

EVALUACIÓN DEL DESEMPEÑO DIAGNÓSTICO DE PRUEBAS RÁPIDAS PARA LEISHMANIASIS VISCERAL

Investigador Principal: GIOVANNY ANDRES HERRERA OSSA

Grupo de Investigaciones Microbiológicas Universidad del Rosario (GIMUR)

Tutor temático: JUAN DAVID RAMÍREZ GONZÁLEZ, Ph.D

Grupo de Investigaciones Microbiológicas Universidad del Rosario (GIMUR)

juand.ramirez@urosario.edu.co

Tutor metodológico: MARIO OLIVERA, MD, M.Sc.

Grupo de parasitología. Instituto Nacional de Salud

moliverajr@gmail.com

UNIVERSIDAD DEL ROSARIO
Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud
UNIVERSIDAD CES
Facultad de Medicina
Bogotá, Febrero 28 de 2019



**EVALUACIÓN DEL DESEMPEÑO DIAGNÓSTICO DE PRUEBAS RÁPIDAS
PARA LEISHMANIASIS VISCERAL**

**Trabajo de investigación para optar al título de
MAGÍSTER EN EPIDEMIOLOGÍA**

PRESENTADO POR:

GIOVANNY ANDRES HERRERA OSSA

Tutor temático

JUAN DAVID RAMÍREZ GONZÁLEZ, Ph.D

Tutor metodológico

MARIO OLIVERA, MD, M.Sc.

UNIVERSIDAD DEL ROSARIO

Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud

UNIVERSIDAD CES

Facultad de Medicina

Bogotá, Febrero 28 de 2019

Nota de Salvedad de Responsabilidad Institucional

Las Universidades del Rosario y CES no se hacen responsables de los conceptos emitidos por los investigadores en su trabajo, solo velarán por el rigor científico, metodológico y ético del mismo en aras de la búsqueda de la verdad y la justicia.

CONTENIDO

	pág.
1. RESUMEN.....	9
2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	11
2.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	11
2.2 JUSTIFICACIÓN	13
2.3 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	14
3. MARCO TEÓRICO.....	15
3.1 GENERALIDADES DE LAS LEISHMANIASIS	15
3.2 TAXONOMÍA.....	16
3.3 FORMAS CLÍNICAS	17
3.3.1 Leishmaniasis Cutánea (LC).....	17
3.3.2 Leishmaniasis Cutánea Difusa (LCD).....	17
3.3.3 Leishmaniasis Mucosa (LM).....	19
3.3.4 Leishmaniasis Atípica (LA).....	19
3.3.5 Leishmaniasis Visceral (LV).....	19
3.4 EPIDEMIOLOGÍA DE LA LV	20
3.5 DIAGNÓSTICO DE LA LV	22
3.5.1 Diagnóstico parasitológico.....	22
3.5.2 Diagnóstico inmunológico	22
3.5.3 Detección molecular	27
4. HIPÓTESIS.....	30
5. OBJETIVOS	31
5.1 OBJETIVO GENERAL.....	31
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
6. METODOLOGÍA.....	32
6.1 ENFOQUE METODOLÓGICO DE LA INVESTIGACIÓN	32
6.2 TIPO DE ESTUDIO	32
6.3 POBLACIÓN	32
6.3.1 Población blanco.....	32

6.3.2 Población elegible	32
6.3.3 Población de estudio	32
6.4 DISEÑO MUESTRAL	33
6.5 CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y DE EXCLUSIÓN	33
6.5.1 Criterios de inclusión.....	33
6.5.2 Criterios de exclusión.....	33
6.6 DESCRIPCIÓN DE LAS VARIABLES.....	33
6.7 TÉCNICAS DE RECOLECCIÓN DE LA INFORMACIÓN	34
6.7.1 Fuentes de información	34
6.7.2 Proceso de obtención de información	35
6.8 CONTROL DE ERRORES Y SESGOS.....	35
6.8.1 Sesgo de selección	35
6.8.2 Sesgo de información	35
6.8.3 Sesgo de confusión	35
6.9 TÉCNICAS DE PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE LOS DATOS	35
6.10 PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS.....	36
6.10.1 Inmunofluorescencia Indirecta	36
6.10.2 rK39- ICT	36
7. CONSIDERACIONES ÉTICAS	38
8. RESULTADOS	39
8.1. CARACTERIZACIÓN DE LAS MUESTRAS INCLUIDAS EN EL ESTUDIO	
39	
8.2. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE LA LV EN EL PERIODO DE ESTUDIO	
40	
8.3. RESULTADOS COMPARATIVOS PARA LAS PRUEBAS APLICADAS EN	
HUMANOS	42
8.4. RESULTADOS COMPARATIVOS PARA LAS PRUEBAS APLICADAS EN	
CANINOS	42
8.5. COMPARACIÓN DE RESULTADOS OBTENIDOS POR TÍTULOS DE	
ANTICUERPOS.....	43
8.6. DESEMPEÑO DIAGNÓSTICO DE LAS PRUEBAS EVALUADAS.....	44
8.7. CURVAS ROC Y ÁREAS BAJO LA CURVA DE LAS PRUEBAS EVALUADAS	
.....	46

9. DISCUSIÓN.....48
10. CONCLUSIONES.....55

FIGURAS

	pág.
Figura 1. Ciclo de vida y organización estructural de <i>Leishmania</i>	16
Figura 2. Taxonomía de <i>Leishmania</i>	18
Figura 3. Formas clínicas de las Leishmaniasis.....	20
Figura 4. Distribución de la LV	21
Figura 5. Esquema del diagnóstico parasitológico	22
Figura 6. Esquema del procedimiento de Inmunofluorescencia Indirecta	23
Figura 7. Esquema del procedimiento de una ELISA.....	24
Figura 8. Esquema representativo de la proteína recombinante rK39	25
Figura 9. Esquema representativo de la proteína recombinante rK28	26
Figura 10. Esquema del funcionamiento de las pruebas inmunocromatográficas	27
Figura 11. Pruebas rápidas empleadas para la detección de anticuerpos anti-rK39	37
Figura 12. Caracterización de las muestras por año de recolección.....	40
Figura 13. Distribución geográfica de la LV en Colombia	41
Figura 14. Comparación del desempeño diagnóstico de las pruebas evaluadas	47
Figura 15. Curvas ROC de las pruebas rápidas evaluadas	477

TABLAS

	pág.
Tabla 1. Comparación de métodos para la tamización y diagnóstico de la LV.....	34
Tabla 2. Operacionalización de variables.....	34
Tabla 3. Comparación de resultados obtenidos por cada prueba para humanos vs IFI	42
Tabla 4. Comparación de resultados obtenidos por cada prueba para caninos vs IFI	43
Tabla 5. Resultados ICT según títulos de anticuerpos evaluados por IFI.....	43
Tabla 6. Desempeño diagnóstico de las pruebas evaluadas	45

1. RESUMEN

La Leishmaniasis Visceral (LV) es la forma mortal de las Leishmaniasis, la cual causa la muerte a más del 90% de los pacientes que la padecen. El diagnóstico de la LV se realiza a través de la observación directa del parásito lo que requiere procedimientos complejos por lo que su uso se restringe a centros especializados. Las pruebas inmunocromatográficas (ICT) son una alternativa de fácil realización y permiten un diagnóstico presuntivo de la enfermedad, tanto en humanos como en caninos, los cuales desempeñan un papel fundamental en el circuito epidemiológico de transmisión. Sin embargo, se ha demostrado la variabilidad que pueden presentar las pruebas de acuerdo con la zona geográfica donde se aplican. Por lo anterior, este estudio evaluó el desempeño diagnóstico de 4 pruebas inmunocromatográficas para LV (Kalazar *Detect*[™] y ad-bio Leishmania IgG/IgM Combo Rapid Test para muestras de humanos, DPP® CVL rapid test y Kalazar *Detect*[™] rapid test, Canine para muestras de caninos) en sueros provenientes de humanos y caninos de zonas endémicas de Colombia. Se seleccionaron 82 sueros de humanos y 70 de caninos diagnosticados como positivos por Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) y 74 sueros de humanos y 54 sueros de caninos diagnosticados como negativos. Para el caso de las muestras humanas las pruebas evaluadas no mostraron diferencias en cuanto a sensibilidad (91,5%), mientras que con la prueba ad-bio Leishmania IgG/IgM Combo Rapid Test se observó mayor especificidad (E=93,2%), valores predictivos (VPP=93,8%, VPN=90,8%) y razones de verosimilitud (RVP=13,54, RVN=0,09) frente a la prueba Kalazar *Detect*[™] (E=89,19% VPP=90,4%, VPN=90,4%, RVP=8,46, RVN=0,09). La prueba DPP® CVL rapid test aplicada en muestras de caninos demostró tener un mayor valor de sensibilidad (85,7% frente a 82,9% de la prueba Kalazar *Detect*[™] rapid test, Canine), sin embargo, los demás parámetros evaluados fueron inferiores (E=79,6% VPP=84,5%, VPN=81,1%, RVP=4,2, RVN=0,18) comparados con la prueba Kalazar *Detect*[™] rapid test, Canine (E=92,6% VPP=93,6%, VPN=80,6%, RVP=11,2, RVN=0,18). No se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas en las áreas bajo la curva de las pruebas tanto de humanos ($p=0,6596$) como de caninos ($p=0,3219$). Se concluye que las pruebas rápidas representan una herramienta de gran utilidad para la tamización de la LV, siempre y cuando se acompañen de un cuadro clínico sugestivo de la enfermedad, sin que se descarte totalmente la necesidad de la confirmación por las técnicas tradicionales. Se recomienda desarrollar pruebas rápidas basadas en las cepas del parásito circulantes en el país.

Palabras clave: Leishmaniasis Visceral, Pruebas rápidas, Desempeño diagnóstico

ABSTRACT

Visceral Leishmaniasis (VL) is the lethal clinical presentation of the Leishmaniasis, that causes the death of more than 90% of the patients that suffer it. The diagnosis of VL is made by the direct observation of the parasite that requires complex proceedings, and restricted to specialized centers. The Immunochromatographic Tests (ICT) are an easy-to-use alternative that allows to obtain a presumptive diagnosis of the disease, both in humans and dogs. The latter plays an important role on the epidemiological circuit of transmission. However, the variability that these ICTs can present has been demonstrated depending on the geographical area where they are applied. Therefore, this study evaluated the diagnostic performance of 4 ICTs for VL (Kalazar *Detect*[™] and ad-bio Leishmania IgG/IgM Combo Rapid Test for human samples, DPP® CVL rapid test and Kalazar *Detect*[™] rapid test, Canine, for canine samples) in sera of humans and canines from endemic areas of Colombia. We selected 82 human serum samples and 70 canine serum samples diagnosed as positive by Indirect Immunofluorescence and 54 human serum samples and 53 canine serum samples diagnosed as negative. The tests evaluated in human serum samples did not show any difference in terms of sensitivity (Se=91.5%). On the other hand, the ad-bio Leishmania IgG/IgM Combo Rapid Test showed more specificity (Sp=93.2%), predictive values (PPV=93.8%, NPV=90.8%) and likelihood ratios (PLR=13.54, NLR=0.09) than Kalazar *Detect*[™] test (Sp=89.19% PPV=90.4%, NPV=90.4%, PLR=8.46, NLR=0.09). The DPP® CVL rapid test applied on canine serum samples demonstrated more sensitivity than the Kalazar *Detect*[™] rapid test, Canine (85.7% vs 82.9%). Nevertheless, the other parameters evaluated were lower (Sp=79.6% PPV=84.5%, NPV=81.1%, PLR=4.2, NLR=0.18) compared to Kalazar *Detect*[™] rapid test, Canine (Sp=92.6% PPV=93.6%, NPV=80.6%, PLR=11.2, NLR=0.18). No statistically significant differences were evident in areas under the curve both for human ($p=0.6596$) and for canine tests ($p=0.3219$). We conclude that rapid tests represent a useful tool for the screening of VL, as long as they are accompanied by a symptomatology suggestive of the disease, without completely ruling out the need for confirmation by traditional techniques. It is recommended to develop rapid tests based on circulating strains of the parasite in the country.

Keywords: Visceral Leishmaniasis, Rapid Test, Diagnostic performance

2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

2.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las leishmaniasis son un conjunto de enfermedades causadas por parásitos flagelados del género *Leishmania*, que pueden ser transmitidos al humano y a otros mamíferos principalmente por insectos de la familia Psychodidae (1-4). Actualmente las leishmaniasis son catalogadas como las enfermedades más desatendidas y constituyen un serio problema de salud pública a nivel mundial, debido a su alta morbilidad y a las zonas donde se presentan la mayoría de los casos, las cuales son generalmente rurales o suburbanas; lo que dificulta el diagnóstico y tratamiento de los pacientes. Las leishmaniasis afectan a más de 12 millones de personas en 98 países y se estima que 350 millones están en riesgo de adquirir la infección, con una incidencia de 1,3 millones de casos nuevos por año (2, 3).

Las presentaciones clínicas de la enfermedad son: leishmaniasis cutánea (LC), leishmaniasis mucosa (LM) y Leishmaniasis Visceral (LV) (1, 4, 5). La Leishmaniasis Visceral (LV) es la forma clínica más grave y mortal de las Leishmaniasis, causando lesiones en órganos del sistema retículo endotelial que pueden llevar a la muerte de las personas que padecen la enfermedad (4). La LV está presente en diferentes regiones del mundo como Suramérica, Asia y África y se estima que anualmente se presentan entre 50 y 90 mil nuevos casos a nivel global (1). En Colombia entre los años 2008 y 2016 se presentaron 181 casos de LV, sin embargo, se estima que este número puede ser aún mayor debido al subregistro y a la dificultad que existe para el correcto diagnóstico de esta enfermedad en el país, donde la mayor parte de casos detectados por los sistemas de salud y vigilancia epidemiológica corresponden a brotes en diferentes focos endémicos del país (1, 6).

En los últimos años ha existido un aumento en el número de casos de LV en zonas urbanas, donde la presencia de los diferentes vectores y reservorios han facilitado la transmisión y aparición de brotes (1). Cabe destacar que, el perro (*Canis lupus familiaris*) desempeña un papel fundamental en el proceso de transmisión urbana, por ser un conocido reservorio del parásito y su estrecho contacto con el humano (7, 8). Por esto, durante la atención de brotes y alertas epidémicas, las autoridades sanitarias realizan muestreo tanto de las personas con sospecha de la enfermedad como de los perros y otros posibles reservorios que puedan estar facilitando la aparición de la LV. Sin embargo, el proceso de muestreo a este tipo de animales no es realizado de rutina, por lo que la información disponible sobre su papel dentro de la infección y transmisión del parásito en el país no es muy bien conocida.

Actualmente en Colombia el diagnóstico de LV se realiza mediante la observación directa de los parásitos en aspirado de médula ósea o bazo, o la Inmunofluorescencia indirecta (IFI), la cual es la técnica más empleada incluso por el Laboratorio Nacional de Referencia para la confirmación de los casos (Grupo de Parasitología, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, Colombia) (1, 6). Sin embargo, esta técnica solo es realizada como prueba confirmatoria, mientras que el aspirado de médula ósea está restringido a unos pocos centros médicos que cuentan con personal capacitado debido a la dificultad de su realización y a los riesgos que representa para los pacientes (1, 6). Por su parte, los hospitales que no cuentan con la posibilidad de realizar este examen deben remitir la muestra al Instituto Nacional de Salud (INS) para su confirmación, lo que produce demoras en la correcta atención y tratamiento de los pacientes, que en últimas puede derivar en su muerte. Actualmente, para la tamización de la enfermedad se dispone de pruebas rápidas basadas en inmunocromatografía (ICT) para la detección de anticuerpos dirigidos a diferentes antígenos (principalmente el rK39) el cual se encuentra en parásitos del complejo *L. donovani* (*L. donovani*, *L. archibaldi*, *L. infantum*, *L. infantum chagasi*), al cual pertenecen las especies causantes de la LV en el país. Sin embargo, estas pruebas han demostrado tener un desempeño diferencial de acuerdo con la zona del mundo donde se utilicen por lo cual es necesario la evaluación del desempeño diagnóstico en cada uno de los países antes de su aplicación (9).

En Colombia, no se cuentan con estudios comparativos que permitan determinar el rendimiento diagnóstico de las pruebas que se encuentran comercialmente disponibles, por lo que el Ministerio de Salud y Protección Social, no tiene un criterio definido para la compra de dichas pruebas, lo que en últimas puede redundar en riesgos para la población en la que se aplica la prueba. Por esto, el presente estudio pretendió evaluar el desempeño diagnóstico de 4 pruebas rápidas inmunocromatográficas para la detección de anticuerpos para tamización de Leishmaniasis Visceral en sueros provenientes de humanos y caninos de zonas endémicas de Colombia (2 pruebas en humanos y 2 en caninos) comparados con la Inmunofluorescencia Indirecta.

2.2 JUSTIFICACIÓN

La Leishmaniasis Visceral causa la muerte en más del 90% de los pacientes que la padecen y es considerada un problema de salud pública a nivel mundial, regional y local. El comité de expertos en Leishmaniasis de la Organización Mundial de la Salud han resaltado la necesidad de llegar a las zonas más alejadas con métodos que permitan de una forma rápida, sensible y específica realizar un diagnóstico confiable de las personas que padecen la enfermedad (10). En este sentido, el diagnóstico representa un desafío, ya que la obtención de la muestra para la técnica de referencia (Observación parasitológica directa) requiere de procedimientos que solo pueden ser realizados por personal altamente capacitado y que puede derivar en complicaciones para los pacientes, por lo que se debe ejecutar en instituciones especializadas.

En Colombia, como alternativa diagnóstica, el Instituto Nacional de Salud emplea la Inmunofluorescencia indirecta (IFI) como técnica de referencia a nivel nacional, la cual se puede realizar a partir de muestras de suero que puede ser obtenido de forma fácil y sin mayores complicaciones por personal de instituciones de primer nivel de atención (11). Esta prueba ha demostrado valores de sensibilidad y especificidad elevados (96 y 98% respectivamente) (12), sin embargo, tiene como desventajas que, en primer lugar requiere de equipos e instalaciones altamente especializadas, en segundo lugar, los anticuerpos pueden ser detectados incluso años después de la infección, por lo que las recidivas no son diagnosticadas de forma confiable, y en tercer lugar, en zonas endémicas se ha demostrado la reactividad en algunas personas sin antecedentes de la enfermedad debido a infecciones asintomáticas (13). Por esto, se recomienda que la prueba de anticuerpos siempre vaya acompañada de una definición clínica normalizada de caso de LV (14).

Las pruebas inmunocromatográficas (ICT) basadas en la detección de anticuerpos dirigidos al antígeno rK39, se han convertido en una herramienta de fácil utilización, que pueden ser usadas en campo y a un costo bajo, las cuales pueden ser aplicadas en muestras de suero cuya obtención no requiere de equipos ni personal altamente especializado (12, 15, 16). Estas ICT han demostrado valores de desempeño diagnóstico variables en diferentes estudios de acuerdo con la región evaluada (36,8 – 100% de sensibilidad y 90,8 – 100% de especificidad) (9, 17), por lo que la OMS recomienda que cada país realice una evaluación de estas pruebas para determinar la que mejor se ajuste a las condiciones propias de cada territorio (9).

En este sentido, es preciso destacar que, desde el Ministerio de Salud y Protección Social de Colombia no existe un lineamiento claro para la elección de la prueba a distribuir en los laboratorios de las zonas endémicas, ya que no existe evidencia

comparativa de las pruebas comercialmente disponibles en el país. De igual manera, no existe una indicación dentro del protocolo de vigilancia epidemiológica de la enfermedad para el diagnóstico de rutina de reservorios animales como el perro en las zonas urbanas, los cuales no solo desempeñan un papel fundamental en la transmisión de la enfermedad, sino que además se ha evidenciado la presencia de especies de diferentes complejos en perros con LV en el país (18), por lo que la sensibilidad y especificidad de estas pruebas pueden verse afectadas.

Por estas razones, se identificó la necesidad de evaluar comparativamente las pruebas rápidas para LV comercialmente disponibles con el fin de determinar su desempeño diagnóstico tanto en humanos como en caninos, ya que estos últimos desempeñan un papel fundamental dentro del circuito epidemiológico de transmisión. Con base en los hallazgos de esta investigación se pueden establecer lineamientos para la tamización de individuos en zonas endémicas, así como una recomendación técnica para el diagnóstico de caninos en estas áreas.

Esta investigación pretendió aportar evidencia del desempeño diagnóstico de las pruebas rápidas en el país, con el fin de determinar cuáles son las pruebas que mejor se ajustan a las condiciones locales. Esto con el fin de contribuir al mejoramiento de la cobertura diagnóstica de la LV, así como la reducción del subreporte de la enfermedad, ya que estas pruebas permiten su aplicación en las zonas más alejadas lo que beneficia directamente a la población de las zonas endémicas que se encuentran principalmente en áreas rurales. De igual manera, esta investigación contribuyó al diseño de una recomendación técnica por parte del Instituto Nacional de Salud sobre la tamización de caninos de zona endémica, ya que su papel como reservorios de la enfermedad y fuente de infección de humanos y otros animales es bien conocida.

2.3 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es el desempeño diagnóstico de 4 pruebas rápidas inmunocromatográficas para la detección de anticuerpos para tamización de Leishmaniasis Visceral en sueros provenientes de humanos y caninos de zonas endémicas de Colombia (2 pruebas en humanos y 2 en caninos) comparados con la Inmunofluorescencia Indirecta?

3. MARCO TEÓRICO

3.1 GENERALIDADES DE LAS LEISHMANIASIS

Las Leishmaniasis son un conjunto de enfermedades parasitarias causadas por protozoos del género *Leishmania*, los cuáles son transmitidos al humano y a los animales por insectos flebotomíneos de los géneros *Phlebotomus* en el viejo mundo y *Lutzomyia*, *Bichromomyia*, *Nyssomyia*, *Pintomyia*, *Psathyromyia* y *Psichodopygus* en el nuevo mundo (2, 4, 5, 19-21)

El ciclo de vida (Figura 1 A) inicia cuando un insecto hembra infectado, durante la ingesta de sangre transfiere a los mamíferos el estadio móvil flagelado denominado promastigote (Figura 1 B), el cual es liberado mediante regurgitación. La picadura del insecto libera una gran cantidad de sustancias que favorecen el reclutamiento de neutrófilos y macrófagos al sitio de la infección, los cuales son invadidos por el parásito mediante unión de moléculas que se encuentran en su superficie con receptores de membrana de las células. Cabe resaltar, además, que otras células como fibroblastos y células de Langerhans pueden ser infectadas por el parásito (22); el papel de los neutrófilos aún no es claro, sin embargo, se cree que actúan como “caballos de troya” para facilitar el ingreso silencioso a los macrófagos que son las células hospederas definitivas de *Leishmania* (23). El contacto de las moléculas de superficie estimula la internalización del parásito, lo que da paso a la formación de una vacuola parasitófora, en la cual el promastigote cambia al estadio de amastigote (Figura 1 C) paralelo a la formación del fagolisosoma por la fusión de dicha vacuola con lisosomas de la célula hospedera. En el interior de dicho fagolisosoma, los amastigotes se multiplican intensamente produciendo una ruptura de la membrana del macrófago y su posterior liberación al tejido. Una vez allí, pueden invadir otros macrófagos o ser ingeridos por un insecto hembra durante su alimentación (22, 24). Dentro del insecto, la sangre con amastigotes llega al intestino medio, donde el nuevo entorno favorece la transformación al estadio replicativo promastigote procíclico el cual va sufriendo pequeños cambios en su proceso de maduración hasta transformarse en promastigote metacíclico el cual es infectivo para los mamíferos, comenzando nuevamente el ciclo (22).

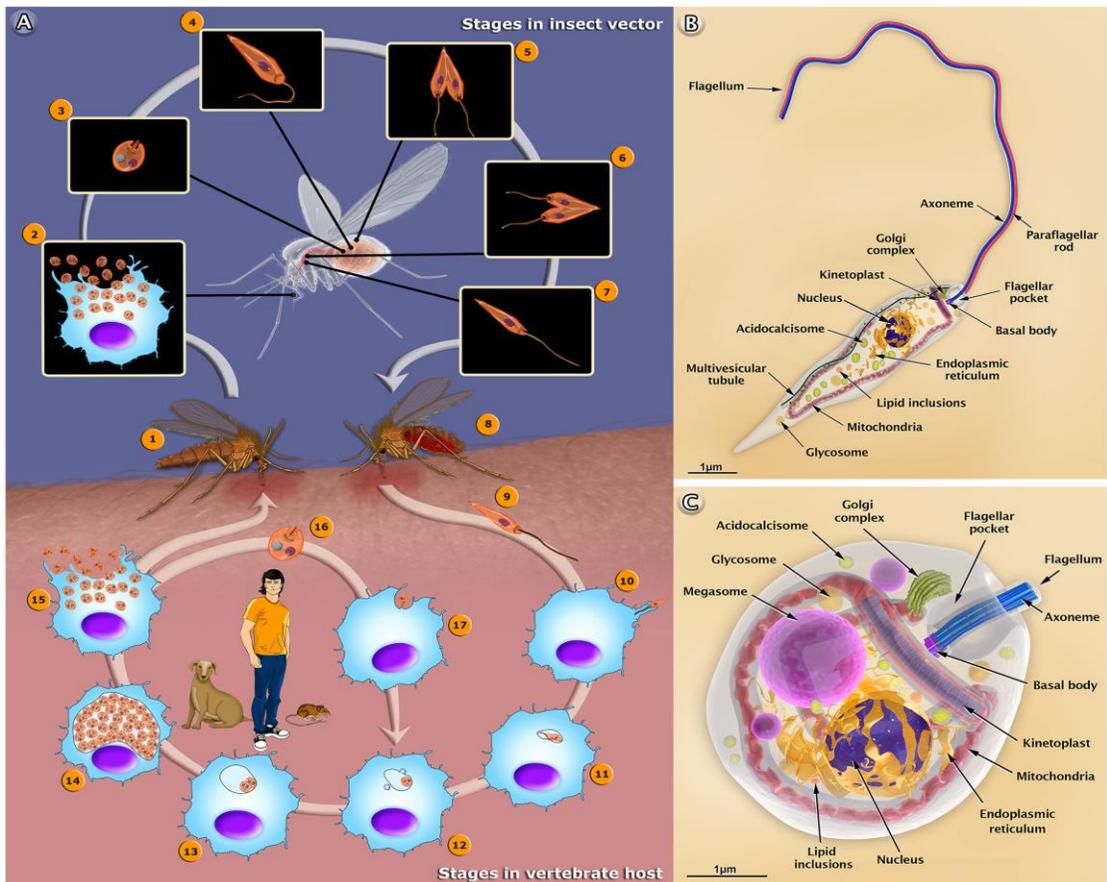


Figura 1. Ciclo de vida y organización estructural de *Leishmania*.
A) Ciclo de vida de *L. amazonensis* **B)** Organización estructural del promastigote **C)** Organización estructural del amastigote. Tomado de Teixeira y colaboradores (22)

3.2 TAXONOMÍA

Los parásitos del género *Leishmania* pertenecen al reino Protozoa, Orden Trypanosomatida, Familia Trypanosomatidae y Género *Leishmania* (Figura 2). 53 especies se han descrito y, 20 de ellas, han sido reportadas causando infección en el humano. El subgénero *Viannia*, el cual es uno de los 5 subgéneros del género *Leishmania* (*Viannia*, *Leishmania*, *Sauroleishmania*, *Paraleishmania* y *Mundinia*), está restringido al neotrópico, presentándose casos con las especies de este subgénero únicamente en el Nuevo Mundo (25). Algunas especies han sido asociadas con determinadas presentaciones clínicas, debido al tropismo que tienen

por ciertos tejidos como la médula ósea, el bazo y las mucosas, siendo importantes *L. infantum* y *L. donovani* en Leishmaniasis Visceral, *L. amazonensis* y *L. aethiopica* en Leishmaniasis cutánea difusa y *L. braziliensis* en Leishmaniasis Mucosa, sin embargo, ninguna presentación clínica es exclusiva de una sola especie (6, 24-26). En Colombia, se ha reportado la presencia de 10 especies (*L. panamensis*, *L. guyanensis*, *L. mexicana*, *L. braziliensis*, *L. infantum chagasi*, *L. colombiense*, *L. lainsoni*, *L. naiffi*, *L. amazonensis* y *L. equatoriensis*), convirtiéndose así, en el país con el mayor número de especies circulantes en el mundo (27, 28)

3.3 FORMAS CLÍNICAS

En el continente Americano pueden observarse un amplio espectro de manifestaciones clínicas, en las que puede estar involucradas una gran diversidad de especies. Como se mencionó anteriormente, algunas manifestaciones se asocian a determinadas especies o subgéneros, sin que exista una restricción a una sola especie de una determinada presentación (24, 29). Las formas clínicas que se pueden observar en América son:

3.3.1 Leishmaniasis Cutánea (LC): Representa más del 98% de los casos de Leishmaniasis en el país (30). Inicialmente las lesiones se presentan como pápulas o nódulos que se van ulcerando dependiendo del tiempo de evolución de la lesión, la especie del parásito involucrada y la respuesta inmune del hospedero. Típicamente las úlceras son redondas u ovaladas de bordes indurados y fondo granular que suelen ser indoloras (Figura 3A) (4-6, 24).

En América, La LC presenta 2 variantes clínicas que son: LC localizada, en la que se presenta una úlcera única generalmente en el sitio expuesto a la picadura del insecto vector; y LC diseminada que se caracteriza por presentar pápulas infiltradas eritematosas que se necrosan principalmente en las extremidades (4-6, 24, 31).

3.3.2 Leishmaniasis Cutánea Difusa (LCD): En esta forma clínica se compromete la piel, no solo en el sitio de picadura del insecto flebótomo. Se observan nódulos, pápulas y placas generalmente en las extremidades producidas por un defecto específico en la inmunidad celular, cuando disminuye la respuesta de tipo Th1. Esta forma clínica es más común en pacientes inmunocomprometidos (Figura 3B) (31, 32).

3.3.3 Leishmaniasis Mucosa (LM): Esta forma se presenta entre el 1 y el 1,5% de los casos de LC. Se caracteriza por presentar lesiones eritematosas en mucosa nasal, paladar, laringe y faringe. Las lesiones en estados avanzados pueden producir perforación y destrucción del tabique. La migración hacia las mucosas ocurre por diseminación linfática o hematógena del parásito, o por contigüidad con el sitio de la infección cuando se presenta la picadura en el rostro. Esta forma clínica suele estar acompañada de sobreinfección bacteriana que puede llevar a complicaciones por compromiso del tracto respiratorio (Figura 3C) (4, 6, 24).

3.3.4 Leishmaniasis Atípica (LA): Esta forma clínica se describe en aquellos pacientes en los cuales la presentación de las lesiones no concuerda con lo descrito anteriormente (34). Se pueden presentar lesiones de tipo esporotricode, erisipeloide, cutis recidiva o zosteriforme, así como lesiones papulares, acneiformes y úlceras en segmentos corporales no contiguos (34, 35). Se atribuye a diferentes causas como comorbilidades, estado de inmunosupresión, embarazo, condiciones ambientales y cepa involucrada en la infección. Es una forma clínica recientemente descrita para la cual no se han establecido guías de manejo clínico (Figura 3D) (35)

3.3.5 Leishmaniasis Visceral (LV): En Colombia, esta forma representa menos del 1% de los casos. Es una enfermedad sistémica que puede resultar fatal cuando no se administra tratamiento. En el continente americano se presenta de forma endémica en algunas regiones de Brasil, Argentina, Paraguay y Colombia principalmente, aunque también se puede encontrar de forma esporádica en otras regiones del continente. La mayor parte de los casos se presenta en pacientes menores de 10 años, aunque se puede observar en adultos principalmente en zonas donde la enfermedad se ha establecido de forma reciente. Algunos casos pueden presentarse de forma asintomática, mientras que en personas con algunos factores de riesgo como malnutrición, comorbilidades, factores genéticos e inmunocompromiso, la enfermedad se presenta de forma clínicamente manifiesta. La transmisión se puede dar de forma antroponótica (Humano – vector – Humano) o antropozoonótica (Animal – Vector – Humano). El principal reservorio del parásito es el perro doméstico (*Canis lupus familiaris*), el cual desempeña un papel fundamental por su estrecho contacto con los humanos, lo que puede facilitar la transmisión del parásito.

El periodo de incubación se estima entre 2 y 6 meses, seguido de signos y síntomas de infección sistémica como fiebre, pérdida de peso, pérdida de apetito, debilidad, fatiga, hepato – esplenomegalia y leucopenia. Esta sintomatología se presenta cuando el parásito migra desde las células del sistema retículo endotelial vía linfática

o hematógica hasta la médula ósea, bazo e hígado, donde invade los macrófagos aumentando el riesgo progresivo de poliadenopatías y anemia (Figura 3E) (4, 6, 13, 24, 36)

Para efectos de la presente investigación, el tema de interés es la Leishmaniasis Visceral, por lo tanto, los temas que se presentarán a continuación se enfocarán únicamente en esta forma clínica.



Figura 3. Formas clínicas de las Leishmaniasis. A. Leishmaniasis Cutánea. B. Leishmaniasis Cutánea Difusa. C. Leishmaniasis Mucosa. D. Leishmaniasis Atípica. E. Leishmaniasis Visceral. Imágenes tomadas de Reithinger y colaboradores, Guimarães y colaboradores, Bruschi y colaboradores, y Standford University (32, 37-39)

3.4 EPIDEMIOLOGÍA DE LA LV

Anualmente en el mundo, se estima que ocurren aproximadamente 1.3 millones de casos nuevos de Leishmaniasis en todas sus formas, de los cuales 300.000 corresponden a la LV (40). Esta presentación clínica está presente en 76 países del mundo, con una concentración del 90% de los casos en Bangladesh, Brasil, Etiopía, India, Nepal, Sudán del Sur y Sudán) (1, 36, 40). Se estima que el número de muertes por la LV varía entre 20.000 y 50.000 (40)

En el continente americano la enfermedad es endémica en 12 países, siendo Brasil el más afectado con el 96% de los reportes (41). Argentina, Brasil y Paraguay representan un escenario especial para la enfermedad, ya que son considerados países con transmisión en expansión, mientras que Colombia y Venezuela presentan una transmisión estable (42). A nivel continental entre los años 2001 y 2016 se presentaron 55.530 casos con un promedio anual de 3.457 casos, destacándose un incremento en los últimos años en Colombia y Venezuela (41). En términos de distribución por género, la enfermedad se presenta en mayor proporción en hombres, siendo los niños menores de 5 años los más

afectados por esta problemática en Colombia, país en el cual se presentaron 181 casos entre 2008 y 2016 (1, 6).

A nivel local la transmisión de la LV se da principalmente en focos endémicos ubicados en los departamentos de Bolívar, Sucre, Córdoba, Cundinamarca, Tolima, Santander, Norte de Santander y Huila (6). Si bien es cierto que cualquier especie que causa LV tiene la capacidad de visceralizar, en general, los casos de LV en humanos se atribuyen a las especies del complejo *L. donovani*, siendo *L. infantum chagasi* la especie más frecuentemente encontrada en el continente americano, así como en Colombia (42). En los caninos por su parte, además de los casos producidos por *L. infantum chagasi*, se ha evidenciado el papel de otras especies como *L. braziliensis* y *L. amazonensis* en el desarrollo de LV (18, 43, 44).

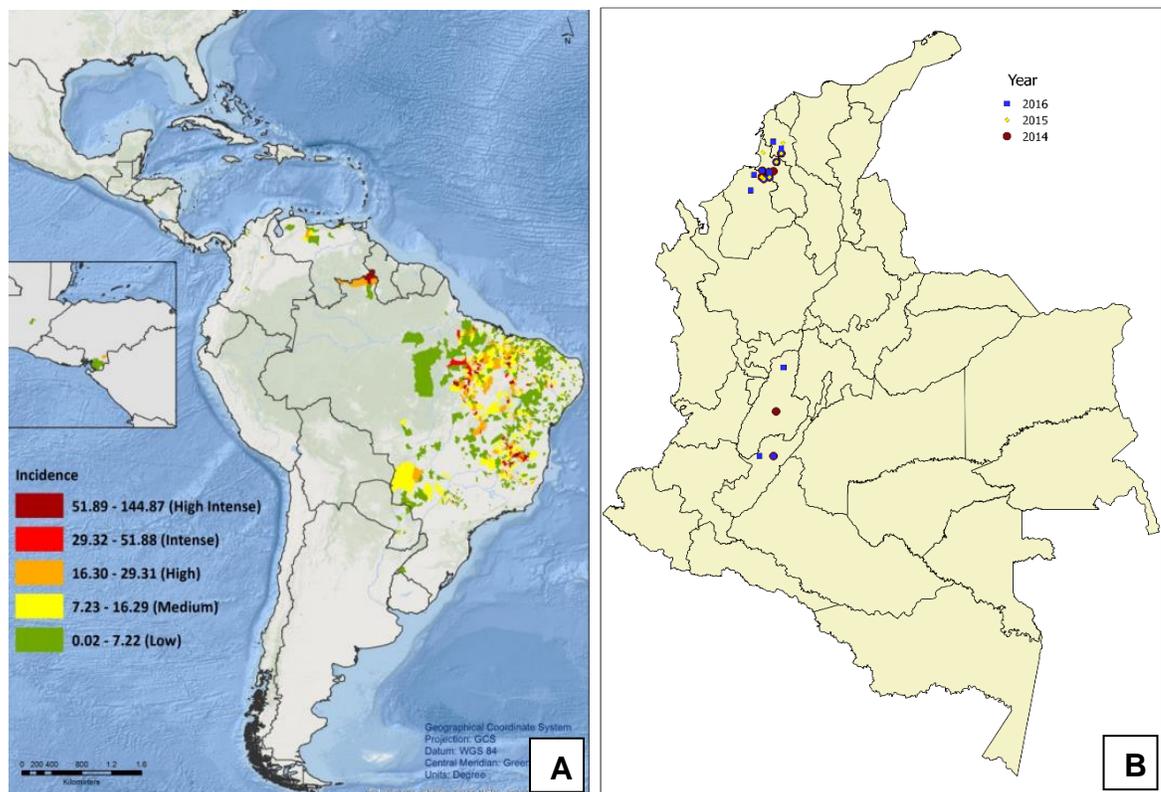


Figura 4. Distribución de la LV. A. Incidencia de LV en Suramérica por país. (Tomado de OPS) (40). B. Distribución de casos de LV en Colombia entre 2014 y 2016

3.5 DIAGNÓSTICO DE LA LV

3.5.1 Diagnóstico parasitológico: La observación de los amastigotes a través del microscopio de muestras de aspirado médula ósea, nódulos linfáticos o bazo continúa siendo la prueba confirmatoria para el diagnóstico de la enfermedad (Figura 5) (13). Esta prueba presenta una especificidad cercana al 100%, sin embargo, la sensibilidad varía entre 50 y 99% dependiendo del operador, la calidad de la coloración y el órgano del que proviene la muestra, siendo más elevada en muestras de bazo y médula ósea (13, 14).

Esta técnica tiene como desventaja que el procedimiento necesario para la obtención de la muestra (aspirado de médula ósea) debe realizarse en centros hospitalarios de segundo o tercer nivel de complejidad debido a las complicaciones que se pueden presentar (14).



Figura 5. Esquema del diagnóstico parasitológico. A) Extracción de médula ósea, B) Tinción citoquímica con Hematoxilina-Eosina o Giemsa, C) amastigotes observados al microscopio en muestra de médula ósea. Imágenes tomadas de diversas fuentes (45-47)

3.5.2 Diagnóstico inmunológico

- **Inmunofluorescencia Indirecta (IFI):** Este procedimiento consiste en la detección de la unión de anticuerpos anti-*Leishmania* a los promastigotes de *Leishmania* spp. El proceso inicia al tomar suero de los pacientes con sospecha de la LV, los cuales pueden contener anticuerpos IgG anti-*Leishmania*. Dicho suero es puesto en contacto con láminas impregnadas con antígeno total de promastigotes de *Leishmania infantum chagasi*. Posterior a la unión de estos anticuerpos al antígeno total, se adicionan Inmunoglobulinas G anti-humanas conjugadas a una molécula de Isotiocianato de Fluoresceína. Posterior a la unión del conjugado se realiza la observación a través de un microscopio de fluorescencia y se evalúan los

títulos de anticuerpos a través de diluciones seriadas (Figura 6) (11). En diversas investigaciones se han demostrado aceptables valores de sensibilidad (80 – 100%) y especificidad (90 – 100%) tanto en muestras humanas como de caninos (12, 48-51). Actualmente, esta técnica es realizada como procedimiento confirmatorio de un caso sospechoso de LV en el Instituto Nacional de Salud (6). De igual manera, para el diagnóstico de VL en caninos, la OIE recomienda su realización como prueba confirmatoria (51). Dentro de sus desventajas se resalta la necesidad de instalaciones y equipos especializados, personal capacitado, así como el hecho de la permanencia de los anticuerpos hasta 16 años después de completar el tratamiento (12, 14, 48).

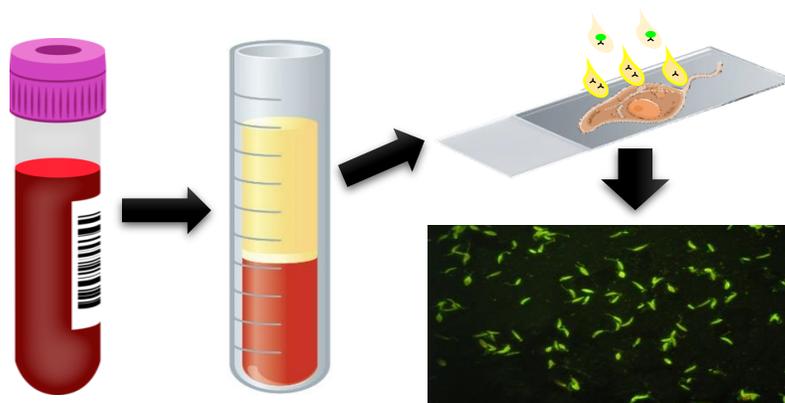


Figura 6. Esquema del procedimiento de Inmunofluorescencia Indirecta. Se observa el paso a paso desde la obtención de suero a partir de una muestra de sangre, la cual es puesta en contacto con láminas sensibilizadas con parásitos inmobilizados, cuya visualización se realiza por medio de la adición de anti-IgG humana unida a Isotiocianato de Fluoresceína. Finalmente se muestra el resultado del proceso visto por medio de un microscopio de fluorescencia. Imágenes tomadas de diversas fuentes (52-56).

- **Ensayo por inmuno-adsorción ligado a enzima (ELISA):** La detección de anticuerpos anti-*Leishmania* es ampliamente utilizada a nivel mundial para el diagnóstico de la LV. Sin embargo, su sensibilidad y especificidad depende en gran medida del antígeno empleado, ya que antígenos crudos o solubles pueden producir reacciones cruzadas (13, 57). Algunos estudios han empleado antígenos crudos para la detección de anticuerpos anti-*Leishmania*, obtenidos a través de procesos que implican cambios sucesivos de temperatura hasta lisar los parásitos obtenidos de cultivo (14, 48). En dichos estudios se han evidenciados valores elevados de sensibilidad (80 – 100%), sin embargo, se ha documentado reacciones cruzadas en sueros de pacientes con Enfermedad de Chagas, tuberculosis y toxoplasmosis (48).

Con el fin de disminuir la proporción de falsos positivos, algunos autores han realizado estudios empleando antígenos selectivos de diferentes masas (66 kDa, 72 kDa, 116 kDa), los cuales han mostrado especificidad de hasta el 100% con una disminución de la sensibilidad hasta el 37,5% (58, 59). Para el año 1995 se describió un ligando fucosa-manosa como antígeno para el diagnóstico de la LV, el cual al ser usado mediante ELISA mostró valores de sensibilidad y especificidad de 100% y 96% respectivamente (60).

Estudios más recientes han evidenciado una sensibilidad de hasta 95% de una ELISA empleando antígenos solubles derivados de promastigotes cultivados en medios libres de proteínas (61-63). Con el desarrollo de antígenos recombinantes como el rK28 y rK39 la técnica presentó valores de sensibilidad y especificidad cercanos al 100% (12, 13, 48, 64, 65). Otros antígenos recombinantes empleados en algunas investigaciones para el diagnóstico de LV tanto por ELISA como por otros métodos similares son el rK9, rK26, Ld-rKE16, rKLO8, rKr95 y rTR18 y rKRP42 con resultados variables, resaltándose el uso de orina para la detección de anticuerpos con algunos de estos antígenos (63, 66-69). Dentro de sus desventajas se resaltan los costos de los antígenos recombinantes, las reacciones cruzadas que impiden su utilización en zonas endémicas para enfermedad de Chagas, el empleo de equipos y personal especializados (13, 14). En la figura 7 se observa un esquema de su realización.

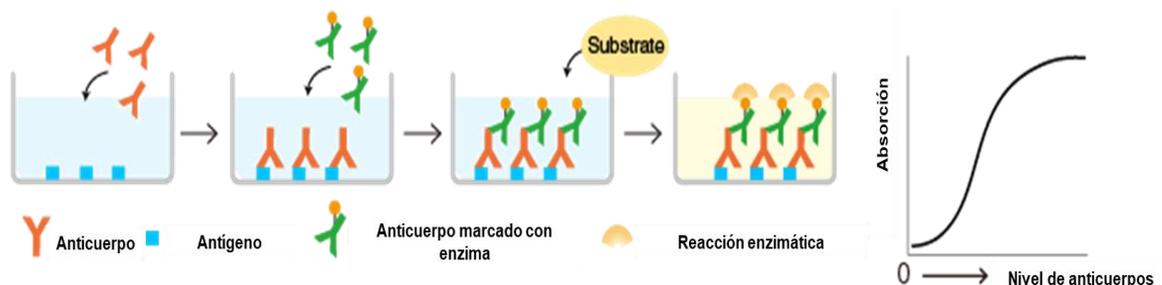


Figura 7. Esquema del procedimiento de una ELISA. Adaptado de página web (70).

- **Reacción de Montenegro:** Es una prueba de hipersensibilidad tardía que únicamente indica contacto previo con el parásito, generalmente en las 4 semanas posteriores al contacto. Se realiza mediante la inoculación intradérmica de un antígeno de *Leishmania*. La zona se delimita y se observa la presencia de induración entre las 48 y 72 horas posteriores a la aplicación. Como principal

desventaja se encuentra que no es una prueba que permita realizar diagnóstico (13, 48).

• **Pruebas rápidas Inmunocromatográficas (ICT):** Los problemas que se presentan con las técnicas anteriormente expuestas, así como la necesidad de realizar el diagnóstico en campo motivaron el desarrollo de las pruebas de diagnóstico rápido basadas en inmunocromatografía. Estas pruebas han sido diseñadas con base en proteínas recombinantes, siendo la rK39 una de las más ampliamente utilizadas, la cual es un antígeno tipo kinesina codificado en los genes de *L. infantum chagasi* descrito por primera vez por Burns y colaboradores en 1992 (71). Este antígeno, junto con el rK28 han sido ampliamente utilizados para el diagnóstico de LV, tanto en muestras de suero como de orina (9, 14, 17, 48, 67, 72-77). La proteína rK39 es una proteína de 230 kDa que contiene repeticiones de 39 aminoácidos (figura 8), con homología a la súper-familia de las kinesinas, las cuales son proteínas motoras, involucradas en una variedad de funciones al interior de las células como lo son el transporte vesicular, segregación cromosómica, fusión nuclear y movimiento flagelar, gracias a la presencia de motores basados en microtúbulos (71). Con base en la reacción de los sueros de pacientes de diferentes zonas geográficas con esta proteína, se han diseñado métodos serológicos para la detección de anticuerpos (12, 14)

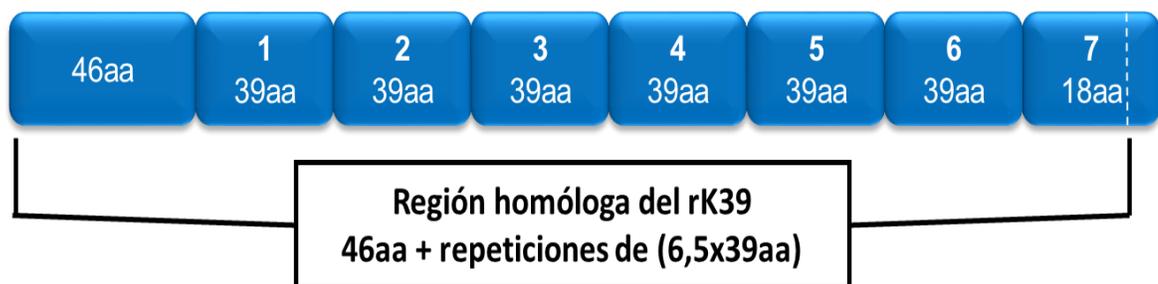


Figura 8. Esquema representativo de la proteína recombinante rK39. Adaptado de Bhattacharyya *et al* (67)

De igual manera, la proteína rK28 ha sido recientemente descrita y evaluada para el diagnóstico de la LV (78). Esta proteína recombinante está compuesta por la unión de proteínas anteriormente descritas, como la kinesina de *L. donovani* LdK39, reportada en Sudan, y las proteínas hidrofílicas B de superficie acilada 1 y 2 (HASP B1 y HASP B2) (Figura 9) (78). Mediante el empleo de esta proteína se han reportado valores de sensibilidad y especificidad de 96,8% y 96,2% respectivamente (72, 78).

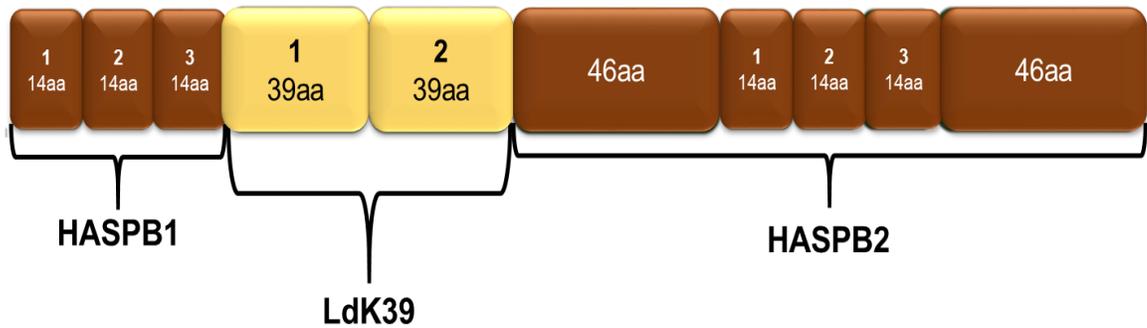


Figura 9. Esquema representativo de la proteína recombinante rK28. Adaptado de Bhattacharyya *et al* (67)

En términos generales las pruebas rápidas funcionan mediante la adición de una muestra (suero, sangre, plasma, saliva, etc) en un pozo o sector de una tira de nitrocelulosa, en el cual se encuentra una cantidad determinada de antígeno recombinante marcado con un indicador (generalmente oro coloidal) que permiten la visualización de la reacción. Si en la muestra se encuentran anticuerpos anti-rK39, estos se unen al antígeno presente en dicho sector de la tira reactiva formando un inmunocomplejo. Este inmunocomplejo va migrando por capilaridad posterior a la adición de un buffer de corrido, el cual funciona como fase móvil de la cromatografía. En el sector denominado de prueba o Test de la tira, se encuentran anticuerpos de captura fijados a la membrana, los cuales son anticuerpos antihumanos que se unen al inmunocomplejo cuya presencia se visualiza por la formación de una línea en el sector de prueba. Finalmente, el antígeno restante continúa migrando a través de la membrana hasta la zona de control, en la cual se encuentran anticuerpos anti-rK39, que capturan el antígeno marcado con oro coloidal para demostrar que hubo migración desde la zona de siembre de la muestra hasta el final de la membrana, dando como resultado la presencia de una banda. En caso de que la muestra no contenga anticuerpos anti *Leishmania*, el antígeno migrará a lo largo de la tira hasta el sector de control, donde será capturado por el anticuerpo anti-rK39 (17, 79). El esquema de las pruebas y el procedimiento se observa en la figura 10.

Diversos estudios han evidenciado que estas pruebas presentan valores de sensibilidad y especificidad superiores al 90% y, a pesar de la variabilidad mostrada en el desempeño diagnóstico en algunas partes del mundo como Asia y África, se resalta que su facilidad de aplicación las convierten en herramientas de gran utilidad para su aplicación en campo como pruebas de tamización para LV (9, 17, 77, 79, 80)

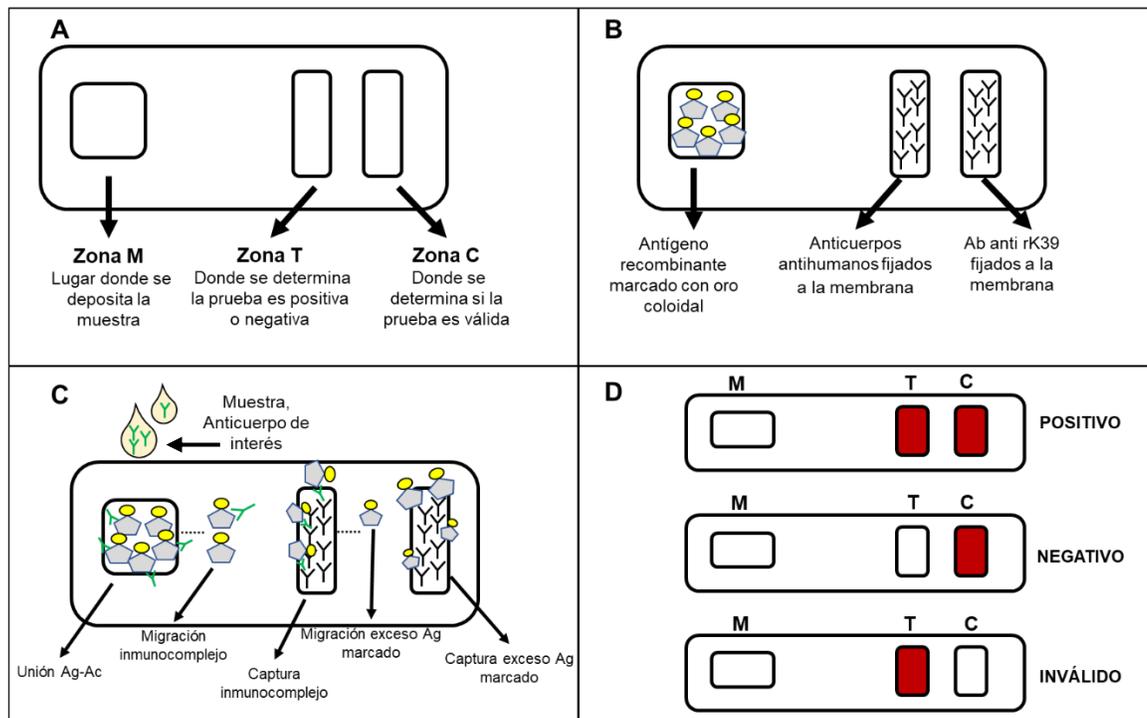


Figura 10. Esquema del funcionamiento de las pruebas inmunocromatográficas. Adaptado de (81)

3.5.3 Detección molecular: Diversas aproximaciones moleculares se han desarrollado para el diagnóstico de LV. La detección del ADN del parásito empleando blancos moleculares como ADN del kinetoplasto, el espaciador del transcrito interno ITS-1 y la subunidad pequeña del ADN ribosomal ha sido ampliamente investigada en diversos estudios con resultados variables (13, 48), así como también se han empleado otros marcadores para la detección, identificación, discriminación, cuantificación y tipificación de las especies involucradas (82). Debido a la baja parasitemia circulante que se presenta en la LV, se ha optado por emplear muestras de aspirados de médula ósea, así como de hígado y bazo limitando su utilización a investigación (82). Estas técnicas presentan como desventaja que detectan el ADN del parásito incluso tiempo después del tratamiento, por lo que su utilización debe estar acompañada de un cuadro clínico sugestivo de la enfermedad (13, 48).

La tabla 1 agrupa las principales características de los diferentes métodos empleados para la tamización y diagnóstico de la LV

Tabla 1. Comparación de métodos para la tamización y diagnóstico de la LV

Técnica	Ventajas	Desventajas	Sensibilidad	Especificidad	Ref.
Diagnóstico parasitológico	<ul style="list-style-type: none"> • No requiere de exámenes complementarios para confirmar diagnóstico • Bajo costo • Altamente específica • Poco tiempo para su procesamiento 	<ul style="list-style-type: none"> • Personal y equipos especializados para obtención de la muestra • No aplicable en campo • Bajas parasitemias pueden llevar a falsos negativos • Sensibilidad variable 	53 – 99%	95 – 100%	(12, 16, 24, 57)
IFI	<ul style="list-style-type: none"> • Altamente específica • Altamente estandarizado 	<ul style="list-style-type: none"> • Para confirmar diagnóstico se requiere acompañar de la historia clínica • Requiere personal y equipos especializados • No aplicable en campo • Anticuerpos detectables años después del tratamiento • Falsos positivos en zonas endémicas 	80 - 100%	90 – 100%	(12, 13, 36, 48, 83)
ELISA	<ul style="list-style-type: none"> • Altamente sensible • Detecta bajos niveles de anticuerpos 	<ul style="list-style-type: none"> • Costoso • Para confirmar diagnóstico se requiere acompañar de la historia clínica • Requiere personal y equipos especializados • No aplicable en campo 	80 - 100%	90 – 100%	(12, 48, 57, 64, 69, 72, 82)

		<ul style="list-style-type: none"> • Anticuerpos detectables años después del tratamiento • Falsos positivos en zonas endémicas • Reacciones cruzadas 			
Molecular	<ul style="list-style-type: none"> • Altamente específico • Buen comportamiento en fases agudas • Diversas muestras se pueden emplear para su realización 	<ul style="list-style-type: none"> • Para confirmar diagnóstico se requiere acompañar de la historia clínica • Personal y equipos especializados para su realización • No aplicable en campo • Bajas parasitemias pueden llevar a falsos negativos • Sensibilidad variable • Detecta ADN, por lo que puede dar falsos positivos ante la presencia de parásitos muertos 	80 – 90%	92 – 98%	(48, 82)
Prueba rápida	<ul style="list-style-type: none"> • Bajo costo • Buenos valores de sensibilidad y especificidad • Fácil realización • Aplicables en campo • Resultados en poco tiempo 	<ul style="list-style-type: none"> • Variabilidad de acuerdo a la zona geográfica • No es apto para seguimiento ni recaídas • Falsos positivos en zonas endémicas • Baja sensibilidad en pacientes VIH positivos 	90 – 100%	90 – 100%	(12, 17, 48, 76, 77, 79, 80, 82, 84, 85)

4. HIPÓTESIS

- H_0 : El desempeño diagnóstico de todas las pruebas rápidas es igual
- H_a : Al menos una de las pruebas rápidas tiene un desempeño diagnóstico diferente

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el desempeño diagnóstico de 4 pruebas rápidas inmunocromatográficas para la detección de anticuerpos para tamización de Leishmaniasis Visceral en sueros provenientes de humanos y caninos de zonas endémicas de Colombia (2 pruebas en humanos y 2 en caninos)

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Describir los años de recolección y títulos de anticuerpos de las muestras incluidas en el estudio
- Establecer la distribución geográfica de la LV en Colombia durante el periodo de estudio
- Determinar la Sensibilidad diagnóstica, Especificidad diagnóstica, Valores Predictivos, Razones de Verosimilitud de 2 pruebas rápidas para detección de anticuerpos anti-rK39 para tamización de Leishmaniasis Visceral en humanos en comparación con la Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)
- Determinar la Sensibilidad diagnóstica, Especificidad diagnóstica, Valores Predictivos, Razones de Verosimilitud de 2 pruebas rápidas para detección de anticuerpos anti-rK39 para tamización para tamización de Leishmaniasis Visceral en caninos en comparación con la Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)

6. METODOLOGÍA

6.1 ENFOQUE METODOLÓGICO DE LA INVESTIGACIÓN

Este estudio es de enfoque cuantitativo, ya que realizó una comparación entre el desempeño diagnóstico de diferentes pruebas.

6.2 TIPO DE ESTUDIO

Estudio de evaluación de prueba diagnóstica.

6.3 POBLACIÓN

A continuación, se detalla la población blanco, elegible y de estudio

6.3.1 Población blanco: Sueros de pacientes con LV adquirida en Colombia confirmada por cuadro clínico y títulos de anticuerpos iguales o superiores a 1:32 mediante IFI y sueros de pacientes con diagnóstico negativo de la enfermedad.

6.3.2 Población elegible: Sueros de pacientes con cuadro clínico compatible con LV que llegaron al laboratorio nacional de referencia del Instituto Nacional de Salud para su confirmación diagnóstica entre junio de 2008 y junio de 2018 y en los que se obtuvieron títulos de anticuerpos iguales o superiores a 1:32 mediante IFI.

6.3.3 Población de estudio: Se utilizaron 82 sueros de humanos y 70 de caninos con cuadros clínicos compatibles con LV y con títulos de anticuerpos iguales o superiores a 1/32 confirmados por IFI en el laboratorio nacional de referencia del Instituto Nacional de Salud recolectados entre junio de 2008 y junio de 2018.

Se emplearon, además, 74 sueros de humanos y 54 de caninos con cuadros clínicos sugestivos de LV y otras entidades diferenciales como Enfermedad de Chagas con títulos de anticuerpos inferiores a 1/32 confirmados por IFI en el INS que llegaron

en el mismo periodo y con diagnóstico de las otras entidades diferenciales que cumplieron con los criterios de inclusión definidos en la presente investigación.

6.4 DISEÑO MUESTRAL

Debido a la baja prevalencia de la enfermedad en el país y al subreporte que existe, se tomaron todas las muestras clasificadas como positivas por IFI en los últimos 10 años (junio de 2008 – junio de 2018), esto con el fin de tener un marco muestral adecuado. De igual manera se recolectaron muestras sugestivas de la enfermedad clasificadas como negativas por IFI

6.5 CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y DE EXCLUSIÓN

6.5.1 Criterios de inclusión: Sueros de humanos y caninos diagnosticados como positivos o negativos por IFI para LV que contaban con el volumen suficiente para la realización de todas las pruebas (Aproximadamente 150 μ L) recolectados entre junio de 2008 y junio de 2018

6.5.2 Criterios de exclusión: Sueros lipémicos que no pudieron ser procesados debido a su contextura.

6.6 DESCRIPCIÓN DE LAS VARIABLES

La descripción de las variables se presenta en la tabla 1

Tabla 2. Operacionalización de variables

Nombre Variable	Descripción	Tipo	Clasificación dentro del estudio	Escala	Unidad de Medida
Diagnóstico IFI	Resultado del examen de IFI	Cualitativa dicotómica	Comparación	Nominal	Positivo/Negativo
Diagnóstico Kalazar <i>Detect</i> TM	Resultado de la ICT	Cualitativa dicotómica	Intervención	Nominal	Positivo/Negativo
Diagnóstico ad-bio Leishmania IgG/IgM Combo Rapid Test	Resultado de la ICT	Cualitativa dicotómica	Intervención	Nominal	Positivo/Negativo
Diagnóstico DPP® CVL rapid test	Resultado de la ICT	Cualitativa dicotómica	Intervención	Nominal	Positivo/Negativo
Diagnóstico Kalazar <i>Detect</i> TM Rapid Test, Canine	Resultado de la ICT	Cualitativa dicotómica	Intervención	Nominal	Positivo/Negativo

6.7 TÉCNICAS DE RECOLECCIÓN DE LA INFORMACIÓN

6.7.1 Fuentes de información: Primaria: La información sobre la presencia o ausencia de anticuerpos específicos contra el antígeno rK39 se recolectó directamente de la muestra de los pacientes. Secundaria: reportes de casos de LV almacenados en SIVIGILA

6.7.2 Proceso de obtención de información: El presente estudio se realizó a partir de los sueros de los pacientes que llegaron al Instituto Nacional de Salud para su confirmación diagnóstica en el periodo de junio de 2008 a junio de 2018. Estos recibieron una codificación interna, y posterior a su análisis fueron almacenados en el criobanco del grupo de parasitología. Las muestras codificadas se dejaron a temperatura ambiente y fueron procesadas siguiendo los protocolos de los fabricantes de cada una de las pruebas a evaluar. Los resultados fueron registrados fotográficamente y tabulados en el programa Microsoft Excel 2016.

De igual manera, se recolectaron los datos de vigilancia rutinaria almacenados en el SIVIGILA entre los años 2008 y 2018. Las poblaciones de los municipios donde se presentaron casos de LV fueron obtenidas de las Estimaciones de población 1985 – 2005, las cuales se encuentran disponibles en el portal del Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE) (https://www.dane.gov.co/files/investigaciones/poblacion/proyepobla06_20/Municipal_area_1985-2020.xls).

6.8 CONTROL DE ERRORES Y SESGOS

6.8.1 Sesgo de selección: Para evitar sesgos en la selección de los participantes del estudio, se seleccionaron todas las muestras en un periodo de tiempo de 10 años.

6.8.2 Sesgo de información: No existió la posibilidad de este sesgo debido a que no se recolectaron datos de los pacientes y el año de recolección de la muestra corresponde con la codificación interna del INS. Sin embargo, para el caso de los datos recolectados a través del SIVIGILA, se pudo presentar este sesgo, ya que no todos los casos se notifican al sistema de vigilancia, por lo que se pueden presentar datos faltantes, sin que estos afecten directamente el análisis de las pruebas rápidas, las cuales son el objetivo principal de esta investigación

6.8.3 Sesgo de confusión: Las variables de confusión e intervinientes fueron controladas con la aplicación de criterios de inclusión y exclusión que permitieron aumentar la probabilidad de diagnóstico de todas las pruebas, con el fin de no favorecer el desempeño de ninguna de ellas.

6.9 TÉCNICAS DE PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE LOS DATOS

Los resultados obtenidos por cada una de las pruebas fueron comparados mediante tablas de 2x2 empleando el software OpenEpi: Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health (86). Allí se calcularon valores de sensibilidad,

especificidad, valores predictivos y razones de verosimilitud. De igual manera se construyeron y confrontaron curvas Receiver Operating Characteristic (ROC) para comparar el rendimiento de las pruebas evaluadas, mediante el software Stata 14 (87). Se emplearon niveles de confianza del 95% y se consideró estadísticamente significativo valores p inferiores a 0,05.

Con los datos almacenados en el SIVIGILA se realizaron mapas de distribución de casos por año mediante el programa QGIS V. 2.18.16 (88). Con base en la población de los municipios donde se presentaron casos de LV durante el periodo de estudio, se calcularon incidencias acumuladas con los datos de LV almacenados en el sistema de información rutinaria del SIVIGILA, empleando el software Microsoft Excel. Posteriormente se elaboró un mapa de incidencia acumulada con gradientes de colores empleando el programa QGIS.

6.10 PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

6.10.1 Inmunofluorescencia Indirecta

Las muestras fueron sometidas a un ensayo de inmunofluorescencia *in house* (IFI) como está descrito en el Manual del Instituto Nacional de Salud (11). Brevemente, se preparó un antígeno de promastigotes de *L. infantum* cultivado en el Instituto Nacional de Salud (Bogotá, Colombia). Posteriormente se detectaron los anticuerpos anti-*Leishmania* usando anticuerpos anti-humanos y anti-caninos conjugados con isotiocianato de fluoresceína (Sigma-Aldrich, USA). Las muestras fueron clasificadas como positivas si se observaba fluorescencia citoplasmática o en la membrana a una dilución 1/32 o superior.

6.10.2 rK39- ICT

Un total de 4 pruebas inmunocromatográficas fueron empleadas en el presente estudio (Kalazar Detect™ (InBios International Inc, Seattle, USA), ad-bio Leishmania IgG/IgM Combo Rapid Test (CTK Biotech, Inc. California, USA) DPP® CVL rapid test (BioManguinhos, Rio de Janeiro, Brazil), Kalazar Detect™ Rapid Test, Canine (InBios International Inc, Seattle, USA)) (Figura 11). Todas las pruebas se realizaron de forma independiente siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se tomaron 20 µL de cada muestra de suero y se adicionaron en la zona indicada para cada prueba. Posteriormente se adicionaron 2 gotas del buffer contenido en cada kit. Para el caso de la prueba DPP, posterior a la adición de la muestra se contabilizaron cinco minutos antes de adicionar el buffer. Todas las pruebas fueron leídas dentro de los quince minutos posteriores a la adición del

reactivo de corrido, tomándose como positivas aquellas pruebas donde se obtuvieran bandas de color sobre las zonas C y T (C e IgG para la prueba ad-bio)



Figura 11. Pruebas rápidas empleadas para la detección de anticuerpos anti-rK39. **A)** Kalazar Detect™, **B)** ad-bio Leishmania IgG/IgM Combo Rapid Test, **C)** DPP® CVL rapid test, **D)** Kalazar Detect™ Rapid Test, Canine. Imágenes tomadas de las casas comerciales de cada prueba

7. CONSIDERACIONES ÉTICAS

Este proyecto fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación de la Universidad del Rosario – Sala de Ciencias de la Vida, mediante código 621-CV1006 del 8 de febrero de 2019

8. RESULTADOS

8.1. CARACTERIZACIÓN DE LAS MUESTRAS INCLUIDAS EN EL ESTUDIO

En el periodo comprendido entre junio de 2008 y junio de 2018 se recolectaron 90 muestras de suero provenientes de humanos clasificadas como positivas para LV por IFI, y 80 sueros clasificados como negativos por la misma técnica. 14 de estos sueros fueron excluidos del estudio por su consistencia lipémica, lo que finalmente permitió obtener 82 sueros positivos y 74 negativos. Para el caso de los caninos, se recolectaron 80 sueros clasificados como positivos para LV por IFI y 70 sueros clasificados como negativos por dicha técnica. 26 de estas muestras fueron excluidas del estudio, lo que finalmente permitió obtener 70 muestras positivas y 54 negativas.

Al analizar las muestras por año de recolección se obtuvo que, tanto para humanos como para caninos, las muestras incluidas en el estudio correspondieron a sueros almacenados desde el año 2010. Con referencia a los sueros de humanos se destaca que, entre los años 2011 y 2013, no se incluyeron muestras, ya que no se contaba con la cantidad suficiente para la ejecución de las 2 pruebas rápidas. Esta misma situación se presentó con las muestras obtenidas de los caninos en el año 2012. Como se observa en la figura 6A, la mayor parte de las muestras incluidas obtenidas de humanos fueron recolectadas entre los años 2017 y 2018 (59%) y se incluyeron muestras de 5 años diferentes. Para el caso de los caninos, las muestras incluidas fueron obtenidas en 8 años diferentes, siendo las muestras recolectadas entre los años 2017 y 2018 las que más se incluyeron en el estudio (59 muestras) (Figura 6C).

Respecto a la proporción de muestras incluidas de acuerdo al resultado obtenido por IFI para cada uno de los años de estudio se encontró que, para el caso de los humanos, en el año 2010 solo se incluyeron muestras negativas, y en los años 2014 y 2015, la proporción de muestras positivas fue de 0,88 y de 0,94 respectivamente. Para el caso de los caninos se observó que, en el año 2013, no se incluyeron muestras negativas. Se destaca también, que, en ambos grupos de estudio, humanos y caninos, las muestras incluidas obtenidas en el año 2018 presentaron una proporción de muestras positivas cercanas a 0,5 (Figura 6B y 6D)

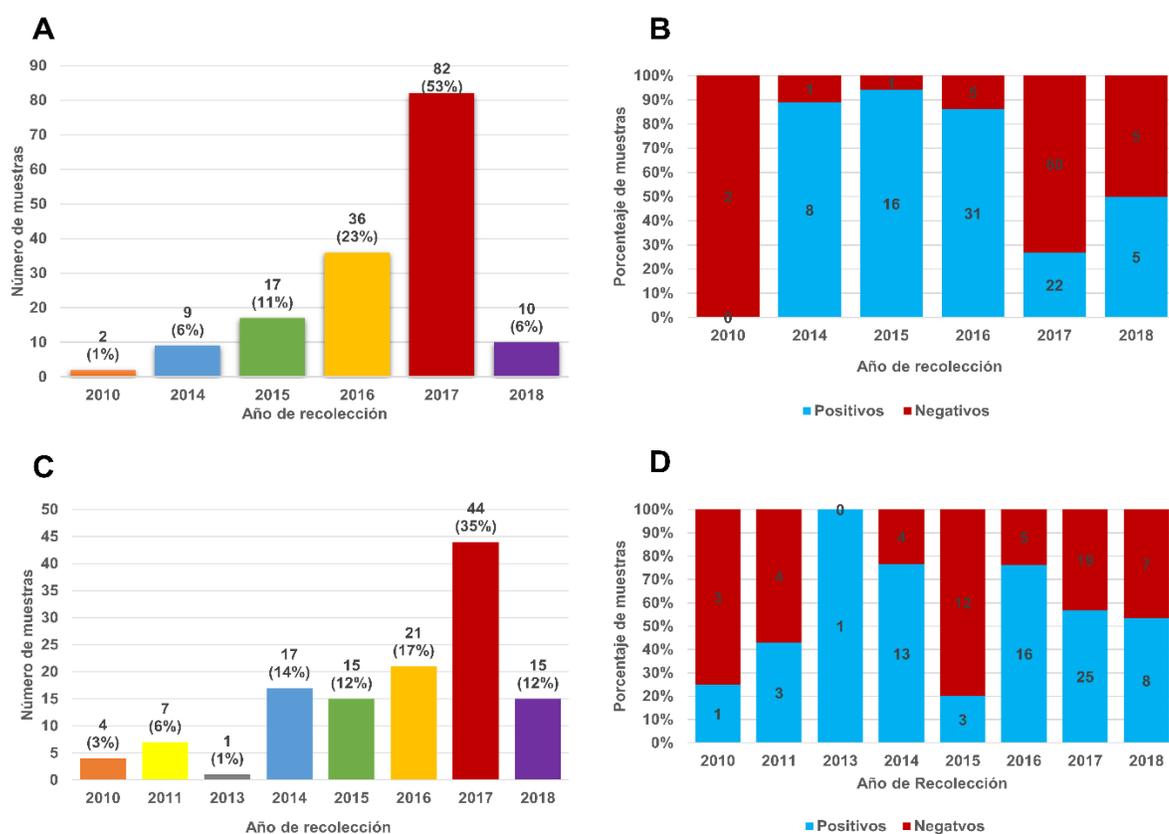


Figura 12. Caracterización de las muestras por año de recolección. **Panel superior: muestras de Humanos.** **A)** Distribución del número de muestras por año de recolección. **B)** Porcentaje de muestras positivas y negativas por año de recolección. **Panel inferior: muestras de caninos.** **C)** Distribución del número de muestras por año de recolección. **D)** Porcentaje de muestras positivas y negativas por año de recolección.

8.2. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE LA LV EN EL PERIODO DE ESTUDIO

Teniendo en cuenta la imposibilidad de acceder a la información clínica de los pacientes, no se pudo determinar la distribución geoespacial y temporal de las muestras empleadas en el presente estudio. Sin embargo, con base en la información del SIVIGILA, se procedió a la realización de los mapas de distribución tanto de los casos que se presentaron cada año durante todo el periodo de estudio, como un mapa de incidencia acumulada de LV para tener una aproximación gráfica de la procedencia de los sueros utilizados en esta investigación. Esta información se detalla en la figura 7. Vale la pena resaltar que estos datos solo están disponibles para las muestras provenientes de humanos.

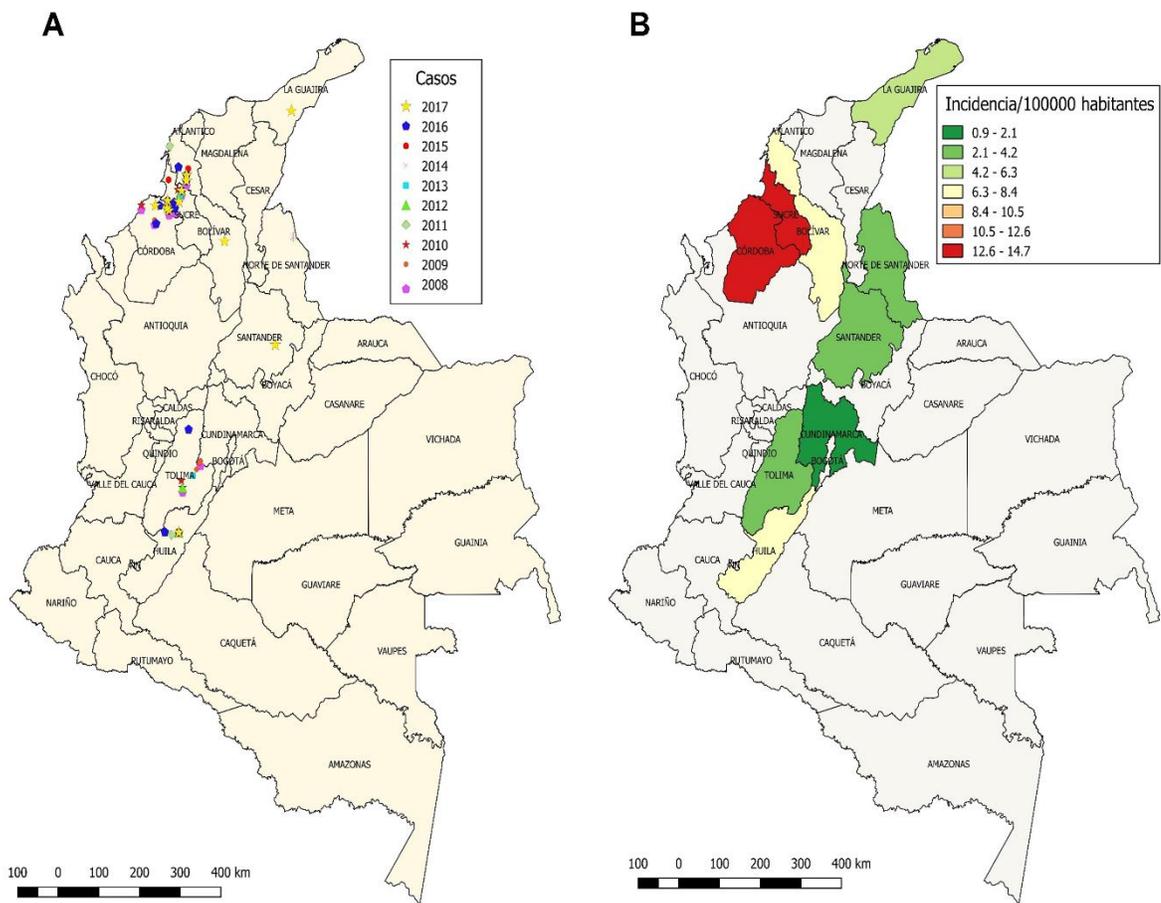


Figura 13. Distribución geográfica de la LV en Colombia. **A)** Distribución de casos de LV por año. **B)** Incidencia acumulada departamental de LV

Entre los años 2008 y 2017 (no se dispone de los datos para el 2018) se presentaron un total de 237 casos de LV en Colombia, distribuidos en 35 municipios de 9 departamentos principalmente del norte (Región Caribe) y del centro (Región Andina) del país (Figura 7A). Los años con menor número de casos fueron 2012 y 2013 con 9 y 13 casos respectivamente, mientras que los años 2009 y 2016 fueron los años con el número de casos más elevado, con 35 y 37 casos respectivamente. Llama la atención que para los años 2016 y 2017 el 84 y 76% de los casos notificados en el SIVIGILA, respectivamente, fueron incluidos en el presente estudio. A nivel de incidencia acumulada, los departamentos de Bolívar, Sucre y Córdoba mostraron los índices más elevados con 7,46, 13,57 y 14,7 casos por cada 100000 habitantes, respectivamente (Figura 7B)

8.3. RESULTADOS COMPARATIVOS PARA LAS PRUEBAS APLICADAS EN HUMANOS

Posterior a la ejecución de todas las pruebas sobre las muestras se realizó la comparación de los resultados obtenidos con el diagnóstico previo por IFI. Para el caso de las pruebas aplicadas en las muestras provenientes de humanos, los resultados se observan en la tabla 2. Con respecto a la prueba rápida Kalazar *Detect*[™], se obtuvieron 7 falsos negativos y 8 falsos positivos, mientras que para la prueba ad-bio Leishmania IgG/IgM Combo Rapid Test se obtuvieron 5 falsos positivos y 7 falsos negativos con respecto a los resultados obtenidos por IFI (Tabla 2)

Tabla 3. Comparación de resultados obtenidos por cada prueba para humanos vs IFI

Prueba	Resultado	Inmunofluorescencia Indirecta		
		Positivo	Negativo	Total
Kalazar <i>Detect</i>[™]	Positivo	75	8	83
	Negativo	7	66	73
	Total	82	74	156
ad-bio Leishmania IgG/IgM Combo Rapid Test	Resultado	Positivo	Negativo	Total
	Positivo	75	5	80
	Negativo	7	69	76
	Total	82	74	156

8.4. RESULTADOS COMPARATIVOS PARA LAS PRUEBAS APLICADAS EN CANINOS

Por su parte, las comparaciones de los resultados obtenidos por las pruebas rápidas con los resultados obtenidos por IFI en muestras provenientes de caninos, se observan en la tabla 3. Se evidenció que con la prueba rápida Kalazar *Detect*[™] Rapid Test, Canine se presentaron 12 falsos negativos y 4 falsos positivos, mientras que con la prueba DPP® CVL rapid test se presentaron 10 falsos negativos y 11 falsos positivos (Tabla 3).

Tabla 4. Comparación de resultados obtenidos por cada prueba para caninos vs IFI

Prueba	Resultado	Inmunofluorescencia Indirecta		
		Positivo	Negativo	Total
Kalazar Detect™ Rapid Test, Canine	Positivo	58	4	62
	Negativo	12	50	62
	Total	70	54	124
DPP® CVL rapid test	Resultado	Positivo	Negativo	Total
	Positivo	60	11	71
	Negativo	10	43	53
	Total	70	54	124

8.5. COMPARACIÓN DE RESULTADOS OBTENIDOS POR TÍTULOS DE ANTICUERPOS

En el presente estudio fueron incluidas un total de 82 muestras positivas para humanos y 70 para caninos. Se destaca que los títulos de anticuerpos evaluados por IFI en estas muestras se encontraban en un rango entre 1/32 y 1/256. El 15% de las muestras positivas obtenidas de humanos presentaron títulos de anticuerpos de 1/32, el 27% presentaron títulos de 1/64, el 29% presentaron títulos de 1/128 y el 29% restante presentaron títulos de 1/256.

Para el caso de los caninos, el 17% de las muestras positivas presentaron títulos de anticuerpos de 1/32, el 10% presentaron títulos de 1/64, el 19% presentó títulos de 1/128 y el 54% restante presentaron títulos de 1/256. La tabla 4 muestra los resultados obtenidos para cada una de las pruebas inmunocromatográficas evaluadas según los títulos de anticuerpos evaluados por IFI.

Tabla 5. Resultados ICT según títulos de anticuerpos evaluados por IFI

ICT	Resultado	Resultado IFI				
		NR	1/32	1/64	1/128	1/256
Kalazar Detect™	Positivo	8	10	20	22	23
	Negativo	66	2	2	2	1
ad-bio Leishmania IgG/IgM Combo Rapid Test	Positivo	5	10	20	22	23
	Negativo	69	2	2	2	1
Kalazar Detect™ Rapid Test, Canine	Positivo	4	7	7	9	35
	Negativo	50	5	0	4	3
DPP® CVL rapid test	Positivo	11	7	5	12	36
	Negativo	43	5	2	1	2

8.6. DESEMPEÑO DIAGNÓSTICO DE LAS PRUEBAS EVALUADAS

Con base en todos los anteriores resultados, se realizaron los cálculos de Sensibilidad, Especificidad, Valores predictivos y Razones de verosimilitud para cada una de las pruebas evaluadas, los cuales se detallan en la tabla 5. Se destacan que las dos pruebas evaluadas para muestras de humanos presentaron iguales valores de sensibilidad (Figura 14A), sin embargo, la prueba ad-bio Leishmania IgG/IgM Combo Rapid Test presentó un mayor valor de Especificidad (Figura 14B). En términos de Valores predictivos y razones de verosimilitud, esta prueba presentó valores superiores a los evidenciados con la prueba Kalazar *Detect™* Rapid Test. Para el caso de las pruebas evaluadas en muestras de caninos, se presentaron valores de sensibilidad moderados en ambas pruebas (Figura 14C), mostrando una mayor especificidad (Figura 14D), Valor predictivo positivo y razón de verosimilitud positiva, la prueba Kalazar *Detect™* Rapid Test, Canine.

Tabla 6. Desempeño diagnóstico de las pruebas evaluadas

Ítem evaluado	Humanos				Caninos			
	Kalazar Detect™		ad-bio Leishmania IgG/IgM Combo Rapid Test		Kalazar Detect™ Rapid Test, Canine		DPP® CVL rapid test	
	Valor	IC 95%	Valor	IC 95%	Valor	IC 95%	Valor	IC 95%
Sensibilidad	91,5%	(83,4 - 95,8)	91,5%	(83,4 - 95,8)	82,9%	(72,38 - 89,91)	85,7%	(75,66 - 92,05)
Especificidad	89,2%	(80,1 - 94,4)	93,2%	(85,1 - 97,1)	92,6%	(82,45 - 97,08)	79,6%	(67,1 - 88,23)
VPP	90,4%	(82,1 - 95,0)	93,8%	(86,19 - 97,3)	93,6%	(84,55 - 97,46)	84,5%	(74,35 - 91,12)
VPN	90,4%	(81,5 - 95,3)	90,8%	(82,2 - 95,5)	80,6%	(69,15 - 88,57)	81,1%	(68,64 - 89,41)
RVP	8,46	(6,61 - 10,84)	13,54	(9,12 - 20,08)	11,19	(6,805 - 18,39)	4,21	(3,502 - 5,056)
RVN	0,096	(0,072 - 0,127)	0,092	(0,069 - 0,121)	0,185	(0,157 - 0,219)	0,179	(0,146 - 0,221)

VPP: Valor predictivo positivo; VPN: Valor predictivo negativo; RVP: Razón de verosimilitud positiva; RVN: Razón de verosimilitud negativa

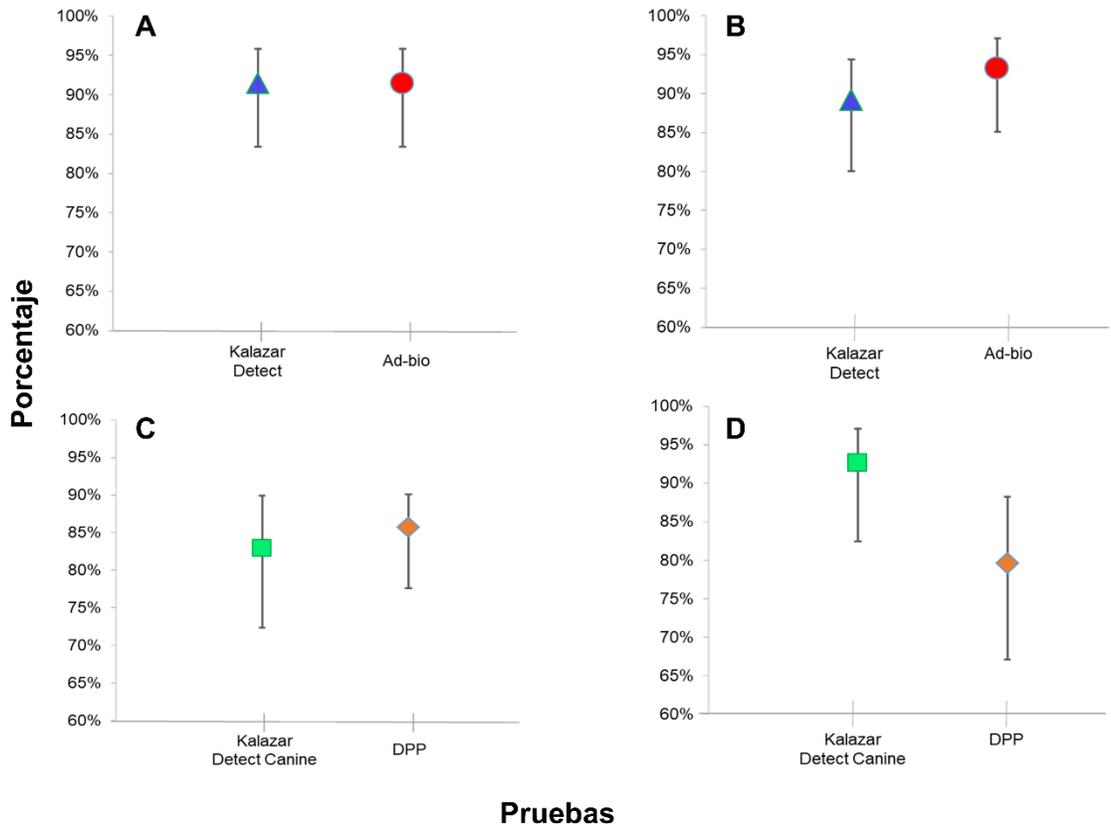


Figura 14. Comparación del desempeño diagnóstico de las pruebas evaluadas. **A)** Sensibilidad (con intervalos de confianza del 95%) de las pruebas para humanos. **B)** Especificidad (con intervalos de confianza del 95%) de las pruebas para humanos. **C)** Sensibilidad (con intervalos de confianza del 95%) de las pruebas para caninos. **D)** Especificidad (con intervalos de confianza del 95%) de las pruebas para caninos.

8.7. CURVAS ROC Y ÁREAS BAJO LA CURVA DE LAS PRUEBAS EVALUADAS

Finalmente, con base en los datos anteriores se procedió a la realización de las curvas ROC. En la figura 8 se detallan de forma comparativa las curvas ROC de las pruebas realizadas tanto en humanos como en caninos. Se observa un desempeño similar en las pruebas evaluadas para las muestras de humanos, ($p=0,6596$), mientras que, para el caso de los caninos, se observó un aparente mejor desempeño por parte de la prueba Kalazar *Detect*TM Rapid Test, Canine, sin que existan diferencias estadísticamente significativas en el rendimiento de ambas

pruebas ($p=0,3219$). Con base en las áreas bajo la curva, se puede concluir que el rendimiento de ambas pruebas para humanos es muy bueno, mientras que el rendimiento de las pruebas para caninos puede ser considerado como bueno.

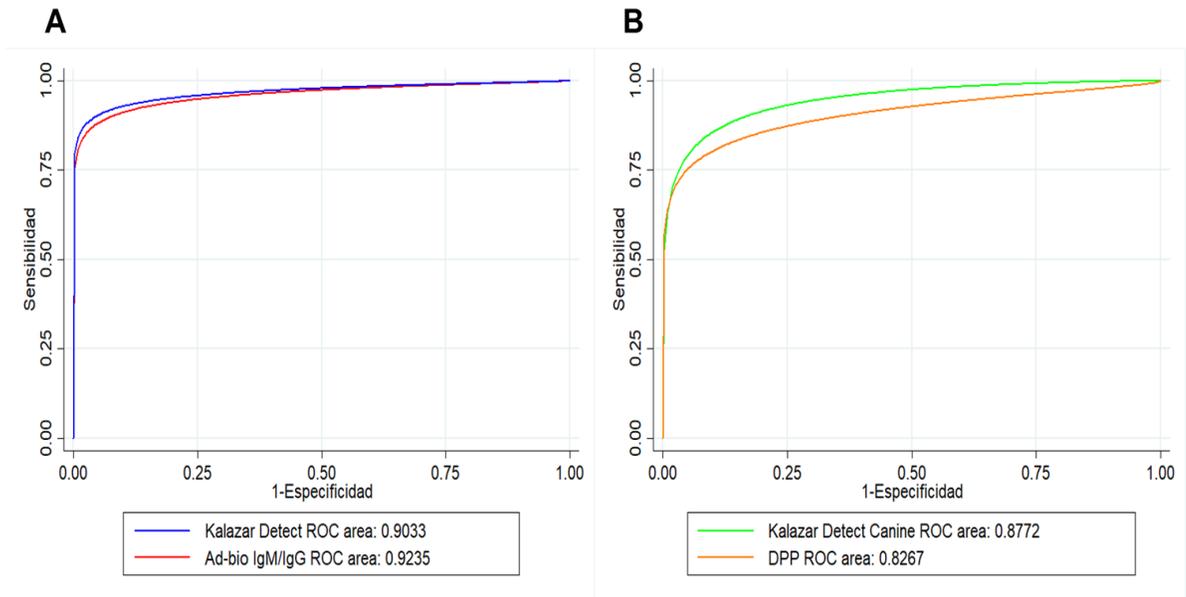


Figura 15. Curvas ROC de las pruebas rápidas evaluadas. **A)** Comparación curvas ROC de pruebas rápidas para humanos. **B)** Comparación curvas ROC de pruebas rápidas para caninos

9. DISCUSIÓN

La Leishmaniasis visceral representa un problema de salud pública en Colombia, principalmente en aquellos territorios situados por debajo de los 1750 m.s.n.m., cuyas condiciones climáticas y geográficas como el clima cálido, humedad y temperatura media entre 25 y 30°C favorecen la reproducción de los vectores y, por tanto, la transmisión del parásito y la proliferación de focos (89). En el país, la LV se presenta principalmente en 2 focos endémicos, uno de ellos ubicado en la costa norte del país en los departamentos de Sucre, Córdoba y Bolívar, y otro en los territorios de influencia del valle del río Magdalena, en el centro del país, en los departamentos de Tolima, Cundinamarca y Huila (6). Los 237 casos notificados al SIVIGILA entre los años 2008 y 2017 (figura 7A) evidencian el impacto de la enfermedad en el país, teniendo en cuenta que la mayor parte de estos casos ocurren en niños menores de 5 años, y que la mortalidad en aquellos casos sin tratamiento puede superar el 90% (90).

Al analizar la información obtenida a través del SIVIGILA, se observó que los casos notificados entre los años 2008 y 2017 provenían en su mayoría de los municipios situados en los focos endémicos descritos en el país, siendo los departamentos de Córdoba, Sucre y Bolívar los más afectados (Figura 7). Los municipios de El Carmen de Bolívar, Ovejas, San Andrés de Sotavento y Neiva, presentaron la mayor cantidad de casos en dicho periodo, lo que estuvo dado en su mayoría por la ocurrencia de brotes urbanos y rurales donde se demostró el papel preponderante de los caninos en la transmisión y mantenimiento de la transmisión del parásito (91-94).

En este sentido vale la pena resaltar la distribución geográfica de los dos principales vectores de la LV en Colombia, *Lutzomyia longipalpis* y *Lutzomyia evansi*, los cuales han sido reportados en regiones con predominancia de bosque seco tropical que se encuentran entre los 0 y 1000 metros de altitud (95), características que se ajustan a los municipios donde se reportó la mayor parte de los casos (Figura 13). Para el caso de *Lu. longipalpis*, se ha evidenciado una distribución en los municipios del valle del río Magdalena, mientras que *Lu. evansi* ha sido recolectado en los municipios del norte y centro del país, desde la Guajira hasta Santander (95). En algunas ocasiones se ha evidenciado una distribución simpátrica de estas especies, sin embargo, su importancia epidemiológica se atribuye principalmente a la densidad de sus poblaciones en los territorios donde habitan (96). Otro elemento importante, hace referencia a las características de las zonas donde se encuentran estos vectores, donde se evidencia un alto grado de intervención de los ecosistemas

por parte de los humanos, para explotación agrícola y ganadera, lo que facilita el contacto de las personas con los vectores, derivando en aumentos de la transmisión del parásito (21, 95).

Otro elemento importante dentro del circuito epidemiológico de la LV es la presencia de reservorios en los municipios donde se reporta la enfermedad. Se destaca la presencia de *Didelphis marsupialis* en los departamentos de la costa atlántica, el cual es un conocido reservorio silvestre de *L. infantum chagasi* y otros flagelados zoonóticos (97). Así mismo, se resalta la importancia del perro como reservorio doméstico de la LV, en el cual se han reportado seroprevalencias de hasta 51% para la enfermedad en municipios del centro y la costa norte del país (98-100). Todos estos elementos, sumados a las características ecológicas de los municipios donde se reportan los casos de LV confluyen para que la enfermedad sea endémica en estos territorios, por lo que la transmisión es constante en estas zonas del país (Figura 13). Lo anterior, resalta la importancia de la realización de estudios que involucren los diferentes elementos del circuito epidemiológico para llevar a cabo intervenciones integrales que permitan un control de la enfermedad tendiente a la disminución de los casos en las zonas más afectadas.

El análisis de la distribución geográfica de las enfermedades permite no solo determinar los patrones geospaciales y temporales sino también evaluar los diversos elementos que componen los circuitos epidemiológicos y su asociación con dichos patrones (101, 102). Estas asociaciones han sido realizadas para Leishmaniasis tegumentaria en el país (20), mostrando resultados que impactan directamente sobre la salud pública, por lo que se recomienda extenderlo a otras enfermedades como la LV.

En el presente estudio se buscó determinar el desempeño diagnóstico de 4 pruebas rápidas basadas en el antígeno rK39 para la tamización de la LV en humanos y caninos, teniendo en cuenta los desempeños diferenciales que han demostrado tener estas pruebas de acuerdo con su lugar de aplicación (9, 79). Lo anterior, sumado a las recomendaciones de la OMS para la evaluación local de las diferentes pruebas comercialmente disponibles con el fin de determinar cuál tiene un mejor desempeño diagnóstico, de acuerdo con las condiciones propias de cada territorio (9, 103). Para cumplir con el objetivo del presente estudio, se emplearon un total de 156 muestras de suero provenientes de humanos y 124 provenientes de caninos recolectadas entre los años 2008 y 2018 que se encontraban almacenadas en el criobanco del Instituto Nacional de Salud como parte de su labor como laboratorio de referencia para la confirmación diagnóstica. Inicialmente se destaca el aumento progresivo del número de muestras incluidas en el estudio a medida que la fecha de recolección se tornaba más reciente (Figura 6). Este comportamiento podría ser atribuido al papel del INS como laboratorio de referencia, donde muchas de las muestras deben ser reprocesadas o son empleadas bien sea como controles

positivos y negativos de la enfermedad o para estudios de investigación de diferente índole, lo que limita la disponibilidad de las muestras. Se espera entonces que, en años más recientes, la disponibilidad de las muestras sea mayor.

Como se mencionó anteriormente, el desempeño diagnóstico de las pruebas rápidas basadas en el antígeno rK39 ha sido ampliamente evaluado (9, 80, 85), sin embargo, cabe destacar que en Colombia este tipo de comparaciones no ha sido realizada, como si ha ocurrido en otros países del mundo y de la región, como Brasil y Venezuela (72, 76, 77, 80, 84, 104, 105). Estudios realizados en zonas endémicas de la India y Sudán, evidenciaron un bajo rendimiento de las pruebas basadas en el antígeno rK39, mientras que otros antígenos como el rKE16 han mostrado tener mejor desempeño para la detección de anticuerpos anti-*Leishmania* (106, 107). Por su parte, los estudios realizados en Brasil y Venezuela mostraron valores de sensibilidad y especificidad de las pruebas rápidas por encima del 85%, lo que ha permitido su aplicación dentro del esquema de tamización para la LV (75-77, 108).

Una de las dificultades que se presenta a la hora de analizar comparativamente los estudios en los que se evalúan pruebas rápidas para la LV es el empleo de diferentes técnicas como estándar de oro para el diagnóstico de la enfermedad, ya que la observación directa del parásito en muestras de aspirado de médula ósea es una técnica de difícil realización que se encuentra limitada a personal capacitado (14, 48). En vista de lo anterior, en los países endémicos se han utilizado las pruebas serológicas como confirmatorias de la LV, siempre y cuando esté acompañada de un cuadro clínico sugestivo de la enfermedad, así como un nexo epidemiológico (6, 14, 16, 57, 109, 110). Esta técnica ha demostrado tener un desempeño diagnóstico bueno en el país (Sensibilidad y Especificidad superior al 90%), por lo que su uso se mantiene vigente por parte del INS, lo cual permite que los resultados obtenidos por esta técnica sean equiparables a la microscopía (6), permitiendo la comparación de los resultados obtenidos en este trabajo con otras investigaciones que emplearon la microscopía como estándar de oro. Precisamente, el potencial de esta prueba ha sido remarcado en diferentes investigaciones que la han empleado como prueba de referencia para la evaluación de las pruebas rápidas en el mundo (17, 75, 80, 85, 111).

En términos del desempeño diagnóstico de las pruebas evaluadas para humanos, se resalta que, los valores de sensibilidad encontrados en este estudio (91,5%) (Tabla 2), concuerdan con la revisión Cochrane realizada en el año 2014 por Boelaert y colaboradores (17), donde se reportó un valor de sensibilidad de 91,9%. Sin embargo, este valor difiere un poco del 84,7% encontrado en la evaluación realizada por el TDR de la OMS en muestras de Brasil empleando la prueba Kalazar *Detect*TM (9). La presencia de falsos negativos entre las muestras evaluadas influye directamente sobre la sensibilidad y podría estar relacionada con bajos títulos de anticuerpos específicos, que se pueden presentar por condiciones como la edad,

estado nutricional e inmune, así como la diversidad de los parásitos (9). Un elemento importante a considerar ante la presentación de falsos negativos hace referencia a la respuesta inmune, la cual es evadida por el parásito por diferentes mecanismos que pueden involucrar la disminución de la presentación antigénica, por lo que la respuesta humoral se ve afectada generando disminución de anticuerpos específicos (112). Así mismo, se ha aseverado el papel del poliparasitismo en el desarrollo de respuestas inmunes aberrantes, lo que deriva en bajos títulos de anticuerpos (106, 107). Este elemento podría jugar un papel fundamental en los pacientes de LV en el país, los cuales son en su mayoría niños habitantes de zonas rurales en las cuales se ha reportado la presencia tanto de malaria y Enfermedad de Chagas, como de parásitos intestinales (113).

Otro elemento importante hace referencia al formato empleado por las pruebas rápidas para el diagnóstico de la LV, donde se ha demostrado en otras regiones del mundo que la utilización del antígeno rK39 tiene resultados diferenciales al emplearse en ELISA, por lo que los elementos empleados en las pruebas rápidas pueden interferir en la detección de los anticuerpos (106, 107). De igual manera, la heterogeneidad de los parásitos, la cual es común en las zonas endémicas, ha sido descrito como un posible factor que puede influir en el diagnóstico de la LV mediante las pruebas rápidas (107). En este sentido vale la pena resaltar que se ha evidenciado las diferencias a nivel genómico existente entre *L. infantum* y *L. braziliensis*, la cual está mediada en su mayoría por la pérdida de genes y la formación de pseudogenes (114). De igual manera, estudios realizados empleando ADN del minicírculo y los microsatélites, así como genomas completos han evidenciado estructuras poblacionales amplias y diversas, que influyen sobre la resistencia a los medicamentos y podrían interferir sobre la respuesta inmune (115-117).

La diversidad intraespecífica en *L. infantum* fue evidenciada en el país por Herrera y colaboradores en 2018 (18), quienes mostraron que pueden existir diferencias genéticas al interior de los parásitos de *L. infantum* provenientes de pacientes con LV. Estas diferencias genéticas, junto con factores del ambiente y nutricionales de los pacientes podrían estar influyendo en la producción de anticuerpos, bien sea por alteraciones de la antigenicidad, como por disminución de la respuesta inmune (106). Sin embargo, se requieren de estudios más amplios y enfocados tanto en aspectos moleculares del parásito, como en el estado general de salud de los pacientes que padecen la enfermedad.

Con respecto a los títulos de los anticuerpos, es de especial importancia recalcar que dentro del estudio se incluyeron muestras positivas con diferentes títulos clasificadas por IFI (Tabla 4), las cuales al ser analizadas no mostraron un comportamiento diferencial influenciado por este factor. Esto puede estar relacionado con el tipo de anticuerpos que es evaluado mediante la IFI, ya que esta

técnica permite determinar los títulos de todos los anticuerpos anti-*Leishmania* en conjunto (11) y no de un anticuerpo en específico, como lo hacen las pruebas rápidas con los anticuerpos anti-rK39. Vale la pena resaltar que mediante la IFI se evalúan antígenos crudos totales del parásito, en su forma de promastigote, los cuales no expresan el antígeno K39, por lo que los anticuerpos dirigidos contra este antígeno no son medidos por esta prueba (11). Lo anterior podría derivar en la presencia de falsos negativos mediante las pruebas rápidas aún en títulos de anticuerpos de 1/256.

A nivel de especificidad se destaca el comportamiento diferencial de ambas pruebas, donde se evidenció que, *ad-bio Leishmania IgG/IgM Combo Rapid Test* presentó un valor más elevado (Tabla 2). Los valores de especificidad de ambas pruebas concuerdan con lo reportado anteriormente, donde se presentaron valores entre 90 y 96% (9). Se destaca la cantidad de falsos positivos que presentaron ambas pruebas, lo cual podría estar dado por infecciones previas que generaron anticuerpos que, si bien no reflejan un título alto por medio de la IFI, son detectables por las pruebas rápidas (14, 48). Es precisamente por este aspecto, que la utilización tanto de la IFI como de las pruebas rápidas debe estar acompañada de una historia clínica compatible con la enfermedad (118).

Por su parte, las pruebas evaluadas en muestras de caninos mostraron algunas diferencias marcadas en términos de su desempeño diagnóstico (Tabla 3). Los valores de sensibilidad mostrados por ambas pruebas concuerdan con lo reportado anteriormente para las pruebas de las casas comerciales evaluadas (75, 76, 119, 120), aunque se destaca que los valores encontrados en este estudio tienden a ser inferiores. Con respecto a la especificidad, ambas pruebas evidenciaron valores más bajos que los reportados anteriormente (75, 76, 119, 120). Algunos aspectos que podrían estar influyendo sobre estos parámetros son las infecciones previas de forma asintomática, así como la presencia de especies diferentes al complejo *L. donovani* en estos animales. Este último aspecto ha sido demostrado en diferentes zonas del mundo (44, 93, 121), incluidos Brasil y Colombia, donde estudios demostraron la presencia de ADN de *L. amazonensis* y *L. braziliensis* en muestras de suero de perros con LV (18, 43, 44). Precisamente la descripción previa de especies del subgénero *Viannia* podría derivar en la obtención de resultados negativos para las pruebas rápidas en muestras positivas por IFI.

Es precisamente por lo anterior que se debe prestar especial atención a los caninos que habitan en zonas endémicas urbanas, los cuales han demostrado desempeñar un papel fundamental en la transmisión de la enfermedad, así como su extensión desde las zonas rurales hacia las urbanas, no solo de LV sino de otras presentaciones clínicas de las Leishmaniasis (7, 122-124). El perro representa un desafío especial en la transmisión de la LV, debido a su capacidad de moverse entre las zonas rurales y urbanas, lo que lo hace propenso a sufrir infecciones simultáneas

por diferentes especies del género *Leishmania*, lo que lo convierte en un puente que facilita la presentación de las diferentes formas clínicas de la enfermedad en las poblaciones endémicas (99). Su carácter sinantrópico con el humano así como la reproducción descontrolada de estos animales en estas zonas producen una alteración del efecto de dilución, ya que el aumento de la población de caninos puede aumentar la población de parásitos, por la mayor disponibilidad de hospederos susceptibles para su transmisión, lo que puede llevar a un aumento de la transmisión hacia los humanos (125)

Al analizar las curvas ROC de las diferentes pruebas evaluadas en el presente estudio, se observó que el rendimiento de las 4 pruebas rápidas es bastante similar e incluso se evidenció que no existen diferencias estadísticamente significativas en las áreas bajo la curva de las pruebas para humanos ($p=0,6596$) ni para caninos ($p=0,3219$) (Figura 8). Sin embargo, es de notar que existen otros parámetros que cobran relevancia en el estudio de pruebas diagnósticas, como lo son las razones de verosimilitud, que permiten evaluar de forma global el desempeño de una prueba sin la influencia de la prevalencia de la enfermedad (126, 127). Con relación a la RVP, las pruebas ad-bio *Leishmania* IgG/IgM Combo Rapid Test y Kalazar *Detect*TM Rapid Test, Canine mostraron valores superiores a 10 (Tablas 2 y 3) para humanos y caninos respectivamente, lo que sugiere que estas pruebas son óptimas para la detección de los anticuerpos anti-rK39, en comparación con las otras pruebas evaluadas. Para el caso de las RVN, las pruebas no mostraron amplias diferencias (0,096 vs 0,092 para las pruebas evaluadas en humanos y 0.185 vs 0,179 para las pruebas evaluadas en caninos).

Finalmente, es necesario resaltar que, si bien algunas pruebas mostraron rendimientos mejores frente a su par evaluada, existen elementos de tipo administrativo y financiero que deben ser tenidos en cuenta a la hora de la adquisición de estas pruebas. Para el caso de la prueba ad-bio *Leishmania* IgG/IgM Combo Rapid Test, existen dificultades a nivel de disponibilidad en el país, ya que para su comercialización deben ser importadas en un proceso que puede demorar hasta 3 meses, lo cual dificulta su obtención de forma rápida en las regiones alejadas. Sin embargo, en términos de costos, esta prueba es más económica que la Kalazar *Detect*TM Rapid Test (\$11300 vs 36000 respectivamente). En este sentido se recomienda evaluar la disponibilidad de estas pruebas, así como los tiempos de entrega para realizar la adquisición. Sin embargo, se destaca que, las pruebas Kalazar *Detect*TM Rapid Test son una muy buena opción que se encuentra disponible y brinda resultados confiables.

Para el caso de las pruebas evaluadas en caninos, se destaca que la prueba DPP® CVL rapid test, no se encuentra comercialmente disponible en Colombia, y su acceso se ve restringido a los laboratorios de investigación, razón por la cual no es posible aplicarlas de forma rutinaria en las zonas endémicas. Por lo anterior, y

teniendo en cuenta los resultados aquí presentados, se recomienda el uso de la prueba Kalazar *Detect*[™] Rapid Test, Canine para la tamización de los caninos de las zonas endémicas.

En conclusión, las pruebas rápidas constituyen una herramienta de gran valor para el diagnóstico de la LV, por la facilidad de su realización, bajo costo y facilidad de interpretación de los resultados. Si bien es cierto que el desempeño de las pruebas evaluadas fue bueno, no se deben tomar decisiones clínicas basadas únicamente en su resultado, ya que se hace necesario la evaluación de los aspectos clínicos y epidemiológicos de los pacientes para proceder con una conducta terapéutica. La confirmación diagnóstica de todos los pacientes bien sea por microscopía o por IFI debe continuar siendo obligatoria con el fin de disminuir los falsos positivos y negativos. La tamización de los caninos para LV en las zonas endémicas debe ser un eje fundamental en las políticas de vigilancia en salud pública de estos territorios, la cual puede realizarse mediante el empleo de pruebas rápidas acompañadas de una evaluación completa del estado del animal antes de proceder a la toma de decisiones clínicas y de salud pública. Se deben continuar con los programas de promoción y prevención en las zonas endémicas, con el fin de reducir los casos de LV, así como sus complicaciones por detecciones tardías de los casos.

10. CONCLUSIONES

- Las pruebas rápidas evaluadas tanto en muestras de humanos como de caninos mostraron rendimientos similares.
- La presencia de falsos negativos y positivos remarca la necesidad de acompañar el empleo de las pruebas rápidas de una historia clínica sugestiva de la enfermedad.
- Se requieren estudios posteriores en diversos campos que permitan determinar las razones de los falsos positivos y negativos.
- La tamización de los caninos es un elemento de gran impacto en la salud pública para la prevención y control de la LV.
- Se requieren diseñar pruebas rápidas basadas en las cepas del parásito circulantes en el país
- La realización de estudios de genómica comparativa de cepas circulantes permitirá establecer diferencias en los genes que codifican para la proteína K39

AGRADECIMIENTOS

Inicialmente agradezco a mi tutor Juan David Ramírez por todo su apoyo, no solo como docente, sino como persona, porque es gracias a él que pude estudiar mi maestría y fue con su brillante guía que pude realizar este gran trabajo.

Al Instituto Nacional de Salud por abrirme sus puertas para la ejecución de este trabajo. Toda la disposición y buen ambiente generaron que todo llegara a buen término.

Igualmente agradezco a la compañía Annar Diagnóstica por la donación de las pruebas rápidas distribuidas por ellos para su respectiva evaluación.

A todos los integrantes del Grupo de Investigaciones Microbiológicas de la Universidad del Rosario (GIMUR) por todo su apoyo y sus consejos para el mejoramiento de mi tesis.

A mi familia y amigos por estar siempre presentes y acompañarme a lo largo de toda esta grandiosa etapa.

A mis profesores por su paciencia y esmero para entregarme sus conocimientos de una manera excepcional.

A la profesora Gilma Hernández por todo su apoyo en las diferentes fases del proyecto.

Al profesor Carlos Trillos por ser tan paciente con todos los problemas presentados durante la ejecución del trabajo.

A mis evaluadores por dedicar con esmero parte de su tiempo al mejoramiento del proyecto, a mi crecimiento profesional y al avance de la ciencia.

BIBLIOGRAFÍA

1. Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One*. 2012;7(5):e35671.
2. Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2004;27(5):305-18.
3. Schwarz NG, Loderstaedt U, Hahn A, Hinz R, Zautner AE, Eibach D, et al. Microbiological laboratory diagnostics of neglected zoonotic diseases (NZDs). *Acta Trop*. 2017;165:40-65.
4. WHO, World Health Organization. 2010. Control of the Leishmaniasis. Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis.
5. Bañuls A-L, Hide M, Prugnolle F. Leishmania and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Advances in parasitology*. 2007;64:1-458.
6. República de Colombia. Instituto Nacional de Salud. Protocolo de vigilancia en Salud pública. Leishmaniasis. Junio 11. 2014.
7. Alvar J, Canavate C, Molina R, Moreno J, Nieto J. Canine leishmaniasis. *Advances in parasitology*. 2004;57:1-88.
8. Romero M, López M, Echeverry M, Rivas F. Canine Visceral Leishmaniasis: diagnostic tests do not detect real state of the infection. *Revista de Salud Pública*. 2008;10(2):290-8.
9. Cunningham J, Hasker E, Das P, El Safi S, Goto H, Mondal D, et al. A global comparative evaluation of commercial immunochromatographic rapid diagnostic tests for visceral leishmaniasis. *Clin Infect Dis*. 2012;55(10):1312-9.
10. Organización Mundial de la Salud; Organización Panamericana de la Salud. 55.º CONSEJO DIRECTIVO, 68.ª SESIÓN DEL COMITÉ REGIONAL DE LA OMS PARA LAS AMÉRICAS. Plan de acción para la eliminación de las enfermedades infecciosas desatendidas y las pedidas posteriores a la eliminación 2016-2022. Washington, 2016.
11. Instituto Nacional de Salud. Inmunofluorescencia Indirecta para el diagnóstico de Leishmaniasis Visceral y mucocutánea. 2016 [Available from: <https://www.ins.gov.co/conocenos/sig/SIG/MEN-R01.5350-013.pdf>].
12. Srivastava P, Dayama A, Mehrotra S, Sundar S. Diagnosis of visceral leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2011;105(1):1-6.
13. Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, Peeling RW, et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat Rev Microbiol*. 2007;5(11):873-82.
14. Tlmcani Z. Visceral leishmaniasis: an update of laboratory diagnosis. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*. 2016;6(7):505-8.
15. Arenas R, Torres-Guerrero E, Quintanilla-Cedillo MR, Ruiz-Esmenjaud J. Leishmaniasis: A review. *F1000Research*. 2017;6.

16. Mondal S, Bhattacharya P, Ali N. Current diagnosis and treatment of visceral leishmaniasis. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2010;8(8):919-44.
17. Boelaert M, Verdonck K, Menten J, Sunyoto T, van Griensven J, Chappuis F, et al. Rapid tests for the diagnosis of visceral leishmaniasis in patients with suspected disease. *Cochrane Database Syst Rev.* 2014(6):CD009135.
18. Herrera G, Higuera A, Patiño LH, Ayala MS, Ramírez JD. Description of *Leishmania* species among dogs and humans in Colombian Visceral Leishmaniasis outbreaks. *Infection, Genetics and Evolution.* 2018.
19. Maroli M, Feliciangeli M, Bichaud L, Charrel R, Gradoni L. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Medical and veterinary entomology.* 2013;27(2):123-47.
20. Herrera G, Teherán A, Pradilla I, Vera M, Ramírez JD. Geospatial-temporal distribution of Tegumentary Leishmaniasis in Colombia (2007-2016). *PLoS Negl Trop Dis.* 2018;12(4):e0006419.
21. Ferro C, López M, Fuya P, Lugo L, Cordovez JM, González C. Spatial Distribution of Sand Fly Vectors and Eco-Epidemiology of Cutaneous Leishmaniasis Transmission in Colombia. *PLoS One.* 2015;10(10):e0139391.
22. Teixeira DE, Benchimol M, Rodrigues JC, Crepaldi PH, Pimenta PF, de Souza W. The cell biology of *Leishmania*: how to teach using animations. *PLoS Pathog.* 2013;9(10):e1003594.
23. Peters NC, Egen JG, Secundino N, Debrabant A, Kimblin N, Kamhawi S, et al. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science.* 2008;321(5891):970-4.
24. McGwire BS, Satoskar AR. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. *QJM.* 2014;107(1):7-14.
25. Akhoundi M, Kuhls K, Cannet A, Votypka J, Marty P, Delaunay P, et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10(3):e0004349.
26. Wilson ME, Jeronimo SM, Pearson RD. Immunopathogenesis of infection with the visceralizing *Leishmania* species. *Microbial pathogenesis.* 2005;38(4):147-60.
27. Ramírez JD, Hernández C, León CM, Ayala MS, Flórez C, González C. Taxonomy, diversity, temporal and geographical distribution of Cutaneous Leishmaniasis in Colombia: A retrospective study. *Sci Rep.* 2016;6:28266.
28. Montalvo AM, Fraga J, Tirado D, Blandón G, Alba A, Van der Auwera G, et al. Detection and identification of *Leishmania* spp.: application of two hsp70-based PCR-RFLP protocols to clinical samples from the New World. *Parasitol Res.* 2017;116(7):1843-8.
29. de Vries HJ, Reedijk SH, Schallig HD. Cutaneous leishmaniasis: recent developments in diagnosis and management. *American journal of clinical dermatology.* 2015;16(2):99-109.
30. Ministerio de Salud y Protección Social. Instituto Nacional de Salud. 2016 Boletín epidemiológico semana 52.

31. Sgarbi IM, Santos FD, Monteiro VE, Fonseca SN, Bernardes Filho F. Disseminated cutaneous leishmaniasis: ulcerovegetative and ulcero-crusted lesions. *Braz J Infect Dis.* 2017;21(2):201-2.
32. Bruschi F, Gradoni L. *The leishmaniasis: old neglected tropical diseases*: Springer; 2018.
33. Akhoundi M, Downing T, Votýpka J, Kuhls K, Lukeš J, Cannet A, et al. Leishmania infections: molecular targets and diagnosis. *Molecular aspects of medicine.* 2017;57:1-29.
34. Guimarães LH, Queiroz A, Silva JA, Silva SC, Magalhães V, Lago EL, et al. Atypical Manifestations of Cutaneous Leishmaniasis in a Region Endemic for *Leishmania braziliensis*: Clinical, Immunological and Parasitological Aspects. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10(12):e0005100.
35. Meireles CB, Maia LC, Soares GC, Teodoro IPP, Gadelha MDSV, da Silva CGL, et al. Atypical presentations of cutaneous leishmaniasis: A systematic review. *Acta Trop.* 2017;172:240-54.
36. Guerin PJ, Olliaro P, Sundar S, Boelaert M, Croft SL, Desjeux P, et al. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. *Lancet Infect Dis.* 2002;2(8):494-501.
37. Reithinger R, Dujardin J-C, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S. Cutaneous leishmaniasis. *The Lancet infectious diseases.* 2007;7(9):581-96.
38. Guimarães LH, Queiroz A, Silva JA, Silva SC, Magalhães V, Lago EL, et al. Atypical manifestations of cutaneous Leishmaniasis in a region endemic for *Leishmania braziliensis*: clinical, immunological and parasitological aspects. *PLoS neglected tropical diseases.* 2016;10(12):e0005100.
39. Stanford University. ParaSite. Extracellular vs. Intracellular Parasitic Mechanisms of Immune Evasion: *Leishmania* [Available from: <https://web.stanford.edu/class/humbio153/ImmuneEvasion/>].
40. World Health Organization. Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases: third WHO report on neglected tropical diseases 2015: World Health Organization; 2015.
41. Pan American Health Organization. Leishmaniasis: Epidemiological report of the Americas. Report N° 6 - February, 2018. 2018 [Available from: http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/34856/LeishReport6_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y].
42. Ready PD. Epidemiology of visceral leishmaniasis. *Clinical epidemiology.* 2014;6:147.
43. Carvalho F, Wenceslau A, Albuquerque G, Munhoz A, Gross E, Carneiro P, et al. *Leishmania (Viannia) braziliensis* in dogs in Brazil: epidemiology, co-infection, and clinical aspects. *Genet Mol Biol.* 2015;14:12062-73.
44. Tolezano JE, Uliana SR, Taniguchi HH, Araújo MF, Barbosa JA, Barbosa JE, et al. The first records of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in dogs (*Canis familiaris*) diagnosed clinically as having canine visceral leishmaniasis from Araçatuba County, São Paulo State, Brazil. *Veterinary parasitology.* 2007;149(3):280-4.

45. A.D.A.M. Aspirado medular. 2019 [Available from: http://printer-friendly.adam.com/content.aspx?productId=118&pid=5&gid=003658&c_custid=802].
46. Hematología. Protocolos de tinción. 2019 [Available from: <http://modhemato.blogspot.com/2015/02/protocolos-de-algunas-tinciones-tincion.html>].
47. The center for Food Security & Public Health. Leishmaniasis. 2019 [Available from: <http://www.cfsph.iastate.edu/DiseaseInfo/disease-images.php?name=leishmaniasis>]=es.
48. Sundar S, Rai M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. Clinical and diagnostic laboratory immunology. 2002;9(5):951-8.
49. Pedras MJ, de Gouvêa Viana L, de Oliveira EJ, Rabello A. Comparative evaluation of direct agglutination test, rK39 and soluble antigen ELISA and IFAT for the diagnosis of visceral leishmaniasis. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2008;102(2):172-8.
50. Machado de Assis TS, Rabello A, Werneck GL. Predictive models for the diagnostic of human visceral leishmaniasis in Brazil. PLoS Negl Trop Dis. 2012;6(2):e1542.
51. O.I.E. Leishmaniosis. In: Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (chap.2.1.11) 6th edition. World Organisation for Animal Health, France. 2016. p.1–12. [Available from: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.11_LEISHMANIOSIS.pdf].
52. Il Cofanetto Magico. Leishmaniosi. 2011 [Available from: <http://www.ilcofanettomagico.it/wp-content/uploads/leishmanie-alla-fluorescenza-1.jpg>].
53. Blood Composition Percentages | www.imagenesmy.com 2019 [Available from: <https://www.imagenesmy.com/imagenes/blood-composition-percentages-f1.html>].
54. Hoja de la cubierta de Laboratorio. 2019 [Available from: <https://www.freepng.es/png-inr2cu/download.html>].
55. Smart. Server Medical Art. Leishmania Promastigote. 2019.
56. Tubo de la sangre 2019 [Available from: <https://es.pngtree.com/element/down?id=Mjc4MjY2OA==&type=1>].
57. Singh OP, Sundar S. Developments in Diagnosis of Visceral Leishmaniasis in the Elimination Era. J Parasitol Res. 2015;2015:239469.
58. Vinayak V, Mahajan D, Sobti R, Singla N, Sundar S. Anti-66 kDa antileishmanial antibodies as specific immunodiagnostic probe for visceral leishmaniasis. The Indian journal of medical research. 1994;99:109-14.
59. De Colmenares M, Portus M, Riera C, Gallego M, Aisa M, Torras S, et al. Detection of 72–75-kD and 123-kD fractions of Leishmania antigen in urine of patients with visceral leishmaniasis. The American journal of tropical medicine and hygiene. 1995;52(5):427-8.
60. Palatnik-de-Sousa CB, Gomes EM, Paraguai-de-Souza E, Palatnik M, Luz K, Borojevic R. Leishmania donovani: titration of antibodies to the fucose-mannose

- ligand as an aid in diagnosis and prognosis of visceral leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1995;89(4):390-3.
61. Ryan JR, Smithyman AM, Rajasekariah G-H, Hochberg L, Stiteler JM, Martin SK. Enzyme-linked immunosorbent assay based on soluble promastigote antigen detects immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies in sera from cases of visceral and cutaneous leishmaniasis. *Journal of clinical microbiology*. 2002;40(3):1037-43.
 62. Rajasekariah G-HR, Ryan JR, Hillier SR, Lisa PY, Stiteler JM, Cui L, et al. Optimisation of an ELISA for the serodiagnosis of visceral leishmaniasis using in vitro derived promastigote antigens. *Journal of immunological methods*. 2001;252(1-2):105-19.
 63. Bhatia A, Daifalla NS, Jen S, Badaro R, Reed SG, Skeiky YA. Cloning, characterization and serological evaluation of K9 and K26: two related hydrophilic antigens of *Leishmania chagasi*. *Molecular and biochemical parasitology*. 1999;102(2):249-61.
 64. Kumar R, Pai K, Pathak K, Sundar S. Enzyme-linked immunosorbent assay for recombinant K39 antigen in diagnosis and prognosis of Indian visceral leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2001;8(6):1220-4.
 65. Qu JQ, Zhong L, Masoom-Yasinzi M, Abdur-Rab M, Aksu HS, Reed SG, et al. Serodiagnosis of Asian leishmaniasis with a recombinant antigen from the repetitive domain of a *Leishmania* kinesin. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1994;88(5):543-5.
 66. Vallur AC, Reinhart C, Mohamath R, Goto Y, Ghosh P, Mondal D, et al. Accurate sero-detection of asymptomatic *Leishmania donovani* infection using defined antigens. *Journal of clinical microbiology*. 2016;JCM. 02620-15.
 67. Bhattacharyya T, Marlais T, Miles MA. Diagnostic antigens for visceral leishmaniasis: clarification of nomenclatures. *Parasit Vectors*. 2017;10(1):178.
 68. Sivakumar R, Sharma P, Chang K-P, Singh S. Cloning, expression, and purification of a novel recombinant antigen from *Leishmania donovani*. *Protein expression and purification*. 2006;46(1):156-65.
 69. Islam MZ, Itoh M, Ul Islam MA, Saifuddin Ekram AR, Rahman MA, Takagi H, et al. ELISA with recombinant rKRP42 antigen using urine samples: a tool for predicting clinical visceral leishmaniasis cases and its outbreak. *Am J Trop Med Hyg*. 2012;87(4):658-62.
 70. The principle and method of ELISA 2019 [Available from: <http://ruo.mbl.co.jp/bio/e/support/method/elisa.html>].
 71. Burns JM, Shreffler WG, Benson DR, Ghalib HW, Badaro R, Reed SG. Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(2):775-9.
 72. Lauricella MA, Maidana CG, Frias VF, Romagosa CM, Negri V, Benedetti R, et al. An rK28-Based Immunoenzymatic Assay for the Diagnosis of Canine Visceral Leishmaniasis in Latin America. *Am J Trop Med Hyg*. 2016;95(1):92-8.
 73. Banu SS, Ahmed B-N, Shamsuzzaman AKM, Lee R. Evaluation of recombinant K39 antigen and various promastigote antigens in sero-diagnosis of

- visceral leishmaniasis in Bangladesh. *Parasite epidemiology and control*. 2016;1(3):219-28.
74. Castellanos-Gonzalez A, Saldarriaga OA, Tartaglino L, Gacek R, Temple E, Sparks H, et al. A Novel Molecular Test to Diagnose Canine Visceral Leishmaniasis at the Point of Care. *Am J Trop Med Hyg*. 2015;93(5):970-5.
75. Laurenti MD, de Santana Leandro MV, Tomokane TY, De Lucca HR, Aschar M, Souza CS, et al. Comparative evaluation of the DPP(®) CVL rapid test for canine serodiagnosis in area of visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol*. 2014;205(3-4):444-50.
76. Quinnell RJ, Carson C, Reithinger R, Garcez LM, Courtenay O. Evaluation of rK39 rapid diagnostic tests for canine visceral leishmaniasis: longitudinal study and meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(1):e1992.
77. de Assis TS, Braga AS, Pedras MJ, Oliveira E, Barral A, de Siqueira IC, et al. Multi-centric prospective evaluation of rk39 rapid test and direct agglutination test for the diagnosis of visceral leishmaniasis in Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2011;105(2):81-5.
78. Pattabhi S, Whittle J, Mohamath R, El-Safi S, Moulton GG, Guderian JA, et al. Design, development and evaluation of rK28-based point-of-care tests for improving rapid diagnosis of visceral leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4(9).
79. Maia Z, Lírio M, Mistro S, Mendes CM, Mehta SR, Badaro R. Comparative study of rK39 Leishmania antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis: systematic review with meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(1):e1484.
80. Bangert M, Flores-Chávez MD, Llanes-Acevedo IP, Arcones C, Chicharro C, García E, et al. Validation of rK39 immunochromatographic test and direct agglutination test for the diagnosis of Mediterranean visceral leishmaniasis in Spain. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018;12(3):e0006277.
81. Mühlhauser PM, Rivas JL. Laboratorio de microbiología: conocimientos básicos para un clínico. *Revista Médica Clínica Las Condes*. 2014;25(3):569-79.
82. Sundar S, Singh OP. *Molecular Diagnosis of Visceral Leishmaniasis*. Mol Diagn Ther. 2018.
83. Abbasi I, Kirstein OD, Hailu A, Warburg A. Optimization of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays for the detection of Leishmania DNA in human blood samples. *Acta Trop*. 2016;162:20-6.
84. Schallig HD, Canto-Cavaleiro M, Silva ESd. Evaluation of the direct agglutination test and the rK39 dipstick test for the sero-diagnosis of visceral leishmaniasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2002;97:1015-8.
85. Chappuis F, Rijal S, Soto A, Menten J, Boelaert M. A meta-analysis of the diagnostic performance of the direct agglutination test and rK39 dipstick for visceral leishmaniasis. *British Medical Journal*. 2006;333(7571):723-6.
86. Dean AG, Sullivan KM, Soe MM. OpenEpi: Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health, Versión. www.OpenEpi.com, actualizado 2013/04/06, accedido 2019/01/24.
87. StataCorp. 2015. *Stata Statistical Software: Release 14*. College Station, TX: StataCorp LP.

88. Quantum GIS Development Team (2017). Quantum GIS Geographic Information System. Open Source Geospatial Foundation Project. 2017 [Available from: <http://qgis.osgeo.org/es/site/>].
89. Ministerio de Salud y Protección Social. Qué es la leishmaniasis 2015 [Available from: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/1/Qu%C3%A9%20es%20la%20leishmaniasis.pdf>].
90. Zaragozano JF, Martínez GR. Leishmaniasis visceral y cutaneomucosa: aspectos epidemiológicos y clínicos. *Medicina integral: Medicina preventiva y asistencial en atención primaria de la salud*. 2001;38(6):264-9.
91. Manotas-Berdugo H, Toro-Maldonado J, Rodríguez-Rodríguez J, Salgado-García D. Brote urbano de leishmaniasis en Colombia. *Revista de Salud Pública*. 2018;20:89-93.
92. Zambrano-Hernandez P, Ayala-Sotelo MS, Fuya-Oviedo P, Montenegro-Puentes CA, Aya-Vanegas NM, Aguilera-Jaramillo G, et al. Brote urbano de leishmaniasis visceral en Neiva, Colombia. *Revista de Salud Pública*. 2015;17:514-27.
93. Vélez ID, Carrillo LM, López L, Rodríguez E, Robledo SM. An epidemic outbreak of canine cutaneous leishmaniasis in Colombia caused by *Leishmania braziliensis* and *Leishmania panamensis*. *Am J Trop Med Hyg*. 2012;86(5):807-11.
94. República de Colombia. Instituto Nacional de Salud. Brote de leishmaniasis visceral en área periurbana en el municipio de Neiva, Huila. Situación de enero a julio de 2017. [Available from: <https://www.ins.gov.co/Direcciones/Vigilancia/Investigacion%20de%20brotes/Brote%20de%20leishmaniasis%20visceral%20en%20%20C3%A1rea%20periurbana%20en%20el%20municipio%20de%20Neiva,%20Huila.pdf>].
95. González C, Cabrera OL, Munstermann LE, Ferro C. Distribución de los vectores de *Leishmania infantum* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) en Colombia. *Biomédica*. 2006;26(Sup1):64-72.
96. Morrison AC, Ferro C, Pardo R, Torres M, Devlin B, Wilson ML, et al. Seasonal abundance of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Phlebotomidae) at an endemic focus of visceral leishmaniasis in Colombia. *Journal of medical entomology*. 1995;32(4):538-48.
97. Travi BL, Jaramillo C, Montoya J, Segura I, Zea A, Goncalves A, et al. *Didelphis marsupialis*, an important reservoir of *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* and *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* in Colombia. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1994;50(5):557-65.
98. Travi BL. Leishmaniasis visceral canina. *Revista MVZ Córdoba*. 2000;5(1):29-32.
99. Paternina-Gómez M, Díaz-Olmos Y, Paternina LE, Bejarano EE. Alta prevalencia de infección por *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) en perros del norte de Colombia. *Biomédica*. 2013;33(3):375-82.
100. Santaella J, Ocampo CB, Saravia NG, Méndez F, Góngora R, Gomez MA, et al. *Leishmania* (*Viannia*) infection in the domestic dog in Chaparral, Colombia. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2011;84(5):674-80.

101. Ratmanov P, Mediannikov O, Raoult D. Vectorborne diseases in West Africa: geographic distribution and geospatial characteristics. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2013;107(5):273-84.
102. Zhou X-N, Lv S, Yang G-J, Kristensen TK, Bergquist NR, Utzinger J, et al. Spatial epidemiology in zoonotic parasitic diseases: insights gained at the 1 st International Symposium on Geospatial Health in Lijiang, China, 2007. *BioMed Central*; 2009.
103. Banoo S, Bell D, Bossuyt P, Herring A, Mabey D, Poole F, et al. Evaluation of diagnostic tests for infectious diseases: general principles. *Nat Rev Microbiol*. 2010;8(12 Suppl):S17-29.
104. Terán-Ángel G, Rodríguez V, Silva R, Zerpa O, Schallig H, Ulrich M, et al. Herramientas no invasivas en Venezuela: comparación entre las pruebas inmunoserológicas DAT, rK26 y rK39 en el diagnóstico de leishmaniasis visceral. *Biomédica*. 2010;30:39-45.
105. Romero HD, Silva Lde A, Silva-Vergara ML, Rodrigues V, Costa RT, Guimaraes SF, et al. Comparative study of serologic tests for the diagnosis of asymptomatic visceral leishmaniasis in an endemic area. *Am J Trop Med Hyg*. 2009;81(1):27-33.
106. Reiter-Owona I, Rehkaemper-Schaefer C, Arriens S, Rosenstock P, Pfarr K, Hoerauf A. Specific K39 antibody response and its persistence after treatment in patients with imported leishmaniasis. *Parasitology research*. 2016;115(2):761-9.
107. Abass E, Kang C, Martinkovic F, Semião-Santos SJ, Sundar S, Walden P, et al. Heterogeneity of *Leishmania donovani* parasites complicates diagnosis of visceral leishmaniasis: comparison of different serological tests in three endemic regions. *PLoS one*. 2015;10(3):e0116408.
108. Terán-Ángel G, Rodríguez V, Silva R, Zerpa O, Schallig H, Ulrich M, et al. Herramientas no invasivas en Venezuela: comparación entre las pruebas inmunoserológicas DAT, rK26 y rK39 en el diagnóstico de leishmaniasis visceral. *Biomédica*. 2010;30(1):39-45.
109. República de Colombia. Ministerio de Salud y Protección Social. Lineamientos para la atención clínica integral de leishmaniasis en Colombia. 2018 [Available from: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/PP/PAI/Lineamientos-leishmaniasis.pdf>].
110. Ready PD. Epidemiology of visceral leishmaniasis. *Clin Epidemiol*. 2014;6:147-54.
111. Camargo J, Langoni H, Troncarelli M, Machado J, Lucheis SB, Padovani C. Performance of IFAT, ELISA, direct parasitological examination and PCR on lymph node aspirates for canine visceral leishmaniasis diagnosis. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*. 2010;16(3):414-20.
112. Gupta G, Oghumu S, Satoskar AR. Mechanisms of immune evasion in leishmaniasis. *Advances in applied microbiology*. 82: Elsevier; 2013. p. 155-84.
113. República de Colombia, Ministerio de Salud y Protección Social. Encuesta nacional de parasitismo intestinal en población escolar Colombia, 2012 – 2014 2015 [Available from:

<https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/PP/ET/encuesta-nacional-de-parasitismo-2012-2014.pdf>.

114. Peacock CS, Seeger K, Harris D, Murphy L, Ruiz JC, Quail MA, et al. Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. *Nature genetics*. 2007;39(7):839.
115. Hamad S, Khalil E, Musa A, Ibrahim M, Younis B, Elfaki M, et al. *Leishmania donovani*: Genetic diversity of isolates from Sudan characterized by PCR-based RAPD. *Experimental parasitology*. 2010;125(4):389-93.
116. Kuhls K, Alam MZ, Cupolillo E, Ferreira GE, Mauricio IL, Oddone R, et al. Comparative microsatellite typing of new world *leishmania infantum* reveals low heterogeneity among populations and its recent old world origin. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(6):e1155.
117. Kuhls K, Keilonat L, Ochsenreither S, Schaar M, Schweynoch C, Presber W, et al. Multilocus microsatellite typing (MLMT) reveals genetically isolated populations between and within the main endemic regions of visceral leishmaniasis. *Microbes and Infection*. 2007;9(3):334-43.
118. Organización Panamericana de Salud. Manual de Diagnóstico y Tratamiento de las Leishmaniasis. 2018 [Available from: 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].
119. Larson M, Toepp A, Scott B, Kurtz M, Fowler H, Esfandiari J, et al. Semi-quantitative measurement of asymptomatic *L. infantum* infection and symptomatic visceral leishmaniasis in dogs using Dual-Path Platform® CVL. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2017;101(1):381-90.
120. Figueiredo FB, Vasconcelos TCB, Madeira MF, Menezes RC, Maia-Elkhoury ANS, Marcelino AP, et al. Validation of the Dual-path Platform chromatographic immunoassay (DPP® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2018;113(11):e180260.
121. Reithinger R, Lambson BE, Barker DC, Davies CR. Use of PCR to detect *Leishmania* (*Viannia*) spp. in dog blood and bone marrow. *Journal of Clinical Microbiology*. 2000;38(2):748-51.
122. Reithinger R, Espinoza JC, Davies CR. The transmission dynamics of canine American cutaneous Leishmaniasis in Huánuco, Peru. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2003;69(5):473-80.
123. Padilla AM, Marco JD, Diosque P, Segura MA, Mora MC, Fernandez MM, et al. Canine infection and the possible role of dogs in the transmission of American tegumentary leishmaniasis in Salta, Argentina. *Vet Parasitol*. 2002;110(1-2):1-10.
124. Cruz I, Acosta L, Gutierrez MN, Nieto J, Canavate C, Deschutter J, et al. A canine leishmaniasis pilot survey in an emerging focus of visceral leishmaniasis: Posadas (Misiones, Argentina). *BMC Infect Dis*. 2010;10:342.
125. Johnson P, Thielges D. Diversity, decoys and the dilution effect: how ecological communities affect disease risk. *Journal of Experimental Biology*. 2010;213(6):961-70.

126. Grimes DA, Schulz KF. Refining clinical diagnosis with likelihood ratios. *The Lancet*. 2005;365(9469):1500-5.

127. Deeks JJ, Altman DG. Diagnostic tests 4: likelihood ratios. *Bmj*. 2004;329(7458):168-9.