15 |
| Tipos de muestra para el diagnóstico de leishmaniasis..... | 15 |
| Métodos de diagnósticos parasitológicos .....              | 15 |
| Métodos de diagnóstico molecular.....                      | 16 |
| CAPÍTULO II.....   | 18 |
| METODOLOGÍA.....   | 18 |
| Tipo de investigación .....                                | 18 |
| Población.....   | 18 |
| Muestra.....   | 19 |
| Estrategias de Búsqueda.....                               | 19 |
| Variables de estudio .....                                 | 20 |
| Técnicas.....  | 20 |
| Procedimientos .....                                       | 20 |
| Procesamiento estadístico .....                            | 22 |
| Consideraciones éticas .....                               | 22 |
| CAPÍTULO III .....   | 23 |
| DESARROLLO .....   | 23 |
| CONCLUSIONES.....  | 32 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....                           | 33 |
| ANEXOS .....   | 42 |

## ÍNDICE DE TABLAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabla 1.</b> Valoración de 3 técnicas de coloración para el diagnóstico de LC mediante la identificación de distintas estructuras de <i>Leishmania</i> .....                             | 24 |
| <b>Tabla 2.</b> Grado de sensibilidad de diferentes tipos de PCR mediante el empleo de diferentes muestras en el diagnóstico de leishmaniasis.....  | 27 |
| <b>Tabla 3.</b> Distribución geográfica de <i>Leishmania</i> en los países más afectados de las Américas y a nivel local (Ecuador), la forma clínica y la respectiva especie causante. .... | 29 |

## ÍNDICE DE ANEXOS

|  |    |
|--|----|
| <b>Anexo 1.</b> <i>Leishmania</i> spp., en forma de promastigotes teñidos con Giemsa.....  | 42 |
| <b>Anexo 2.</b> A) <i>Leishmania</i> spp., en forma de amastigote extracelulares teñidos con Giemsa; B) Macrófago infectado con <i>Leishmania</i> spp., en forma de amastigotes y teñidos con Giemsa. ....   | 42 |
| <b>Anexo 3.</b> Gel de agarosa de electroforesis del análisis por PCR-RFLP de fragmentos del gen <i>mpi</i> de 6 especies de <i>Leishmania</i> : 1. <i>L. guyanensis</i> , 2. <i>L. panamensis</i> , 3. <i>L. braziliensis</i> , 4. <i>L. naiffi</i> , 5. <i>L. major</i> y 6. <i>L. mexicana</i> . .... | 43 |
| <b>Anexo 4.</b> Gel de PCR hsp70. M representa el marcador de peso molecular de 50 pb, 1-4 muestras clínicas positivas, 5 y 6 el control negativo y positivo respectivamente, y finalmente B representa un blanco. ....  | 43 |

## RESUMEN

El siguiente trabajo de investigación tuvo el objetivo de recopilar información sobre el parásito flagelado del género *Leishmania* mediante la búsqueda y revisión de literatura de fuentes primarias y secundarias que sirva para realizar el diagnóstico de la leishmaniasis por observación microscópica del parásito y detección del ADN. La metodología empleada en este trabajo fue de enfoque cualitativo, documental, transversal y retrospectivo con una muestra empleada de 58 fuentes bibliográficas útiles y relacionadas estrechamente con el objeto de estudio; se recopiló información de sitios web (OMS/OPS), reportes epidemiológicos, libros y manuales digitales, y artículos de bases de datos como Scopus, ProQuest, Scielo, Redalyc, Lilacs y Medigraphic, publicados en los últimos 10 años para cumplir el criterio de actualidad y responder al problema de estudio. Para recolectar los datos se aplicó una estrategia de búsqueda avanzada en las mismas bases y buscadores web, se seleccionó palabras claves, y se filtró la información con los últimos 10 años, idioma español e inglés, y en las disciplinas medicina y salud. Los resultados obtenidos fueron que, para el diagnóstico de la leishmaniasis en el laboratorio el frotis tradicional teñido con Giemsa o Wright sigue siendo la técnica de estándar de oro, a pesar de presentar una sensibilidad baja y variable, por otro lado, el diagnóstico molecular por PCR es altamente sensible y específico para el diagnóstico porque permite identificar y diferenciar de forma concreta la especie causal de leishmaniasis al detectar marcadores moleculares o dianas genéticas específicas en su genoma.

**Palabras clave:** leishmaniasis, diagnóstico de laboratorio, microscopía, ADN, PCR



## **ABSTRACT**

The following research work had the objective of collecting information on the flagellated parasite of the genus *Leishmania* by searching and reviewing the literature from primary and secondary sources that can be used to diagnose leishmaniasis by microscopic observation of the parasite and DNA detection. The methodology used in this work was qualitative, documentary, cross-sectional and retrospective, with a sample of 58 useful bibliographic sources closely related to the object of study; Information collected from websites (WHO / PAHO), epidemiological reports, digital books and manuals, and articles from databases such as Scopus, ProQuest, Scielo, Redalyc, Lilacs and Medigraphic, published in the last 10 years to meet the criteria of present and respond to the study problem. To collect the data, an advanced search strategy applied in the same databases and web search engines, keywords selected, and the information filtered with the last 10 years, Spanish and English language, and in the medical and health disciplines. The results obtained were that, for the diagnosis of leishmaniasis in the laboratory, the traditional smear stained with Giemsa or Wright continues to be the gold standard technique, despite presenting a low and variable sensitivity, on the other hand, molecular diagnosis by PCR is highly sensitive and specific for diagnosis because it allowed the specific identification and differentiation of the causative species of leishmaniasis by detecting molecular markers or specific genetic targets in its genome.

**Keywords:** leishmaniasis, laboratory diagnosis, microscopy, DNA, PCR

Reviewed by:

Mgs. Maritza Chávez Aguagallo

**ENGLISH PROFESSOR**

c.c. 0602232324

# CAPÍTULO I

## INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis o leishmaniosis es una infección parasitaria producida por la picadura de un vector infectado con un protozoo flagelado del género *Leishmania* spp. Este protozoo es transmitido por la regurgitación de un tapón de promastigotes que obstruyen el esófago de las hembras hematófagas de un insecto del género *Lutzomyia* y *Phlebotomus* en el Nuevo y Viejo Mundo, respectivamente <sup>1</sup>. Estos insectos son pequeños dípteros que abundan en las zonas tropicales y subtropicales alrededor de todo el mundo, son también llamados comúnmente como moscas de arena.

La leishmaniasis cuenta con más de 20 especies de *Leishmania* spp., que infectan a los humanos y cada una produce diferentes afecciones clínicas. Dependiendo de la especie infectante y las manifestaciones clínicas se pueden distinguir tres patrones principales de la enfermedad para su clasificación. Estos patrones en que se pueden presentar la leishmaniasis son: leishmaniasis visceral (LV), leishmaniasis mucocutánea (LMC) y leishmaniasis cutánea (LC) <sup>1,2</sup>.

Para que la infección se produzca, el insecto transmisor debe ingerir células del hospedador infectadas con amastigotes, durante el ciclo biológico el parásito se transforma en el estadio morfológico infectante de *Leishmania* que es el promastigote metacíclico. Estos promastigotes infectantes son rápidamente fagocitados por células del sistema reticuloendotelial y se transforman en amastigotes intracelulares, para multiplicarse y llenar los citoplasmas de las células, estas se rompen y quedan en libertad los parásitos que son fagocitados nuevamente repitiendo el ciclo hasta producir las manifestaciones clínicas de la enfermedad <sup>3</sup>.

La enfermedad comienza cuando los promastigotes de *Leishmania* spp., son depositados por el insecto vector a 0,1 milímetro de la piel, cuando el parásito hace contacto con la piel, rápidamente se activa el sistema fagocítico mononuclear formado por los macrófagos, células dendríticas y monocitos, que se encargan de fagocitar los promastigotes infectantes al ser reconocidos sus receptores específicos. Debido a la estructura y composición química de la membrana del parásito, este evade su destrucción de la vacuola fagocítica, en el

citoplasma de las células y por el contrario empieza su multiplicación por fisión binaria hasta estallar la célula.

Como antecedente histórico de leishmaniasis se han hallado descripciones de lesiones leishmánicas en lápidas del siglo VII a.C., (antes de Cristo). También existen documentos de médicos orientales y árabes como Avicena que hacen referencia a lesiones ulcerosas debidas a la infección por *Leishmania* <sup>1</sup>. De acuerdo con la Organización Panamericana de la Salud (OPS) a nivel mundial existe más de 12 millones de personas infectadas. La leishmaniasis es una de las 10 enfermedades tropicales con mayor índice de desatención sanitaria y con aproximadamente alrededor de 0,9-1,6 millones de casos al año <sup>4</sup>.

La leishmaniasis tiene considerable cifra de defunciones de entre un número aproximado de 20 000 a 30 000 muertes por año <sup>4</sup>. Los países con más casos de leishmaniasis visceral son: Somalia, India, Etiopía, Brasil y Sudan; es mortal en más del 95% de las infecciones y gran parte de los casos son registrados en India, Brasil y África oriental. Mientras que, de leishmaniasis cutánea es prevalente en Perú, Nicaragua, Colombia y Brasil, se registra aproximadamente el 95% de los casos en América, Asia Central, la cuenca del Mediterráneo y Oriente medio. La leishmaniasis mucocutánea se produce en más del 90% de los casos en Perú, Bolivia, Brasil y Etiopía <sup>5</sup>.

En el continente americano se registra aproximadamente una media de 55 000 infecciones de leishmaniasis cutánea y mucosa, y 3 500 casos de leishmaniasis visceral al año. En la región de Asia Sudoriental las formas endémicas de la enfermedad son tanto la leishmaniasis visceral como cutánea, donde la principal forma es la visceral. En el continente Africano, Argelia tiene las tres formas existentes como endémicas y muy endémicas en la región oriental de África <sup>5</sup>. La región del Mediterráneo Oriental se presenta 70% de casos de todo el mundo de leishmaniasis cutánea; por otro lado, en el continente europeo las leishmaniasis cutánea y visceral son endémicas.

En América, principalmente en Sudamérica y parte de centro América, la leishmaniasis es considerada como endémica en las zonas tropicales y subtropicales. En otros lugares no endémicos también se pueden presentar casos, esto se da por diversos factores como los ecológicos (deforestación), climáticos, socioeconómicos y migratorios. Como Kaylin et al.,<sup>6</sup> mencionan, Estados Unidos no es endémico de leishmaniasis pero por las relaciones

militares y viajeros, pueden ser diagnosticada. En la población militar es muy común, como las tropas que recientemente fueron agrupadas en oriente medio y África, especialmente en Iraq y Afganistán donde la leishmaniasis es endémica.

Moo Llanes <sup>7</sup> en su artículo establece el nicho ecológico de leishmaniasis de la región Neotropical conformada de 21 países latinoamericanos con una población estimada: 960 millones de pobladores. En México, se ha observado todas las formas clínicas que se presentan la leishmaniasis, su incidencia en fue 6 por cada 100 000 habitantes en el 2015. Sosa y colaboradores reportaron que durante el periodo 2005-2011 hubo un índice de 41% de mortalidad en Chiapas y un 16% en Tabasco <sup>8</sup>.

En Costa Rica el 95% de los casos reportados es a causa de *Leishmania (Viannia) panamensis* mientras que el 5% restante por *L. (Viannia) braziliensis*. El promedio de la incidencia de LC en el trienio 2014-2016 fue de 30,5 casos por 100 000 habitantes, disminuyendo del trienio anterior. En el trienio contemplado entre 2005-2007, la incidencia fue mayor con 35,5 casos por 100 000 habitantes según el estudio de Jaramillo et al. <sup>9</sup>. Con respecto al principal vector de leishmaniasis cutánea en Costa Rica se describe a *Lutzomyia ylephiletor*, que es conocido por los campesinos comúnmente como aliblanco.

Costa Rica por la alta incidencia de leishmaniasis presente se ubica en el quinto lugar más afectado de América Latina. Entre los principales reservorios de las zonas endémicas del país se encuentran los perezosos del género *Bradypus* y *Choloepus*, se incluye también el *Heteromys desmarestianus*, siendo este último un roedor. Los más afectados son los menores de 20 años, en el 2009 se reportó una tasa de más de 1 000 casos por cada 100 000 habitantes y alrededor de 1 721 casos en el 2012 <sup>10</sup>.

En Venezuela, en el estado de Mérida, se han reportado casos de leishmaniasis con una gran diversidad de especies en los vectores transmisores de *Leishmania*. Nieves et al., <sup>11</sup> en su estudio menciona que las principales especies de vectores en viviendas de las zonas urbanas de Mérida son: *Lutzomyia spinicrassa*, *Lu. venezuelensis*, *Lu. lichyi*, *Lu. atroclavata*, *Lu. youngi*, *Lu. migonei*, *Lu. walkeri* y *Lu. ovallesi*. El 62,5% de estos vectores tienen costumbres de antropohematofagia y debido a los cambios climáticos y deforestación, su capacidad de adaptación aumentó para extenderse a nuevas áreas epidemiológicas.

En Colombia, reportes epidemiológicos de la OPS <sup>12</sup> notifican que es el segundo país con más casos de LC (5 829) y LMC (78) con 5 907 casos en el 2019. En el estudio de Manotas et al., <sup>13</sup> presenta que los brotes de LV se dan especialmente en niños y que el vector principal es *Lutzomyia gomezi*. Se reporta que la distribución geográfica en orden de frecuencia fueron: *L. panamensis*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. infantum*, *L. amazonensis*, *L. mexicana*, *L. colombiense*, *L. lainsoni* y *L. equatorensis*, las 3 últimas son de similar frecuencia <sup>14</sup>. Otros estudios reportan que la principal especie de vector causante de LC en Boyacá, Colombia fueron: *Nyssomyia yuilli* y *N. trapidoi* <sup>15</sup>.

Brasil es el país sudamericano con mayor número de casos LC y LMC, con 15 484 casos en total, con 14 659 LC y 825 LMC <sup>12</sup>. Además, Brasil también se incluye en el país con mayor número de casos de LV, representando el 97% de todos los casos reportados en las Américas. En Brasil han sido reportados casos de LC en todos los estados y casos de LV en alrededor de 21 estados, con aproximadamente 1 600 ciudades que presentan la transmisión de forma endémica. Anversa et al., <sup>16</sup> también menciona que los datos de mortalidad por leishmaniasis son escasos, pero asumiendo el rango normal (es decir un 10%) se estima que la tasa de mortalidad es de 20 000- 40 000 decesos por año.

Perú, Nicaragua y Bolivia le siguen a Colombia con 5 349, 3 321 y 2 052 casos respectivamente de LC y LMC en el año 2019. Entre el período del 2001 al 2019 se han notificado a la OPS alrededor de 1 028 084 casos de LC y LMC en América. Por otro lado, en el mismo periodo fueron registrado 65 934 nuevos casos de LV a la OPS con un promedio de 3 470 casos anuales <sup>12</sup>. Actualmente, Perú cuenta con una tasa de incidencia de leishmaniasis de 13,4 por cada 100 000 habitantes por año, el mayor porcentaje de reportes (>60%) pertenece a los departamentos de Huánuco, Cuzco, Madre de Dios, Cajamarca, Junín, Amazonas y San Martín; se presenta dos formas de leishmaniasis: LC y LMC <sup>17</sup>.

La OPS reporta 2 052 nuevos casos de leishmaniasis en Bolivia en el año 2019, de los cuales el 85,8% (1 760 casos) son de LC y 14,2% (292 casos) son de LMC. La incidencia es de 33,7 / 100 000 habitantes, y presentando también un alto nivel de transmisión. Según la revisión realizada por Mollinedo et al., <sup>18</sup> determina que a lo largo de 30 años (entre 1983-2015) la mayoría de los casos reportados de leishmaniasis provenían en un 97,9% de la cuenca del Río Amazonas y el resto del Río de la Plata. Las regiones de Bolivia tanto

tropicales como subtropicales son endémicas de leishmaniasis con presencia de LC y LMC, además de algún caso de LV de manera casual <sup>19</sup>.

La OPS reporta en Argentina en su informe epidemiológico que en el año 2019 hubo 241 nuevos casos de leishmaniasis, de los cuales 220 fueron de LC (91,3%), 20 LMC (8,3%) y un caso sin especificar (0,4%). La incidencia de la leishmaniasis es de 5,21 por cada 100 000 habitantes en las zonas endémicas de Argentina, con predominio de *L. braziliensis*. En un estudio realizado por Díaz et al., <sup>20</sup> en la provincia de Misiones en Argentina, identificaron que la principal especie causante de LV fue *Leishmania infantum*.

En Ecuador hay variedad de enfermedades producidas por diferentes vectores y agentes patógenos como el dengue, chikungunya, zika, fiebre amarilla, malaria, leishmaniasis y enfermedad de Chagas. El SIVE registra los nuevos casos para llevar el conteo epidemiológico en las regiones endémicas del país. El período del 2015-2020 fueron reportados 7 801 casos de leishmaniasis, 1 382 en 2015, 1 397 en 2016, 1 654 en 2017, 1 336 en 2018, 1 108 en 2019 y 924 en 2020. La leishmaniasis es considerada una enfermedad tropical endémica en Ecuador en la mayor parte del país, afectando principalmente en la región oriental y litoral.

De forma local, la OPS registra una incidencia de leishmaniasis de 8,2 por cada 100 000 habitantes, con 1 104 casos (1 084 LC y 20 LMC). Estudios realizados por Freire et al., <sup>21</sup> sobre la prevalencia de LC en Napo-Ecuador, mostraron una prevalencia de 81,8% en el periodo 2012-2013. La alta prevalencia según la investigación se da por los siguientes factores: falta de servicios básicos, residencia en zonas rurales y por la falta de información sobre la transmisión y prevención de la enfermedad. La OMS señala que en al 2013 la provincia de Carchi tenía una tasa del 1,1 por cada 100 000 habitantes según el Ministerio de Salud; el principal vector del cantón Mira, en Carchi, cerca de la comunidad indígena AWA fue *Lutzomyia trapidoi* <sup>22</sup>.

Según el reporte del Subsistema de Vigilancia SIVE- Alerta de Enfermedades por Vectores Ecuador <sup>23</sup>, durante el año 2019 se reportaron 1 108 casos de leishmaniasis. En el año 2020 los casos de leishmaniasis reportados fueron 924 (894 LC, 30 LC), y hasta febrero del 2021 del informe SIVE se han notificado 140 nuevos casos, 134 LC y 6 LMC. Las provincias que

con el mayor número de casos son: Manabí (47 casos), Esmeraldas (26 casos) y Pichincha (19 casos).

Hasta el último informe del SIVE (semana 9) por parte del Ministerio de Salud Pública del Ecuador actualizado el 3 de marzo del 2021 que se usó para esta investigación; 144 nuevos casos aumentaron dando un total de 284 en el año 2021, de los cuales 278 son de LC y 6 de LMC. Las provincias afectadas por LMC son Morona Santiago con 3 casos y Pastaza, Zamora Chinchipe y Orellana con 1 caso respectivamente <sup>24</sup>. En este país las infecciones parasitarias por *Leishmania* spp., se limita únicamente a la presentación clínica cutánea y mucocutánea <sup>25</sup>.

La principal contribución de la investigación es que aporta información científica para conocer sobre diagnóstico de leishmaniasis. La recopilación de este conocimiento servirá de guía para el diagnóstico de la enfermedad. Debido a la existencia de una gran diversidad de especies de *Leishmania* spp., los métodos moleculares son importantes porque intervienen en el auxilio de identificar la especie específica causante de leishmaniasis, y así, el médico pueda dar el tratamiento adecuado porque hay algunas especies resistentes a los fármacos convencionales.

Los principales beneficiarios será el personal sanitario, en especial el personal de laboratorio que trabaje en zonas endémicas de leishmaniasis alrededor del mundo, puesto que la información presentada tiene gran utilidad. Además, servirá como aporte informativo a la comunidad para que tomen medidas el control y prevención de la enfermedad, tanto en vectores como en reservorios. Al ser una de las enfermedades tropicales más desatendidas a nivel mundial, con un alto índice de prevalencia en el continente americano y tasas muy altas de mortalidad, el estudio es viable para dar una mayor información al personal de salud y población en general.

Con este estudio de carácter bibliográfico, se podrá brindar información de cómo se realiza el diagnóstico de leishmaniasis por medio del laboratorio, también servirá para dar a conocer este problema de salubridad desatendido que ignora gran parte de la población del Nuevo y Viejo Mundo. Incluso, al ser un problema de salubridad aún no controlado, el estudio podrá motivar a nuevos miembros de la comunidad científica a que se unan, investiguen y aporten

con nuevas soluciones que ayuden a erradicar este problema que tiene altos índices de mortalidad, principalmente en personas que no son diagnosticadas y tratadas a tiempo.

Al recopilar la información de *Leishmania* spp., revisarla, interpretarla y construir el marco teórico, se amplía en gran medida los diferentes conceptos y métodos de diagnóstico. Esto ayuda a esclarecer de una manera centrada como es el diagnóstico de la leishmaniasis por medio de las técnicas parasitológicas y moleculares existentes en la actualidad, y con ello dar respuesta al problema de investigación planteado.

La leishmaniasis es un problema de salud pública mundial, que afecta a millones de personas y animales año tras año causando miles de muertes. La leishmaniasis es una de las enfermedades más desatendidas con una incidencia de 1,3 millones de casos nuevos en el año <sup>2</sup>. Su distribución geográfica es muy amplia, con aproximadamente 12 millones de personas infectadas y 350 000 millones de personas con riesgo de infectarse <sup>5</sup>.

Factores climáticos, socioeconómicos, ambientales, migratorios y ecológicos han conllevado a su gran distribución geográfica que hay en la actualidad. Las regiones más afectadas son aquellas de bajos recursos sin una vivienda adecuada que carecen de servicios básicos. Las poblaciones de riesgo son las personas inmunosuprimidas, de edad pediátrica y poblaciones que presenten malnutrición, debido a que su sistema inmunitario no es competente. En estas personas, las manifestaciones clínicas se van a producir de manera severa y el tratamiento será menos eficaz.

La leishmaniasis es endémica en las regiones tropicales y subtropicales del mundo, siendo la LC la forma más común de presentarse. En el sur de Europa y en África, la leishmaniasis se ha convertido en una enfermedad oportunista en pacientes inmunosuprimidos. Se reporta que alrededor del mundo se producen aproximadamente entre 50 mil y 90 mil nuevos casos de LV. América tiene alta prevalencia de LC, se ha calculado nuevos casos de entre 600 mil a 1 millón por año. La LMC resulta ser desfigurante porque cursa con destrucción e invasión de los tejidos, el 90% de los casos son: Brasil, Etiopía, Perú y Bolivia.

Cada forma de leishmaniasis (LC, LMC, LV) van a presentar diferentes signos y síntomas, esto también dependerá del estado inmune y genético del paciente, genotipo del parásito, y tamaño y zona del inóculo. La leishmaniasis cutánea puede manifestarse como difusa (LCD)



o localizada (LCL), presenta en ambos casos distintas manifestaciones. La leishmaniasis cutánea localizada se caracteriza por producir lesiones ulcerosas indoloras únicas o múltiples en zonas específicas de la piel. La leishmaniasis cutánea difusa produce nodulaciones alrededor de toda la piel, esto debido a la diseminación en linfa, sangre y líquido tisular.

La LMC se manifiesta de manera crónica con lesiones destructivas afectando principalmente a la mucosa nasal, faríngea y laríngea, incluso puede extenderse a labios y nariz. La LV presenta fiebre intermitente, hepatoesplenomegalia, anemia, pérdida de peso y linfonódulos, si no es tratada a tiempo tiene alta tasa de mortalidad <sup>26</sup>. Después de la recuperación de LV, es posible ver casos de LC cursada por nódulos cutáneos que tienen gran cantidad de macrófagos infectados.

La leishmaniasis cuenta con más de 20 especies infectantes al hombre, de las cuales 15 han sido identificadas en América como autoras de la infección. También se ha identificado alrededor de 54 especies distintas de vectores involucradas en la transmisión. Debido a la gran variedad de especies de *Leishmania*, reservorios y vectores, esta enfermedad resulta de difícil control epidemiológico en el mundo. Además de tener altos índices de morbimortalidad, la leishmaniasis puede ser una enfermedad ignorada por la población general y por el personal de salud, lo que conlleva a un retraso en su diagnóstico <sup>9</sup> y por consiguiente a su tratamiento.

El diagnóstico de la leishmaniasis tiene una importancia para la salud del paciente, debido a que cuadros clínicos de LV y LMC resultan mortales si no se realiza tratamiento. La leishmaniasis tanto en el ámbito local como mundial sigue siendo un gran problema de salud, y es catastrófico en pacientes no tratados. La leishmaniasis es considerada como una de las enfermedades tropicales más desatendidas a nivel mundial y conocer los métodos y técnicas aplicables en el laboratorio de diagnóstico clínico resulta esencial tanto para el diagnóstico, tratamiento y seguimiento del paciente.

Por lo mencionado anteriormente, este trabajo aporta con información clave para el diagnóstico de la leishmaniasis por medio del análisis molecular y parasitológico en el laboratorio, y con ello se planteó el siguiente problema de investigación: ¿Cómo se realiza el diagnóstico de leishmaniasis por observación microscópica del parásito y detección del ADN?

## **OBJETIVOS**

### **General:**

Recopilar información del parásito flagelado del género *Leishmania* mediante la búsqueda y revisión de literatura de fuentes primarias y secundarias que sirva para realizar el diagnóstico de la leishmaniasis por observación microscópica del parásito y detección del ADN.

### **Específicos:**

- Evaluar los métodos parasitológicos y moleculares mediante el análisis de información seleccionada que sirva para el diagnóstico de leishmaniasis.
- Especificar las distintas especies y subespecies de *Leishmania* según los estudios publicados para su caracterización clínica.
- Deducir las diferentes técnicas parasitológicas y moleculares existentes en base a la información recolectada para el diagnóstico de *Leishmania spp.*, en el laboratorio.

### **Descripción de la leishmaniasis**

La leishmaniasis se denomina al grupo de afecciones clínicas antroponóticas producidas por la infección del protozoo flagelado del género *Leishmania spp.*, transmitida principalmente por la picadura del flebótomo hembra parasitada. La transmisión de leishmaniasis también se puede dar de manera congénita, por transfusiones sanguíneas o por el uso compartido de agujas. El vector es el mosquito del género *Phlebotomus* en el Viejo Mundo y *Lutzomyia* en el Nuevo mundo, son organismos endémicos de regiones tropicales y subtropicales.

Las formas de presentación clínica de la leishmaniasis en los humanos generalmente son diferenciadas en tres: leishmaniasis cutánea (llamada también botón de Bagdad, úlcera húmeda o seca, uta, úlcera de Oriente o úlcera de chicleros), leishmaniasis mucocutánea (o espundia) y la leishmaniasis visceral (llamada en hindi Kala azar). *Leishmania* tiene diferentes cepas que se diferencian por diferentes aspectos como: la virulencia, el tropismo a tejidos, características biológicas y epidemiológicas, y criterios serológicos y bioquímicos.

### **Distribución geográfica de leishmaniasis**

Actualmente la leishmaniasis está presente de forma endémica en 88 países alrededor de los 5 continentes del mundo, en países del sur de Asia, Sur de Europa, Medio Oriente, África y el sur y centro de América. India, África, Asia de Europa y Sudamérica; en conjunto tienen una prevalencia mundial de 12 millones de habitantes infectados y alrededor de 350 millones de personas en riesgo <sup>27</sup>.

Para Organización Mundial de Salud (OMS) de leishmaniasis representa una de las 13 enfermedades tropicales más olvidadas del mundo, está presente en todos los continentes a excepción de Oceanía. La leishmaniasis está presente especialmente en regiones selváticas con altitudes de 0-1 500 msnm (metros sobre el nivel del mar), a una temperatura media de más de 20° C, es más frecuente en épocas de lluvia <sup>28</sup>.

Alrededor del mundo, más del 90% de los casos de LV ocurren en seis países principales, estos son Bangladesh, India, Etiopía, Sudán, el sur de Sudán y Brasil. Alrededor de un tercio de casos de LC se da en América, el occidente de Asia y la cuenca del Mediterráneo, principalmente en países como Argelia, Afganistán, Irán, Siria, Etiopía, la región norte de Sudán, Costa Rica, Colombia, Perú y Brasil <sup>1,16</sup>. Los casos reportados de LC en un 75% son principalmente en: Siria, Argelia, Afganistán, Irán, Norte de Sudán, Costa Rica, Colombia, Perú y Brasil <sup>29</sup>.

La OMS calcula que los nuevos casos de LV son entre 50 000 a 90 000, solo entre el 25% y el 45% son notificados a la OMS. En el año 2018 la mayoría de los casos (95%) fueron registrados en Iraq, China, Kenia, Sudán y Sudán del sur, Brasil, Somalia, Etiopía, Nepal e India. La distribución de casos de LC se registraron el mayor porcentaje (95%) en el continente americano, Oriente Medio, la cuenca del Mediterráneo y Asia Central.

### **Clasificación Taxonómica**

Los protozoarios del género *Leishmania* incluyen un gran grupo de subespecies y especies que infectan tanto a personas y animales mamíferos. Los criterios de clasificación de este protozoo flagelado se realizan en base a aspectos morfológicos, bioquímicos, genéticos-moleculares e inmunológicos. Esta clasificación también puede darse por la distribución geográfica, manifestaciones clínicas y el desarrollo del parásito en el díptero vector.

| Taxonomía del género <i>Leishmania</i> |   |                   |                 |                      |  |   |   |
|--|---|-------------------|-----------------|----------------------|--|---|---|
| Subreino                               | Protozoario   |                   |                 |                      |  |   |   |
| Orden                                  | Kinetoplastea   |                   |                 |                      |  |   |   |
| Familia                                | Trypanosomatidae  |                   |                 |                      |  |   |   |
| Género                                 | <i>Leishmania</i>   |                   |                 |                      |  |   |   |
| Subgénero                              | <i>Leishmania</i>   |                   |                 |                      |  | <i>Viannia</i>  |   |
| Complejo                               | <i>L. donovani</i>  | <i>L. tropica</i> | <i>L. major</i> | <i>L. aethiopica</i> | <i>L. mexicana</i>   | <i>L. guyanensis</i>  | <i>L. braziliensis</i>                        |
| Especies                               | <i>L. donovani</i><br><i>L. chagasi</i><br><i>L. infantum</i> |                   |                 |                      | <i>L. mexicana</i><br><i>L. amazonensis</i><br><i>L. venezuelensis</i><br><i>L. garnhami</i><br><i>L. aristidesi</i><br><i>L. enrietti</i> | <i>L. guyanensis</i><br><i>L. panamensis</i><br><i>L. shawi</i> | <i>L. braziliensis</i><br><i>L. peruviana</i> |
| Forma Clínica                          | LV  | LC                | LC              | LCD                  | LCL<br>LCD   | LMC   | LCL   |

**Cuadro 1.** Clasificación taxonómica del género *Leishmania* y la forma clínica que presenta cada complejo.

*Leishmania* se integra en la orden Kinetoplastea, suborden Trypanosomatina y a la familia Trypanosomatidae, esta se divide en tres subgéneros: *Leishmania*, *Viannia* y *Saurollesishmania*. El subgénero *Leishmania* y *Viannia* son clasificados de acuerdo al desarrollo del parásito en el vector. Las especies del subgénero *Leishmania* se desarrolla en la porción suprapilórica (ubicada contigua a la probóscide) mientras que las del subgénero *Viannia* lo hacen en el intestino medio y posterior del píloro (desarrollo peripilórico) <sup>1,27</sup>. Molina, López y Sánchez <sup>27</sup> en su libro clasifican las subespecies, complejos y especies de la forma como se presenta en el cuadro 1.

### Características del parásito

*Leishmania* spp., es un protozoo flagelado unicelular, este es un parásito intracelular obligatorio que infecta células del sistema fagocítico mononuclear (como macrófagos, monocitos, etc.). Su kinetoplasto de ADN mitocondrial (ADNm) contiene  $10^7$  pares de bases, lo que representa hasta un 20% de material genómico de *Leishmania* <sup>1</sup>. En el subgénero *Leishmania* el parásito solo se desarrolla en la porción suprapilórica del intestino, mientras que *Viannia* en el intestino medio y posterior.

El ciclo de vida de *Leishmania* presenta 2 fases: el promastigote que se encuentra en el vector y el amastigote en el hospedero vertebrado. El promastigote es extracelular y contiene un flagelo anteronuclear, esta es la fase móvil de *Leishmania* spp., que se desarrolla en el tracto

digestivo del vector con un tamaño de 6-20 micrómetros y presenta un kinetoplasto anterior. Los promastigotes al ser inoculados por regurgitación del invertebrado son fagocitados por el sistema fagocítico mononuclear y cambian a fase amastigote. El amastigote es la fase inmóvil (sin flagelo) e intracelular obligada de *Leishmania* spp., es redondo u ovoide y tiene un tamaño de 2 a 6 micrómetros de diámetro <sup>27</sup>.

La estructura de *Leishmania* spp., está compuesta por diversas moléculas, las más abundantes de la superficie del parásito son una glucoproteína de 63 kDa (gp63) y el lipofosfoglucono (LPG). La gp63 tiene actividad metaloproteasa (es decir, genera proteólisis); mientras que el LPG es un glucofosfolípido que se encuentra fijado a la membrana por medio del glucosilfosfatidil-inositol (GPI) modificado <sup>1</sup>, este está compuesto por de una extensa cadena de dominios repetitivos de fosfosacáridos. Estas partes por las que está compuesta el parásito servirán para la aplicación de ciertas pruebas diagnósticas en el laboratorio clínico, como son las inmunológicas y moleculares.

Las moléculas gp63 y LPG sobresalen de la membrana de *Leishmania* spp., y participan en la adaptación del parásito en el ciclo de vida tanto del vector como del hospedero. La diversidad de especies de *Leishmania* spp., se distingue por las diferencias que presenta en el lipofosfoglucono, concretamente en las cadenas laterales que se ramifican desde la columna central de los fosfosacáridos. Las especies de *Leishmania* que predominan en el continente americano son las pertenecientes al complejo *L. braziliensis* y *L. mexicana* que producen LC y *L. donovani chagasi* que produce la LV <sup>1,2,28</sup>.

## **Vectores**

Los flebotomíneos son pequeños mosquitos que generalmente miden hasta 3 mm de longitud cuando son adultos y presentan pilosidad densa con alas ovales o lanceoladas. El cuerpo y las alas presentan un aspecto hirsuto, el tórax es giboso y tiene un flagelo articulado en las antenas <sup>30</sup>. Los vectores adultos generalmente tienen actividad nocturna o vespertina y las hembras para completar su fase ovárica necesita de sangre. Se han descrito aproximadamente 1 000 especies de la subfamilia Phlebotominae hasta el año 2017; en América se reconocen 536 especies, la principal de riesgo sanitario en América es *Lutzomyia*.

Los flebotomíneos taxonómicamente pertenecen al orden: Diptera, suborden: Nematocera, y familia: Psychodidae, viven en hábitats selváticos, rurales y peridomésticos. Estos vectores

son de gran importancia en la salud por su papel de vectores de parásitos (género *Leishmania*) y bacterias (género *Bartonella*)<sup>31</sup>. La presencia de estos flebotomíneos ha sido demostrada hasta los 3 500 msnm; aunque la incursión del hombre a los nichos ecológicos de *Lutzomyia* ha llevado a que algunas especies se adapten a lugares no endémicos y que se expanda la leishmaniasis.

### **Ciclo de Vida**

El ciclo de vida inicia cuando la hembra (hematófaga) sin infección pica a un vertebrado parasitado, aquí obtiene los amastigotes de *Leishmania* spp., al ingerir células infectadas o amastigotes libres. En el intestino del vector los amastigotes se transforman en promastigotes procíclicos, estos se adhieren al intestino del vector mediante el LPG. Posteriormente, el promastigote procíclico se transforma en promastigotes metacíclicos, se vuelven extracelulares e inicia el desarrollo y división binaria en el tubo digestivo del vector. Se procede a la metacicloogénesis, proceso que modifica la cubierta del parásito para sobrevivir en el insecto y además permite el desprendimiento intestinal para su migración<sup>1,27,30,32</sup>.

Los promastigotes metacíclicos migran al esófago del vector, y están listos para ser regurgitados, al chocar con la sangre que el vector ingiere del nuevo hospedador con la picadura del mosquito. El ciclo de *Leishmania* spp., en el vector dura entre 4 a 25 días, en cada picadura el vector inocula entre 10-1 000 promastigotes metacíclicos<sup>32</sup>.

Los promastigotes infectantes (metacíclicos) son fagocitados por células del sistema fagocítico mononuclear, células de Langerhans, y monocitos circulantes. Una vez dentro del fagolisosoma del macrófago, los promastigotes metacíclicos se diferencian nuevamente a amastigotes y se dividen por fisión binaria tantas veces que llevan al rompimiento celular. Estos amastigotes liberados invaden otras células fagocíticas circundantes, las infectan y el ciclo de división intracelular y rompimiento de la célula se repite. Finalmente, el ciclo cierra cuando un nuevo mosquito libre de infección pica al hospedero vertebrado infectado y el ciclo de *Leishmania* spp., nuevamente comienza desde un inicio.

### **Tipos de leishmaniasis**

**-Leishmaniasis Cutánea:** Se presenta en la piel como ulceraciones cutáneas que pueden ser únicas o múltiples, son indoloras con bordes elevados localizados principalmente en la piel expuesta<sup>33</sup>. La úlcera pueden o no presentar exudado y se cicatriza espontáneamente en

meses, semanas o persistir a más de un año, dependiendo de la infección secundaria con bacterias <sup>1,34</sup>.

La LCL y LCD son inmunológicamente opuestas, la primera se distingue por la presencia de úlceras únicas que aparecen entre 15-20 días después de la picadura; la segunda se caracteriza por una falta de reacción inmunológica (anérgica) hacia los antígenos del parásito lo que permite la diseminación a vía linfática, hematógena o hacia líquido tisular para posteriormente desarrollar lesiones en toda la piel <sup>27,35</sup>. La leishmaniasis diseminada (LCDs) cursa con la presencia de 10 o más lesiones que pueden ser papulosas, ulceradas, acneiformes, nodulares entre otras <sup>30,32</sup>.

**-Leishmaniasis Mucocutánea o espundia:** Afecta los tejidos nasofaríngeos, se caracteriza por la destrucción tisular progresiva, puede causar desfiguración en el rostro del paciente. Se denomina altamente deformante porque produce erosión y ulceración de los tejidos blandos y el cartílago de las partes afectadas (laringe, faringe o labio superior) <sup>27,36</sup>. Las lesiones en LMC tienden a tener poca cantidad de parásitos y los daños son secundarios de la reacción inflamatoria del organismo. Las especies causantes de esta forma clínica son las pertenecientes al complejo *L. Viannia braziliensis*; *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. peruviana* y *L. panamensis*.

**-Leishmaniasis Visceral, Kala-azar o fiebre negra:** Es la forma más grave de las leishmaniasis, invade órganos y tejidos hematopoyéticos; cursa con caquexia, anemia, pérdida de peso, fiebre intermitente y hepatoesplenomegalia. En el 95% de los casos sin tratamiento resulta mortal, incluso pacientes con LV y con tratamiento tienen un índice de mortalidad de aproximadamente el 15% <sup>27</sup>.

La LV afecta a personas en mal estado de nutrición, inmunosuprimidos y niños <sup>37</sup>, y afecta principalmente al hígado, bazo, ganglios linfáticos y la médula ósea. En las Américas la LV es causada por *L. infantum* y los principales hallazgos clínicos son fiebre y agrandamiento de las vísceras <sup>30,32,38</sup>. Estudios en Bihar, India, demostraron que pacientes con LV activa y LC post kala-azar pueden transmitir el parásito al vector transmisor <sup>39</sup>; por consiguiente, un diagnóstico y tratamiento temprano pueden remover de manera eficaz a estos pacientes como reservorio y disminuir infecciones por *Leishmania*.

## **Diagnóstico de leishmaniasis en el laboratorio**

Para el diagnóstico de leishmaniasis se puede utilizar diferentes métodos que demuestran la presencia del parásito de manera directa o indirecta y van a depender de la forma de presentación de la enfermedad. Para la LC el frotis directo es el más usado para la confirmación diagnóstica, en LMC es el estudio histopatológico del tejido nasal o técnicas no invasivas como las moleculares. Para la LV las técnicas de diagnóstico más usadas incluyen la visualización en el tejido de amastigotes, aislamiento de *Leishmania* spp., en cultivos *in vitro* y las pruebas inmunológicas.

Los métodos diagnósticos que se pueden realizar son: parasitológicos como los frotis, improntas, biopsias, cultivos e inoculación en animales; inmunológicos como la prueba cutánea o intradermoreacción de Montenegro, ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) o inmunofluorescencia indirecta (IFI) en muestras de sangre, inmunoelectrotransferencia (Wester blot), prueba de aglutinación directa (Direct Agglutination Test, DAT), inmunohistoquímica con anticuerpos (Ac) anti-*Leishmania*; y moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus sigla en inglés de *Polymerase Chain Reaction*), TP-PCR (transcriptasa inversa), RT-PCR(PCR en tiempo real) o RFLP-PCR (Restriction Fragment Length Polymorphism) <sup>40-42</sup>.

## **Tipos de muestra para el diagnóstico de leishmaniasis**

Para el diagnóstico de la leishmaniasis cutánea <sup>31</sup> de las diferentes formas se pueden obtener las siguientes muestras:

- Forma ulcerada: raspado, aspirado de la lesión o ganglio y biopsia.
- Forma diseminada: raspado, aspirado de lesión o ganglio y biopsia.
- Forma difusa: raspado, aspirado de lesión o ganglio y biopsia.
- Forma atípica: aspirado de la lesión.

Para el diagnóstico de la leishmaniasis mucocutánea se puede obtener muestra de raspado, biopsia y suero; para la visceral: suero/sangre y aspirado de médula ósea.

## **Métodos de diagnósticos parasitológicos**

Estos métodos pueden ser usados en todas las formas clínicas que se presenta la leishmaniasis, aunque presentan una sensibilidad baja. También se puede hacer el examen histopatológico por medio de biopsias para la búsqueda del parásito. El diagnóstico



parasitológico se basa en la demostración del parásito en extendidos teñidos de material obtenido de: lesiones cutáneas, ganglios linfáticos, médula ósea, bazo, líquido cefalorraquídeo, tejido o del cultivo <sup>38</sup>.

La base de confirmación de LC es el frotis directo, se reporta como positiva cuando al menos se observa un amastigote intra o extracelular en la placa teñida con el material obtenido del paciente y vista al microscopio. En la LV el estudio de frotis directo no tiene valor diagnóstico, por ende, para el diagnóstico se usa el aspirado de médula ósea (sensibilidad del 76-85%).

Coloraciones: se pueden realizar en todas las formas clínicas de la enfermedad, se deben preparar extendidos o improntas de tejido, raspados o aspirados. Todas estas muestras deben ser tomados del borde de las lesiones, y después de extender, fijar y teñir se realiza la búsqueda minuciosa microscópica de amastigotes del parásito. Para la LV las muestra para el examen parasitológico se pueden obtener de aspirados de médula ósea, bazo y nódulos linfáticos que igualmente se deben teñir previo análisis <sup>30,40</sup>.

Para este análisis microscópico el material se extiende sobre la lámina, se fija con metanol, se tiñe con Giemsa y se observa al microscopio con el objetivo de 100X. En estos frotis directos los amastigotes aparecen de forma intra o extracelular, ovalados o redondos de 2-4  $\mu\text{m}$  de diámetro con núcleo y kinetoplasto bien definidos <sup>32</sup>. El núcleo y el kinetoplasto se tiñen de un color púrpura mientras que el citoplasma adquiere un color azul pálido con la coloración de Giemsa. En caso de biopsias, para su estudio se necesita un cilindro de piel de  $4\text{mm}^2$ , se fija en formol neutro, se procede con la tinción hematoxilina-eosina (H-E) y a la búsqueda de amastigotes por microscopía óptica.

### **Métodos de diagnóstico molecular**

Las técnicas moleculares permiten detectar el ADN de *Leishmania* spp., en todas las presentaciones clínicas que se manifiesta la enfermedad; la PCR puede detectarlo en cantidades mínimas y es muy sensible y específica. En la PCR es preferente el uso de secuencias multicopias para tener una mayor sensibilidad en la detección. En el Viejo Mundo algunas especies de *Leishmania* presentan 36 cromosomas, mientras que, las del Nuevo Mundo poseen 34 o 35; en el complejo de *Leishmania mexicana* están fusionados los

cromosomas 8 y 29, y el 20 con el 36, y en complejo de *Leishmania braziliensis* los cromosomas 20 y 34<sup>30</sup>.

La revisión bibliográfica de Montalvo et al.,<sup>40</sup> menciona que las dianas genéticas más comunes en el diagnóstico molecular son: espaciadores internos de la transcripción (ITS), ADN del kinetoplasto (kADN), subunidad pequeña del ARN ribosomal (Ssu-rRNA), gen que codifica la glicoproteína de 63 kDa (gp63), gen que codifica la cisteína proteinasa B (cpb), genes que codifican los miniexones (mini-exon), y genes que codifican la proteína de 7 kDa (hsp70). Para el análisis molecular por PCR se requiere previa extracción del ADN de la muestra que se quiera identificar con el uso de una técnica de extracción válida, en la actualidad se pueden encontrar diversos protocolos que pueden ser usados.

Esta investigación tuvo como objetivo: Recopilar información del parásito flagelado del género *Leishmania* mediante la búsqueda y revisión de literatura de fuentes primarias y secundarias que sirva para realizar el diagnóstico de la leishmaniasis por observación microscópica del parásito y detección del ADN.

## CAPÍTULO II

### METODOLOGÍA

#### Tipo de investigación

**-De enfoque cualitativa:** Esta investigación de revisión bibliográfica fue de enfoque cualitativa porque se recolectó y se analizó datos teóricos obtenidos de fuentes de información científica para responder con el problema de investigación que se planteó; no se usó análisis estadístico.

**-De diseño documental:** Al tratarse de un trabajo de revisión bibliográfica únicamente se recopiló información de varias fuentes de información científica como artículos, libros, reportes epidemiológicos y manuales, y se hizo un compendio de la información más importante para el desarrollo de la investigación al especificar propiedades y características del objeto de estudio.

**-Corte transversal:** El proyecto se desarrolló en un tiempo determinado que corresponde al periodo académico noviembre 2020-abril 2021.

**-Retrospectiva:** Se indagó información y estudios realizados en el pasado, en esta investigación se trabajó con diferentes fuentes de información y documentos que se obtuvieron de bases de datos y sitios web confiables publicados dentro de los últimos 10 años, estos sirvieron para recolectar información del objeto de estudio.

#### Población

Para la población de estudio de este proyecto de investigación de tipo bibliográfico se empleó bibliografía extraída de diferentes fuentes primarias y secundarias de información en donde se obtuvieron: libros digitales; manuales digitales disponibles en la OPS y OMS sobre la leishmaniasis; artículos científicos de diversas bases de datos como Lilacs, Scielo, Scopus, ProQuest, Medigraphic, y Redalyc; informes epidemiológicos de la leishmaniasis de la OPS/OMS y del Ministerio de Salud Pública del Ecuador (SIVE) e información de sitios web de organizaciones internacionales tanto de la OMS como de la OPS.

La población total de esta investigación quedó constituida por 75 fuentes bibliográficas de información científica que están conformadas por: 6 libros, 62 artículos científicos, 2 manuales, 3 informes epidemiológicos y 2 sitios web. El número de artículos científicos que se obtuvo de cada base de datos fueron: 2 artículos de Lilacs, 12 de ProQuest, 7 de Redalyc, 29 de Scielo, 2 de Medigraphic, 6 de Scopus, 1 de PubMed y 3 de Google Académico.

## **Muestra**

La muestra que se seleccionó fueron de 58 fuentes bibliográficas útiles que relacionaban su contenido estrechamente con las variables del objeto de estudio. Esta muestra está conformada por: 6 libros, 45 artículos científicos (2 de Lilacs, 9 de ProQuest, 6 de Redalyc, 22 de Scielo, 2 de Medigraphic y 4 de Scopus), 2 manuales, 3 informes epidemiológicos y 2 sitios web (OMS, OPS). Para esta muestra seleccionada se aplicó un tipo de muestreo no probabilístico porque los criterios de inclusión y exclusión fueron a criterio del autor de la investigación.

## **Criterios de inclusión:**

- Fuentes primarias y secundarias con menos de 10 años de ser publicadas, es decir desde el 2011 hasta el 2021
- Fuentes bibliográficas que aporten con información fidedigna y específica sobre la leishmaniasis, la presentación clínica, el parásito *Leishmania* spp., el ciclo de vida y el diagnóstico
- Fuentes provenientes de bases de datos de revistas indexadas y documentos de organizaciones internacionales (OMS/OPS)

## **Criterios de exclusión:**

- Fuentes primarias y secundarias que tengan más de 10 años de ser publicadas (< 2011)
- Fuentes que no tengan relevancia en la información con relación a las ciencias de la salud y a la leishmaniasis en el hombre (por ejemplo: artículos enfocados en aspectos económicos, políticos, veterinarios, de tratamiento, etc.)

## **Estrategias de Búsqueda**

En la presente investigación se aplicó en primer lugar la selección de palabras clave sobre el objeto de estudio (dentro de estas palabras claves utilizadas fueron: leishmaniasis, *Leishmania*, diagnóstico/ diagnosis, ADN, molecular, epidemiología/ epidemiology), se optó por la búsqueda en las bases de datos previamente mencionadas escribiendo las palabras claves, en los resultados se filtraron por años y áreas temáticas relacionados a salud y medicina. También se incluyó el operador booleano “AND” para una búsqueda más especializada y obtener mejores fuentes bibliográficas relacionadas netamente con el tema, luego se leyó el título y se seleccionó de acuerdo al criterio del autor los artículos que servirían para la investigación.

### **Variables de estudio**

Las variables de esta investigación según la naturaleza fueron de tipo cualitativa porque se expresan de forma verbal. La leishmaniasis será la variable dependiente y el diagnóstico por observación microscópica del parásito y detección del ADN la independiente.

### **Métodos de estudio**

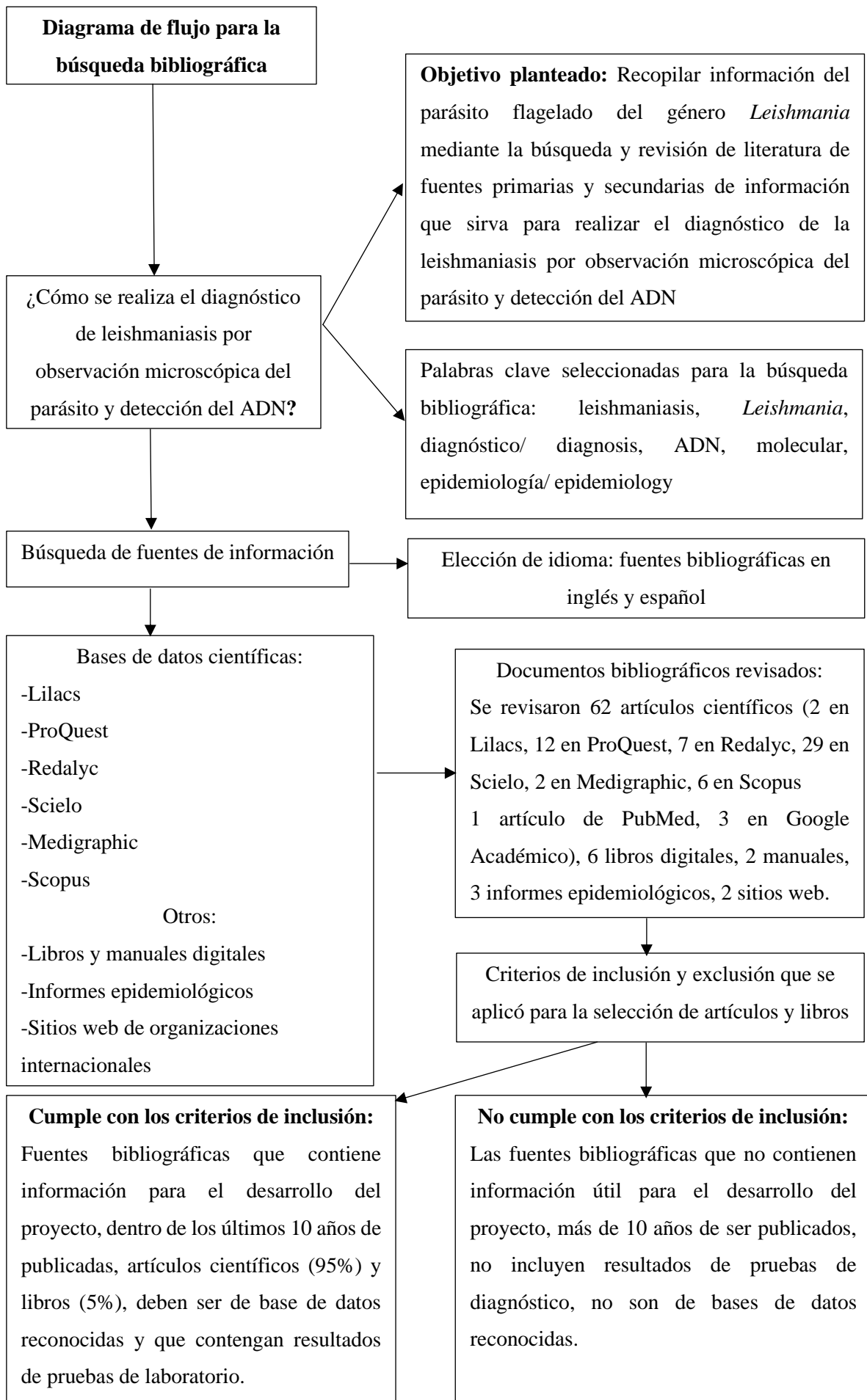
Se aplicó el método teórico porque solo se realizó el análisis de los artículos científicos, libros y manuales digitales, sitios web de organizaciones internacionales e informes con respecto al objeto de estudio para su respectiva síntesis y desarrollo de la investigación.

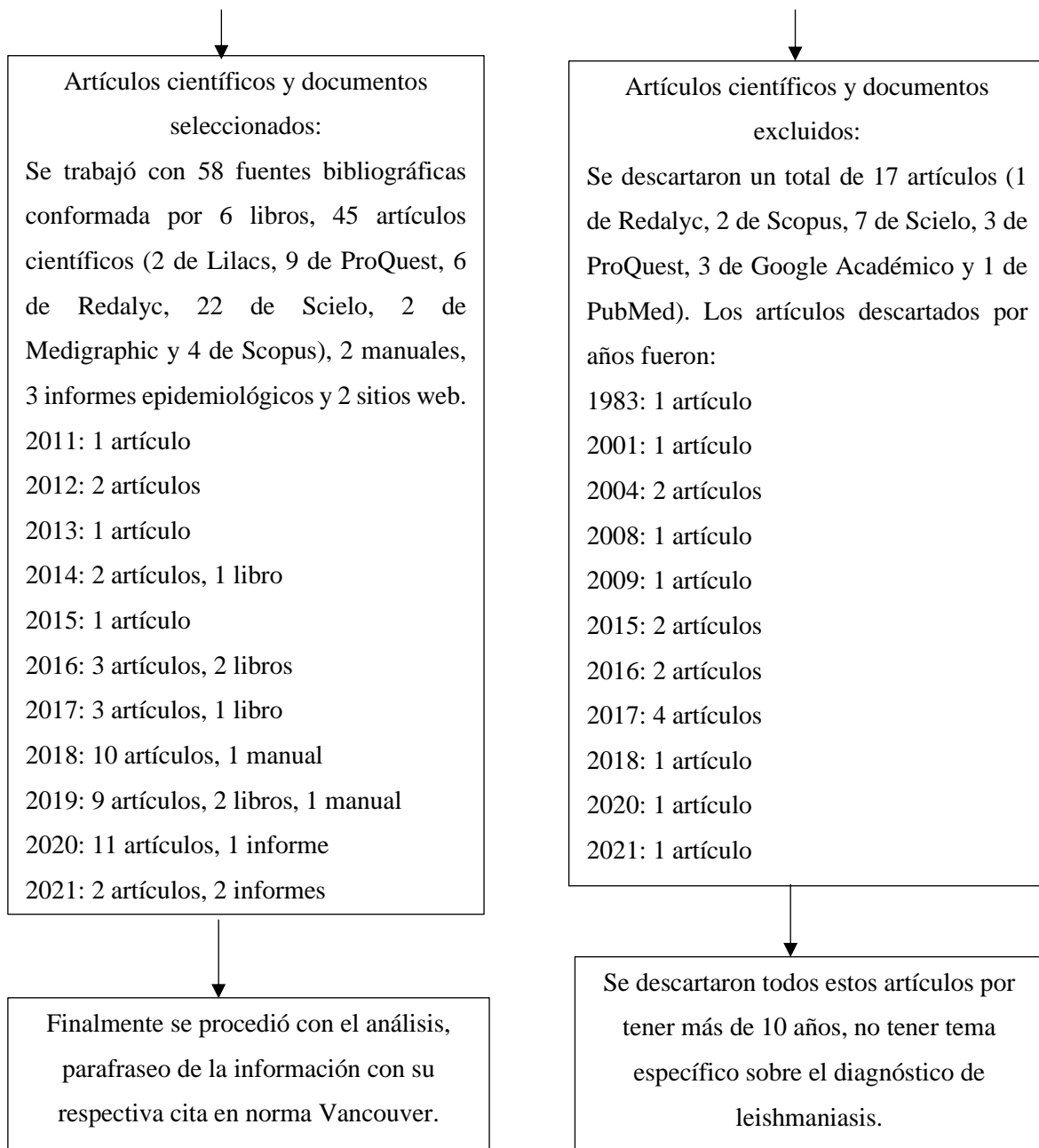
### **Técnicas**

Al tratarse de un proyecto de revisión bibliográfica las técnicas que se usaron en la recopilación de la información fueron la búsqueda de información científica mediante el empleo de buscadores de información científica como Google Académico y bases de datos como Lilacs, ProQuest, Redalyc, Scielo, Medigraphic y Scopus de los cuales se escogieron documentos que según el criterio del autor aportaron a la investigación.

### **Procedimientos**

Para la búsqueda de documentos bibliográficos de carácter científico usados en la investigación se procedió como se muestra en el diagrama de flujo que se encuentra a continuación.





### **Procesamiento estadístico**

Solo se recolectó datos cualitativos para su análisis y luego se procedió a la selección de información útil para ser incorporados en el proyecto de investigación. No se requirió ningún procesamiento estadístico para esta investigación.

### **Consideraciones éticas**

No fue necesario permisos de un comité de bioética porque al tratarse de una investigación de revisión bibliográfica no se trabajó con muestras biológicas de humanos, plantas, ni animales.

## CAPÍTULO III

### DESARROLLO

En el presente proyecto de investigación de carácter bibliográfico, las principales fuentes de información fueron seleccionadas de acuerdo al contenido del documento descargado y a la actualidad de la información. Se logró recolectar fuentes de información científica de distintas bases de datos como Lilacs, PorQuest, Redalyc, Scielo, Medigraphic y Scopus, las cuales fueron el pilar para el desarrollo del proyecto de investigación; adicional se trabajó también con informes epidemiológicos (obtenidos de la OPS, OMS y Ministerio de Salud Pública del Ecuador), manuales y libros digitales de acceso abierto y totalmente descargables en formato PDF de la web.

La leishmaniasis representa un grave problema de salud a nivel mundial, con un alto índice de prevalencia en las diferentes zonas endémicas alrededor del mundo. La diversidad de especies, reservorios y vectores han sido los principales protagonistas del difícil control y eliminación de la leishmaniasis en el planeta, se incluye también factores como el desconocimiento por parte de población y el personal sanitario al no saber sobre la enfermedad e ignorar su diagnóstico y tratamiento.

Las poblaciones que viven en zonas endémicas que generalmente tienen un estatus económico bajo son las más afectadas al tener un difícil acceso a la atención sanitaria y un disminuido nivel de control en reservorios y vectores. La leishmaniasis incluso se ha vuelto una infección parasitaria oportunista en pacientes inmunosuprimidos con alto porcentaje de prevalencia; además de hacer más difícil el tratamiento y más severas las manifestaciones clínicas en estos. De acuerdo a las fuentes bibliográficas de la mayoría de los documentos analizados, mencionan que la leishmaniasis es una de las enfermedades tropicales más olvidadas y, que el mismo hecho de su desconocimiento hace que continúe en ese estado.

El diagnóstico de leishmaniasis tiene una amplia gama de metodologías en las ciencias de la salud, como por ejemplo el diagnóstico clínico diferencial por parte de los médicos y el diagnóstico de laboratorio por parte del personal especializado. El diagnóstico diferencial resulta tener ciertas desventajas porque las presentaciones clínicas (signos y síntomas de la leishmaniasis) son parecidas a otras enfermedades como la lepra, la histoplasmosis, etc., que



son causadas por otros microorganismos diferentes de *Leishmania* spp., pero presentan manifestaciones con cierto porcentaje de similitud.

El diagnóstico por laboratorio puede ser realizado por diferentes áreas: la inmunológica, la de biología molecular, la histopatológica y la parasitológica; en donde al aplicar técnicas de carácter científico se puede llegar al agente específico que causa la leishmaniasis. Esta investigación se centra en los métodos parasitológicos por observación microscópica y la molecular por detección del ADN de *Leishmania* spp.

En la Tabla 1, se presenta un estudio que evalúa 3 técnicas de tinción usadas para el diagnóstico de la leishmaniasis realizada por Cannova et al., <sup>43</sup>; en este, expertos en diagnóstico de leishmaniasis valoraron la calidad y nitidez de los campos microscópicos de 60 placas, distribuidas y teñidas por 3 diferentes colorantes para evaluar las particularidades de cada uno y su valor diagnóstico en el laboratorio.

**Tabla 1.** Valoración de 3 técnicas de coloración para el diagnóstico de LC mediante la identificación de distintas estructuras de *Leishmania*, en la escala se valoró 4 categorías: bien visible, medianamente visible, poco visible, no visible.

| Técnica de coloración | Categoría            | Visibilidad de los amastigotes | Visibilidad del kinetoplasto |
|-----------------------|----------------------|--------------------------------|------------------------------|
| <b>Giemsa</b>         | Bien visible         | 90%                            | 80%                          |
|                       | Medianamente visible | 10%                            | 20%                          |
|                       | Poco visible         | 0%                             | 0%                           |
|                       | No visible           | 0%                             | 0%                           |
| <b>Gaffney</b>        | Bien visible         | 0%                             | 0%                           |
|                       | Medianamente visible | 0%                             | 0%                           |
|                       | Poco visible         | 60%                            | 0%                           |
|                       | No visible           | 40%                            | 100%                         |
| <b>Pap-mart®</b>      | Bien visible         | 0%                             | 0%                           |
|                       | Medianamente visible | 0%                             | 50%                          |
|                       | Poco visible         | 60%                            | 30%                          |
|                       | No visible           | 40%                            | 20%                          |

**Bien visible:** observación microscópica con nitidez y uniformidad en todos los campos, características morfológicas y de organelas de *Leishmania* spp., bien definidas; **Medianamente visible:** no son completamente visibles las organelas y

características morfológicas del parásito, sin uniformidad de todos los campos, pero se logra observar amastigotes; **Poco visible**: cuando las características morfológicas y organelas en todos los campos no son nítidas ni definidas para su identificación; **No visible**: sin visualización ni identificación de las características morfológicas del amastigote.

**Fuente:** Datos obtenidos del artículo de Cannova, Brito y Simons <sup>43</sup>.

El diagnóstico de leishmaniasis se basa en verificar la presencia de la forma amastigote de *Leishmania* spp., en un frotis, impronta o placa de biopsia. Por excelencia se usa la coloración de Giemsa para teñir los frotis o extendidos citológicos. Este colorante metacromático tiñe los componentes citológicos de un color diferente al color original que presenta este (azul), es decir de color púrpura o rojizo. El colorante Giemsa está constituido por azul de metileno y eosina (ácido débil), el primer componente sirve para teñir sustancias basófilas y el segundo para el citoplasma, tejido conjuntivo y fibras colágenas de un color rojo fuerte <sup>43</sup>.

La LC es la forma más frecuente como se presenta la infección de *Leishmania* spp., con la manifestación de una sola lesión en 69% de los casos de los pacientes parasitados, la LCL es la forma común y se caracteriza por la aparición de una única úlcera indolora con límites definidos. En la investigación realizada que se presentó anteriormente en la Tabla 1, se concluyó que la coloración de Giemsa y Pap-mart® resultaron efectivas para la identificación de amastigotes de *Leishmania* spp., mientras que, en la coloración de Gaffney únicamente se pudo identificar hematíes como elemento celular del hospedero.

En los métodos parasitológicos de diagnóstico de *Leishmania* spp., Montalvo et al., <sup>40</sup> y el Manual de Diagnóstico y Tratamiento de las Leishmaniasis <sup>41</sup> establecen que la principal tinción usada para el diagnóstico de LC es con el colorante de Giemsa, lo cual concuerda con el estudio de Cannova, Brito y Simons <sup>43</sup> en ser el colorante más óptimo y eficaz en la identificación de amastigotes de *Leishmania* spp., además de la identificación clara del kinetoplasto del parásito que en las otras dos coloraciones no se pudieron observar (Gaffney y Pap-Mart®). En los frotis teñidos con Giemsa se observó claramente la forma ovalada de los amastigotes de aproximadamente 2-4 µm con un núcleo bien definido y gran nitidez, reflejando el desempeño óptimo que la tinción de Giemsa presenta en el diagnóstico.

Por otro lado, Rodríguez et al., <sup>32</sup> en su texto “Las Leishmaniasis: atlas texto” añaden que el núcleo y kinetoplasto de *Leishmania* spp., también se pueden observar claramente con otras

coloraciones diferentes a la de Giemsa; estas coloraciones pueden ser Wright, Field o hematoxilina-eosina; la coloración de Wright, Field y Romanowsky modificada son usadas también en el diagnóstico de malaria <sup>44</sup>. De la coloración de Field y hematoxilina-eosina no existen estudios dentro de los últimos 10 años que evalúen su eficacia como técnica diagnóstica en la identificación microscópica de *Leishmania* spp.

La tinción de Pap-Mart en la investigación de Cannova, Brito y Simons no presentó un óptimo desempeño, tenía baja nitidez y definición de las estructuras de *Leishmania* spp., sin embargo, los expertos en diagnóstico parasitológico de *Leishmania* spp., pudieron identificar microscópicamente el amastigote del parásito en los frotis sin mayor dificultad lo cual para profesionales con poca experticia resultaría una gran desventaja en el trabajo. Pero, por otra parte, la coloración de Pap-Mart no es eficaz en el diagnóstico de la leishmaniasis, pero si resulta muy útil en citología como mencionan Uranga, Esparragoza, Simón y Sánchez, miembros del Colegio Nacional de Profesionales de la Citotecnología en su presentación.

No solo las diferentes tinciones o coloraciones pueden interferir en el diagnóstico de leishmaniasis, sino también factores externos como menciona Pineda et al. <sup>45</sup> en su estudio, que la manipulación de las lesiones cutáneas en la leishmaniasis también interfieren en el diagnóstico. Esta manipulación que hacen referencia estos autores son la aplicación de cremas tópicas, químicos o remedios medicinales de plantas que los pacientes colocaban en las úlceras cutáneas. En la investigación los cambios más notables por la manipulación de las lesiones fueron el aumento e inflamación de las lesiones, por consiguiente, se considera que en el diagnóstico de laboratorio también interferirían en los resultados por estos cambios.

El diagnóstico convencional y de primera mano en la mayoría de centro de atención primaria de salud es el frotis directo, considerado como método estándar de oro <sup>46</sup>. El resultado del diagnóstico va a depender de las habilidades y conocimiento del profesional, un aspecto que influye directamente con la sensibilidad de la técnica. Para la toma de muestra se necesita de un bisturí para raspar la lesión de los bordes y el centro de las úlceras. Otra forma de toma de muestra es el aspirado, útil en extendidos en lámina, detección de ADN y cultivos, pero esto requiere un personal más especializado e infraestructura avanzada. La ventaja de la detección del ADN es que al aplicar la PCR, resulta crucial para informar la decisión del tratamiento <sup>47</sup>.

En la Tabla 2 se presenta el porcentaje de sensibilidad obtenido de diferentes estudios por distintos autores en el análisis molecular de la leishmaniasis. Algunas de las investigaciones realizadas fueron con el fin de evaluar la sensibilidad de diagnóstico al aplicar la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en sus distintas versiones para detectar a *Leishmania* spp.

**Tabla 2.** Grado de sensibilidad de diferentes tipos de PCR mediante el empleo de diferentes muestras en el diagnóstico de leishmaniasis.

| Autor                         | Muestra utilizada  | PCR aplicada                       | Sensibilidad   |
|-------------------------------|--|------------------------------------|--|
| Méndez et al. <sup>46</sup>   | ADN extraído de impronta en papel filtro   | PCR convencional                   | 90,07%   |
|                               | ADN extraído de aspirado   | PCR convencional                   | 86,3%  |
| Alves et al. <sup>48</sup>    | ADN extraído de raspado de lesión impregnado en papel filtro   | PCR convencional                   | 100%   |
| Marín et al. <sup>49</sup>    | ADN extraído de cultivo <i>in vitro</i>  | PCR-HRM (PCR con curvas de fusión) | 91,4%  |
| Montalvo et al. <sup>50</sup> | ADN extraído de cepas de referencia de <i>Leishmania</i>   | PCR convencional (hsp20)           | <b>Sensibilidad analítica</b>  |
|                               |  |                                    | 0,1 pg   |
| Chena et al. <sup>51</sup>    | ADN extraído de cultivos de cepas de referencia de <i>L. (V.) braziliensis</i> , <i>L. (L.) amazonensis</i> , y <i>L. (L.) chagasi</i> . | PCR-RFLP                           | <b>Sensibilidad analítica (pg)</b>   |
|                               |  |                                    | <i>L. braziliensis</i> ≤ 10<br><i>L. chagasi</i> = 100<br><i>L. amazonensis</i> =100 |

**PCR-HRM:** PCR-High Resolution Melting; **PCR-RFLP:** PCR- Restriction Fragment Length Polymorphism.

En la investigación de Méndez y colaboradores <sup>46</sup> evalúan a la impronta como una técnica eficaz y con mayor ventaja que el aspirado para el diagnóstico de leishmaniasis. Manifiestan que la impronta, se fundamenta en la impresión de los microlíquidos de la lesión en un papel filtro, tienen una especificidad y sensibilidad para PCR de 100%. Además de no ser una técnica invasiva en la toma de muestra del paciente, la impronta evita las laboriosas metodologías de transporte y conservación porque el ADN se mantiene estable en la impronta simplemente en temperatura ambiente y sin conservantes.

El estudio de Méndez et al., <sup>46</sup> fue realizado en una población militar de Colombia y al igual que la revisión de Beiter et al., <sup>6</sup> concuerda en que las fuerzas armadas de sus países son una población de riesgo al ser enviadas a trabajar a zonas endémicas de leishmaniasis, a más de infectarse, son un posible vehículo para llevar al parásito a sus localidades. La impronta según Méndez podría llegar a ser un método más universal y útil para el diagnóstico de leishmaniasis, porque no se necesita un personal con gran conocimiento científico para la toma de muestra y su conservación es sencilla y dura por varios años.

A diferencia de Méndez et al., que hace la impronta directa de las úlceras, Alves et al., <sup>48</sup> realiza la toma de muestra convencional por raspado de la piel, la cual luego impregna en un papel filtro para posteriormente identificar molecularmente al parásito mediante una PCR. Ambas investigaciones evalúan la sensibilidad de la PCR en la identificación de *Leishmania* spp., en muestras de ADN extraídas de papel filtro; ambos estudios presentan alto porcentaje de sensibilidad, pero con diferente toma de muestra, la impronta directa y el raspado de piel. Sin embargo Sapienza et al., <sup>52</sup> aclara que las técnicas basadas en biología molecular no son suficientemente sensibles en el diagnóstico de la leishmaniasis tegumentaria americana por la principal razón que estos pacientes presentan una respuesta inmunológica más fuerte, especialmente en leishmaniasis crónica y mucocutánea, con una negatividad en la PCR.

Marín et al., <sup>49</sup>, en búsqueda de una mejor técnica de estudio, desarrollan una PCR con curvas de fusión para el diagnóstico y diferenciación de 3 especies, *L. braziliensis*, *L. panamensis* y *L. guyanensis*, que mediante un análisis genómico y selección de regiones específicas con ayuda de la bioinformática; establecieron que únicamente 3 pares de los 24 cebadores diseñados en la investigación resultan ser útiles para el objetivo que fueron diseñados, detectar una sola especie de *Leishmania* y no tener identificaciones cruzadas con otro

miembros de la familia Trypanosomatidae. Entre estas regiones esta Pan082, Pan09, Pan10, Pan17, Pan19, Pan21, Pan301, Pan203, Pan 3030; 3661, 3662, y S615.

Sudarshan et al.,<sup>53</sup> en su estudio establece que la PCR cuantitativa (quantitativePCR o qPCR) sirve en la detección temprana de LV, por consiguiente facilita la intervención temprana del personal médico y disminuye la morbilidad y mortalidad. Kato et al.,<sup>54</sup> en su estudio hecho en Ecuador mencionan que los intercambios genéticos en las especies de *Leishmania* spp., elevan la patogenicidad de las especies, y pueden ser identificadas genéticamente por medio de PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism).

La PCR-RFLP es útil para identificar especies de *Leishmania* spp., las amplificaciones que se basan en PCR utilizan diversos blancos moleculares como: espaciadores internos de la transcripción de ARN ribosómico (ITS-rRNA), el gen que codifica la proteína de choque térmico de 70kDa (hsp70) y el DNA del kinetoplasto (kDNA)<sup>55</sup>. El análisis de PCR-RFLP permiten la comparación de cepas de *Leishmania* spp., con el uso de enzimas de restricción (Ej. *BstU I*, *Hae III* y *Mbo I*)<sup>56</sup>.

En la Tabla 3, se puede apreciar la distribución de las especies de *Leishmania* en los distintos países de las Américas con mayor número de casos en el 2019, la especie y la forma clínica que produce respectivamente. Esta información es de acuerdo con el “Manual de Procedimientos para Vigilancia y Control de las Leishmaniasis en las Américas” de la OPS<sup>31</sup>.

**Tabla 3.** Distribución geográfica de *Leishmania* en los países más afectados de las Américas y a nivel local (Ecuador), la forma clínica y la respectiva especie causante.

| País y número de casos reportados en el 2019 | Especie de <i>Leishmania</i> | Forma clínica |
|--|------------------------------|---------------|
| <b>Brasil</b><br><b>(15 484)</b>             | <i>L. guyanensis</i>         | LC            |
|  | <i>L. amazonensis</i>        | LC            |
|  | <i>L. braziliensis</i>       | LC, LMC       |
|  | <i>L. infantum</i>           | LV            |
|  | <i>L. lainsoni</i>           | LC            |
|  | <i>L. shawi</i>              | LC            |
|  | <i>L. naiffi</i>             | LC            |
|  | <i>L. lindenberg</i>         | LC            |

|                             |                        |               |
|-----------------------------|------------------------|---------------|
| <b>Colombia</b><br>(5 907)  | <i>L. braziliensis</i> | LC, LMC       |
|                             | <i>L. panamensis</i>   | LC, LMC       |
|                             | <i>L. guyanensis</i>   | LC, LMC       |
|                             | <i>L. colombiensis</i> | LC            |
|                             | <i>L. amazonensis</i>  | LC, LCD       |
|                             | <i>L. mexicana</i>     | LC            |
|                             | <i>L. infantum</i>     | LV            |
| <b>Perú</b><br>(5 349)      | <i>L. peruviana</i>    | LC, LMC       |
|                             | <i>L. lainsoni</i>     | LC            |
|                             | <i>L. amazonensis</i>  | LC            |
|                             | <i>L. guyanensis</i>   | LC, LMC       |
|                             | <i>L. braziliensis</i> | LC, LMC y LCD |
| <b>Nicaragua</b><br>(3 321) | <i>L. infantum</i>     | LV, LC        |
|                             | <i>L. panamensis</i>   | LC            |
|                             | <i>L. braziliensis</i> | LC, LMC       |
| <b>Bolivia</b><br>(2 052)   | <i>L. braziliensis</i> | LC, LMC       |
|                             | <i>L. amazonensis</i>  | LC, LCD       |
|                             | <i>L. infantum</i>     | LV            |
|                             | <i>L. guyanensis</i>   | LC            |
|                             | <i>L. lainsoni</i>     | LC            |
| <b>Ecuador</b><br>(1 108)   | <i>L. braziliensis</i> | LC, LMC       |
|                             | <i>L. panamensis</i>   | LC            |
|                             | <i>L. guyanensis</i>   | LC            |
|                             | <i>L. amazonensis</i>  | LC, LCD       |
|                             | <i>L. mexicana</i>     | LC, LCD       |

Existe una amplia diversidad de especies que causan leishmaniasis alrededor del todo el mundo, y producen diferentes tipos de leishmaniasis con manifestaciones clínicas totalmente diferentes (LC, LMC y LV). No únicamente existen una amplia gama de especies de *Leishmania* spp., sino también de reservorios y vectores que influyen de manera directa en la prevalencia de leishmaniasis en todo el mundo.

Estudios realizados por Sandoval et al.,<sup>57</sup> en la identificación de especies de *Leishmania* spp., en Perú, tiene completa concordancia con la información proporcionada por el manual de la OPS; en donde las 5 especies mencionadas en la tabla 3 se encontraron en los pacientes de la investigación por Sandoval. Dentro de las especies más prevalente se encuentran: *Leishmania braziliensis*, *Leishmania guyanensis*, y *Leishmania peruviana*. En Brasil, Anversa<sup>16</sup> en su revisión, indica que *L. amazonensis* y *L. guyanensis* también puede ser

causante de LMC y no solo *L. brasiliensis* como indica el manual de OPS. Sin embargo, Anversa acota que *L. amazonensis* y *L. guyanensis* producen LMC en una menor frecuencia.

Hernández et al.,<sup>58</sup> describen que los casos de LCL en Nicaragua son principalmente causadas por *L. mexicana*, lo cual no es descrito por el manual de OPS; y añade también que *L. infantum* puede causar una leishmaniasis cutánea atípica en los pacientes. La revisión de Isaza<sup>2</sup> describe que las especies más frecuentes que producen LC en Colombia son: *L. panamensis* en un 61,3%; *L. brasiliensis* en un 27,1%; *L. mexicana* en un 2,1%; *L. guyanensis* en un 0,9 % y *L. equatoriensis* en un 0,6%.

En el ámbito local, Ecuador, a parte de las especies mencionadas en el manual de OPS: *L. brasiliensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis*, *L. amazonensis*, y *L. mexicana*; Isaza et al.,<sup>2</sup> añade otra especie reportada que se encuentra en circulación en las regiones endémicas de Ecuador, *L. equatoriensis*. En otra revisión bibliográfica de Montalvo et al.,<sup>40</sup> añade que en la distribución geográfica de Ecuador está dada también por: *L. chagasi* y *L. naiffi*. Robles et al.,<sup>25</sup> en su estudio de casos de leishmaniasis también reporta la presencia de *L. tropica*, en la Joya de los Sachas, *L. lainsoni* y *L. naiffi* en Macas, *L. mexicana* en Progreso y en forma limitada en Azuay y Chimborazo, *L. equatoriensis* en Guayas, y *L. guyanensis* en las costas ecuatorianas del norte y centro del país.



## CONCLUSIONES

En el diagnóstico de leishmaniasis, las técnicas parasitológicas son muy importantes para un diagnóstico precoz, rápido, y económico, porque no requiere de reactivos y materiales especializados, está disponible para los pacientes en la mayoría de los centros de atención sanitario en las zonas endémicas alrededor del mundo y simplemente se basa en la búsqueda de amastigotes tanto intracelulares como extracelulares en muestras de raspados o aspirados de las lesiones y teñidas generalmente con Giemsa o Wright después de ser fijadas en metanol.

El método parasitológico va a tener una sensibilidad variable que depende de factores como la experiencia del analista (la dimensión de los amastigotes dificulta la visualización en profesionales sin experiencia), la especie del parásito, la toma de muestra e incluso el tiempo de evolución de las lesiones en el paciente, por ello, se puede decir que el método parasitológico presenta cierto límite. En cuanto al método molecular, la detección de *Leishmania* spp., a través de la PCR, resulta muy sensible y específico para identificar de toda la variedad de especies existentes del parásito; requieren de un personal capacitado para su realización y aunque costosa, es la prueba confirmatoria de la leishmaniasis en los pacientes.

Usualmente, los métodos moleculares son usados en el diagnóstico de LV y para dar el respectivo tratamiento porque no todas las especies de *Leishmania* son sensibles al mismo fármaco. Para realizar el diagnóstico molecular por PCR existen diversos blancos genéticos útiles para identificar las especies de *Leishmania* spp.

Las fuentes consultadas establecen que el complejo *L. donovani* causa de LV, el complejo *L. tropica* y *L. major* causa de LC, el complejo *L. aethiopica* causa LCD, y el complejo de *L. mexicana* producen LCL y LCD; el subgénero *Viannia* complejo *L. guyanensis* causa LMC y el complejo *L. braziliensis* presenta LCL. Debido a las modificaciones genéticas de *Leishmania* spp., la variedad de tipos de vectores en las zonas endémicas alrededor del mundo y del estado del propio sistema inmune de hospedador, no siempre va a producir manifestaciones clínicas.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Becerril Flores MA. Parasitología Médica. 4ta Ed. México: McGrawHill; 2014.
2. Isaza-Jaimes A, Rodríguez J, Chacón G, Bravo A, Silva-Sarabia C. Una visión acerca de la Leishmaniasis americana y de su comportamiento epidemiológico. Arch Venez Farmacol y Ter [Internet]. 2018 [citado el 18 de febrero de 2021];37(3):190–196. Disponible en: <https://search.proquest.com/scholarly-journals/una-visión-acerca-de-la-leishmaniasis-americana-y/docview/2154550952/se-2?accountid=36757>
3. Carroll K, Hobden J, Miller S, Morse S, Timothy M, Detrick B, et al. Jawetz, Melnick, & Adelberg Microbiología Médica. 27a Ed. México: McGrawHill; 2016.
4. Organización Panamericana de la Salud. Leishmaniasis [Internet]. 2021 [citado el 27 de enero de 2021]. Disponible en: <https://www.paho.org/es/temas/leishmaniasis>
5. Organización Mundial de la Salud - OMS. Leishmaniasis [Internet]. 2021 [citado el 28 de enero de 2021]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>
6. Beiter K, Wentlent Z, Hamouda A, Thomas B. Nonconventional opponents: A review of malaria and leishmaniasis among United States Armed Forces. PeerJ [Internet]. el 25 de enero de 2019 [citado el 19 de febrero de 2021]; Disponible en: <https://search.proquest.com/scholarly-journals/nonconventional-opponents-review-malaria/docview/2171138456/se-2?accountid=36757>
7. Moo-Llanes D. Nicho ecológico actual y futuro de la Leishmaniasis (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) en la región Neotropical. Rev Biol Trop [Internet]. 2016 [citado el 19 de febrero de 2021];64(3):1237–1245. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=44946472025>
8. Sosa-Ávila EJ, Caro-Lozano J, Zúñiga-Carrasco IR. Perfil epidemiológico de la leishmaniasis: una enfermedad olvidada en México Leishmaniasis: epidemiological profile from a forgotten disease in Mexico. Enf Inf y Microbiol [Internet]. 2014 [citado el 27 de marzo de 2021];34(1):31–36. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/micro/ei-2014/ei141e.pdf>
9. Jaramillo-Antillón O, Espinoza-Aguirre A, Calvo-Fonseca N, Mara-Somarribas C, Wasserman H. La leishmaniosis cutánea en Costa Rica: prevención, diagnóstico y tratamiento. Acta Med Costarric [Internet]. el 17 de junio de 2018 [citado el 19 de febrero de 2021];60(3):103–114. Disponible en: [https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0001-60022018000300103&lang=es](https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-60022018000300103&lang=es)

10. Rojas Madriz B. Leishmaniasis cutánea: una revisión centrada en Costa Rica. Rev Med Leg COSTA RICA [Internet]. 2019 [citado el 19 de febrero de 2021];36(2). Disponible en: <https://www.scielo.sa.cr/pdf/mlcr/v36n2/2215-5287-mlcr-36-02-82.pdf>
11. Nieves Blanco E, Zambrano Avendaño E, Sanchez M, Rondón de Velasco M, Sandoval Ramirez C. Invasión urbana de flebotomíneos transmisores de *Leishmania* en Mérida, Venezuela. Duazary [Internet]. 2018 [citado el 19 de febrero de 2021];15(2):129-142. Disponible en: <https://search.proquest.com/docview/2182473270/fulltext/7C9AF5D2EDA5475DPQ/1?accountid=36757>
12. Organización Panamericana de la Salud. Informe epidemiológico de las Américas, diciembre 2020 [Internet]. 2020 [citado el 20 de febrero de 2021]. Disponible en: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/53089>
13. Manotas-Berdugo H, Toro-Maldonado J, Rodríguez-Rodríguez J, Salgado-García D. Brote urbano de leishmaniasis en Colombia. Rev Salud Pública [Internet]. 2018 [citado el 20 de febrero de 2021];20(1):89–93. Disponible en: <https://search.proquest.com/docview/2091183079/E6609DCA98874E3FPQ/7?accountid=36757>
14. Salgado-Almario J, Hernández C, Ovalle-Bracho C. Geographical distribution of *Leishmania* species in Colombia, 1985-2017. Biomédica [Internet]. 2019 [citado el 21 de marzo de 2021];39(2):278–90. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/bio/v39n2/0120-4157-bio-39-02-00278.pdf>
15. Martínez D, Ávila J, Molano F. Flebotomos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), presentes en una zona endémica de leishmaniasis cutánea en el occidente de Boyacá, Colombia. Colomb Med [Internet]. 2019 [citado el 26 de marzo de 2021];50(3):192–200. Disponible en: [http://www.scielo.org.co/pdf/cm/v50n3/es\\_1657-9534-cm-50-03-00192.pdf](http://www.scielo.org.co/pdf/cm/v50n3/es_1657-9534-cm-50-03-00192.pdf)
16. Anversa L, Gomes Salles T, Richini-Pereira VB, Ramirez LE. Human leishmaniasis in Brazil: A general review. Rev Assoc Med Bras [Internet]. 2018 [citado el 22 de marzo de 2021];64(3):281–289. Disponible en: [https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0104-42302018000300281&lng=en&tlng=en](https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-42302018000300281&lng=en&tlng=en)
17. Cubas WS, Centeno-Leguía D, Arteaga-Livias K, Depaz-López E. Revisión clínica y epidemiológica de la leishmaniasis tegumentaria en una región central del Perú. Rev

- Chil Infectol [Internet]. 2019 [citado el 22 de marzo de 2021];36(6):707–715. Disponible en: [https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0716-10182019000600707&lang=es](https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182019000600707&lang=es)
18. Mollinedo Z, Mollinedo S. Leishmaniasis en Bolivia. Rev Médica La Paz [Internet]. 2020 [citado el 22 de marzo de 2021];26(1):50–66. Disponible en: [http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1726-89582020000100009&lang=es](http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-89582020000100009&lang=es)
  19. Mollinedo JS, Mollinedo Z, Magne M, Girona W, Salomón Ó. Leishmaniasis en Bolivia, revisión y estado actual en Tarija, frontera con Argentina. Biomédica [Internet]. 2020 [citado el 22 de marzo de 2021];40(1):45–61. Disponible en: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0120-41572020000500045&lng=en&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-41572020000500045&lng=en&nrm=iso&tlng=es)
  20. Díaz R, Salvatierra K, Silva G, Deschutter E, Bornay-Llinares F, Acosta L. Primera caracterización molecular de *Leishmania infantum* en pacientes con leishmaniosis visceral de la Provincia de Misiones, Argentina. Biomédica [Internet]. 2019 [citado el 24 de marzo de 2021];39(2):405–14. Disponible en: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0120-41572019000200405&lng=en&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-41572019000200405&lng=en&nrm=iso&tlng=es)
  21. López J, Freire C, Moncayo T, Alulema M, Gaibor C. Prevalencia y factores asociados a la leishmaniasis cutánea en Tena-Napo, Ecuador 2012-2013. Síndro Cardiomet [Internet]. 2018 [citado el 22 de febrero de 2021];8(1):5–9. Disponible en: <https://search.proquest.com/docview/2112560674/abstract/2B6854C53DF340E8PQ/1?accountid=36757>
  22. Arrivillaga J, Ponce P, Cevallos V. Primer registro de flebotomínos para la Provincia Carchi en el Ecuador, *Lutzomyia trapidoi* (Diptera: Pshychodidae: Phlebotominae). Boletín Malariol y Salud Ambient [Internet]. 2013 [citado el 27 de marzo de 2021];53(2). Disponible en: [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1690-46482013000200010](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1690-46482013000200010)
  23. Ministerio de Salud Pública. Subsistema de vigilancia SIVE-Alerta Enfermedades Transmitidas por vectores Ecuador, SE 05-2021 [Internet]. 2021 [citado el 19 de febrero de 2021]. Disponible en: <https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2021/02/Vectores-SE-05.pdf>
  24. Ministerio de Salud Pública Ecuador. Subsistema de Vigilancia SIVE - Alerta Enfermedades Transmitidas por Vectores Ecuador, SE 09-2021 [Internet]. 2021

- [citado el 24 de marzo de 2021]. Disponible en: <https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2020/03/gaceta-vectores-SE-9-2020.pdf>
25. Robles M, Silva J, Jiménez A, Márquez R, Carrillo-Pincay. Joffre. Estudio de Casos de Leishmaniasis Cutánea Registrados en un Hospital Público en Portoviejo, Ecuador. *Rev científica Digit INSPILIP* [Internet]. septiembre de 2018 [citado el 24 de marzo de 2021];2(2). Disponible en: <https://docs.bvsalud.org/biblioref/2019/03/981999/estudio-de-casos-de-leishmaniasis-en-un-hospital-de-portoviejo-03-edite.pdf>
  26. Armúa-Fernández M, Venzal JM. Leishmaniosis: breve puesta al día. *Vet* [Internet]. 2019 [citado el 21 de febrero de 2021];55(211):29–36. Disponible en: [http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1688-48092019000100029&lang=es](http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1688-48092019000100029&lang=es)
  27. Molina-López J, López-Martínez R, Sánchez-Vega JT. *Microbiología y parasitología médicas de Tay*. 5ta ed. México: Méndez Editores S.A.; 2019.
  28. Arenas-Guzmán R. *Dermatología. Atlas, diagnóstico y tratamiento*. 7ma ed. McGrawHill, editor. México; 2019..
  29. Jiménez-Camacho DC. Parasitosis: Leishmaniasis. *Rev Méd Costa Rica y Centroamérica* [Internet]. 2015 [citado el 25 de marzo de 2021];72(614):129–133. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/revmedcoscen/rmc-2015/rmc151y.pdf>
  30. Organización Panamericana de la Salud. Atlas interactivo de leishmaniasis en las Américas: aspectos clínicos y diagnósticos diferenciales [Internet]. 1ra ed. Maia-Elkhoury AN, Hernández CA, Oballe-Bracho C, Soto J, Valadas S, editores. Washington, D.C.: Licencia: CC BY-NC-SA 3.0 IGO; 2020 [citado el 23 de febrero de 2021]. Disponible en: <https://www.paho.org/es/documentos/atlas-interactivo-leishmaniasis-americas-aspectos-clinicos-diagnosticos-diferenciales>
  31. Organización Panamericana de la Salud. Manual de procedimientos para vigilancia y control de las leishmaniasis en las Américas [Internet]. 1ra Ed. Washington, D.C.: Organización Panamericana de la Salud; 2019 [citado el 23 de febrero de 2021]. Disponible en: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/50524>
  32. Rodríguez G, Arenas C, Ovalle C, Hernández C, Camargo C. *Las leishmaniasis: atlas y texto* [Internet]. 1ra Ed. Hernández C, editor. Bogotá, D.C.: David Hernández Mora; 2016 [citado el 23 de febrero de 2021]. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/843/84350981019.pdf>

33. Tironi F de C, Machado GU, Arruda SM, Machado PRL. Plantar ulcer as an atypical manifestation of cutaneous leishmaniasis. *An Bras Dermatol* [Internet]. 2020 [citado el 26 de marzo de 2021]; Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0365059621000532?via%3Dihub>
34. Lloveras S, Moreno D, Bava AJ, Orduna T. El diagnóstico de la leishmaniasis cutánea: a propósito de un caso. *Acta Bioquímica Clin Latinoam* [Internet]. 2011 [citado el 23 de febrero de 2021];45(1):133–136. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=53519965010>
35. Aldama A, García JM, Aldama JG, Pereira J. Leishmaniasis Cutánea Difusa por *Leishmania (Viannia) brasiliensis*. A propósito de un caso. *Fac Cienc Méd* [Internet]. 2020 [citado el 26 de marzo de 2021];53(2). Disponible en: <https://docs.bvsalud.org/biblioref/2020/09/1119624/v53n2a15.pdf>
36. Molina-Avila IJ, Pimentel-Sola JM, García-Bustos MF, Pimentel-Sola J, Marco-Jorge D, Brunetto G, et al. Leishmaniasis Mucocutánea con Manifestacion Oral: Reporte de un Caso. *Int J Odontostomatol* [Internet]. septiembre de 2020 [citado el 26 de marzo de 2021];14(3):342–347. Disponible en: [https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0718-381X2020000300342&lng=es&nrm=iso&tlng=es](https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-381X2020000300342&lng=es&nrm=iso&tlng=es)
37. Piña-Borrego CE, Fernández-Fernández M de L, Piña-Rodríguez LK. Caracterización clínico epidemiológica de la leishmaniosis visceral infantil. *Rev Cubana Pediatr* [Internet]. 2020 [citado el 26 de marzo de 2021];92(3):e771. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-75312020000300007](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75312020000300007)
38. Tying S, Lupi O, Hengge U. *Tropical Dermatology*. 2th Ed. United Kingdom: ELSEVIER.,2017.
39. Singh OP, Tiwary P, Kushwaha AK, Singh SK, Singh DK, Lawyer P, et al. Xenodiagnosis to evaluate the infectiousness of humans to sandflies in an area endemic for visceral leishmaniasis in Bihar, India: a transmission-dynamics study. *The Lancet Microbe* [Internet]. 2021 [citado el 27 de marzo de 2021];2(1):e23–31. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S266652472030166X>
40. Montalvo A, Fraga J, Monzote L, García M, Fonseca L. Diagnóstico de la leishmaniasis: de la observación microscópica del parásito a la detección del ADN. *Rev Cubana Med Trop* [Internet]. 2012 [citado el 23 de febrero de 2021];64(2):108–

131. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0375-07602012000200002](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602012000200002)
41. OPS, OMS, Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social. Manual de Diagnóstico y Tratamiento de las Leishmaniasis [Internet]. 1ra ed. 2018 [citado el 27 de marzo de 2021]. Disponible en: [https://www.paho.org/par/index.php?option=com\\_docman&view=download&alias=575-manual-de-diagnostico-y-tratamiento-de-las-leishmaniasis&category\\_slug=publicaciones-con-contrapartes&Itemid=253](https://www.paho.org/par/index.php?option=com_docman&view=download&alias=575-manual-de-diagnostico-y-tratamiento-de-las-leishmaniasis&category_slug=publicaciones-con-contrapartes&Itemid=253)
42. Oliveira-Ribeiro C, Fernandes Pimentel MI, Caevalhaes-Oliveira R de V, Fagundes A, Madeira M, Mello C, et al. Clinical and laboratory profiles of patients with early spontaneous healing in cutaneous localized leishmaniasis: a historical cohort study. *BCM Infect Dis* [Internet]. 2017 [citado el 3 de abril de 2021];17(559). Disponible en: <https://search.proquest.com/docview/1934571150/3D3297B9A0A6439DPQ/1?accountid=36757>
43. Cannova D, Brito E, Simons MI. Evaluación de técnicas de coloraciones para el diagnóstico de la leishmaniasis cutánea. *Salus* [Internet]. 2016 [citado el 28 de marzo de 2021];20(2):24–9. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=375947694006>
44. Cortés LJ, Muñoz L, Ayala MS. Comparación entre metodologías para el diagnóstico microscópico de malaria. *Biomedica* [Internet]. 2018 [citado el 29 de marzo de 2021];38(2):244–252. Disponible en: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0120-41572018000200244&lng=en&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-41572018000200244&lng=en&nrm=iso&tlng=es)
45. Pineda-Reyes J, Marín R, Tinageros-Zevallos A, Ramos AP, Alvarez F, Llanos-Cuentas A. Manipulación de lesiones en pacientes con leishmaniasis cutánea: serie de casos en un hospital peruano. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* [Internet]. 2020 [citado el 3 de abril de 2021];37(2):265–269. Disponible en: [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1726-46342020000200265&lang=es](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342020000200265&lang=es)
46. Méndez Bejarano CP, Pérez Rico JJ, Rodríguez Angarita O, Velandia Rodríguez DA, Romero Barbosa YA, Alvarado Flechas MT, Valbuena-Pinzón TM. La impronta como método no invasivo de toma de muestra para el diagnóstico molecular de la leishmaniasis cutánea en población de Colombia. *Rev Med* [Internet]. 2018 [citado el

- 29 de marzo de 2021];26(2):15–21. Disponible en: <https://search.proquest.com/docview/2418337488/E9F09EEE52B940E3PQ/4?accountid=36757>
47. Tsai PH, Chen YT, Liao JY, Huang MH, Hsu HM, Yeong EK, Hung CC. Molecular diagnosis and therapy for cutaneous leishmaniasis of a returned traveler from Mexico. *J Microbiol Immunol Infect* [Internet]. 2020 [citado el 3 de abril de 2021]; Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S168411822030164X>
  48. Alves-Mota C, Sabaini-Venazzi EA, Donizeti-Zanzarini P, Alessi-Aristides SM, Campana-Lonardon MV, Verznassi-Silveira TG. Filter paper performance in PCR for cutaneous leishmaniasis diagnosis. *Rev Soc Bras Med Trop* [Internet]. 2021 [citado el 30 de marzo de 2021];54(00472020):1–5. Disponible en: [https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0037-86822021000100605&lang=es](https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822021000100605&lang=es)
  49. Marín J, Urrea D, Muskus C, Echeverry MC, Mejía AM, Triana O. Curvas de fusión de regiones genómicas específicas: una herramienta prometedora para el diagnóstico y tipificación de las especies causantes de la leishmaniasis cutánea en Colombia. *Biomédica Rev del Inst Nac Salud* [Internet]. 2017 [citado el 31 de marzo de 2021];37(4):538–47. Disponible en: <https://www.redalyc.org/jatsRepo/843/84354859012/84354859012.pdf>
  50. Montalvo A, Fraga J, Álvarez L, Alba A, Torres C. Normalización de una nueva variante de reacción en cadena de la polimerasa-hsp20 (PCR-hsp) útil para la detección de *Leishmania*. *Rev Cubana Med Trop* [Internet]. 2018 [citado el 3 de abril de 2021];70(3). Disponible en: [http://scielo.sld.cu/pdf/mtr/v70n3/a08\\_378.pdf](http://scielo.sld.cu/pdf/mtr/v70n3/a08_378.pdf)
  51. Chena L, Nara E, Canese A, Oddone R, Morán M, Russomando G. Caracterización de cepas de *Leishmania*, por medio de la técnica de PCR-FFLP de la región del Spliced Leader Miniexon (SLME), aisladas de humanos y caninos en Paraguay. *Memorias del Inst Investig en Ciencias la Salud* [Internet]. 2012 [citado el 3 de abril de 2021];10(1):14–23. Disponible en: [http://scielo.iics.una.py//scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1812-95282012000100003&lang=es](http://scielo.iics.una.py//scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1812-95282012000100003&lang=es)
  52. Sapienza-Pinheiro A, Shu-Kurizky P, Ferreira M, de Souza Mota M, Santos-Ribeiro J, de Oliveira Filho E, Souza C, Holanda-Barroso D, Ribeiro-Sampaio R, Martins-Gomes C. The accuracy of the Montenegro skin test for leishmaniasis in PCR-negative patients. *Rev Soc Bras Med Trop* [Internet]. agosto de 2020 [citado el 30 de



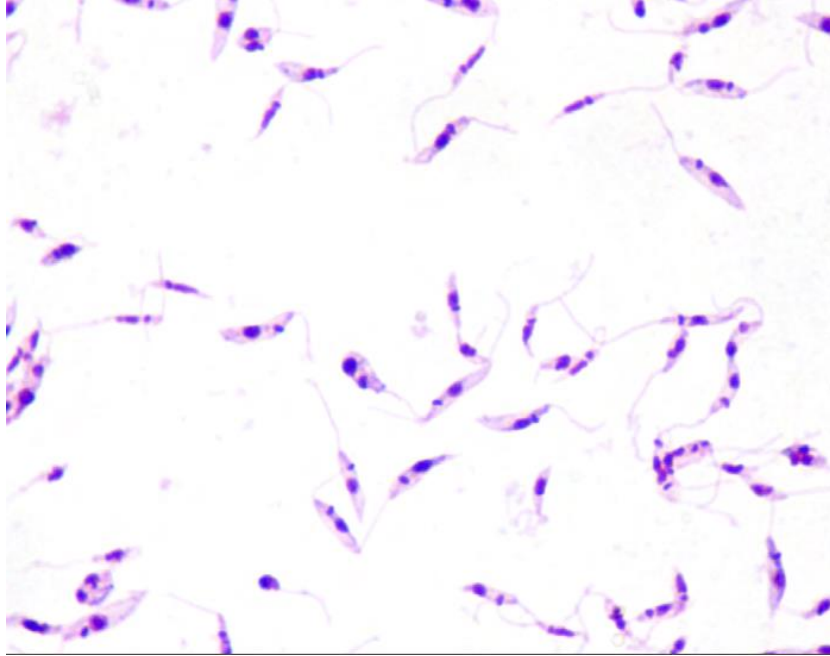
- marzo de 2021];53: e20190433. Disponible en:  
[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S0037-86822020000100318&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0037-86822020000100318&lng=en&nrm=iso&tlng=en)
53. Sudarshan M, Singh T, Kumar-Singh A, Chourasia A, Singh B, Wilson M, Chakravarty J, Sudar S. Quantitative PCR in Epidemiology for Early Detection of Visceral Leishmaniasis Cases in India. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2014 [citado el 3 de abril de 2021];8(12). Disponible en:  
<https://search.proquest.com/docview/1685620009/fulltextPDF/D920ADBC51FB4A8FPQ/1?accountid=36757>
54. Kato H, Gómez E, Seki C, Furumoto H, Martini-Robles L, Muzzio J, Velez L, Kubo M, Tabbabi A, Yamamoto D, Hashiguchi Y. PCR-RFLP analyses of *Leishmania* species causing cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis revealed distribution of genetically complex strains with hybrid and mito-nuclear discordance in Ecuador. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2019 [citado el 3 de abril de 2021];13(9):e0007403. Disponible en:  
<https://search.proquest.com/docview/2252318827/fulltextPDF/29E0CC9DA5594545PQ/1?accountid=36757>
55. Montalvo A, Fraga J, Montano I, Monzote L, der Auwera GV, Marín M, Maskus C. Identificación molecular con base en el gen hsp70 de aislamientos clínicos de *Leishmania* spp. en Colombia. *Biomédica* [Internet]. 2016 [citado el 3 de abril de 2021];36(1):37–44. Disponible en:  
<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=84346573006>
56. Benítez I, Andrade-Zampieri R, Silveira-Elkhoury AN, Floeter-Winter LM, Lauletta-Lindoso JA, Pereira J, Cacciali P, Muñoz M, Aragón-López MA. Detección molecular de *Leishmania (Viannia) lainsoni* Silveira, Shaw, Braga & Ishikawa, 1987 (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) en humanos de Paraguay. *Rev del Inst Med Trop* [Internet]. 2019 [citado el 3 de abril de 2021];14(1):21–28. Disponible en:  
[http://scielo.iics.una.py/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1996-36962019000100021&lng=en&nrm=iso&tlng=es](http://scielo.iics.una.py/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1996-36962019000100021&lng=en&nrm=iso&tlng=es)
57. Sandoval-Juárez A, Minaya-Gómez G, Rojas-Palomino N, Cáceres O. Identificación de especies de *Leishmania* en pacientes derivados al Instituto Nacional de Salud del Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* [Internet]. 2020 [citado el 3 de abril de 2021];37(1):87–92. Disponible en:  
[http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1726-](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-)

46342020000100087&lng=es&nrm=iso&tlng=pt

58. Hernández-Bojorge S, Blass-Alfaro G, Rickloff M, Gómez-Guerrero M, Izurieta R. Epidemiology of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Nicaragua. *Parasite Epidemiol Control* [Internet]. 2020 [citado el 3 de abril de 2021];11:e00192. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405673120300611>

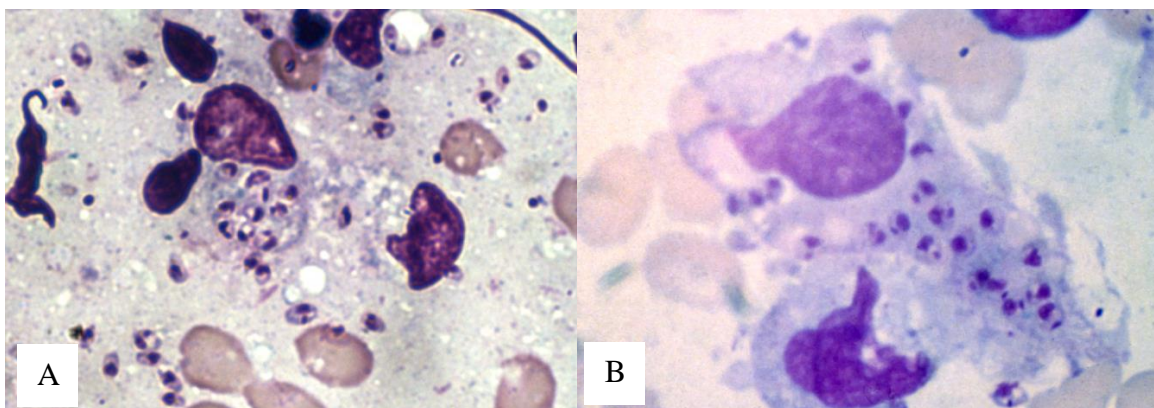
## ANEXOS

**Anexo 1.** *Leishmania* spp., en forma de promastigotes teñidos con Giemsa.



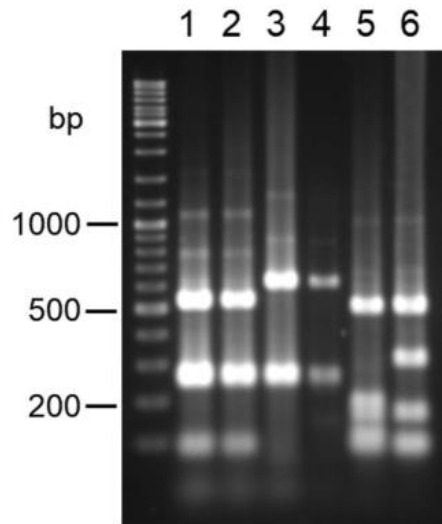
**Fuente:** Atlas interactivo de leishmaniasis en las Américas

**Anexo 2. A)** *Leishmania* spp., en forma de amastigote extracelulares teñidos con Giemsa;  
**B)** Macrófago infectado con *Leishmania* spp., en forma de amastigotes y teñidos con Giemsa.



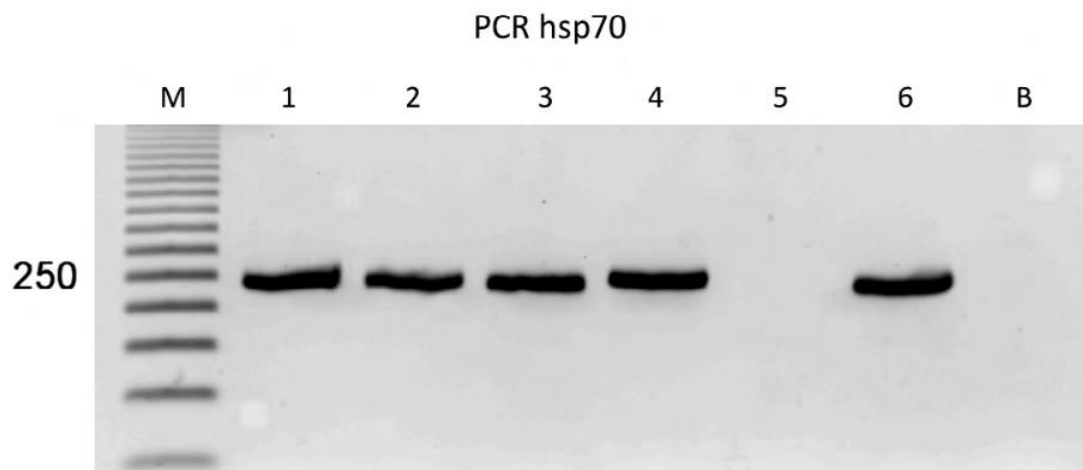
**Fuente:** Atlas interactivo de leishmaniasis en las Américas

**Anexo 3.** Gel de agarosa de electroforesis del análisis por PCR-RFLP de fragmentos del gen *mpi* de 6 especies de *Leishmania*: 1. *L. guyanensis*, 2. *L. panamensis*, 3. *L. braziliensis*, 4. *L. naiffi*, 5. *L. major* y 6. *L. mexicana*.



**Fuente:** 10.1371/journal.pntd.0007403

**Anexo 4.** Gel de PCR hsp70. M representa el marcador de peso molecular de 50 pb, 1-4 muestras clínicas positivas, 5 y 6 el control negativo y positivo respectivamente, y finalmente B representa un blanco.



**Fuente:** Atlas interactivo de leishmaniasis en las Américas