



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
SEDE BOGOTÁ
FACULTAD DE MEDICINA

Evaluación del desempeño analítico del diagnóstico molecular de leishmaniasis cutánea

Cielo Maritza León Ramos

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina, Departamento de Salud Pública
Bogotá, Colombia
2017

Evaluación del desempeño analítico del diagnóstico molecular de leishmaniasis cutánea

Cielo Maritza León Ramos

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Infecciones y Salud en el Trópico

Director:

Juan David Ramírez González, Ph.D.

Codirectora:

Myriam Consuelo López Páez, M.Sc.

Línea de Investigación:

Diagnóstico Molecular

Grupo de Investigación:

Grupo de Investigaciones Microbiológicas (GIMUR), Universidad del Rosario

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina, Departamento de Salud Pública

Bogotá, Colombia

2017

DEDICATORIA

A Dios.

Por su inmensa bendición y amor.

A mi padres Teresa Ramos y José León

A mis hermanos Yolanda, William, Nelson y Erika

A todos mis sobrinos

A mi Ángel Juan Ricardo Cubides y mi segunda familia

*Quienes han sido, son y serán mi motivación, inspiración,
apoyo y por brindarme todo su amor, paciencia y confianza
en el transcurso de esta etapa*

“Dime y lo olvido, enséñame y lo recuerdo, involúcrame y lo aprendo.” Benjamin Franklin.

Agradecimientos

A Dios

Al Dr. Juan David Ramírez, Director de tesis y a la Dra. Myriam Consuelo López, Codirectora de tesis, por su asesoría, orientación, conocimiento e infinita paciencia.

A Marina Muñoz y Carolina Hernández por sus consejos, enseñanzas y asesorías que fueron un aporte valioso para la realización del proyecto de investigación pero aún más importante, por brindarme su amistad.

A mis compañeros del Grupo de Investigaciones Microbiológicas de la Universidad del Rosario (GIMUR): Luz Patiño, Adriana Higuera, Maira Wintaco, Lissa Saavedra, Claudia Sánchez, Giovanni Herrera y a la Profesora Dora Ríos.

A mis compañeros de Centro de investigaciones en Microbiología y Parasitología Tropical de la Universidad de los Andes CIMPAT: Gisell Molina y su bebé, Marla López, Diana Toro, Laura Tamayo, German Aguilera y a la Profesora Camila González.

Al Instituto Nacional de Salud, Grupo de Parasitología, por la financiación de reactivos y préstamo de equipos.

A la Universidad Nacional de Colombia, Maestría Infecciones y Salud en el Trópico, por la formación académica que me otorgó.

A mi compañera y amiga incondicional de maestría, Angie Johana Sánchez, porque valió la pena todo el esfuerzo, dedicación, lágrimas y noches en vela para alcanzar nuestro propósito.

A todos muchas gracias!

Resumen

Las leishmaniasis comprenden un espectro de enfermedades parasitarias producidas por protozoos del género *Leishmania*. Colombia es uno de los 3 países con mayor número de especies de *Leishmania* que afectan a los seres humanos y la leishmaniasis cutánea es la forma clínica más frecuente observada en el país. Colombia no cuenta con un estándar de oro para el diagnóstico de leishmaniasis cutánea, siendo el examen directo la prueba de elección, la cual reporta una baja sensibilidad que varía en función de varios aspectos. Recientemente, métodos moleculares se han utilizado en el diagnóstico permitiendo detectar ADN en cantidades mínimas; en muchos estudios moleculares no se evidencia una adecuada evaluación del desempeño analítico de la técnica y blancos genéticos empleados, parámetros necesarios para hablar de sensibilidad y especificidad analítica. El objetivo de este trabajo fue evaluar el desempeño analítico de las técnicas de PCR convencional, PCR en tiempo real y LAMP para el diagnóstico molecular de las principales especies causantes de leishmaniasis cutánea determinando la exclusividad e inclusividad, Rango Reportable Anticipado, límite de detección, repetibilidad, precisión y porcentaje de positividad de las tres plataformas moleculares. Se concluyó que el marcador molecular ADNk utilizado en estos ensayos, a pesar de ser el más sensible, no cumple con el criterio de exclusividad de la técnica, el HSP70 presentó un límite de detección bajo en PCR convencional y similar en qPCR y LAMP, también presentó una baja reproducibilidad y en LAMP no cumplió con el criterio de exclusividad, finalmente el marcador 18S presentó el mejor desempeño analítico en las tres plataformas.

Palabras clave: Diagnóstico, *Leishmania*, LAMP, PCR, qPCR, desempeño analítico.

Abstract

The Leishmaniasis include a spectrum of parasitic diseases caused by protozoans of the genus *Leishmania*. Colombia is one of three countries with the highest number of *Leishmania* species that affect humans, being cutaneous leishmaniasis the most frequent clinical manifestation observed in the country. Colombia does not count with a gold standard for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis, the test of choice is direct lesion examination which has a low detection sensibility that varies in function of distinct aspects. Recently, molecular assays have been used in the diagnosis allowing the detection of DNA in low quantities. Nevertheless, in many molecular studies no evidence of an adequate evaluation of the analytic performance of the technique and genetic targets used is demonstrated; preventing the definition of the sensitivity and specificity of the analysis. The aim of this study was to evaluate the analytical performance of PCR, qPCR and LAMP for the molecular diagnosis of the principle species of *Leishmania* identified as causative agents of the cutaneous form, by determining exclusivity and inclusivity, anticipated reportable range, limit of detection, test-retest reliability, precision and percentage positivity in the three molecular platforms. Results obtained in this study allowed to determine that the molecular marker kDNA used in these tests, despite being the most sensitive, does not comply with the exclusivity criterion of the technique. HSP70 presented a low detection limit in conventional PCR as well as in qPCR and LAMP, yet low test-retest reliability was identified and in LAMP exclusivity criterion was not fulfilled. Finally, the molecular marker 18s presented the best analytic performance in the three platforms analyzed.

Keywords: Diagnosis, *Leishmania*, LAMP, PCR, qPCR, analytic performance

Contenido

	Pág.
Abreviaturas	1
1 Capítulo 1: Leishmaniasis	5
1.1 Clasificación taxonómica	5
1.2 Ciclo de vida.....	6
1.3 Cuadros clínicos.....	8
1.3.1 Leishmaniasis cutánea	8
1.3.2 Leishmaniasis mucosa.....	8
1.3.3 Leishmaniasis visceral	9
1.4 Epidemiología	10
2 Capítulo 2: Diagnóstico	12
2.1 Examen directo	12
2.1.1 Biopsia de piel	12
2.1.2 Cultivo	13
2.1.3 Pruebas serológicas	14
2.1.4 Diagnóstico molecular.....	15
2.1.4.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional	15
2.1.4.2 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR).....	16
2.1.4.3 Amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP).....	18
2.1.5 Marcadores moleculares para diagnóstico molecular de <i>Leishmania</i>	23
2.1.5.1 ADN del quinetoplasto (ADNk).....	23
2.1.5.2. Espaciadores Internos Transcritos (ITS).....	24
2.1.5.2 Proteínas de choque térmico (HSP70).....	25
2.1.5.3 Subunidad Ribosomal 18S.....	26
2.1.5.4 Gen Miniexón.....	27
3 Capítulo 3: Parámetros de validación de un método de diagnóstico	28
3.1 Validación analítica	28
3.2 Características del desempeño analítico	29
3.2.1 Repetibilidad.....	29
3.2.2 Rango Reportable Anticipado (RRA)	30
3.2.3 Especificidad analítica	30
3.2.3.1 Selectividad.....	30
3.2.3.2 Inclusividad	31
3.2.3.3 Exclusividad	31
3.2.4 Sensibilidad analítica	31
3.2.4.1 Límite de detección LoD.....	31
3.2.4.2 Límite de cuantificación.....	31
3.2.4.3 Precisión	31

3.3	Antecedentes.....	32
4	OBJETIVOS	38
4.1	Objetivo General.....	38
4.2	Objetivos específicos.....	38
5	Capítulo 5: Metodología	39
5.1	Consideraciones éticas.....	39
5.2	Diseño y pre-requisitos del estudio	39
5.2.1	Ensayos preliminares	40
5.2.2	Estandarización de los protocolos del estudio	40
5.2.3	Verificación de los estándares de calidad para cada uno de los equipos	40
5.3	Diseño de la investigación	40
5.3.1	Población de estudio y muestras.....	41
5.4	Material biológico.....	41
5.5	Crecimiento del Parásitos	42
5.6	Obtención de parásitos y recuento en cámara de Neubauer.....	42
5.7	Extracción de ADN a partir de cultivos parasitarios.....	43
5.8	Procedimiento de extracción de ADN para láminas coloreadas con Giemsa	43
5.9	Curva estándar	44
5.10	Determinación del desempeño analítico	44
5.10.1	Especificidad analítica	44
5.10.1.1	Inclusividad.....	44
5.10.1.2	Exclusividad.....	44
5.10.2	Sensibilidad analítica.....	45
5.10.2.1	Rango Reportable Anticipado (RRA)	45
5.10.2.2	Límite de Detección (LoD)	45
5.10.2.3	Precisión.....	45
5.10.2.4	Porcentaje de positividad.....	45
5.11	Ensayos moleculares.....	46
5.11.1	Marcadores moleculares	46
5.11.2	Amplificación de ADN por PCR convencional.....	47
5.11.3	Electroforesis de los productos de PCR en geles de agarosa	48
5.11.4	Amplificación de ADN por PCR en tiempo real qPCR.....	49
5.11.5	Amplificación de ADN mediante LAMP	50
5.12	Análisis de resultados	53
5.12.1	Determinación de repetibilidad.	53
5.12.2	Rango Reportable Anticipado (RRA).....	53
5.12.3	Determinación del Límite de detección (LoD)	54
5.12.4	Precisión	54
6	Resultados	55
6.1	Inclusividad para PCR convencional y qPCR.....	55
6.2	Exclusividad de la PCR convencional y qPCR	56
6.3	Rango Reportable Anticipado	58
6.3.1	Rango reportable anticipado en PCR convencional.....	58
6.3.2	Rango Reportable Anticipado en qPCR	61
6.4	Límite de detección.....	66
6.4.1	Límite de detección en PCR convencional	66
6.4.2	Límite de detección en qPCR.....	68
6.4.2.1	Día de realización de la prueba.	68

6.4.2.2	Concentración del ADN molde utilizado	70
6.4.2.3	Marcador molecular usado para el diagnóstico.	71
6.4.3	Análisis de regresión Probit para determinar el límite de detección.	73
6.5	Precisión	74
6.5.1	Precisión PCR convencional.....	74
6.5.2	Precisión q PCR	75
6.6	Amplificación Isotérmica mediada por Loop.	77
6.6.1	Diseño de cebadores para los blancos moleculares ADNk, HSP70 e ITS-1 ..	77
6.6.2	Estandarización de la LAMP para el marcador 18S	79
6.6.3	Estandarización de la LAMP para los marcadores HSP70, ADNk e ITS-1.	81
6.6.4	Rango reportable Anticipado.....	82
6.6.5	Inclusividad.....	85
6.6.6	Exclusividad.....	86
6.6.7	Límite de detección.....	87
6.6.8	Precisión.....	89
6.7	Porcentaje de positividad.	89
7	Discusión.....	93
7.1	PCR convencional.....	93
7.2	qPCR	94
7.3	LAMP	96
8	Conclusiones.....	99
9	Recomendaciones.....	100
10	Bibliografía	101

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1. Taxonomía de <i>Leishmania</i>	6
Figura 2. Morfología de <i>Leishmania</i> spp.	7
Figura 3. Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> spp.....	7
Figura 4. Lesión típica de leishmaniasis cutánea.	8
Figura 5. Lesión en nariz y en labio superior.....	9
Figura 6. Lesihmaniasis visceral	10
Figura 7. Raspado del borde de la úlcera.....	12
Figura 8. Biopsia con tinción de azul de toluidina.....	13
Figura 9. Cultivo de <i>Leishmania</i> en medio bifásico.	14
Figura 10. Promastigotes teñidos de verde en Inmunofluorescencia indirecta.	14
Figura 11. Esquema general de las etapas de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	16
Figura 12. Representación de la interacción del SYBER Green I con el ADN de doble cadena.....	17
Figura 13. Esquema PCR en tiempo Real.....	18
Figura 14. Esquema de los cebadores utilizados para LAMP:.....	19
Figura 15. Inicio de la reacción de LAMP.	20
Figura 16. Segunda etapa de la reacción de LAMP.	21
Figura 17. Formación de bucles en LAMP.	21
Figura 18. Detección de LAMP por turbidez.....	22
Figura 19. Detección de LAMP por cambio de color con verde de malaquita.....	23
Figura 20. Detección de LAMP por fluorescencia.....	23
Figura 21. Minicírculo del ADNk.....	24
Figura 22. Esquema de ITS 1 y 2.....	25
Figura 23. Esquema de HSP70.....	26
Figura 24. Esquema de SSU rRNA.....	27
Figura 25. Gen mini-exon en <i>Leishmania</i>	27
Figura 26. Etapas y criterios de validación.	29
Figura 27. Características del desempeño analítico.....	32
Figura 28. Diluciones seriadas en base 10 de los ADN de las cepas de referencia de <i>Lesihmania</i>	44
Figura 29. Cambio de color en amplificación por LAMP.	53
Figura 30. Inclusividad PCR convencional	55
Figura 31. Inclusividad para qPCR.....	56

Figura 32. Exclusividad PCR convencional.	57
Figura 33. Exclusividad de PCR en tiempo real.....	57
Figura 34. Gel rango reportable anticipado para el marcador ADNk.....	58
Figura 35. Gel rango reportable anticipado para el marcador HSP70.....	59
Figura 36. Gel rango reportable anticipado para el marcador ITS.	59
Figura 37. Gel rango reportable anticipado para el marcador 18S.....	60
Figura 38. Rango Reportable Anticipado para ADNk.....	62
Figura 39. Rango Reportable Anticipado para HSP70.....	63
Figura 40. Rango Reportable Anticipado para ITS-1	64
Figura 41. Rango Reportable Anticipado para 18S.....	65
Figura 42. Límite de detección en PCR convencional para ADNk y HSP70	66
Figura 43. Límite de detección en PCR convencional para ITS-1 y 18S.....	67
Figura 44. Diferencia de medias para el marcador ADNk	68
Figura 45. Diferencia de medias para el marcador HSP70	69
Figura 46. Diferencia de medias para el marcador ITS.....	69
Figura 47. Diferencia de medias para el marcador 18S.....	70
Figura 48. Comparación de Ct de cada dilución por cada marcador molecular.	71
Figura 49. Comparación por marcador molecular utilizado.	72
Figura 50. Secuencia consenso para el gen HSP70 y localización de los cebadores LAMP	77
Figura 51. Secuencia consenso para el gen ITS y localización de los cebadores LAMP	78
Figura 52. Secuencia consenso para el gen ADNk y localización de los cebadores LAMP	79
Figura 53. Estandarización de la técnica LAMP con reactivo fluorescente.	80
Figura 54. Estandarización de la técnica LAMP con verde de malaquita.	81
Figura 55. Estandarización de la técnica LAMP para ADNk e ITS-1	81
Figura 56. PCR convencional con cebadores externos.	82
Figura 57. Rango reportable anticipado para el marcador 18S.....	83
Figura 58. Rango reportable anticipado para el marcador HSP70.....	84
Figura 59. Inclusividad de la LAMP.	86
Figura 60. Exclusividad de la LAMP con el marcador HSP70.....	86
Figura 61. Exclusividad de la LAMP con el marcador 18 S.....	87
Figura 62. Límite de detección de 18S en LAMP	87
Figura 63. Límite de detección de HSP70 en LAMP	88

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1. Revisión de literatura. Blancos genéticos utilizados en PCR convencional y qPCR para diagnóstico de <i>Leishmania</i>	33
Tabla 2. Revisión de literatura. Blancos genéticos utilizados en LAMP para diagnóstico de <i>Leishmania</i>	37
Tabla 3. Cepas de referencia <i>Leishmania</i> y <i>Trypanosoma</i>	41
Tabla 4. Secuencias de los marcadores moleculares utilizados en la PCR convencional y qPCR.....	46
Tabla 5. Condiciones de la Master mix con Taq Platinum® ADN Polimerasa	47
Tabla 6. Perfil térmico de amplificación con HSP70, ADNk y SSU sRNA 18S	48
Tabla 7. Perfil térmico de amplificación con ITS-1.....	48
Tabla 8 Condiciones de la master mix con SYBR® Green.....	49
Tabla 9. Perfil térmico de amplificación en el equipo Real time PCR 7500 Fast de Applied Biosystems	49
Tabla 10. Secuencias del marcador molecular SSU rRNA 18S utilizados en LAMP	50
Tabla 11. Número de acceso al Genbank de las secuencias por marcador molecular	51
Tabla 12. Master mix con kit Loopamp amplification Kit EIKEN®.....	51
Tabla 13. Perfil térmico de amplificación con HSP70, ADNk, ITS-1 y SSU sRNA 18S	52
Tabla 14. Consenso Rango Reportable Anticipado para PCR convencional.....	60
Tabla 15. Rango reportable anticipado para ADNk	62
Tabla 16. Rango Reportable Anticipado para HSP70.....	63
Tabla 17. Rango Reportable Anticipado para ITS-1	64
Tabla 18. Rango Reportable Anticipado para 18S	65
Tabla 19. Consenso límite de detección para PCR convencional	67
Tabla 20. Límite de detección determinada por análisis de regresión Probit.	73
Tabla 21. Precisión de la PCR convencional para los cuatro marcadores moleculares...	74
Tabla 22. Precisión de la qPCR para HSP70 e ITS.....	75
Tabla 23. Precisión de la qPCR para ADNk y 18 S	76
Tabla 24. Cebador LAMP HSP70 seleccionados en el software Primer Explorer.....	77
Tabla 25. Cebador LAMP ITS seleccionados en el software Primer Explorer	78
Tabla 26. Cebador LAMP ADNk seleccionados en el software Primer Explorer.....	78
Tabla 27. Condiciones de la Master mix con Loopamp de Eiken ®.....	79

Tabla 28. Rango Reportable Anticipado para LAMP con HSP70 y 18S.....	85
Tabla 29. Límite de detección para LAMP	88
Tabla 30. Precisión de LAMP con los marcadores 18S y HSP70	89
Tabla 31 Comparación de resultados LAMP con el marcador 18S a partir de ADN de frotis directos y flebotomos.	90
Tabla 32. Concordancia entre el examen microscópico y las técnicas moleculares	91

Lista de Símbolos y abreviaturas

Símbolo	Término
mL	Mili Litro
μL	Micro Litro

Abreviaturas

ABREVIATURA	TÉRMINO
ADN	Ácido Desoxiribonucleico
LAMP	Amplificación isotérmica mediada por Loop
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
qPCR	PCR en tiempo real
RRA	Rango Reportable Anticipado
LoD	Límite de detección
HSP70	Proteína de choque térmico de 70kDa
ITS-1	Espaciador interno transcrito 1
18S	Subunidad ribosomal
ADNk	ADN del quinetoplasto
SSU	Subunidad pequeña del ARN ribosomal
fg	Fentogramos
BLAST	Basic Local Alignment and Search Tool

Introducción

La leishmaniasis constituye un espectro de enfermedades tropicales desatendidas, endémicas en muchas áreas de los trópicos, subtrópicos, cuenca del mediterráneo y producida por un complejo de especies del género *Leishmania* (1). Según datos reportados por la Organización Mundial de la Salud (OMS), se estima que en el mundo aproximadamente 12 millones de personas están infectadas y 2 millones de nuevas infecciones ocurren cada año, de las cuales 1,5 millones de casos corresponden a cuadros cutáneos de la enfermedad (2, 3).

Colombia hace parte de los 3 países con mayor número de especies de *Leishmania* que afectan a los seres humanos en el mundo (diez especies en total) (4). Es una patología endémica en casi todo el territorio nacional, excepto en San Andrés Islas y Bogotá D.C. Se estima que en el país existen alrededor de 11 millones de personas en riesgo, donde la transmisión principalmente se da en áreas rurales (5). En Colombia, se presentan las tres formas clínicas de la enfermedad, siendo la más frecuente y la de mayor distribución geográfica, la leishmaniasis cutánea (entre 95% y 98% de los casos); la leishmaniasis mucosa, que es el resultado de la diseminación del parásito, y se puede presentar de semanas a años después de la lesión cutánea (1% a 4%) y leishmaniasis visceral (entre el 0,1 y 1,5 %). La enfermedad prevalece en gran parte del país, especialmente en los focos silvestres, y en los valles interandinos (6). Para Colombia se cuentan con datos de tipificación de especie mediante isoenzimas, anticuerpos monoclonales y análisis de diversidad y reconstrucción filogenética, encontrando con mayor frecuencia *L. panamensis*, *L. braziliensis* y *L. guyanensis* (7, 8).

En la actualidad no existe un estándar de oro para el diagnóstico de leishmaniasis cutánea. En el país se maneja un constructo de pruebas en las que se incluye el examen directo, biopsia y cultivo, además se ha reportado la sensibilidad del examen directo para leishmaniasis cutánea en un 40% y aumenta a un 74% en lesiones de menos de cuatro meses de evolución (9, 10), algunos autores reportan que la sensibilidad puede alcanzar un 90% si la muestra se toma del centro de la lesión y si se aumenta el número de muestras analizadas por lesión (11-13). Esta sensibilidad varía en función del método de toma de muestra, tiempo de evolución de la lesión, tratamientos previos y los

conocimientos y experticia por parte del observador (11, 14). Cuando se han realizado varios exámenes directos pero no se logra observar la presencia de las formas infectantes del parásito, autores reportan la obtención de biopsias de la lesión, este es un examen que se ha catalogado como invasivo e incómodo para el paciente y requiere de personal calificado para tal procedimiento (15, 16), a pesar de ser un técnica que determina la descripción del infiltrado inflamatorio relacionado con la leishmaniasis cutánea, no es adecuada para la observación directa del parásito ya que suele ser el método con la menor sensibilidad diagnóstica (45%) para esta forma clínica (11, 17).

Los métodos moleculares se han utilizado en el diagnóstico de la leishmaniasis, estos permiten detectar el ADN presente en varias muestras aún en cantidades mínimas (femtogramos) o lo que es igual, hasta un solo parásito (18). Para la amplificación de fragmentos de ácidos nucleicos de especies de *Leishmania*, se ha reportado en varios estudios el uso de blancos genéticos como el ADN del quinoplasto (ADNk), el espaciador interno transcrito (ITS), la proteína de choque térmico (HSP70) y la subunidad pequeña ribosomal 18S donde los productos son sometidos a RFLP (Poliformismos de restricción de fragmentos de longitud) para la discriminación de especies (19-21). En estos estudios solo se reporta aspectos relacionados con la sensibilidad y especificidad de la técnica, se llega a evaluar máximo dos marcadores por técnica y una especie de *Leishmania* además, no se realiza una adecuada evaluación del desempeño analítico de la técnica y blancos genéticos empleados los cuales son parámetros necesarios para hablar de sensibilidad y especificidad analítica. (15, 18, 19, 22-25).

Una nueva técnica molecular que consiste en la amplificación de ácidos nucleicos en condiciones isotérmicas conocida como LAMP (Amplificación isotérmica mediada por bucle) (26) se ha evaluado en virus, bacterias y parásitos (27-29). La LAMP con fines de diagnóstico de leishmaniasis cutánea, solo se ha reportado en la literatura los marcadores genéticos ADNk y 18S, siendo el ADNk el marcador de elección para especies de *Leishmania* del viejo mundo. (30-32).

Para determinar la validación de una técnica diagnóstica se aconseja establecer las características de desempeño analítico las cuales se establecen al inicio del ensayo (33). El desempeño analítico de una técnica diagnóstica se basa en la determinación de las características analíticas mediante la determinación de la repetibilidad y la

reproducibilidad, Además, en esta etapa se determina la especificidad analítica, la cual permite distinguir entre el analito buscado y los componentes que pueden alterarla (inclusividad y exclusividad) y la sensibilidad analítica que es el límite de detección del analito en una prueba. (34). En organismos como *Trypanosoma cruzi*, *Toxoplasma gondii* y virus como el Zika, Dengue y Hepatitis B se ha determinado el desempeño analítico como una etapa para realizar la validación completa de la técnica con fines diagnósticos (35, 36).

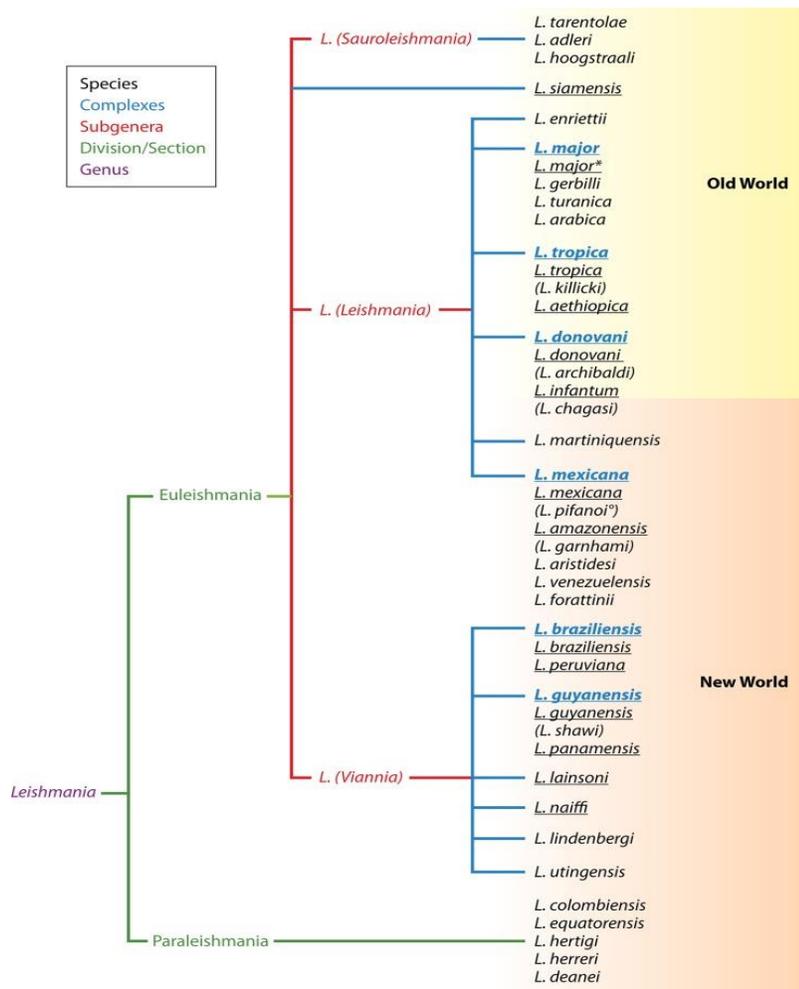
En Colombia, a pesar de la disponibilidad de las técnicas de biología molecular como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional y en tiempo real, no se ha evaluado el desempeño analítico del diagnóstico molecular de leishmaniasis cutánea. Razón por la cual es necesario determinar la especificidad y sensibilidad analítica de tres técnicas de amplificación de ácidos nucleicos (PCR convencional, PCR en tiempo real y amplificación Isotérmica LAMP) utilizando cuatro marcadores moleculares para detectar las principales especies causantes de leishmaniasis cutánea con el propósito de fortalecer la red de diagnóstico y vigilancia del evento en el país.

1 Capítulo 1: Leishmaniasis

1.1 Clasificación taxonómica

Todos los miembros del género *Leishmania* son parásitos de mamíferos y algunos reptiles (37, 38). Rioux y colaboradores en 1990 utilizó el análisis de isoenzimas para definir complejos de especies dentro de los subgéneros (39). Inicialmente, la clasificación de especies se basó en varios criterios extrínsecos tales como las manifestaciones clínicas, distribución geográfica y características biológicas. Las especies de *Leishmania* son heteroxenas, es decir, capaces de colonizar dos huéspedes; viven en los fagocitos del sistema retículo-endotelial de los mamíferos y en el intestino de los flebótomos (Familia Psychodidae). Estas especies se encuentran en áreas tropicales y subtropicales, incluyendo América del Norte, Centro y Sudamérica, así como Cuenca mediterránea, el sudeste de Europa, Oriente Medio, Asia Central y Sudoriental, Subcontinente Indio, África y los informes recientes también demuestran su presencia en Australia (40).

Actualmente se ha propuesto una nueva clasificación para *Leishmania* basada en Electroforesis de enzimas multilocus (Por sus siglas en inglés Multilocus Enzyme Electrophoresis) (41) (Figura 1), formándose dos linajes filogenéticos. Los dos subgéneros (*Leishmania* y *Viannia*) se clasifican según su ubicación en el intestino del vector; si la replicación del parásito ocurre en el intestino medio y anterior del insecto vector se habla del subgénero *Leishmania* y si ocurre en el intestino posterior se habla del subgénero *Viannia* (39). En el subgénero *Leishmania* se agrupan especies presentes en Europa, Asia, África y América y el subgénero *Viannia* se restringe a las Américas.

Figura 1. Taxonomía de *Leishmania*.

Fuente: (41).

1.2 Ciclo de vida

El ciclo biológico comienza cuando la hembra hematófaga del mosquito (principalmente de la familia Psychodidae) infectada con el parásito pica a un hospedero vertebrado, inyectándole la forma infectiva que es el promastigote (Figura 2B). Éstos son rápidamente fagocitados por los macrófagos del huésped y se transforman en el estadio intracelular amastigote (Figura 2A) donde se adaptan para sobrevivir y multiplicarse por fisión binaria. La multiplicación de los parásitos lisa los macrófagos liberando los amastigotes que infectan nuevas células (42).

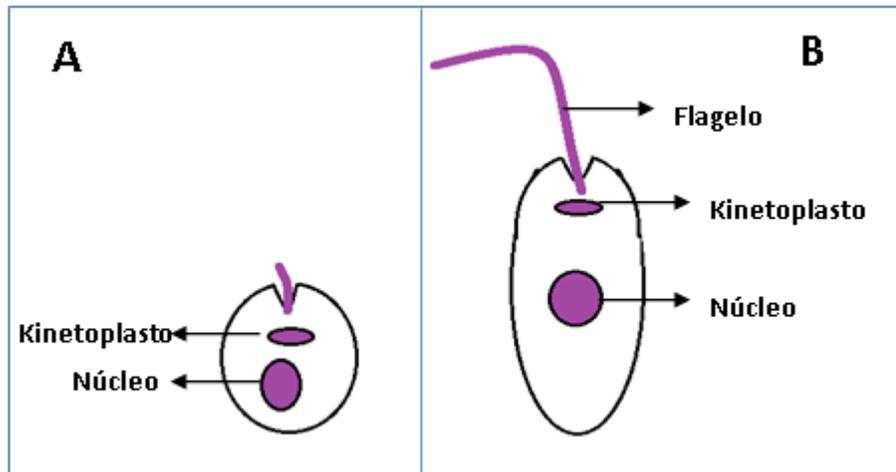


Figura 2. Morfología de *Leishmania* spp.
 A: Amastigote; B: Promastigote Fuente: Autor.

El mosquito, al ingerir sangre del huésped infectado, toma amastigotes que se transforman a promastigotes en el tracto digestivo del insecto vector. Los promastigotes migran a las glándulas salivales del insecto, en donde son inoculados junto con la saliva a un nuevo hospedero durante una ingesta sanguínea e inician un nuevo ciclo (Figura 3) (43, 44). Se ha sugerido la posibilidad que durante el ciclo biológico de muchos protozoos parásitos, puede tener lugar un intercambio genético. En el año 2009, Akopyants y col. demostraron la evidencia de intercambio genético en promastigotes de *Leishmania major* en el insecto vector (*Phlebotomus duboscqi*) (45).



Figura 3. Ciclo de vida de *Leishmania* spp.
 Fuente: <http://www.niaid.nih.gov>

1.3 Cuadros clínicos

De manera general, se reconocen las formas de presentación que se describen a continuación.

1.3.1 Leishmaniasis cutánea

La leishmaniasis cutánea es la forma más común de la enfermedad. En Colombia, la presentación más habitual es una úlcera indolora con compromiso linfagítico y adenopatía regional (10). Las úlceras típicas son redondeadas, con un fondo limpio de aspecto granular y bordes elevados y eritematosos, que usualmente son indoloras (Figura 4). Las úlceras dejan una cicatriz característica, atrófica en su centro, de borde hiperpigmentado, con estriaciones estrelladas del centro a la periferia.



Figura 4. Lesión típica de leishmaniasis cutánea.
Fuente: (46).

La forma linfagítica se presenta cuando la úlcera se acompaña de nódulos que siguen el trayecto de los vasos linfáticos que drenan la lesión inicial. La leishmaniasis cutánea difusa se presenta en pacientes que tienen un defecto específico de la inmunidad celular y es causada principalmente por *Leishmania amazonensis* y *Leishmania mexicana*; se presenta con pápulas, placas y nódulos generalizados (46).

1.3.2 Leishmaniasis mucosa

La leishmaniasis mucosa puede ocurrir simultáneamente con una manifestación cutánea, sin embargo, generalmente ocurre meses o años después de la leishmaniasis cutánea.

Se produce por la diseminación hematogena o linfática de los parásitos desde la piel hasta la mucosa oronasofaríngea (47). Generalmente ante la inspección médica se puede encontrar edema y en estados más avanzados ulceración, perforación y destrucción del tabique nasal (Figura 5). Las lesiones suelen estar acompañadas de sensación de congestión, obstrucción, prurito nasal, epistaxis y rinorrea (48). *L. braziliensis* es la especie más implicada en casos de leishmaniasis mucosa en el Nuevo Mundo, aunque *L. panamensis*, *L. guyanensis* y *L. amazonensis* pueden también estar involucradas (49).



Figura 5. Lesión en nariz y en labio superior.
Fuente: (46).

1.3.3 Leishmaniasis visceral

La leishmaniasis visceral, es la forma más grave de esta enfermedad y en la mayoría de los casos su curso generalmente es asintomático. Al picar el flebótomo, el parásito invade las células del sistema fagocítico mononuclear, se reproduce y se disemina por vía linfática o sanguínea hasta los macrófagos de médula ósea, hígado y bazo. Se caracteriza por fiebre, esplenomegalia y/o hepatomegalia (Figura 6), poliadenopatías, anemia, leucopenia, trombocitopenia, debilidad progresiva y pérdida de peso (50).



Figura 6. Lesihmaniasis visceral Hepatoesplenomegalia en niño. Fuente: (46).

1.4 Epidemiología

Según las estadísticas de la Organización Mundial de la Salud (OMS), la leishmaniasis está presente al menos en 88 países a nivel mundial, en 32 de los cuales es de notificación obligatoria. Existen actualmente, en el mundo, cerca de 12 millones de personas infectadas y cada año se presentan aproximadamente, 2 millones de casos nuevos de las diferentes formas clínicas de las leishmaniasis (3).

En América Latina, la leishmaniasis cutánea y mucosa constituyen un problema de salud pública, endémica en 22 países donde las especies del subgénero *Viannia* causan la mayoría de casos de leishmaniasis cutánea (51). Alvar y colaboradores junto con el equipo de control de las leishmaniasis de la OMS, presentan la distribución biológica y clínica de las especies de *Leishmania* para Colombia y estiman que las especies frecuentemente reportadas son *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) panamensis* y *L. (V.) guyanensis* (2).

En Colombia, Corredor y col, reportan los resultados de un estudio donde se reportan *L. panamensis* (53,8%), *L. braziliensis* (30,3%), *L. chagasi* (9,4%), *L. guyanensis* (2,6%), *L. amazonensis* (1,8%), *L. mexicana* (0,9%) y *Leishmania sp.* (1,2%) a partir de aislamientos obtenidos de humanos, reservorios y vectores de varias regiones de Colombia (4). Saravia y colaboradores en el año 1998, realizaron un estudio donde encontraron que *L. braziliensis* estaba distribuida en varias zonas del país, donde *L. panamensis* era prevalente en el occidente colombiano y *L. guyanensis* en las riberas de los ríos Orinoco y Amazonas (52). De igual forma en el año 2002 se reporta el

predominio de *L. panamensis*, *L. braziliensis* y *L. guyanensis* mediante la expresión de epítopes específicos del subgénero *Leishmania Viannia* (7, 52). Ovalle y colaboradores en el 2006, determinaron la distribución geográfica de los casos de leishmaniasis cutánea en Colombia concentrados en el Instituto Nacional de dermatología Federico Lleras Acosta. La frecuencia encontrada de los 137 aislamientos fue: *Leishmania panamensis* 74,45%; *Leishmania braziliensis* 15,33%; *Leishmania guyanensis* 0,73%; Complejo *Leishmania mexicana* 3,65%, *Leishmania mexicana* 5,11%. La distribución geográfica de estas especies correspondió a los departamentos de Caldas, Santander, Cundinamarca, Caquetá, Casanare, Cauca y Valle del Cauca (8). Recientemente, Ramírez y colaboradores en el 2016, evaluaron la distribución de *Leishmania* en Colombia a partir de aislamientos parasitarios en diferentes regiones geográficas del país en los años 1980 a 2001. 327 cepas de *Leishmania* (humanos, reservorios y flebótomos) se tipificaron mediante Cytb y HSP70, finalmente, basados en el consenso final de Cytb y tipificación de HSP70 se logró discriminar nueve especies de *Leishmania*: *L. panamensis* 61,3%, *L. braziliensis* 27,1% , *L. lainsoni* 0,6%, *L. guyanensis* 0,9%, *L. infantum chagasi* 4,0%, *L. equatoriensis* 0,6%, *L. mexicana* 2,1%, *L. amazonensis* 2,8% y *L. colombiensis* 0,6% (53). Estos estudios hacen parte de la información disponible acerca de la distribución de especies en el país, donde se puede determinar que la especie más frecuentemente aislada es *L. panamensis* seguida por *L. braziliensis*.

Para la semana epidemiológica No. 13 del año 2017, se notificaron al Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública (SIVIGILA), 1.265 casos de leishmaniasis de los cuales, 1.240 corresponden a la forma cutánea, representando el 98% de la notificación, 13 casos de leishmaniasis mucosa que representan el 1% y 12 casos confirmados de leishmaniasis visceral que representan el 1%. Durante el mismo periodo del año 2016 se notificaron al sistema 1.318 casos, lo que representa un descenso de 53 casos. Los casos de leishmaniasis se concentraron en los departamentos Antioquia, Santander, Tolima, Nariño y Norte de Santander (54).

2 Capítulo 2: Diagnóstico

2.1 Examen directo

Es la observación microscópica de la forma diagnóstica (amastigote) en láminas coloreadas con Giemsa, tomadas de la lesión del paciente (Figura 7). Su sensibilidad varía en aspectos relacionados con el tiempo de evolución de la lesión, procedimiento adecuado en la toma de muestra, la coloración de la misma y la experticia del observador. Se ha reportado que la sensibilidad del examen directo varía entre un 80 % y un 40% en lesiones de menos de cuatro meses de evolución y del lugar donde se realice la toma de muestra (9, 10, 48, 55).



Figura 7. Raspado del borde de la úlcera.
Fuente: (46).

2.1.1 Biopsia de piel

La biopsia es un procedimiento utilizado en el estudio de la leishmaniasis cutánea, esta se realiza después que en el estudio del frotis de las lesiones no sea posible comprobar la presencia del amastigote (Figura 8) (10). La biopsia de piel del borde de una úlcera, por escisión (losange) o con sacabocados y que incluya hipodermis, es la muestra ideal para hacer un diagnóstico preciso de leishmaniasis y para diferenciarla de otras entidades (56).

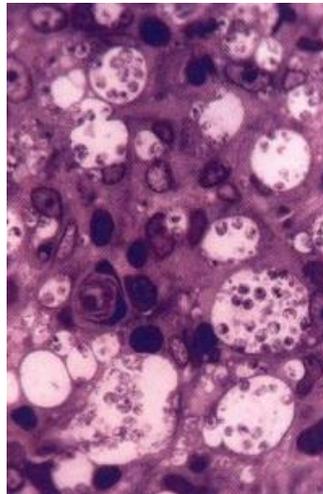


Figura 8. Biopsia con tinción de azul de toluidina.
Fuente: (46).

2.1.2 Cultivo

Para el manejo y mantenimiento de los cultivos no existe un medio universal que permita el crecimiento de las distintas especies de *Leishmania*, ya que éstas presentan diferentes requerimientos nutricionales. Los medios universalmente aceptados y más frecuentemente utilizados son los medios bifásicos de agar con sangre desfibrinada de conejo (medio de Novy, Nicolle y McNeal o NNN modificado) (Figura 9) y los medios monofásicos o líquidos (Schneider, RPMI, etc.), habitualmente enriquecidos con glutamina y suero fetal bovino (10 - 30%). El cultivo se realiza a partir de biopsia tomadas de la lesión activa, se utiliza para obtener grandes cantidades de promastigotes para la obtención de antígeno requerido en pruebas serológicas, estudios de evaluación en modelos murinos y obtención de parasitemia altas requeridas para realizar curvas estándar utilizadas en técnicas de biología molecular (57).



Figura 9. Cultivo de *Leishmania* en medio bifásico.
Fuente: autor.

2.1.3 Pruebas serológicas

Su positividad indica la presencia de anticuerpos circulantes que reconocen partes antigénicas del parásito. Se utilizan varias técnicas tales como inmunofluorescencia indirecta (IFI) (Figura 10), enzimoimmunoensayo (ELISA) y otras como hemoaglutinación. Para Colombia se ha establecido el uso de estas pruebas para casos de leishmaniasis mucosa y leishmania visceral, para leishmaniasis cutánea aún no se ha establecido como un examen diagnóstico (10).

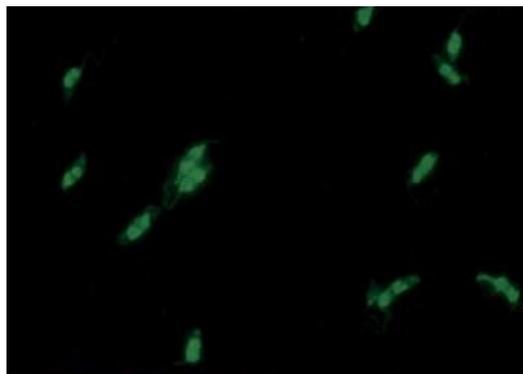


Figura 10. Promastigotes teñidos de verde en Inmunofluorescencia indirecta.
Fuente: (46).

2.1.4 Diagnóstico molecular

La PCR (Por sus siglas en inglés Polymerase Chain Reaction) permite la amplificación selectiva de secuencias específicas de ácidos nucleicos mediante síntesis enzimática (58) y se utiliza ampliamente para el diagnóstico de la leishmaniasis, pues permite detectar el ADN presente en muestras biológicas en cantidades mínimas (femtogramos) (18). En la leishmaniasis cutánea, la PCR ha sido reportada como una herramienta de gran valor y su sensibilidad puede alcanzar el 100% (21). En la forma mucosa, el uso del ADNk como diana genética ha demostrado ser una buena prueba diagnóstica, mientras que la región ITS es más útil para discriminar especies (25). Entre las plataformas más utilizadas se encuentran:

2.1.4.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional

La Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN. La técnica se basa en la replicación del ADN realizada por una ADN polimerasa termoestable (Taq polimerasa). Esta enzima realiza la síntesis de una cadena complementaria de ADN en el sentido 5'→3' usando un molde de cadena sencilla a partir de un fragmento de doble cadena. Para iniciar la reacción se utilizan los iniciadores de ADN, también llamados cebadores o primer (Figura 11). La PCR se conforma de etapas (desnaturalización, hibridación y elongación) y ciclos (repetición de las 3 etapas). La primera etapa es la desnaturalización de las cadenas de ADN las cuales se separan a 95°C, la segunda etapa consiste en un descenso de la temperatura para permitir que los cebadores se unan por complementariedad al ADN molde, esta segunda etapa se conoce como hibridación donde las temperaturas habituales en esta fase oscilan entre 35 y 60°C y por último, en la etapa de elongación o extensión, la enzima polimerasa incorpora nucleótidos complementarios a partir del extremo 3' libre de la región en que han hibridado los cebadores. La temperatura a la que se lleva a cabo esta etapa depende de la enzima polimerasa empleada; si se utiliza Taq polimerasa la temperatura de elongación suele ser de 72°C. La amplificación del fragmento de ADN sigue una progresión geométrica de forma que al final de "n" ciclos se obtienen 2^n copias hasta el momento en que se alcanza el efecto meseta (59).

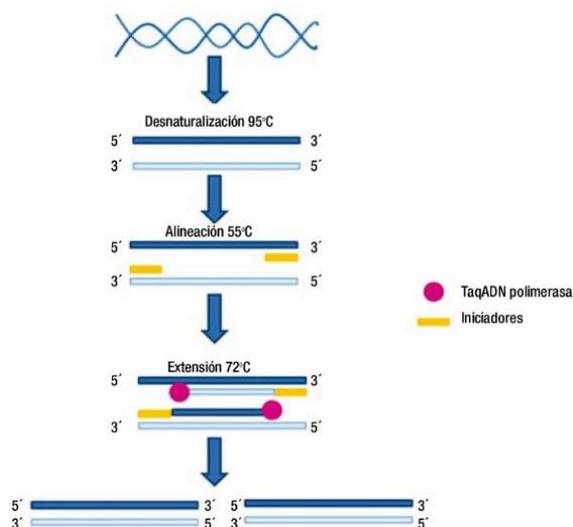


Figura 11. Esquema general de las etapas de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
Fuente: <http://www.elsevier.es/es-revista-gaceta-mexicana-oncologia-305>.

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

La PCR en tiempo real tiene como objetivo detectar y cuantificar las secuencias específicas de los ácidos nucleicos mediante la lectura de la fluorescencia emitida durante la reacción, la cual es indicativa de la producción del amplicón en cada ciclo de la PCR. El término en tiempo real se refiere a que la detección de los productos amplificados sucede en cada ciclo de la reacción (59). En la qPCR se puede cuantificar la concentración inicial de ADN (o ARN) diana, mediante el uso de estándares con concentraciones conocidas y crecientes de ADN diana (curva patrón) en el ciclo de amplificación. Esta PCR puede utilizar fluoróforos generales de unión no específica al ADN como el Bromuro de Etidio o el SYBR Green I, sondas de hidrólisis (Sondas 5' nucleasa), sondas de hibridización, molecular beacon o sondas de secuencias específicas. Los agentes intercalantes son fluoróforos que aumentan notablemente la emisión de fluorescencia cuando se unen a ADN de doble cadena (ADNdc). El más utilizado en qPCR es el SYBR Green I (Figura 12), el cual interacciona con el surco menor del ADNdc, emitiendo 1.000 veces más fluorescencia que cuando está libre en solución, el incremento de ADN en cada ciclo se refleja en un aumento proporcional de la fluorescencia emitida. El SYBR Green I absorbe luz en una longitud de onda de 480 nm y la emite a 520 nm (60).

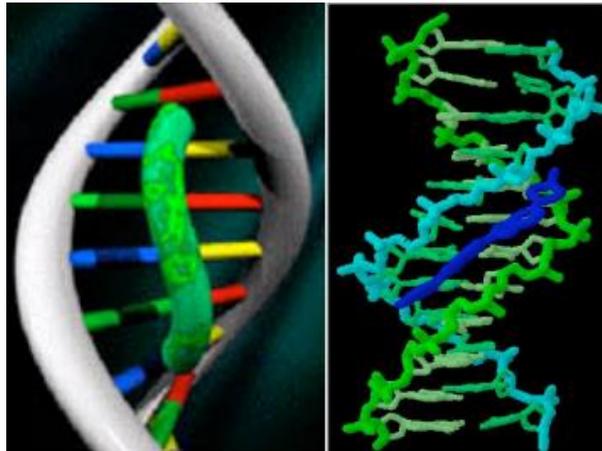


Figura 12. Representación de la interacción del SYBER Green I con el ADN de doble cadena.
Fuente: <http://docplayer.it/821674-Pcr-polymerase-chain-reaction.html>

En la qPCR se va registrando el incremento de fluorescencia (proporcional al aumento de producto de amplificación) en cada ciclo, y esta información se refleja gráficamente en curvas de cinética de la reacción para cada una de las muestras, estándares y controles. Para cada muestra el programa calcula el número de ciclo en el que el lector empieza a detectar un incremento de fluorescencia significativo, con respecto a la señal de base. El número de ciclos en donde la fluorescencia de la muestra supera el umbral se denomina punto de corte (C_p , de crossing point) o ciclo umbral (C_t , de threshold cycle) y es inversamente proporcional a la concentración inicial de ADN diana presente en la muestra (Figura 13).

Con las concentraciones previamente conocidas de los controles externos y sus C_t correspondientes se dibuja una curva patrón. Extrapolando en ella los valores de los C_t de cada muestra problema se puede inferir su concentración de ADN inicial. Idealmente cada ADN blanco en la muestra original se duplica de ciclo en ciclo, lo que equivale a una eficiencia de amplificación de $E = 2$. La eficiencia de la reacción puede ser calculada por la siguiente ecuación: $E = 10^{(-1/-(\text{Log}_E)^{-1})}$. La eficiencia de la PCR deber ser de aproximadamente 90-100% con una pendiente ideal de -3.1 a -3.6 (61).

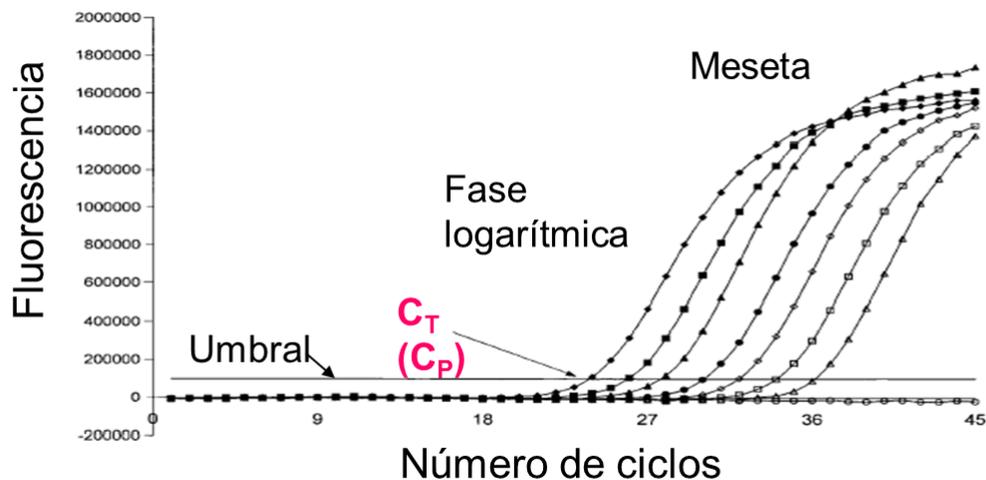


Figura 13. Esquema PCR en tiempo Real.
Fuente: (62).

2.1.4.3 Amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP)

El método LAMP está basado en el principio de síntesis de ADN por desplazamiento de cadena, el cual es llevado a cabo por una polimerasa con alta actividad de desplazamiento de cadena y un sistema de dos cebadores internos y dos cebadores externos para reconocer un total de seis secuencias distintas en el ADN blanco bajo condiciones isotérmicas (temperatura constante) (26). Desde su publicación en el año 2000, varios ensayos de LAMP se han desarrollado para la identificación de virus, bacterias, protozoos y hongos (62-65). Los cebadores internos se denominan Forward Inner Cebador (FIP) compuesto por dos fracciones (F1c + F2) y Backward Inner Cebador (BIP) compuesta por B1c y B2), cada set de cebadores contiene dos secuencias distintas que corresponden a las secuencias sentido y antisentido del ADN blanco. Los cebadores externos se denominan F3 y B3. Todo el conjunto de cebadores reconoce 6 diferentes regiones del ADN blanco (F3c, F2c, F1c, B1, B2 y B3) (Figura 14).

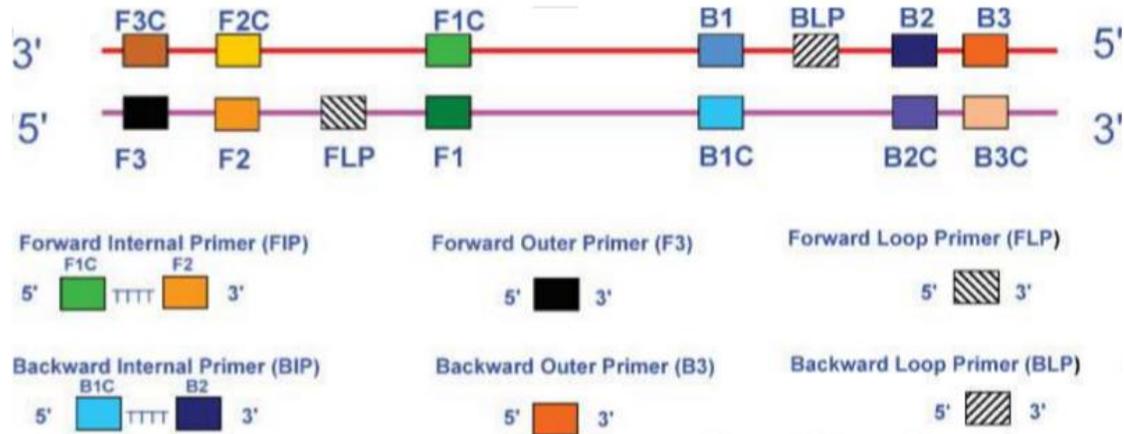


Figura 14. Esquema de los cebadores utilizados para LAMP:
Fuente: (66).

Para el diseño de cebadores de LAMP, el contenido de GC debe ser aproximadamente del 50- 60% y alrededor de 40-50 % para AT. Los cebadores deben ser diseñados de manera que no se forme fácilmente estructuras secundarias. La secuencia del extremo 3' no debe ser rica en AT o complementarias de otros cebadores. La distancia entre el extremo 5' de F2 y B2 debería ser 120 - 180pb, y la distancia entre F2 y F3 así como de B2 y B3 debe ser 0-20pb. La distancia para las regiones de formación de bucle (5' de F2 a 3' de F1, 5' de B2 a 3' de B1) debe ser 40-60pb (66).

La amplificación se lleva a cabo en dos pasos: no cíclico y cíclico.

NO CÍCLICO: Aquí los cebadores inician su acción en dirección 5' - 3', el cebador que interactúa con el ADN blanco es el FIP el cual se une a su región complementaria F2c y así comienza a sintetizar la hebra complementaria del ADN blanco. El siguiente cebador en interactuar es el F3 uniéndose a la región F3c complementaria del ADN blanco, la Bst actúa también como helicasa lo que ocasiona que la doble hebra se abra y la F3 pueda seguir con su camino; por el otro extremo tanto BIP como B3 siguen el mismo paso, la hebra complementaria hace que por complementariedad sus extremos formen un bucle, esta hebra es la que servirá como secuencia madre para la posterior síntesis de ADN (Figura 15).

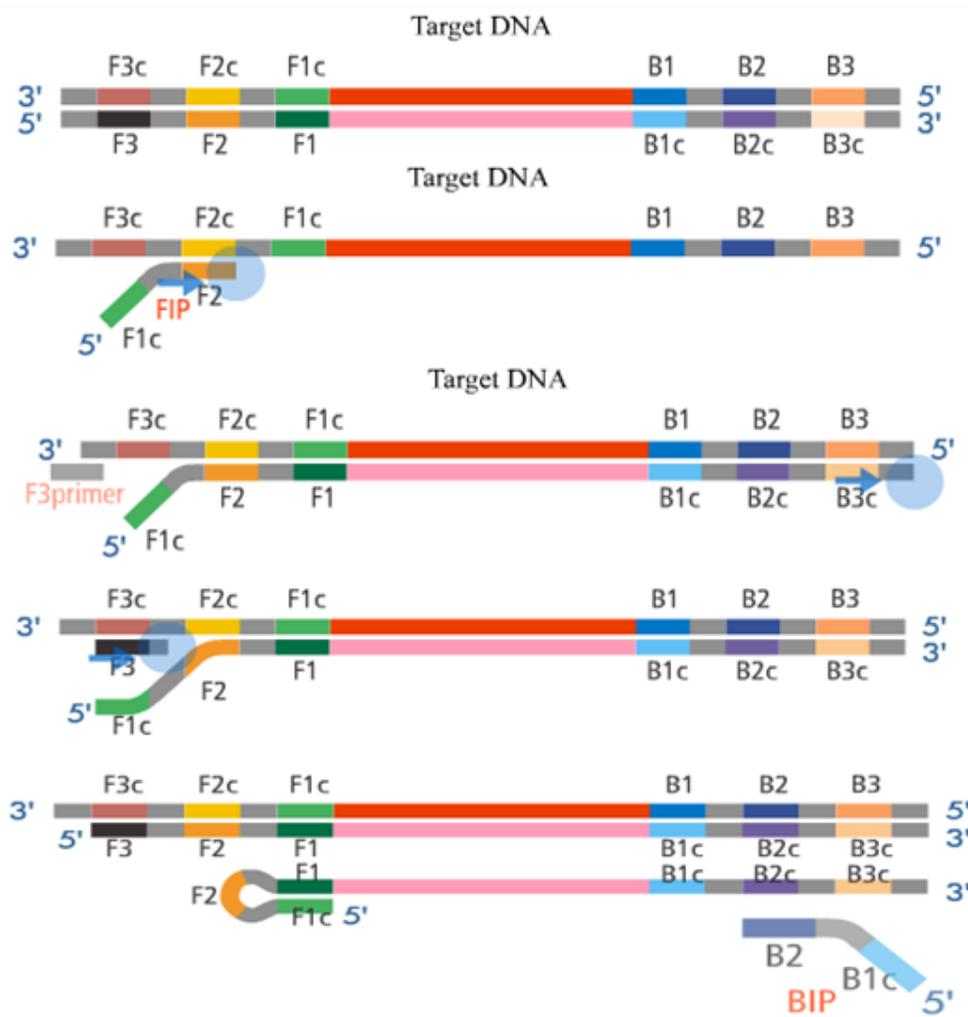


Figura 15. Inicio de la reacción de LAMP.
Interviene el cebador interno FIP y el cebador externo F3. Fuente:
<http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/loop.html>

CICLICO: En la secuencia blanco, interactúan nuevamente el cebador FIP donde la región F2 se une a su región F2c de la hebra complementaria realizando la hibridación así como también por el otro extremo BIP donde la región B2 se une a su región B2c de la hebra complementaria, en el transcurso de la polimerización las secuencias sintetizadas van adquiriendo una conglomeración de bucles. (Figura 16).

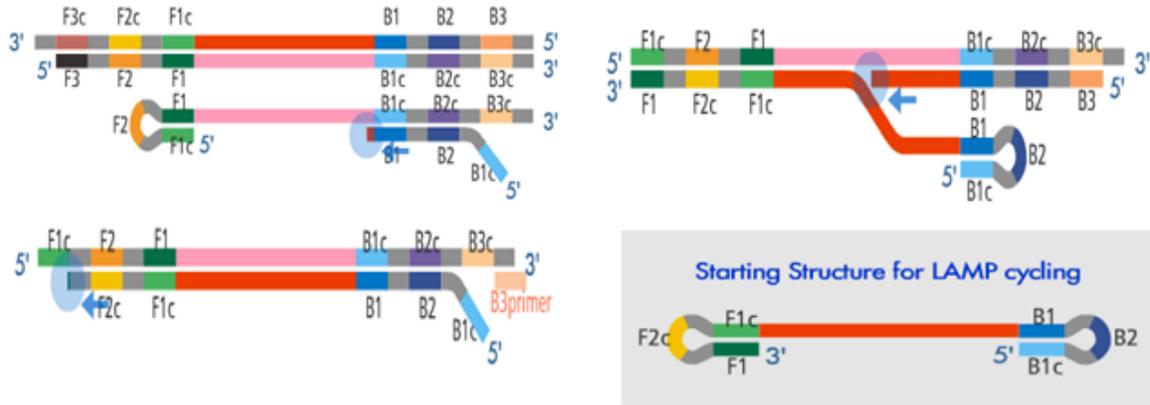


Figura 16. Segunda etapa de la reacción de LAMP. Interviene el cebador interno BIP y el cebador externo B3 y se forma la estructura de doble asa. Fuente: <http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/loop.html>

Ambos productos sirven luego como molde para un cebador BIP en los ciclos siguientes de la reacción por desplazamiento de la hebra, de los cuales, una parte es denominada elongación y reciclaje. Así, la secuencia original de LAMP es amplificada tres veces cada medio ciclo (Figura 17). Los productos finales son una mezcla de ADN en herradura con diferentes longitudes en su tallo y con estructuras similares a un conglomerado con múltiples bucles formados por la unión entre repeticiones invertidas alternativas de la secuencia blanco en la misma cadena (26).

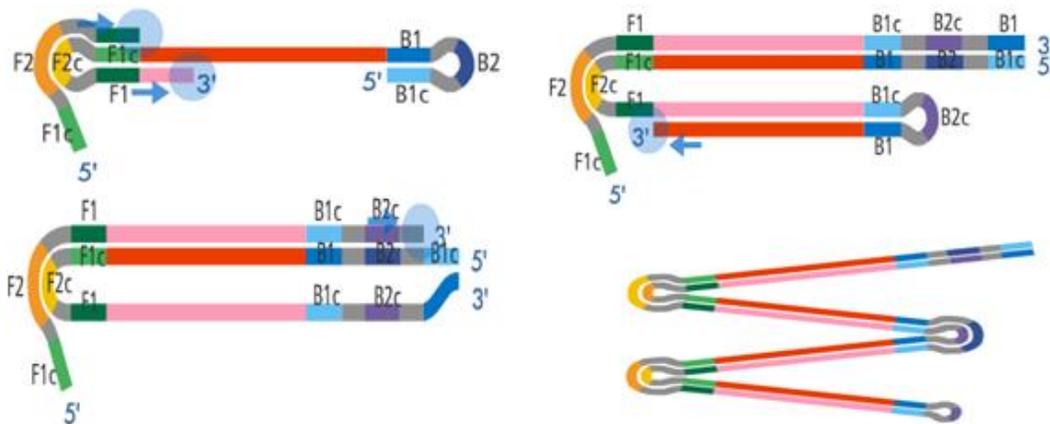


Figura 17. Formación de bucles en LAMP. Múltiples bucles formados por la unión de repeticiones invertidas alternativas de la secuencia blanco en la misma cadena. Fuente: <http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/loop.html>

El uso de cuatro cebadores (reconocimiento de seis secuencias diferentes) en las etapas iniciales de LAMP y dos cebadores (reconocimiento de las cuatro secuencias) durante los siguientes pasos garantiza alta especificidad para la amplificación.

Métodos de detección

Detección visual por turbidez: La turbidez de pirofosfato de magnesio (polimerización del ADN produce pirofosfato el cual se precipita como pirofosfato de magnesio), un subproducto de la reacción de amplificación, es producida en proporción directa con la cantidad de los productos amplificados. Debido a que la amplificación LAMP puede producir una cantidad abundante de productos, la turbidez blanca puede ser apreciada a simple vista (Figura 18). Según esto, la presencia de turbidez puede indicar la presencia del gen de interés y la detección visual puede lograrse (67).

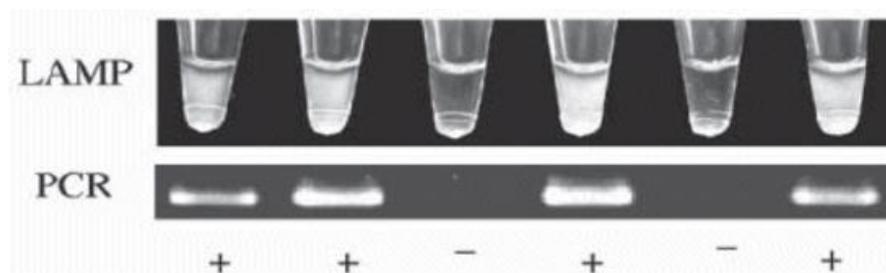


Figura 18. Detección de LAMP por turbidez.
Fuente: (67).

Detección por cambio de color: El verde de Malaquita es un compuesto orgánico que tradicionalmente se ha utilizado para la tinción de esporas bacterianas. Nzelu en el año 2014, empleó este reactivo como método de revelado de la LAMP dando como resultado un color azul aguamarina al amplificar el ADN (Figura 19), mientras que las muestras negativas (sin amplificación) son incoloras (68).



Figura 19. Detección de LAMP por cambio de color con verde de malaquita.
Fuente: (68).

Detección visual por fluorescencia: La calceína que viene incluida en el kit de reacción se combina con iones de magnesio para conseguir el efecto de amortiguación. La amplificación genera el subproducto, iones pirofosfato, los cuales se unirán y quitarán iones manganeso de la calceína para producir fluorescencia (Figura 20) (30). La fluorescencia es intensificada mucho más a medida que la calceína se combina con los iones magnesio. En consecuencia, la presencia de fluorescencia puede indicar la presencia del gen blanco y la detección visual puede lograrse (69).

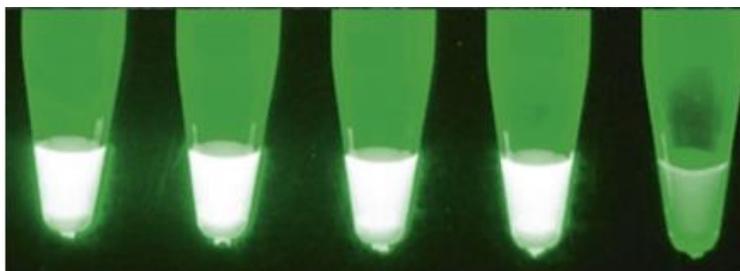


Figura 20. Detección de LAMP por fluorescencia.
Fuente: (62).

2.1.5 Marcadores moleculares para diagnóstico molecular de *Leishmania*

Para el caso de *Leishmania*, las técnicas basadas en PCR pueden utilizar diferentes blancos genéticos en los que se encuentran:

2.1.5.1 ADN del quinetoplasto (ADNk).

El ADN del quinetoplasto (ADNk) es una estructura única de los quinetoplastidos, localizado en la mitocondria del parásito protozoo flagelado perteneciente al orden

Kinetoplastida, el cual comprende una red de discos de ADN. El kinetoplasto está compuesto por maxicírculos y minicírculos, los maxicírculos codifican genes destinados al proceso de edición del ARN. Los minicírculos son pequeñas moléculas circulares de alrededor de 800 pb, que contiene una región conservada de 120 pb y una región altamente variable que codifica para ARNs involucrados en los procesos de edición (Figura 21). La ventaja de utilizar estos genes para el diagnóstico se basa en su alto número de copias (10.000 copias por parásito) lo que resulta en una alta sensibilidad del ensayo (70).

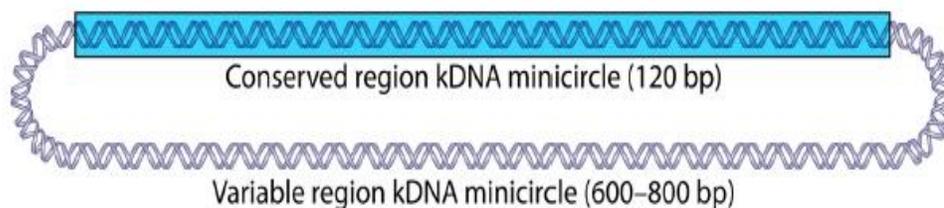


Figura 21. Minicírculo del ADNk.

Fuente: Disponible en <http://www.nature.com/scitable/topicpage/kinetoplastids>

2.1.5.2. Espaciadores Internos Transcritos (ITS)

Los genes ribosomales y los espaciadores proveen sitios diana importantes para la detección molecular y estudios filogenéticos. El ADN ribosomal se presenta en repeticiones en tándem y está formado por tres subunidades altamente conservadas (18 ADNr, 5.8 ADNr y 28 ADNr), separadas por dos espaciadores con elevadas tasas de sustitución (ITS1 e ITS2) (Figura 22). Las regiones ITS son de evolución rápida y por consiguiente su variabilidad permite la realización de análisis filogénicos, evolutivos y biogeográficos entre órdenes, géneros y especies relacionados (71). Estas repeticiones en tándem se encuentran a lo largo de todo el genoma y evolucionan concertadamente. El espaciador interno transcrito 1 (ITS1) separa los genes que codifican la subunidad pequeña del ARNr de la 5.8S generando un fragmento de 300 a 350 pb fragmento común para todas las especies de *Leishmania* (72).

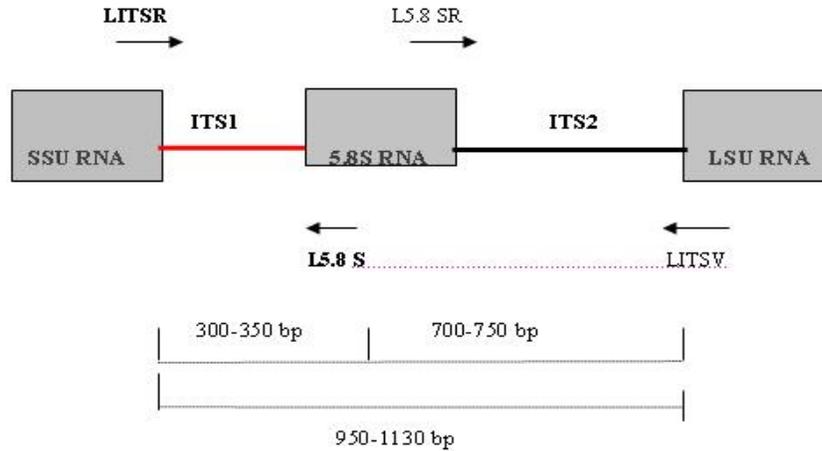


Figura 22. Esquema de ITS 1 y 2.

Fuente: Disponible en <http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/al-jawabreh-amer-2005>

2.1.5.2 Proteínas de choque térmico (HSP70)

Las proteínas de choque térmico son las que garantizan la termotolerancia de los parásitos (73) (Figura 23). Durante la transmisión de *Leishmania*, el parásito se enfrenta a dos situaciones de estrés: el aumento de temperatura y el descenso de pH. Mientras que en el insecto, los promastigotes de *Leishmania* se encuentran a temperaturas de 22-28°C, tras su transmisión al hospedero mamífero quedan expuestos a temperaturas de 31-35°C en el caso de las especies dermatrópicas (*L. panamensis*, *L. braziliensis*) o a temperaturas de 37°C en el caso de las especies viscerotrópicas (*L. donovani*, *L. infantum*) (74). Por tanto, para asegurar su supervivencia en el mamífero, *Leishmania* posee mecanismos de termotolerancia, para lo cual resulta fundamental la respuesta al choque térmico desencadenada durante la transmisión (75). Generalmente los cebadores amplifican un fragmento polimórfico de 1.422 pb del gen *hsp70* de *Leishmania* spp (76).

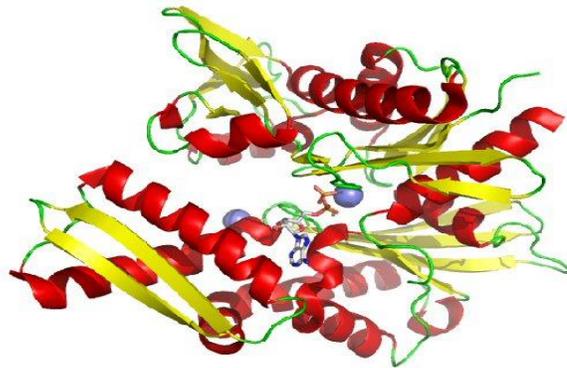


Figura 23. Esquema de HSP70

Fuente: Disponible en <http://www.biounalm.com/2009/02/hsp70-al-rescate.html>

2.1.5.3 Subunidad Ribosomal 18S

El ribosoma de los eucariotas posee dos subunidades de ADN Ribosomal con diferentes gradientes de sedimentación: 40S y 60S, el cual esta codificado por tres genes, la subunidad grande (28S), la subunidad pequeña (18S) y el gen 5.8S. La subunidad pequeña del ARN ribosomal (SSU) 18S (Figura 24) ha sido reportada como uno de los genes más utilizados en estudios filogenéticos y como blanco genético para la PCR. El gen 18S es muy conservado en todos los organismos y sus variaciones permiten la diferenciación de especies de *Leishmania* (77).

En general, las secuencias de genes rRNA son de fácil acceso debido a las regiones flanqueadas altamente conservadas que permite el uso de primers universales (78). Su disposición repetitiva dentro del genoma proporciona cantidades excesivas de ADN molde para PCR, el gen 18S es parte del núcleo funcional ribosómico y está expuesto a fuerzas selectivas similares en todos los seres vivos (79) Este gen codifica para el ADN ribosomal (ADNr), que presenta entre 10 y 100 copias. La PCR-ADNr (PCR-18S) amplifica un fragmento de 350 pb (80).

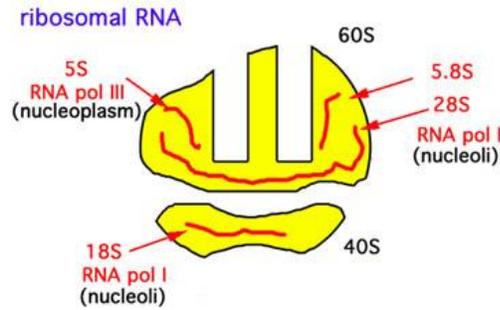


Figura 24. Esquema de SSU rRNA.

Fuente: Disponible en <http://genemol.org/genemol/theory/BIOGEN/orggen/transcriptionm1.jpg>

2.1.5.4 Gen Miniexón.

En los protozoarios quinetoplastidios el gen mini-exon está presente en el genoma nuclear en aproximadamente 200 copias arregladas en secuencias repetitivas de tipo tándem (81). Es de gran importancia la alta conservación de secuencias del gen mini exón y la naturaleza multicopia repetidas en tándem así, la variación de la secuencia en este gen pueden reflejar patrones taxonómicos (82). Este gen es único en el genoma de *Leishmania*, la región transcrita es altamente conservada (Figura 25), pero la región espaciadora no transcrita es distinta en longitud y en secuencia entre diferentes especies de *Leishmania* (83).

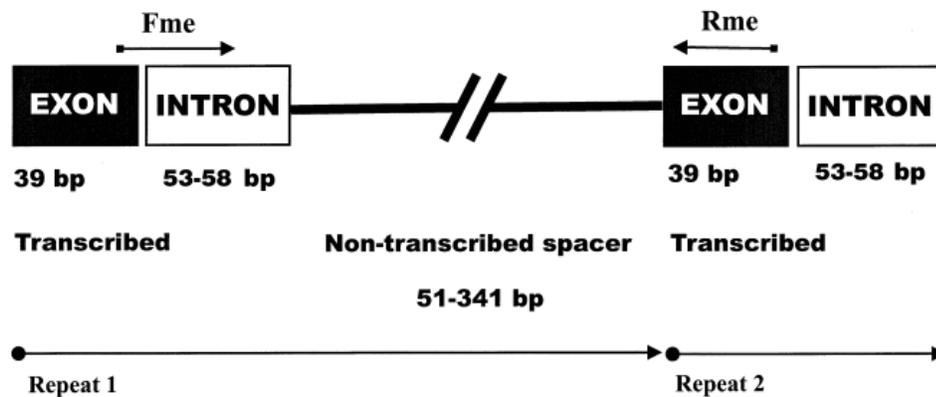


Figura 25. Gen mini-exon en *Leishmania*.

Contiene un exón muy conservado (39 bp), una región intron transcrita, moderadamente variable (55 a 101 bp) y una secuencia espaciadora no transcrita altamente (51 a 341 bp). Fuente: (83).

3 Capítulo 3: Parámetros de validación de un método de diagnóstico

Una prueba diagnóstica se considera válida cuando haya cumplido un conjunto de criterios de validación esenciales. La falta de cumplimiento de cualquiera de estos criterios es probable que reduzca la confianza en que la prueba cumpla los objetivos deseados.

3.1 Validación analítica

Es un proceso que determina la aptitud de un ensayo, que ha sido correctamente desarrollado, optimizado y estandarizado, para un propósito definido. Para validar cualquier técnica diagnóstica es necesario estimar características del desempeño analítico y características del desempeño diagnóstico (84). Para mejor comprensión, las características del desempeño analítico hacen referencia a la primera etapa de la figura 26.

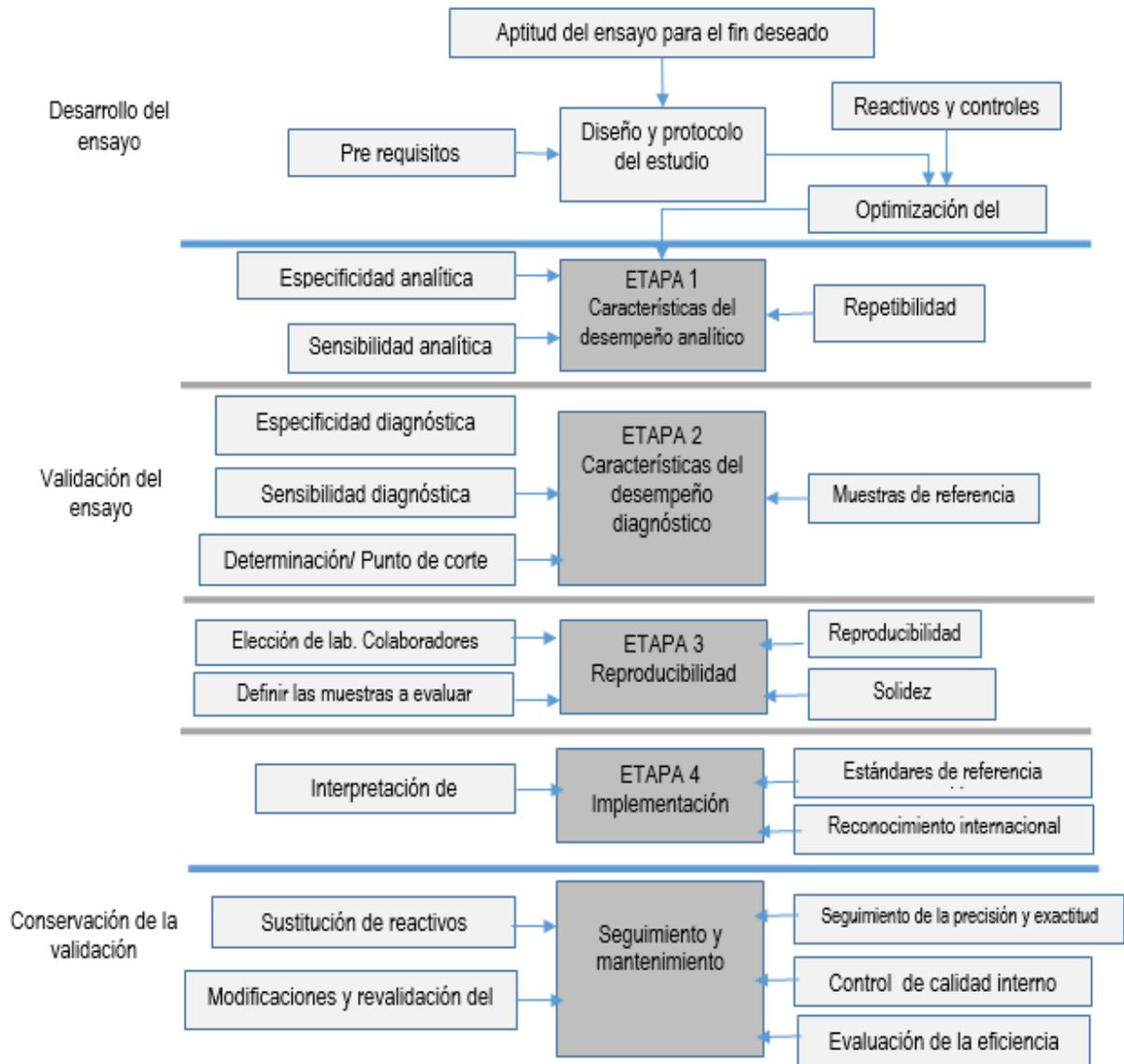


Figura 26. Etapas y criterios de validación.
Fuente: (85).

3.2 Características del desempeño analítico

3.2.1 Repetibilidad

Es el nivel de concordancia entre los resultados de las réplicas de una muestra. La repetibilidad (también conocida como coeficiente de correlación intraclass) es una medida estadística de la consistencia entre medidas repetidas de un mismo carácter en un mismo individuo (85). Un valor de repetibilidad de uno indica que la medida es

perfectamente consistente y repetible, y que el investigador no comete ningún error en la medición de ese carácter. Un valor de cero indica que las medidas repetidas obtenidas de ese carácter son distintas (86).

3.2.2 Rango Reportable Anticipado (RRA)

Se utiliza para referirse a un intervalo de concentraciones en el cual el analito puede determinarse con un adecuado nivel de confianza y precisión sobre el cual el laboratorio puede establecer o verificar la exactitud del instrumento (33). En la literatura se conoce como estudio de linealidad en el cual se establecen de 7 a 9 diluciones a lo largo de rango de medición y con los resultados obtenidos se realiza un análisis de regresión lineal. Se recomienda utilizar aquellas diluciones hechas con matrices que se aproximan a las muestras reales son preferidas a diluciones hechas con agua o solución salina (87).

3.2.3 Especificidad analítica

La especificidad analítica es la capacidad del ensayo para distinguir el analito objetivo (por ejemplo, anticuerpos, organismo o secuencia genómica) de analitos no objetivo (85) (Figura 27). En esta se incluye:

3.2.3.1 Selectividad

Es el grado en que un método puede cuantificar con exactitud el analito en cuestión en presencia de: 1) interferentes, tales como componentes de la matriz (por ejemplo, inhibidores de enzimas en la mezcla de reacción); 2) productos de degradación (por ejemplo, factores tóxicos); 3) una unión no específica de los reactivos a una fase sólida (por ejemplo, conjugado de un ELISA adsorbido a un pocillo de la placa de microtitulación); 4) anticuerpos contra la vacunación, que pueden confundirse con anticuerpos contra la infección activa. Estos interferentes pueden causar falsas reducciones o incrementos en la prueba que afectarán negativamente a su especificidad analítica (88).

3.2.3.2 Inclusividad

Es la capacidad de una prueba de detectar varias cepas o serovariedades de una especie, varias especies de un género o una agrupación similar de microorganismos o anticuerpos estrechamente emparentados (36).

3.2.3.3 Exclusividad

Es la habilidad que tiene el método de detectar un analito o secuencia genómica que es propia del microorganismo analizado y excluye todos los demás estrechamente relacionados o aquellos que pudieran dar una reacción cruzada o que sean reportados como microorganismos de diagnóstico diferencial (36).

3.2.4 Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica es la capacidad del ensayo para detectar el analito objetivo (por ejemplo, anticuerpos, organismo o secuencia genómica) a mínimas diluciones (85) (Figura 16). En esta se incluye:

3.2.4.1 Límite de detección LoD

Es la cantidad más pequeña que el método puede detectar de manera fiable para determinar la presencia o ausencia de un analito. Esto se puede expresar como el número de copias del genoma, la dosis infecciosa, las unidades formadoras de colonias, las unidades formadoras de placas, etc. del agente que se pueden detectar y distinguir del resultado de una matriz sin el analito (34).

3.2.4.2 Límite de cuantificación

El límite de cuantificación es la concentración más baja de analito en la muestra, que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables cuando se emplea el procedimiento exigido. Se mide mediante el análisis de muestras que contengan cantidades conocidas de analito en disminución, y la determinación del nivel más bajo al cual pueden alcanzarse grados aceptables de exactitud y precisión (34).

3.2.4.3 Precisión

Se refiere a la dispersión de un conjunto de valores obtenidos de mediciones repetidas de una magnitud (34). Cuanto menor es la dispersión mayor la precisión. La

precisión está relacionado íntegramente con el error aleatorio causado por factores que varían durante el funcionamiento normal del ensayo (33).

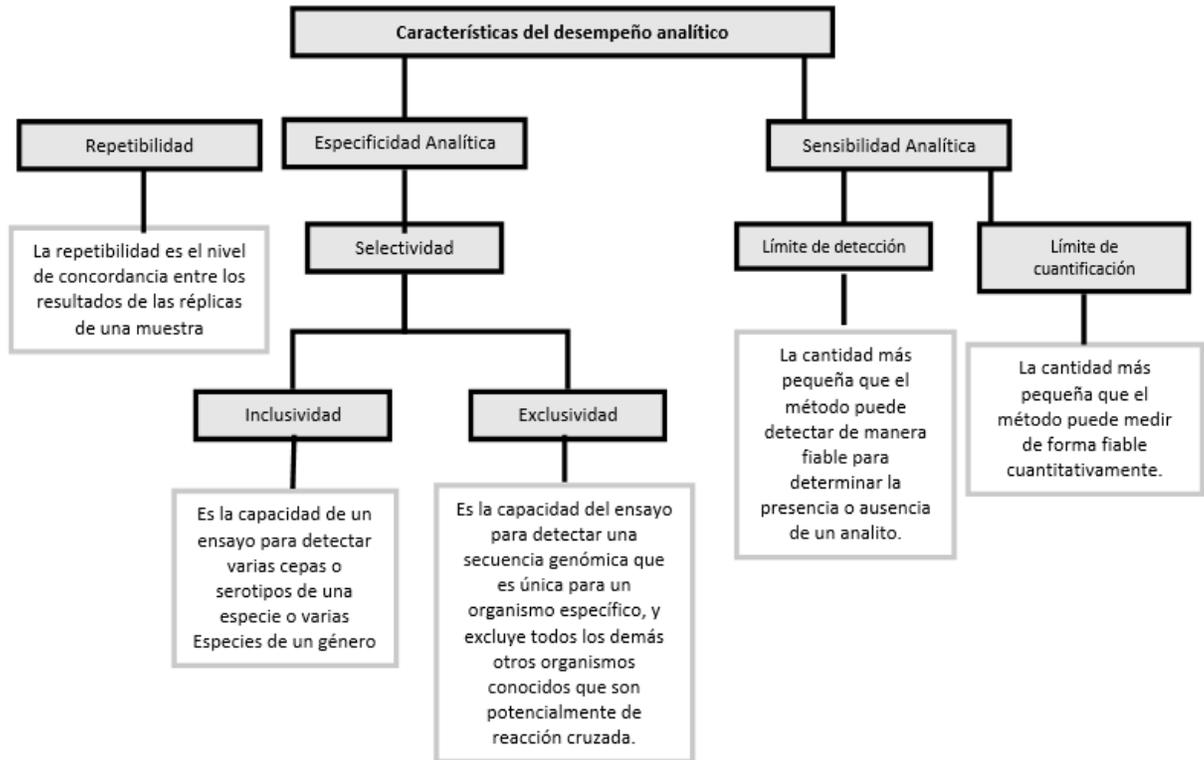


Figura 27. Características del desempeño analítico.
Fuente: Autor

3.3 Antecedentes

Se realizó una revisión de la literatura relacionada con los marcadores moleculares utilizados para el diagnóstico de especies de *Leishmania* empleados en PCR convencional, qPCR y LAMP (Tablas 1 y 2), se puede destacar que en estos estudios solo se determinaron sensibilidad y especificidad de uno o máximo dos marcadores moleculares implementados en un solo ensayo. No se ha reportado estudios de desempeño analítico de técnicas moleculares para el diagnóstico de *Leishmania*.

Da Silva y colaboradores desarrollaron y validaron un ensayo basado en PCR –RFLP para el diagnóstico de leishmaniasis cutánea utilizando como gen blanco la proteína de choque térmico HSP70 y el espaciador interno ITS-1. Se sometieron al ensayo 70 cepas de *Leishmania* donde se incluyeron 7 cepas de referencia y 63 cepas tipificadas previamente. Se observó una buena concordancia entre el empleo de los dos marcadores moleculares y la identificación de las especies de *Leishmania* (89). En el año 2008, Shahbazi y colaboradores compararon técnicas parasitológicas para el diagnóstico de leishmaniasis cutánea (frotis directos coloreados con Giemsa y cultivos de parásitos) con un ensayo de PCR donde se evaluó el Espaciador Interno Transcrito (ITS-1). Los autores reportaron una sensibilidad de la PCR de 98,8% al comparar los resultados obtenidos con los resultados de las técnicas parasitológicas (90).

En Colombia se evaluó la sensibilidad de la PCR en tiempo real utilizando el gen 18S como marcador molecular. Las muestras provenían de hisopados de lesiones donde se reportó una sensibilidad de 98% y una especificidad del 84% (22). En Marruecos, Mouttaki y colaboradores en el año 2014 realizaron un ensayo para evaluar el diagnóstico molecular de la leishmaniasis cutánea utilizando como blancos genéticos el ADNk y el ITS1, sugiriendo el uso de la PCR-ITS1-RFLP para la identificación de las especies en áreas similares a la cuenca del mediterráneo (24).

Tabla 1. Revisión de literatura. Blancos genéticos utilizados en PCR convencional y qPCR para diagnóstico de *Leishmania*

Autor/año	Titulo	Blanco	Nivel taxonómico de identificación	Sensibilidad	Especificidad
(91)	Simple form of clinical sample preservation and <i>Leishmania</i> DNA extraction from human lesions for diagnosis of american cutaneous leishmaniasis via polymerase	ADNk	Género	90%	No hay dato

	chain reaction				
(92)	Molecular epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Venezuela.	ADNk	Género	88,2 - 95,4%	100%
(19)	Polymorphism analysis of the internal transcribed spacer and small subunit of ribosomal RNA genes of <i>Leishmania mexicana</i>	ITS + RFLP	Género y especie	80%	100%
(15)	Identification and Differentiation of <i>Leishmania</i> Species in Clinical Samples by PCR Amplification of the Miniexon Sequence and Subsequent Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis	Mini exon + RFLP	Género y especie	89,70%	No hay dato
		ITS + RFLP		51,71%	
(23)	Usefulness of PCR in the diagnosis of cutaneous leishmaniasis in Tunisia	Ssu-rRNA (18 s)	Género	99,30%	No hay dato
(18)	Comparison of PCR Assays for Diagnosis of Cutaneous leishmaniasis	ADNk	Género	98,70%	57,10%
		ITS		91,00%	100%

(25)	Polymerase chain reaction with two molecular targets in mucosal leishmaniasis' diagnosis: a validation study	ADNk	Género	68,60%	92%
		ITS		40,00%	96%
(93)	Cutaneous leishmaniasis caused by <i>Leishmania tropica</i> in Bikaner, India: parasite identification and characterization using molecular and immunologic tools	ITS1 + RFLP	Género y especie	82,75%	100%
		ADNk	Género	96,60%	66,70%
(21)	American tegumentary leishmaniasis: direct species identification of <i>Leishmania</i> in non-invasive clinical samples	hsp 70 + RFLP	Género y especie	95%	100%
(80)	A Simplified and Standardized Polymerase Chain Reaction Format for the Diagnosis of leishmaniasis	Ssu-rRNA (18 s)	Género	92%	99%
(94)	A Comparative Study of Diagnosis by Polymerase Chain Reaction (PCR), Microbiological, and Histopathological Methods of Old World Cutaneous leishmaniasis in Iraq.	ADNk	Género	97,10%	No hay dato
(95)	PCR detection of <i>Leishmania</i> in skin biopsies	Ssu-rRNA (18 s)	Género	84,60%	100%

(96)	<i>Leishmania</i> OligoC-TesT as a Simple, Rapid, and Standardized tool for Molecular Diagnosis of Cutaneous leishmaniasis in Perú	ADNk	Género	94%	80%
(97)	Detection and Species Identification of <i>Leishmania</i> DNA from Filter Paper Lesion Impressions for Patients with American Cutaneous leishmaniasis	ADNk + RFLP	Género y especie	94,20%	92,90%
(98)	Characterization of <i>Leishmania</i> strains using PCR-RFLP of Spliced Leader Miniexon (SLME) in human and canine isolates in Paraguay	Mini exon + RFLP	Género y especie	99,20%	No hay dato
(99)	Real-Time PCR Assay for Detection and Quantification of <i>Leishmania (Viannia)</i> Organisms in Skin and Mucosal Lesions: Exploratory Study of Parasite Load and Clinical Parameters	ADNk	Género y especie	97,90%	87,50%
(22)	Sensitive diagnosis of cutaneous leishmaniasis by lesion swab sampling coupled to qPCR	18 S	Género y especie	98%	84%

Entre los blancos genéticos reportados en la literatura utilizados en la técnica LAMP para el diagnóstico de leishmaniasis se pueden encontrar el ADN del quinoplasto (ADNk) y la subunidad pequeña ribosomal 18S (Tabla 2).

Tabla 2. Revisión de literatura. Blancos genéticos utilizados en LAMP para diagnóstico de *Leishmania*

Autor/año	Título	Target
(32)	The Direct Boil-LAMP method: A simple and rapid diagnostic method for cutaneous leishmaniasis	ADNk
(67)	Development of a loop-mediated isothermal amplification method for rapid mass-screening of sand flies for <i>Leishmania</i> infection	ADNk
(30)	Development of a Reverse Transcriptase Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assay for the Sensitive Detection of <i>Leishmania</i> Parasites in Clinical Samples	18 S ribosomal
(31)	Diagnostic accuracy of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for detection of <i>Leishmania</i> DNA in buffy coat from visceral leishmaniasis patients.	ADNk
(100)	Sensitive, Specific, and Rapid Detection of <i>Leishmania donovani</i> DNA by Loop-Mediated Isothermal Amplifications	ADNk
(101)	Application of loop-mediated isothermal amplification assay for the sensitive and rapid diagnosis of visceral leishmaniasis and post-kala-azar dermal leishmaniasis	ADNk

A pesar del reporte de varios estudios donde se evalúan diferentes blancos genéticos y plataformas para la realización del diagnóstico molecular de la leishmaniasis cutánea, no se ha descrito un estudio donde se evalué el desempeño analítico. Razón por la cual es de gran importancia determinar la especificidad y sensibilidad analítica de tres plataformas de amplificación de ácidos nucleicos (PCR convencional, PCR en tiempo real y amplificación Isotérmica LAMP) utilizando cuatro marcadores moleculares para las principales especies causantes de leishmaniasis cutánea.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Evaluar el desempeño analítico de las técnicas de PCR convencional, PCR en tiempo real y LAMP para el diagnóstico molecular de las principales especies causantes de leishmaniasis cutánea (*L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis* y *L. mexicana*).

4.2 Objetivos específicos

- Determinar el Rango Reportable Anticipado (RRA), límite de detección, repetibilidad, precisión, exclusividad e inclusividad de la PCR convencional.
- Determinar el Rango Reportable Anticipado, límite de detección, repetibilidad, precisión, exclusividad e inclusividad de la PCR en tiempo Real.
- Diseñar cebadores para el desarrollo de la LAMP utilizando los blancos genéticos ADNk, HSP70 e ITS y determinar el Rango Reportable Anticipado, límite de detección, repetibilidad, precisión, exclusividad e inclusividad de la técnica.
- Evaluar el porcentaje de positividad de la PCR, qPCR y LAMP para el diagnóstico de leishmaniasis cutánea a partir de frotis directos.

5 Capítulo 5: Metodología

5.1 Consideraciones éticas

El estudio está enmarcado dentro de los lineamientos de la resolución No. 008430 del 4 de octubre de 1993 del Ministerio de Salud, por lo que se consideró una investigación sin riesgo de acuerdo al Artículo II del Capítulo I.

Este proyecto contó con acta de aprobación de comité de ética de la Universidad Nacional de Colombia N°: 002-010-15 expedida el 12 de febrero del 2015.

Este trabajo hace parte de un macro-proyecto denominado “Fortalecimiento de la capacidad diagnóstica de investigación y vigilancia de enfermedades transmisibles emergentes y reemergentes en Colombia” Componente: Enfermedades parasitarias transmitidas por vectores; Enfermedad de Chagas y *Leishmania*, ejecutado por el Instituto Nacional de Salud y financiado por Colciencias No. 757-13.

5.2 Diseño y pre-requisitos del estudio

Este trabajo hace parte de un macro-proyecto denominado “Fortalecimiento de la capacidad diagnóstica de investigación y vigilancia de enfermedades transmisibles emergentes y reemergentes en Colombia” Componente: Enfermedades parasitarias transmitidas por vectores; Enfermedad de Chagas y *Leishmania*, ejecutado por el Instituto Nacional de Salud y financiado por Colciencias (No. 757-13).

En la evaluación preliminar realizada por profesionales del grupo de Parasitología del Instituto Nacional de Salud se determinó el tipo de muestras a utilizar y el diseño de cada una de las etapas para la determinación del desempeño analítico.

En cuanto a la robustez del procedimiento se evaluó parámetros que potencialmente consiguieran alterar el procedimiento como los que se describen a continuación:

5.2.1 Ensayos preliminares

Para determinar el buen desempeño de los reactivos, se realizó la verificación y registro del número de lote, fecha de vencimiento, cadena de frío y almacenamiento para los reactivos de PCR convencional (Buffer, MgCl₂, dNTPs, Taq Platimun), PCR en tiempo real (Fast SYBR Green) y LAMP (Loopamp DNA amplification kit), también para el kit de extracción (High Pure PCR Template Preparation).

5.2.2 Estandarización de los protocolos del estudio

Para cada uno de los ensayos, se realizó 4 procedimientos operativos estándar (POE) para el proceso de extracción de ADN, PCR convencional, PCR en tiempo real y LAMP.

5.2.3 Verificación de los estándares de calidad para cada uno de los equipos

Se realizó un seguimiento a los procesos de calibración de los termocicladores convencionales (T100™ Bio-Rad), termociclador en tiempo real (7500 Fast real time systems Applied Biosystems) y micropipetas mono y multicanal (2, 20, 100, 200, 1000 µL). La calibración y mantenimiento preventivo fue realizada por la compañía PROVEO S.A.S cada 6 meses. Los registros están consignados en las hojas de vida de cada uno de los equipos del grupo de Parasitología del INS siguiendo las instrucciones de cada formato (Anexo 1 y 2).

5.3 Diseño de la investigación

Estudio analítico de comparación entre PCR convencional, PCR en tiempo real (qPCR) y amplificación isotérmica mediada por loop (LAMP) a partir de cepas de referencia de

Leishmania y frotis directos para determinar el desempeño analítico (sensibilidad y especificidad analítica).

5.3.1 Población de estudio y muestras

Para el estudio se incluyeron:

- 6 cepas de referencia de *Leishmania* donadas por el Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas, CIDEIM.
- 1 cepa de *Trypanosoma cruzi* y 1 cepa de *Trypanosoma rangeli*, y 50 láminas de frotis directo provenientes del Grupo de parasitología del Instituto Nacional de Salud.
- Cultivo de *Sporothrix schenckii* y *Staphylococcus aureus* provenientes del Grupo de Investigaciones Microbiológicas de la Universidad de Rosario, GIMUR.
- Cultivo de *Streptococcus pyogenes* e *Histoplasma capsulatum* provenientes de la facultad de Medicina de la Universidad Nacional.
- ADN de *Mycobacterium tuberculosis* donados por la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia, FIDIC.
- Cultivo *Fonsecaea pedrosoi* donado por la Universidad de los Andes.

5.4 Material biológico

Se emplearon cultivos de promastigotes de las cepas de referencia, de igual forma se utilizaron cultivos de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma rangeli* (Tabla 3).

Tabla 3. Cepas de referencia *Leishmania* y *Trypanosoma*

CEPA DE REFERENCIA	CÓDIGO
<i>Leishmania braziliensis</i>	(MHOM/BR/75/M2903)
<i>Leishmania panamensis</i>	(MHOM/PA/71/LS94)
<i>Leishmania guyanensis</i>	(MHOM/BR/75/M4147)
<i>Leishmania infantum</i>	(MHOM/TN/80/IPT1)
<i>Leishmania amazonensis</i>	(IFLA/BR/67/PH8)
<i>Leishmania mexicana</i>	MHOM/BZ/82/BEL21)
<i>Trypanosoma cruzi</i>	(MHOM/CO/01/DA)
<i>Trypanosoma rangeli</i>	(IRHO/CO/IRHO/CO/Choachi)

5.5 Crecimiento del Parásitos

Las cepas de *Leishmania* fueron mantenidas en medio bifásico (medio Novy, Nicolle y McNeal y medio Schneider suplementado con 20% de suero fetal bovino), para el manejo de las cepas de *Trypanosoma* se utilizó medio Tobie como fase sólida y medio Liver Infusion Tryptose (LIT) como fase líquida. Los parásitos fueron cultivados y mantenidos a 28°C. Cada seis días se renovaron los cultivos dependiendo del crecimiento del parásito. Las cepas mantenidas en tubos de ensayo fueron transferidas a frascos de cultivo de 100 mL conteniendo el medio líquido Schneider para el caso de *Leishmania* y LIT para *Trypanosoma*. Los cultivos fueron mantenidos por siete días hasta que los parásitos alcanzaron la fase estacionaria temprana de crecimiento.

5.6 Obtención de parásitos y recuento en cámara de Neubauer

Los parásitos crecidos en los frascos de cultivo se transvasaron a tubos Falcón de 50 mL, se centrifugaron a 4°C a 3.000 g por 10 min. El sobrenadante se descartó y al pellet se le agregó 10 mL de solución salina estéril, este se resuspendió suavemente y se centrifugó con las mismas indicaciones anteriores. Este lavado se repitió tres veces más, luego del cual nuevamente se resuspendió el pellet en 1 mL de solución salina.

Para el recuento en cámara de Neubauer, se tomaron alícuotas de 300 µL y una dilución 1:10 para el montaje, posteriormente se realizó el conteo para obtener alícuotas de 10⁶ parásitos/mL. Para realizar el proceso de extracción de ADN, la curva estándar se comenzó con 10⁵ parásitos/mL, para obtener 800 µL de dicha concentración se realizó el siguiente procedimiento:

Se agregó 80 µL de cultivo de 10⁶ parásitos/mL en un tubo eppendorf, luego se adicionó 120 µL del medio en el que se encuentren los parásitos y posteriormente se agregó 600 µL de sangre de un paciente que no tenía antecedentes de vivir en zona endémica para la enfermedad. Se agitó en vortex por 15 segundos y se almacenó en refrigeración hasta la extracción de ADN. Este procedimiento se realizó para cada una de las cepas de referencia de *Leishmania*.

5.7 Extracción de ADN a partir de cultivos parasitarios

Para la obtención de ADN parasitario de cada cepa de referencia de *Leishmania*, se realizó la extracción según las indicaciones del kit High Pure PCR Template Preparation (Roche ® Ref. 11796828001). A partir de la muestra de 800 µl con una concentración de 10^5 parásitos/mL, se tomaron 300 µl y se le adicionaron 40 µL de proteinasa K y 100 µL de buffer de pegado (binding buffer). Las muestras fueron homogenizadas e incubadas a 70°C durante 10 minutos para luego agregar 100 µL de isopropanol y mezclar en vortex durante 15 segundos. La mezcla se transfirió a columnas de extracción con tubos recolectores de 2 mL y se centrifugó a 8.000 rpm durante 1 minuto.

Luego la columna se transfirió a un nuevo tubo recolector y se adicionaron 500 µL de buffer removedor de inhibidores, nuevamente se centrifugó a 8.000 rpm durante 1 minuto y la columna se transfirió a un nuevo tubo recolector para agregar 500 µL de buffer de lavado (este paso se repitió una vez). Posterior a esto se transfirió la columna a un tubo eppendorf sin tapa y se centrifugó a máxima velocidad durante 10 segundos para secar la columna de extracción, posteriormente la columna se transfirió a un nuevo tubo eppendorf sin tapa y se adicionó 100 µL de buffer de elución (precalentado a 70°C) a cada columna y se centrifugó a 8.000 rpm durante 1 minuto. Finalmente se trasvasó el contenido a un tubo eppendorf con tapa y se realizó la cuantificación mediante espectrometría de la concentración de ADN obtenido.

5.8 Procedimiento de extracción de ADN para láminas coloreadas con Giemsa

Para la obtención de ADN parasitario a partir de láminas coloreadas con Giemsa, se sumergieron las láminas en Xilol absoluto por 2 segundos, con el fin de remover el aceite de inmersión. Cada impronta se procesó como muestra por separado, luego se colocó sobre cada impronta 200 µL de Buffer de lisis por 5 minutos. Se removió el material biológico con palitos de plástico estériles para luego aspirar el contenido de cada impronta y se transvaso a un eppendorf de 1,5 mL a partir de aquí, se maneja el mismo procedimiento de extracción de muestras provenientes de cultivo según las indicaciones del kit High Pure PCR Template Preparation (Roche ® Ref. 11796828001).

5.9 Curva estándar

Una vez obtenido el ADN de cada cepa de referencia, se efectuaron diluciones seriadas de 10^4 a 10^{-2} para determinar el desempeño analítico de las tres plataformas moleculares. Para esto, a un tubo de PCR que contenía 45 μ L de ADN de un paciente negativo para leishmaniasis en cualquier de sus tres manifestaciones clínicas, se adicionó 5 μ L de ADN de cada cepa de referencia de *Leishmania* a una concentración de 10^5 parásitos/mL, a partir de aquí se realizaron las diluciones seriadas en base 10 (en cada dilución se homogenizó en vortex). (Figura 28)

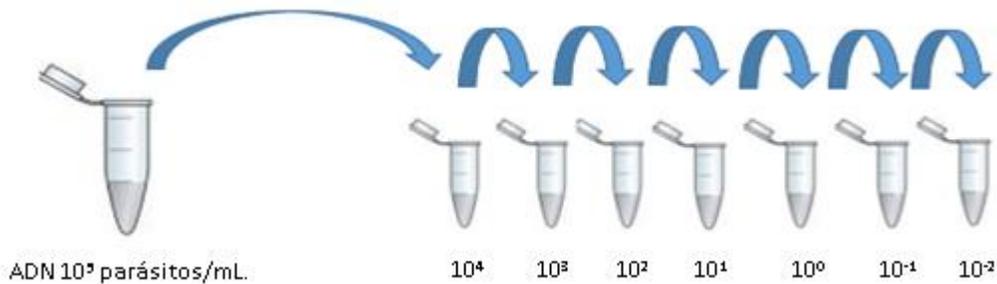


Figura 28. Diluciones seriadas en base 10 de los ADN de las cepas de referencia de *Leishmania*.

5.10 Determinación del desempeño analítico

5.10.1 Especificidad analítica

5.10.1.1 Inclusividad

Para determinar este parámetro, todos los ADNs de las cepas de referencia (*L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis*, *L. mexicana* y *L. infantum*) se sometieron a PCR convencional, PCR en tiempo real y LAMP con los cuatro marcadores moleculares descritos en la tabla 4. Estos ensayos se realizaron en un solo día.

5.10.1.2 Exclusividad

Para determinar la exclusividad de las técnicas, ADNs de parásitos pertenecientes al orden Kinetoplastida (*Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma rangeli*) y de los microorganismos de diagnóstico diferencial de leishmaniasis cutánea (56, 102) (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Histoplasma capsulatum*,

Mycobacterium tuberculosis, *Sporothrix schenckii* y *Fonsecaea pedrosoi*) se sometieron a PCR convencional, PCR en tiempo real y LAMP con los cuatro marcadores moleculares descritos en la tabla 4. Este ensayo se realizó en un solo día.

5.10.2 Sensibilidad analítica

5.10.2.1 Rango Reportable Anticipado (RRA)

Para determinar este rango, se tomaron las 7 diluciones seriadas (1×10^4 a 1×10^{-2} parásitos/mL) de cada ADN de las 6 cepas de referencia de *Leishmania* y se sometieron a PCR convencional, PCR en tiempo real y LAMP con cada uno de los cuatro marcadores moleculares. Este ensayo se realizó por triplicado en un solo día.

5.10.2.2 Límite de Detección (LoD)

El LoD fue determinado mediante regresión Probit (Probit Minitab 15 software, USA) El análisis de Probit se utiliza para estudios que tienen variables de respuesta binomial y estima con fiabilidad los puntos finales, los estudios de límite de detección, la respuesta del ensayo utilizando diversas concentraciones de analito tiene sólo dos resultados: detectados o no detectados. Cada concentración ensayada debe tener un mínimo de tres repeticiones, pero tamaños de muestra grandes (10 o más repeticiones en cada concentración) (33). Para determinar el límite de detección, se utilizaron 5 diluciones seriadas de cada ADN de las 6 cepas de referencia de *Leishmania* y se sometieron a PCR convencional, PCR en tiempo real y LAMP con cada uno de los cuatro marcadores moleculares. En este ensayo se realizaron 8 réplicas por dilución y se repitió el proceso durante 5 días en las mismas condiciones.

5.10.2.3 Precisión

Para determinar la precisión de las técnicas, se utilizó una dilución por encima y una por debajo del LoD de cada ADN de las 6 cepas de referencia de *Leishmania* y se sometieron a cada uno de los cuatro marcadores moleculares. Este ensayo se realizó por triplicado y se repitió el proceso durante 10 días en las mismas condiciones.

5.10.2.4 Porcentaje de positividad

Se sometieron a diagnóstico molecular (PCR convencional, qPCR y LAMP con el marcador molecular que obtenga el mejor desempeño analítico) raspados de 50 láminas

coloreadas con Giemsa provenientes del laminario de colección del Grupo de Parasitología del Instituto Nacional de Salud, láminas obtenidas de muestras de pacientes de un brote de leishmaniasis cutánea en el departamento de Tolima entre los años 2003 y 2004, todas las lamina fueron evaluadas por examen directo pero los ensayos moleculares se realizaron en ciego. Se utilizó como controles positivos, laminas coloreadas las cuales reportaron un diagnostico confirmado de *Leishmania spp.* Láminas de pacientes con lesiones similares a leishmaniasis cutánea pero con diagnostico confirmado de otra entidad clínica fueron los controles negativos. Se evaluaron las concordancias entre los resultados del examen directo y del diagnóstico molecular mediante la determinación del índice Kappa y el porcentaje de positividad.

5.11 Ensayos moleculares

5.11.1 Marcadores moleculares

Para determinar el desempeño analítico de la PCR convencional y PCR en tiempo real qPCR, se utilizaron cuatro marcadores moleculares reportados en la literatura (el gen que codifica para la proteína de choque térmico HSP-70, la región ITS-1, la región hipervariable del ADN del quinetoplasto (ADNk) y la subunidad pequeña de ARN ribosomal 18S). A estos marcadores se realizó un ensayo *in silico* para verificar cada una de las secuencias, se observó que no presento hit con ADN humano ni con ningún microorganismo de diagnóstico diferencial. Las secuencias de los marcadores moleculares se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Secuencias de los marcadores moleculares utilizados en la PCR convencional y qPCR

Cebadores	Secuencia	Tamaño de amplicón	Referencia
HSP70 Forward	AGGTGAAGGCGACGAACG	337 pb	(103)
HSP70 Reverse	CGCTTGTCATCTTTGCGTC		
ITS – LITSR	CTGGATCATTTCGGATG	300 – 350 pb	(72)
ITS - L5.8S	TGATACCACTTATCGCACTT		
ADNk Forward	(G/C) (G/C) (C/G) CC (A/C) CTA T (A/T) TTA CAC CCA ACC CC	120 pb	(104)

ADNk Reverse	GGG GAG GGG CGT TCT GCG AA		
18S - R223	TCCCATCGCAACCTCGGTT		
18S - R333	AAAGCGGGCGCGGTGCTG	350 pb	(105)

5.11.2 Amplificación de ADN por PCR convencional

La amplificación de los cuatro marcadores fue realizada de forma independiente (una master mix para cada blanco) utilizando la enzima Taq Platinum® ADN polimerasa (Invitrogen® Ref. 10966-018) en un volumen final de 15 µL (Tabla 5).

Tabla 5. Condiciones de la Master mix con Taq Platinum® ADN Polimerasa

Reactivos para mezcla HSP-70, ITS-1, ADNk y SSU rRNA 18S	[] Inicial	[] Final	Volumen por tubo (µL)
Buffer	10x	1x	1,2
MgCl ₂	50 mM	3,3 mM	0,375
Cebador forward	10 µM	0,6 µM	0,5
Cebador reverse	10 µM	0,6 µM	0,5
dNTPs	100 µM	25 µM	0,125
Taq	2 U	1 U	0,05
Agua		NA	9,2
ADN			3
Volumen Final			15 µL

Se distribuyó 12 µL de la master mix a tubos de PCR según el número de muestras a analizar, luego se adicionó 3 µL de la muestra de ADN de las seis cepas de referencia de *Leishmania* y de los ocho microorganismos de diagnóstico diferencial (para evaluar el parámetro de exclusividad) a cada una de las mezclas y 3 µL de ADN de una cepa de referencia como control positivo y 3 µL de ADN negativo para leishmaniasis en cualquier de sus tres manifestaciones clínicas como control negativo. Para el control de reactivos no se adicionó ningún ADN. Luego se taparon los tubos de PCR y se realizó un spin en una minicentrífuga de tubos de 0,2 mL. El perfil térmico utilizado para la amplificación se describe en las tablas 6 y 7.

Tabla 6. Perfil térmico de amplificación con HSP70, ADNk y SSU sRNA 18S

Condiciones para HSP-70, ADNk y SSU sRNA 18S	Temperatura	Tiempo
1. Denaturación inicial	95°C	5 min
2. Denaturación Anillamiento Extensión (40 ciclos)	95°C	1 min
	60°C	1 min
	72°C	1 min
	72°C	10 min
3. Extensión final	12°C	∞

Tabla 7. Perfil térmico de amplificación con ITS-1

Condiciones para HSP-70, ADNk y SSU sRNA 18S	Temperatura	Tiempo
1. Denaturación inicial	95°C	5 min
2. Denaturación Anillamiento Extensión (40 ciclos)	95°C	1 min
	56°C	1 min
	72°C	1 min
	72°C	10 min
3. Extensión final	12°C	∞

5.11.3 Electroforesis de los productos de PCR en geles de agarosa

Una vez amplificados los productos de PCR convencional, se procedió a realizar la electroforesis en geles de agarosa al 2% más la adición de Sybr Safe como tinción (Anexo 3: preparación de soluciones agarosa y TBE 5X). Para este procedimiento se colocó el molde para realizar el gel con sus respectivos peines, se sirvió la agarosa al 2%, una vez polimerizada la agarosa se colocó en la cámara de electroforesis y se cubrió con TBE 1X, se sembraron cada uno de los productos de PCR, y se dejó correr por 35 minutos a 120 voltios. Una vez transcurrido el tiempo se reveló en un transiluminador.

5.11.4 Amplificación de ADN por PCR en tiempo real qPCR

La amplificación de los cuatro marcadores fue realizada de forma independiente (una master mix para cada blanco) utilizando la master mix Fast SYBR® Green (Applied Biosystems Ref. 4385370) como se muestra en la tabla 8.

Tabla 8 Condiciones de la master mix con SYBR® Green

Reactivos para mezcla HSP-70, ITS-1, ADNk y SSU rRNA 18S	[] Inicial	[] Final	Volumen por tubo (μ L)
Fast SYBR Green	2x	1x	5,0
Cebador forward	10 μ M	0,8 μ M	0,6
Cebador reverse	10 μ M	0,8 μ M	0,6
Agua			3,8
ADN			2,0
Volumen Final			12 μ L

Se distribuyó 10 μ L de la master mix a la placa de qPCR según el número de muestras a analizar, luego se adicionó 2 μ L de la muestra de ADN de las seis cepas de referencia de *Leishmania* y de los ocho microorganismos de diagnóstico diferencial (para evaluar el parámetro de exclusividad) a cada una de las mezclas y 2 μ L de ADN de una cepa de referencia como control positivo y 2 μ L de ADN negativo para leishmaniasis en cualquier de sus tres manifestaciones clínicas como control negativo, para el control de reactivos no se adicionó ningún ADN, luego se cubrió la placa con un film y se llevó a la centrifuga de placas a 2.500 rpm por dos minutos a 4°C. El perfil térmico utilizado para la amplificación en el equipo Real time PCR 7500 Fast de Applied Biosystems® se describe en la tabla 9.

Tabla 9. Perfil térmico de amplificación en el equipo Real time PCR 7500 Fast de Applied Biosystems

Condiciones para HSP-70, ADNk y SSU sRNA 18S	Temperatura	Tiempo
Primer paso	50°C	2 min

Segundo paso	95°C	10 min
Tercer paso	95°C	15 seg
Cuarto paso	*60°C	1 min
<u>40 ciclos</u>		
Disociación de amplicón acoplada		
Primer paso	95°C	15 seg
Segundo paso	60°C	1 min
Tercer paso	95°C	30 seg
Cuarto paso	60°C	15 seg

* Para el blanco genético ITS-1 la temperatura de anillamiento fue 56°C

5.11.5 Amplificación de ADN mediante LAMP

Para la LAMP se utilizó el blanco genético SSU rARN 18S reportado en la literatura. Las secuencias se describen en la tabla 10.

Tabla 10. Secuencias del marcador molecular SSU rRNA 18S utilizados en LAMP

Cebadores	Secuencia	Ref.
SSU rRNA 18S	FIP: TACTGCCAGTGAAGGCATTGGTGGC AACCATCGTCGTGAG BIP: TGCGAAAGCCGGCTTGTTCATCA CCAGCTGATAGGGC F3: GGGTGTCTCCACTCCAGA B3: CCATGGCAGTCCACTACAC	(68)

Para dar cumplimiento con el objetivo específico No. 3, se empleó la herramienta de diseño común para alineamientos múltiples con el programa en línea PrimerExplorer Versión 4 (Eiken Chemical Co. Ltd. <http://primerexplorer.jp/e/> versión 4) para encontrar el o los mejores conjuntos de cebadores LAMP dirigidos a las secuencias consenso del ADNk, ITS y HSP70.

Se realizó el alineamiento de las secuencias de ADN en formato Fasta obtenidas del Genbank (Tabla 11) para los marcadores moleculares ADNk, ITS y HSP70 de 6 especies de *Leishmania* involucradas en el estudio.

Tabla 11. Número de acceso al Genbank de las secuencias por marcador molecular

	HSP70	ITS-1	ADNk
<i>L. amazonensis</i>	L14605.1	DQ182536.1	EU429383.1
<i>L. braziliensis</i>	AF291716.1	FN398336.1	U19805.1
<i>L. guyanensis</i>	EU599093.1	FN398330.1	HQ878382.1
<i>L. panamensis</i>	XM_010702330.1	FJ948446.1	U19811.1
<i>L. mexicana</i>	XM_003877072.1	AB558246.1	Z11555.1
<i>L. infantum</i>	XM_003392632.1	AJ634371.1	Z35272.1

Para cada uno de los marcadores moleculares, se introdujo el alineamiento consenso al software PrimerExplorer V4 y se eligió la opción *Common*. El diseño se realizó con los siguientes parámetros:

- Prueba por defecto, los cuales son seleccionados por el software de acuerdo al porcentaje de Guanina/Citosina de la secuencia.
- Selección del conjunto de cebadores con la mejor energía libre de Gibbs (estabilidad de extremos 5'3') y la menor capacidad de formación de dímeros y estructuras secundarias de acuerdo a los valores dados por el software.
- A partir de los conjuntos de cebadores emitidos, se inició la búsqueda de aquellos que no tuvieran hits con ADN humano empleando Blastn online contra una base de datos no redundante y se realizó Blast con cada uno de los cebadores.

Para la estandarización de la técnica se utilizó el kit Loopamp DNA Amplification de Eiken® (Ref. LMP205), el cual contiene: Tris— HCl 40 mM, KCl 20 mM, MgSO₄ 16 mM, (NH₄)₂SO₄ 20 mM, Tween 20 0.2 %, Betaina 1.6 M dNTPs 2.8 mM de cada uno. La mezcla de la reacción se describe en la tabla 12.

Tabla 12. Master mix con kit Loopamp amplification Kit EIKEN®

Reactivo Mezcla	[] Inicial	[] Final	Volumen por tubo (µL)
Reaction Mix (RM)	2x	1x	12,5
Cebador FIP	40 pMol	1,6 pMol	4
Cebador BIP	40 pMol	1,6 pMol	4
Cebador F3	15 pMol	0,6 pMol	0,75

Cebador B3	15 pMol	0,6 pMol	0,75
<i>Bst</i> DNA Polimerasa	8 U		1
Verde de malaquita	0,004%		1
ADN			2
Volumen final			25 µL

Se distribuyó 23 µL de cada una de las mezclas de LAMP a cada tubo de PCR LAMP según el número de muestras a analizar, luego se adiciono 2 µL de las muestra de ADN de las seis cepas de referencia de *Leishmania* y de los ocho microorganismos de diagnóstico diferencial (para evaluar el parámetro de exclusividad) a cada una de las mezclas y 2 µL de ADN de una cepa de referencia como control positivo y 2 µL de ADN negativo para leishmaniasis en cualquier de sus tres manifestaciones clínicas como control negativo, para el control de reactivos no se adiciono ningún ADN, todas las mezclas se mantuvieron en hielo durante su preparación y posterior siembra de ADN. Una vez terminada la siembra se taparon los tubos y se realizó un spin en una minicentrífuga de tubos de 0,2 mL El perfil térmico utilizado para la amplificación se describe en la tabla 13.

Tabla 13. Perfil térmico de amplificación con HSP70, ADNk, ITS-1 y SSU sRNA 18S

Condiciones para HSP-70, ADNk ITS-1 y SSU sRNA 18S	Tempe ratura	Tiempo
1. Amplificación	63°C	60 min
2. Inactivación de la enzima	80°C	5 min

Los resultados se interpretaron por el cambio de color (Figura 29) y se comprobó la amplificación mediante electroforesis para observar el bandeo de amplificación de cada uno de los loops o bucles formados en la reacción.



Figura 29. Cambio de color en amplificación por LAMP. Paso de color azul intenso a azul claro para las muestras positivas e incoloras para muestras negativas. Fuente: autor.

5.12 Análisis de resultados

Se realizó un estudio de consistencia de pruebas diagnósticas al comparar la variabilidad obtenida entre los resultados de la PCR convencional, PCR en tiempo real y LAMP con cada uno de los marcadores moleculares utilizados.

5.12.1 Determinación de repetibilidad.

Todos los ensayos de PCR convencional, qPCR y LAMP se realizaron con una serie de réplicas intraobservador dependiendo del parámetro a evaluar cómo se describe en la metodología. Una vez obtenido los resultados se determinó un análisis dependiendo del parámetro a evaluar y del tipo de técnica (datos cualitativos o cuantitativos) cómo se describe a continuación.

5.12.2 Rango Reportable Anticipado (RRA)

Mediante siete diluciones seriadas se determinó el rango reportable anticipado para cada una de las tres técnicas moleculares, una vez obtenidos los resultados de las réplicas se realizó tablas consenso de los resultados para el caso de PCR convencional y LAMP y análisis de regresión logística en qPCR para determinar la pendiente de la recta (Slope) como una medida de la eficiencia de la reacción y el coeficiente de correlación (R^2), las gráficas se realizaron mediante el uso del programa GraphPad Prism 7.

5.12.3 Determinación del Límite de detección (LoD)

Mediante cinco diluciones seriadas se determinó la dilución más baja a la cual la técnica es capaz de detectar el producto de amplificación de interés. Para la PCR convencional se determinó con la observación directa en geles de agarosa del fragmento de interés a la mínima dilución y elaboración de tablas consenso de resultados; para la qPCR se determinó el valor del ciclo umbral (Ct) a la mínima dilución mediante análisis de regresión Probit y en el caso de LAMP mediante la observación directa de cambio de color a la mínima dilución. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con medidas repetidas con el programa estadístico Epidat 3.1, todos los datos se manejaron a un nivel de confianza al 95%.

5.12.4 Precisión

Para determinar la precisión en las tres técnicas moleculares, se estableció la media, la desviación estándar y el coeficiente de variación.

6 Resultados

Para dar cumplimiento al objetivo No. 1 y 2 (Determinar la Inclusividad, exclusividad el Rango Reportable Anticipado, límite de detección, repetibilidad y precisión de la PCR convencional y qPCR) se obtuvieron los siguientes resultados:

6.1 Inclusividad para PCR convencional y qPCR

A partir de los ADNs de las 6 cepas de *Leishmania* se realizó PCR convencional y qPCR con los cuatro marcadores moleculares, se observa la obtención de bandas en los tamaños esperados (Fig. 30) y emisión de fluorescencia (Figura 31) en todas las muestras, se puede concluir que la técnica es inclusiva al amplificar todos los ADNs en ambas plataformas.

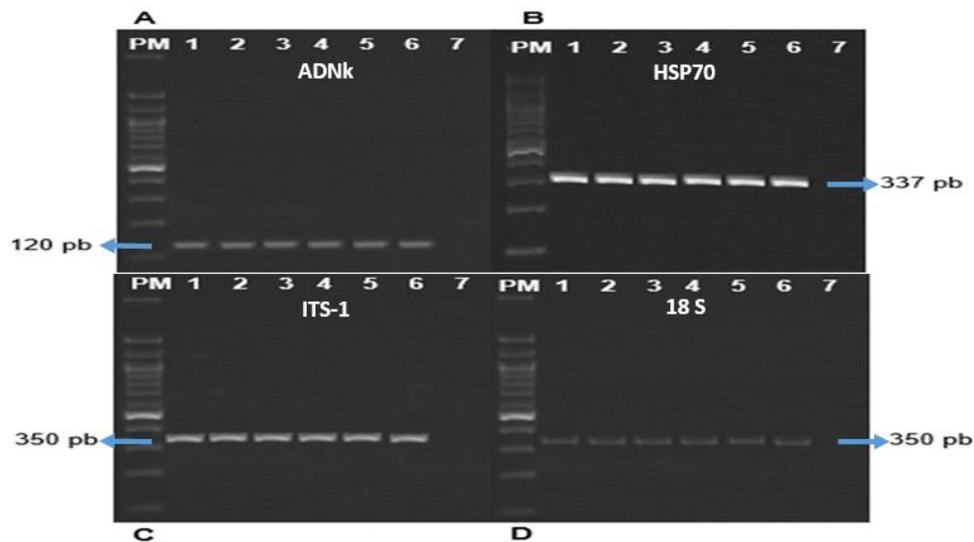


Figura 30. Inclusividad PCR convencional

A: kDNA; B: HSP 70; C: ITS – 1; D: 18 S. PM: 100 pb; 1: *Le. amazonensis*; 2: *Le. braziliensis*; 3: *Le. guyanensis*; 4: *Le. panamensis*; 5: *Le. mexicana*; 6: *Le. infantum*; 7: Control negativo

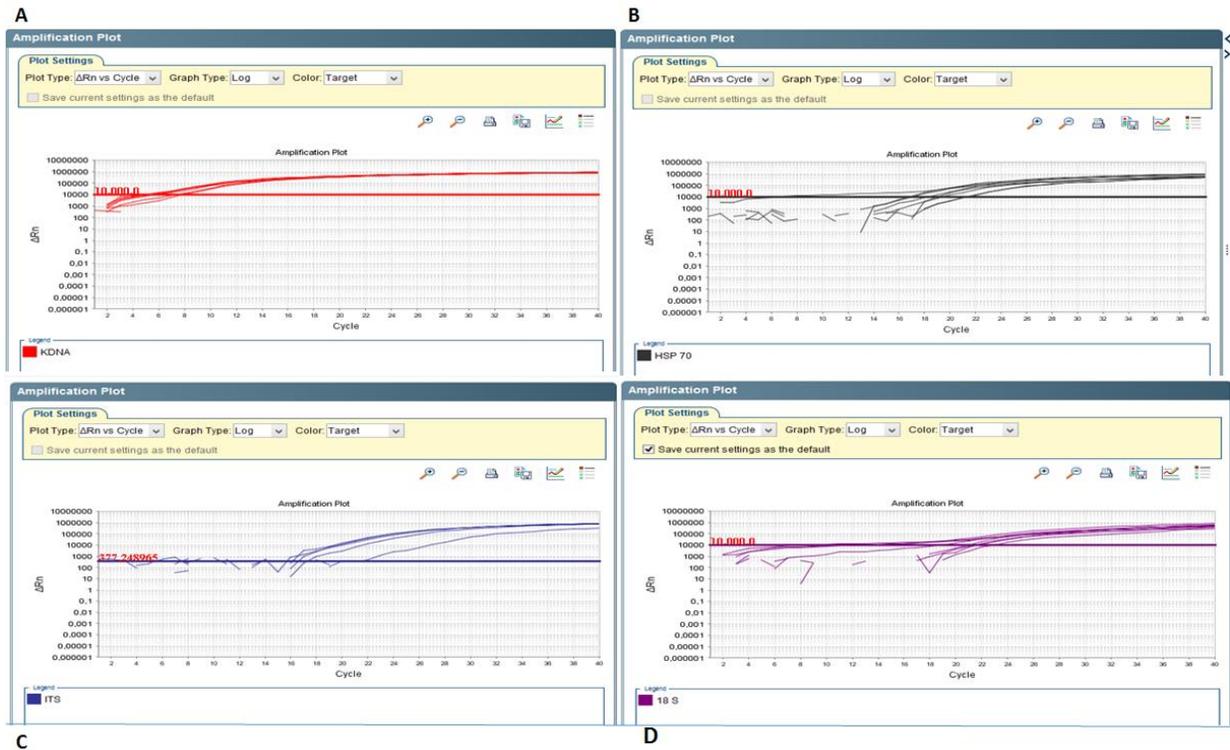


Figura 31. Inclusividad para qPCR.
qPCR de los ADNs de las 6 cepas de referencia de *Leishmania* para los 4 marcadores moleculares **A**: kDNA; **B**: HSP 70; **C**: ITS – I; **D**: 18 S

6.2 Exclusividad de la PCR convencional y qPCR

A partir de los ADNs de los 8 microorganismos de diagnóstico diferencial (*T. cruzi*, *T. rangeli*, *S. aureus*, *S. pyogenes*, *H. capsulatum*, *M. tuberculosis*, *S. schenckii* y *F. pedrosoi*) se realizó PCR convencional y qPCR con los cuatro marcadores moleculares, se observa que para el marcador molecular ADNk, la técnica no es exclusiva en ambas plataformas para la amplificación de *Leishmania*, pues se observa banda a 120 pb (Figura 32) y emisión de fluorescencia (Figura 33) correspondiente a los ADNs de *T. cruzi* y *M. tuberculosis*.

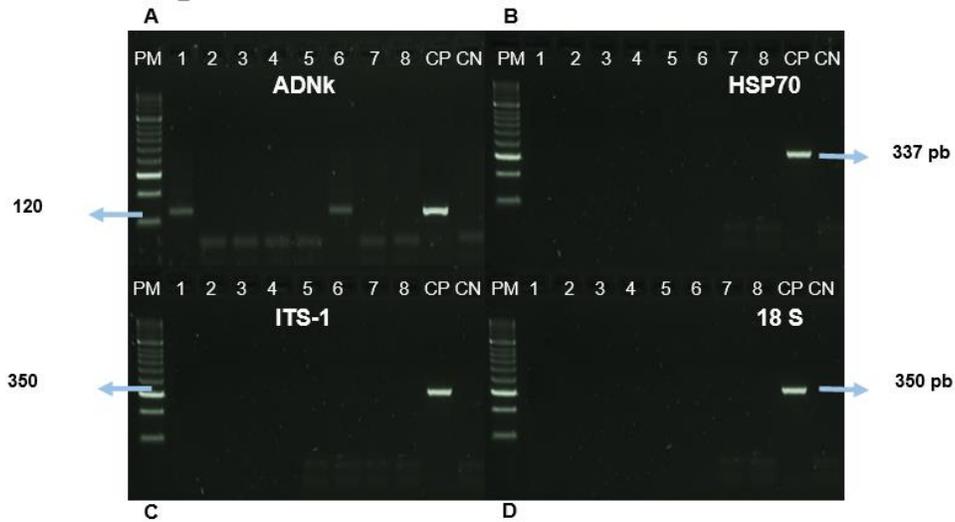


Figura 32. Exclusividad PCR convencional.
 A: ADNK; B: HSP 70; C: ITS – I; D: 18 S. PM: 100 pb; 1: *T. cruzi*; 2: *T. rangeli*; 3: *S. aureus*; 4: *S. pyogenes*; 5: *H. capsulatum*; 6: *M. tuberculosis*; 7: *S. schenckii*; 8: *F. pedrosoi*; C+: Control positivo (*L. amazonensis*); CN: Control negativo

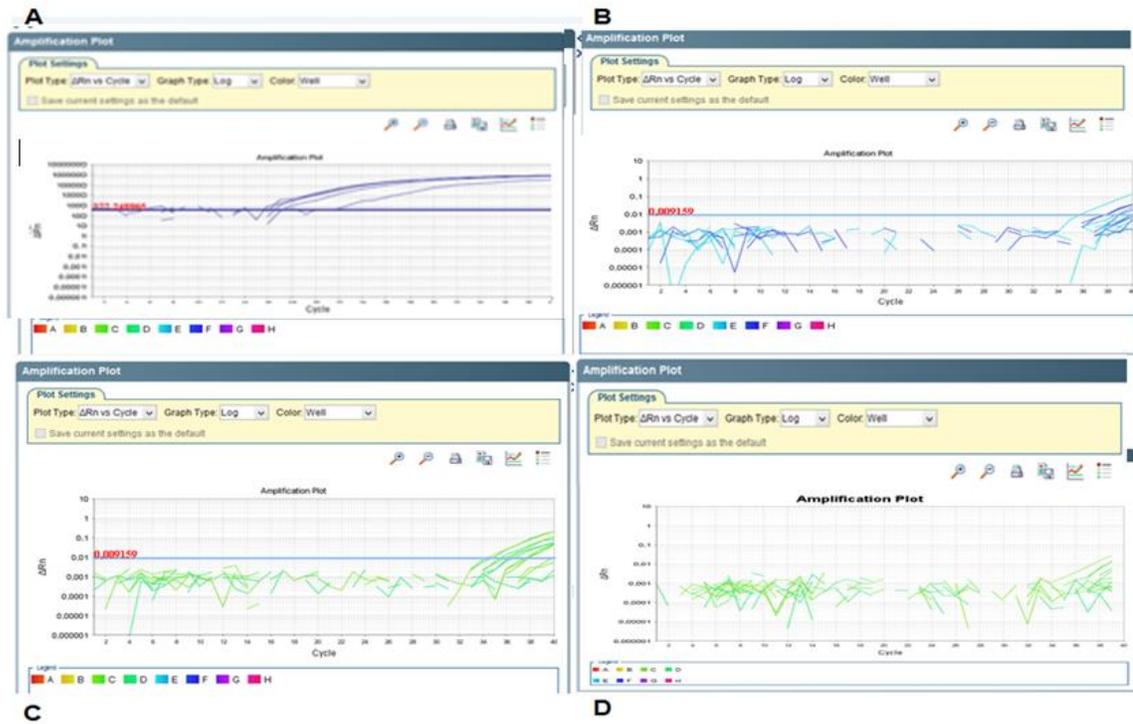


Figura 33. Exclusividad de PCR en tiempo real.
 qPCR de los ADNs de los 8 microorganismos de diagnóstico diferencial para los 4 marcadores moleculares A: kDNA; B: HSP 70; C: ITS – I; D: 18 S

6.3 Rango Reportable Anticipado

Se realizó PCR convencional y qPCR con los cuatro marcadores moleculares en un rango de diluciones seriadas entre 1×10^4 y 1×10^{-2} parásitos/mL de cada una de las 6 cepas de referencia de *Leishmania*, los ensayos moleculares se realizaron por triplicado en un solo día en cada plataforma.

6.3.1 Rango reportable anticipado en PCR convencional

A todas las diluciones de los ADNs se les realizó PCR convencional para determinar el intervalo de concentraciones a la cual se puede observar la obtención de banda visible en cada marcador molecular (Figuras 34 – 37).

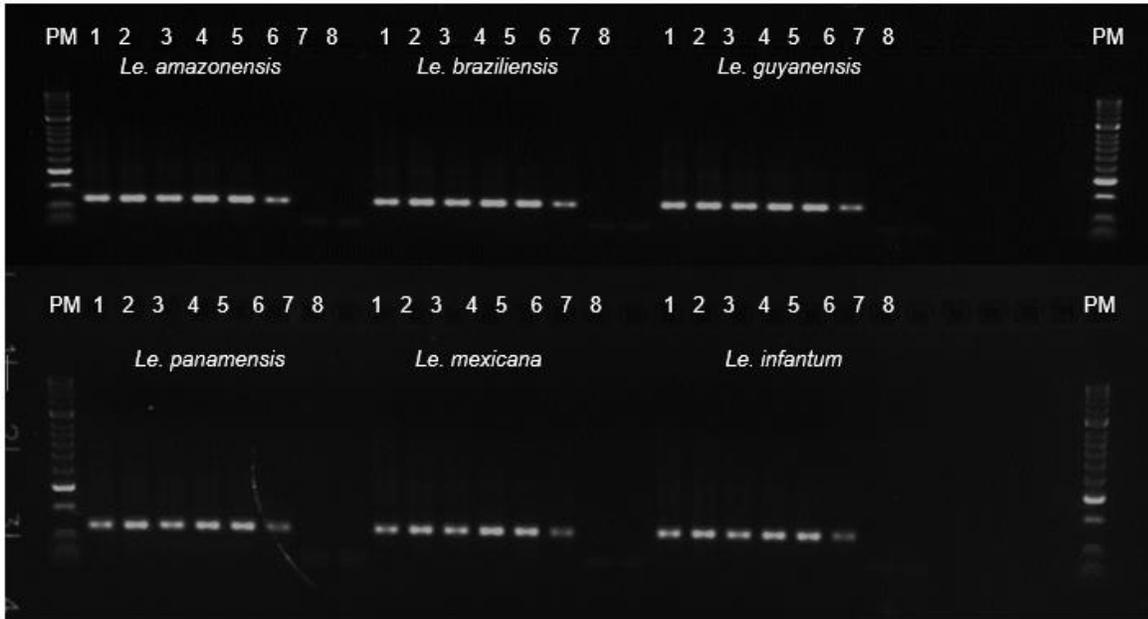


Figura 34. Gel rango reportable anticipado para el marcador ADNk.
Diluciones seriadas 1: 10^4 ; 2: 10^3 ; 3: 10^2 ; 4: 10^1 ; 5: 10^0 ; 6: 10^{-1} ; 7: 10^{-2} ; 8: CN; PM: peso molecular.
Tamaño de banda esperado: 120 pb.

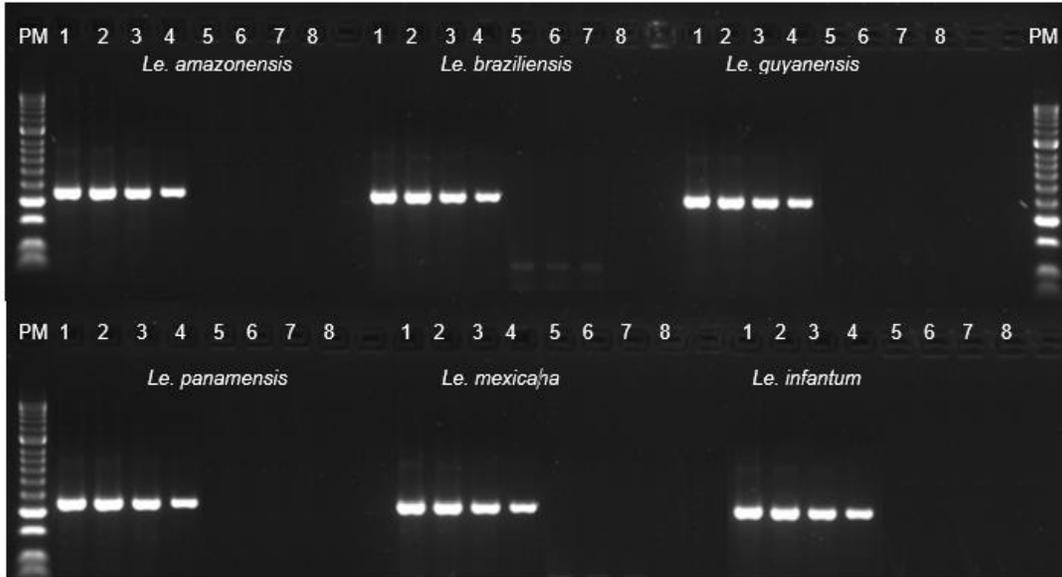


Figura 35. Gel rango reportable anticipado para el marcador HSP70.
 Diluciones seriadas 1: 10^4 ; 2: 10^3 ; 3: 10^2 ; 4: 10^1 ; 5: 10^0 ; 6: 10^{-1} ; 7: 10^{-2} ; 8: CN; PM: peso molecular.
 Tamaño de banda esperado: 337 pb.

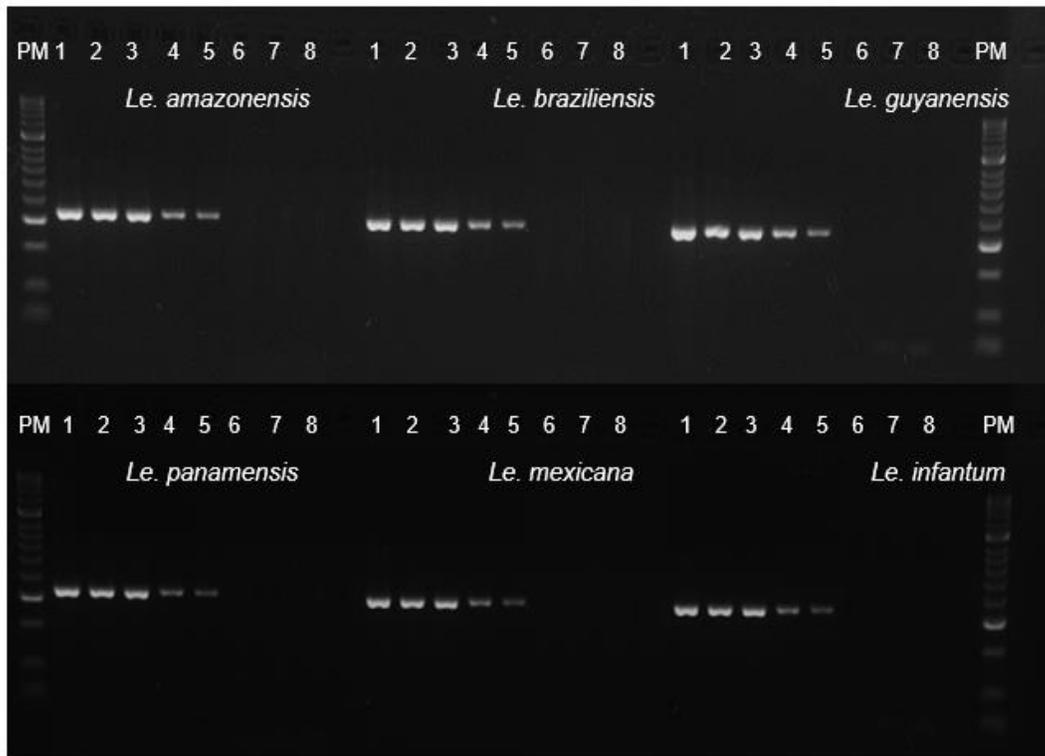


Figura 36. Gel rango reportable anticipado para el marcador ITS.
 Diluciones seriadas 1: 10^4 ; 2: 10^3 ; 3: 10^2 ; 4: 10^1 ; 5: 10^0 ; 6: 10^{-1} ; 7: 10^{-2} ; 8: CN; PM: peso molecular.
 Tamaño de banda esperado: 350 pb.

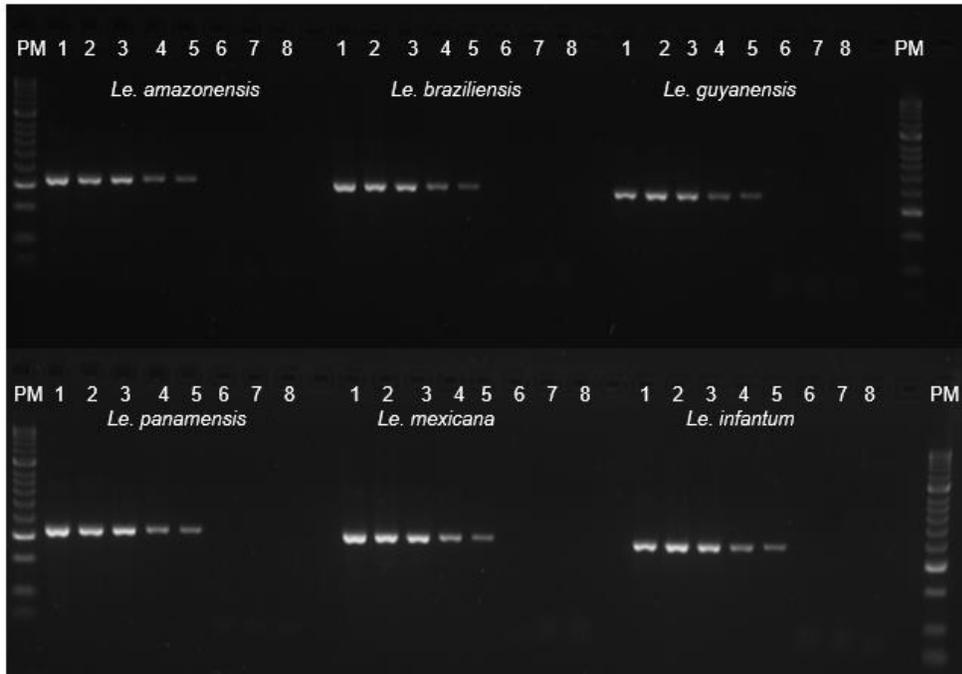


Figura 37. Gel rango reportable anticipado para el marcador 18S. Diluciones seriadas 1: 10^4 ; 2: 10^3 ; 3: 10^2 ; 4: 10^1 ; 5: 10^0 ; 6: 10^{-1} ; 7: 10^{-2} ; 8: CN; PM: peso molecular. Tamaño de banda esperado: 350 pb.

Una vez obtenido todos los resultados de las tres replicas con los cuatro marcadores moleculares y las 7 diluciones seriadas se tabularon los datos en una base en Microsoft Excel digitando uno (1) cuando la banda de amplificación en el tamaño esperado se pudo obtener y cero (0) cuando hubo ausencia de amplificación, luego se realizó un consenso entre las réplicas y días y se realizó la tabla 14.

Tabla 14. Consenso Rango Reportable Anticipado para PCR convencional

Cepas	Marcador	10^4	10^3	10^2	10^1	10^0	10^{-1}	10^{-2}
<i>L. amazonensis</i>	kDNA	1	1	1	1	1	1	0
	HSP70	1	1	1	1	0	0	0
	ITS	1	1	1	1	1	0	0
	18S	1	1	1	1	1	0	0
<i>L. braziliensis</i>	kDNA	1	1	1	1	1	1	0
	HSP70	1	1	1	1	0	0	0
	ITS	1	1	1	1	1	0	0
	18S	1	1	1	1	1	0	0

<i>L. guyanensis</i>	kDNA	1	1	1	1	1	1	0
	HSP70	1	1	1	1	0	0	0
	ITS	1	1	1	1	1	0	0
	18S	1	1	1	1	1	0	0
<i>L. panamensis</i>	kDNA	1	1	1	1	1	1	0
	HSP70	1	1	1	1	0	0	0
	ITS	1	1	1	1	1	0	0
	18S	1	1	1	1	1	0	0
<i>L. mexicana</i>	kDNA	1	1	1	1	1	1	0
	HSP70	1	1	1	1	0	0	0
	ITS	1	1	1	1	1	0	0
	18S	1	1	1	1	1	0	0
<i>L. infantum</i>	kDNA	1	1	1	1	1	1	0
	HSP70	1	1	1	1	0	0	0
	ITS	1	1	1	1	1	0	0
	18S	1	1	1	1	1	0	0

1= obtención de banda 0= no banda

Una vez analizados los datos se puede concluir que el rango reportable anticipado más amplio se obtiene con el marcador ADNk obteniendo amplificación hasta la dilución 1×10^{-1} para todas las especies de *Leishmania*, para los marcadores ITS y 18S el rango se reporta desde las diluciones 1×10^4 hasta 1×10^0 y finalmente para el marcador HSP70 se reporta un rango bajo de amplificación (1×10^1).

6.3.2 Rango Reportable Anticipado en qPCR

A todas las diluciones de los ADNs se les realizó qPCR para determinar el intervalo de concentraciones a la cual se puede observar la emisión de fluorescencia en cada marcador molecular. Una vez obtenidos los resultados, se realizaron análisis de regresión lineal para cada marcador molecular con sus respectivas especies de *Leishmania*.

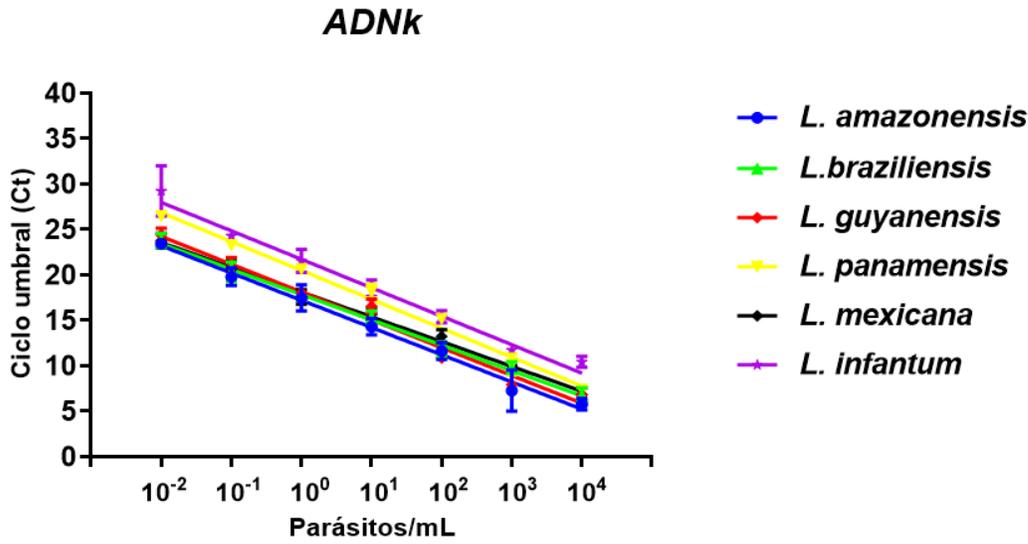


Figura 38. Rango Reportable Anticipado para ADNk

Tabla 15. Rango reportable anticipado para ADNk

Cepa	Pendiente [IC 95%]	Intercepto con eje Y [IC 95%]	Coefficiente de correlación	Ecuación
<i>L. amazonensis</i>	[-3,28 a -2,71]	[25 a 27,5]	0,993	$Y = -3 \cdot X + 26,2$
<i>L. braziliensis</i>	[-2,97 a -2,6]	[25,4 a 27,1]	0,997	$Y = -2,79 \cdot X + 26,2$
<i>L. guyanensis</i>	[-3,58 a -2,54]	[25 a 29,6]	0,979	$Y = -3,06 \cdot X + 27,3$
<i>L. panamensis</i>	[-3,56 a -2,8]	[28,4 a 31,8]	0,989	$Y = -3,18 \cdot X + 30,1$
<i>L. mexicana</i>	[-2,94 a -2,52]	[25,4 a 27,3]	0,995	$Y = -2,73 \cdot X + 26,3$
<i>L. infantum</i>	[-3,6 a -2,66]	[29 a 33,2]	0,983	$Y = -3,13 \cdot X + 31,1$

$y = ax + b$ donde a es la pendiente y b el intercepto.

Para el marcador ADNk se pudo observar que la amplificación cubre todas las diluciones del rango reportable anticipado a unos Ct muy tempranos (5 a 29 aproximadamente). No se observó variabilidad en el rango reportable entre las especies de *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis* y *L. mexicana*, a diferencia de las especies *L. panamensis* y *L. infantum* donde la dilución 1×10^{-2} obtuvo un Ct mayor que las demás (Figura 38). En general la técnica presenta una buena eficiencia y reproducibilidad entre replicas en todas las especies de *Leishmania* (Tabla 15).

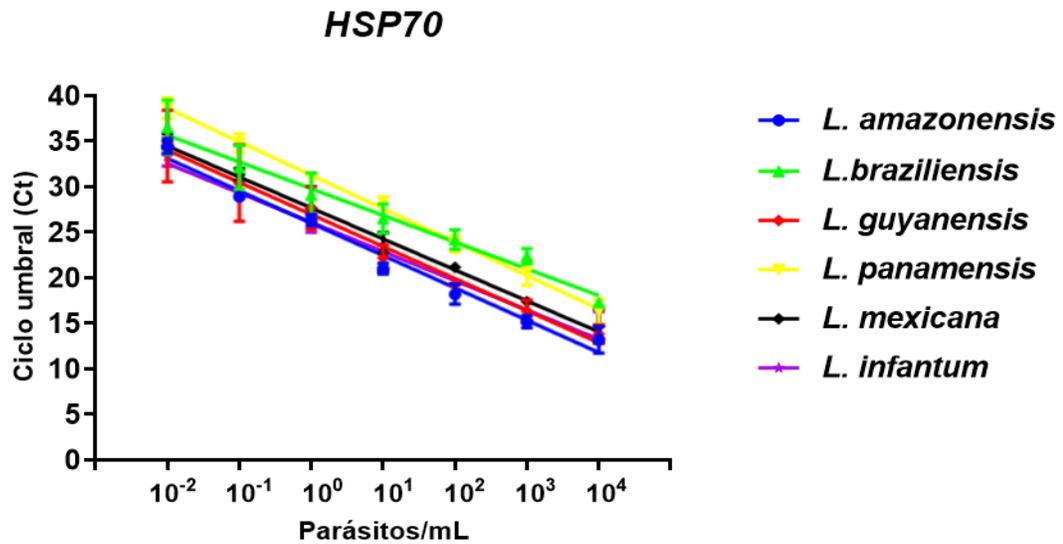


Figura 39. Rango Reportable Anticipado para HSP70

Tabla 16. Rango Reportable Anticipado para HSP70

Cepa	Pendiente [IC 95%]	Intercepto con eje Y [IC 95%]	Coefficiente de correlación	Ecuación
<i>L. amazonensis</i>	[-4,13 a -2,97]	[34,1 a 39,3]	0,98	$Y = -3,55 \cdot X + 36,7$
<i>L. braziliensis</i>	[-3,38 a -2,49]	[36,6 a 40,6]	0,983	$Y = -2,93 \cdot X + 38,6$
<i>L. guyanensis</i>	[-3,93 a -3,11]	[35,7 a 39,4]	0,99	$Y = -3,52 \cdot X + 37,6$
<i>L. panamensis</i>	[-3,89 a -3,46]	[41,4 a 43,3]	0,997	$Y = -3,67 \cdot X + 42,3$
<i>L. mexicana</i>	[-3,78 a -3,02]	[36,2 a 39,6]	0,991	$Y = -3,4 \cdot X + 37,9$
<i>L. infantum</i>	[-3,69 a -2,73]	[33,6 a 37,9]	0,983	$Y = -3,21 \cdot X + 35,8$

$y = ax + b$ donde a es la pendiente y b el intercepto.

Para el marcador HSP70 se presentó mayor variabilidad del rango reportable entre cepas como es el caso de *L. panamensis* donde el rango reportable se encontró entre un Ct de 40 a la dilución más baja (1×10^{-2} parásitos/mL) (Figura 39), en general la técnica presenta una buena eficiencia y reproducibilidad entre replicas en todas las especies de *Leishmania* (Tabla 16).

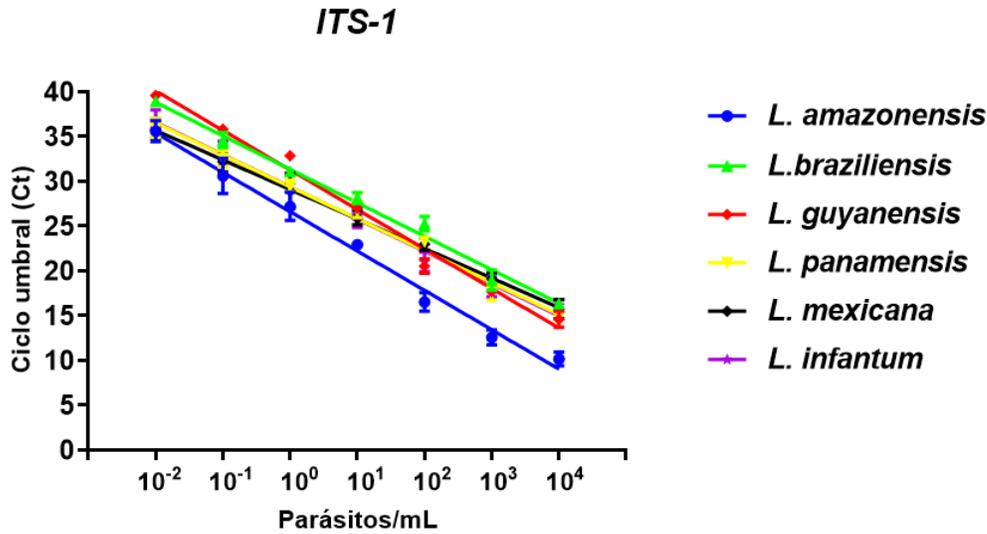


Figura 40. Rango Reportable Anticipado para ITS-1

Tabla 17. Rango Reportable Anticipado para ITS-1

Cepa	Pendiente [IC 95%]	Intercepto con eje Y [IC 95%]	Coefficiente de correlación	Ecuación
<i>L. amazonensis</i>	[-4,86 a -3,92]	[37,7 a 41,9]	0,991	$Y = -4,39 * X + 39,8$
<i>L. braziliensis</i>	[-4,17 a -3,31]	[40,7 a 44,5]	0,99	$Y = -3,74 * X + 42,6$
<i>L. guyanensis</i>	[-5,01 a -3,82]	[41,9 a 47,2]	0,986	$Y = -4,41 * X + 44,6$
<i>L. panamensis</i>	[-4,05 a -3,08]	[37,9 a 42,3]	0,986	$Y = -3,57 * X + 40,1$
<i>L. mexicana</i>	[-3,43 a -3,17]	[38,4 a 39,6]	0,999	$Y = -3,3 * X + 39$
<i>L. infantum</i>	[-3,99 a -3,21]	[38,5 a 42]	0,991	$Y = -3,6 * X + 40,2$

$y = ax + b$ donde a es la pendiente y b el intercepto.

Para el marcador ITS-1 se obtuvo un rango reportable donde a diluciones bajas los valores de Ct se comportan de manera homogénea a excepción de *L. amazonensis* (Figura 40). Se determina una buena reproducibilidad de la técnica con este marcador pero una baja eficiencia en las especies de *L. amazonensis* y *L. guyanensis* (Tabla 17).

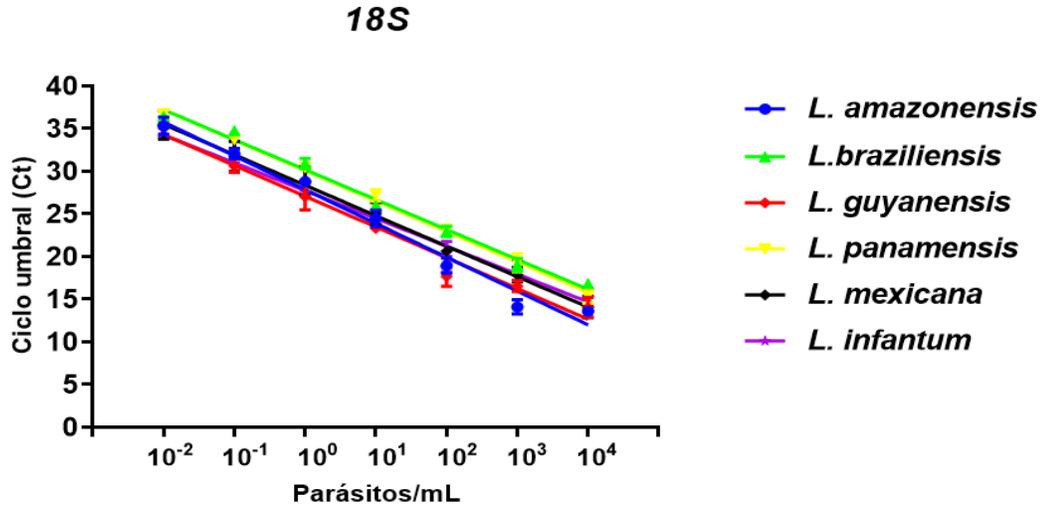


Figura 41. Rango Reportable Anticipado para 18S

Tabla 18. Rango Reportable Anticipado para 18S

Cepa	Pendiente [IC 95%]	Intercepto con eje Y [IC 95%]	Coefficiente de correlación	Ecuación
<i>L. amazonensis</i>	[-4,6 a -3,33]	36,9 a 42,6	0,981	Y = -3,56*X + 39,8
<i>L. braziliensis</i>	[-3,92 a -3,1]	38,9 a 42,6	0,99	Y = -3,51*X + 40,8
<i>L. guyanensis</i>	[-4,21 a -3]	35,2 a 40,6	0,979	Y = -3,61*X + 37,9
<i>L. panamensis</i>	[-3,82 a -3,33]	39,7 a 41,9	0,996	Y = -3,57*X + 40,8
<i>L. mexicana</i>	[-3,75 a -3,39]	38,3 a 39,9	0,998	Y = -3,57*X + 39,1
<i>L. infantum</i>	[-3,6 a -2,93]	36,1 a 39	0,992	Y = -3,26*X + 37,6

y= ax+b donde a es la pendiente y b el intercepto.

Para el marcador 18S se obtuvo un rango reportable anticipado muy homogéneo entre todas las especies de *Leishmania* (Figura 41) en comparación con ADNk, HSP70 e ITS. Se pudo determinar una buena reproducibilidad y eficiencia de la técnica con este marcador molecular (Tabla 18).

Cuando se realizó la comparación entre cada especie de *Leishmania* y los cuatro marcadores moleculares, se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en la especie *L. braziliensis* con el ADNk al compararlo con HSP70, ITS y 18S (valor P: 0,028; 0,017 y 0,031 respectivamente); para *L. mexicana* se obtuvo diferencias significativas con el ADNk al compararlo con el ITS (valor P: 0,03) (Anexo 4).

6.4 Límite de detección

Se realizó PCR convencionales y qPCR con los cuatro marcadores moleculares en un rango de 5 diluciones seriadas entre 1×10^4 y 1×10^0 parásitos/mL de cada una de las 6 cepas de referencia de *Leishmania*, los ensayos moleculares se realizaron con 8 réplicas por dilución durante 5 días.

6.4.1 Límite de detección en PCR convencional

A todas las diluciones de los ADNs se les realizó PCR convencional para determinar el límite de detección en el cual se puede observar la obtención de banda visible en cada marcador molecular (Figura 42 – 45).

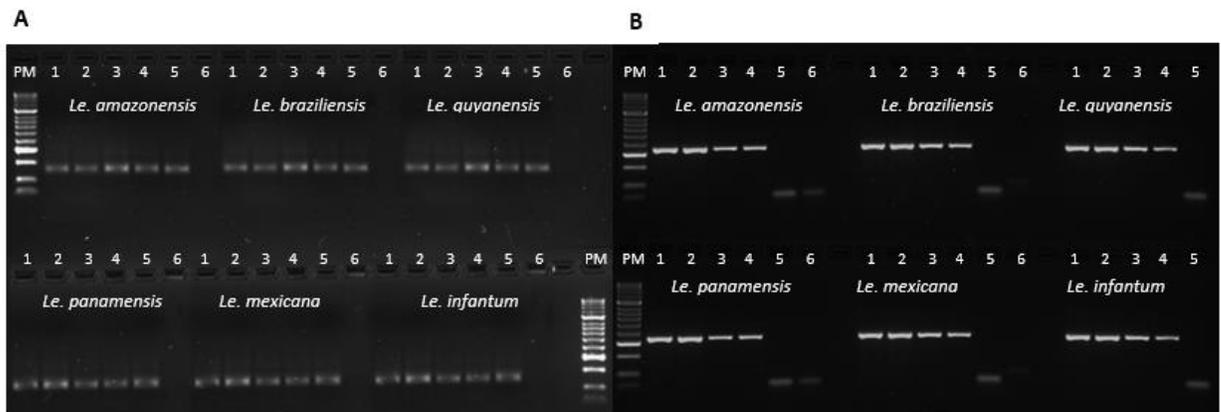


Figura 42. Límite de detección en PCR convencional para ADNk y HSP70
 A: ADNk tamaño de banda 120 pb; B: HSP70 tamaño de banda 337 pb. Diluciones seriadas 1: 10^4 ; 2: 10^3 ; 3: 10^2 ; 4: 10^1 ; 5: 10^0 ; 6: CN; PM: peso molecular

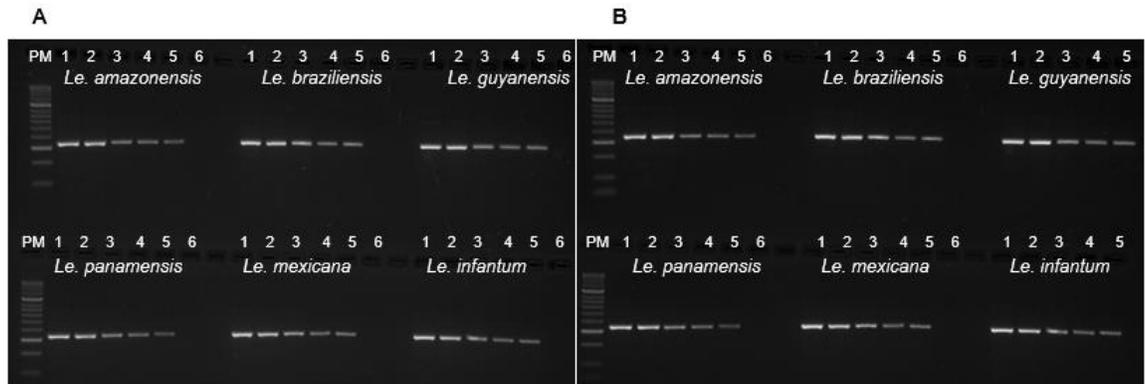


Figura 43. Límite de detección en PCR convencional para ITS-1 y 18S. A: ITS-1 tamaño de banda 350 pb; B: 18S tamaño de banda 350 pb. Diluciones seriadas 1: 10^4 ; 2: 10^3 , 3: 10^2 , 4: 10^1 ; 5: 10^0 ; 6: CN; PM: peso molecular.

Una vez obtenido todos los resultados de las ocho replicas por dilución en los cuatro marcadores moleculares se realizó el mismo tratamiento de datos que en el rango reportable anticipado en PCR convencional y se elaboró el consenso de la tabla 19.

Tabla 19. Consenso límite de detección para PCR convencional

Cepas	Marcador	10^4	10^3	10^2	10^1	10^0
<i>L. amazonensis</i>	kDNA	1	1	1	1	1
	HSP70	1	1	1	1	0
	ITS	1	1	1	1	1
	18S	1	1	1	1	1
<i>L. braziliensis</i>	kDNA	1	1	1	1	1
	HSP70	1	1	1	1	0
	ITS	1	1	1	1	1
	18S	1	1	1	1	1
<i>L. guyanensis</i>	kDNA	1	1	1	1	1
	HSP70	1	1	1	1	0
	ITS	1	1	1	1	1
	18S	1	1	1	1	1
<i>L. panamensis</i>	kDNA	1	1	1	1	1
	HSP70	1	1	1	1	0
	ITS	1	1	1	1	1
	18S	1	1	1	1	1
<i>L. mexicana</i>	kDNA	1	1	1	1	1
	HSP70	1	1	1	1	0
	ITS	1	1	1	1	1
	18S	1	1	1	1	1
<i>L. infantum</i>	kDNA	1	1	1	1	1

	HSP70	1	1	1	1	0
	ITS	1	1	1	1	1
	18S	1	1	1	1	1

1= obtención de banda 0= no banda

De acuerdo a los resultados obtenidos, se pudo determinar que el límite de detección para los marcadores ADNk, ITS-1 y 18 S fue hasta la dilución 1×10^0 parásitos/mL, para el caso del marcador HSP70 el límite de detección fue de 1×10^1 parásitos/mL para todas las especies de *Leishmania*. Estos resultados son consistentes con el RRA descrito anteriormente.

6.4.2 Límite de detección en qPCR

Para determinar este parámetro, la diferencia entre las medias de Ct obtenidos de forma independiente, fue comparada a tres niveles:

- Día de realización de la prueba
- Concentración del ADN molde utilizado
- Marcador molecular usado para el diagnóstico.

6.4.2.1 Día de realización de la prueba.

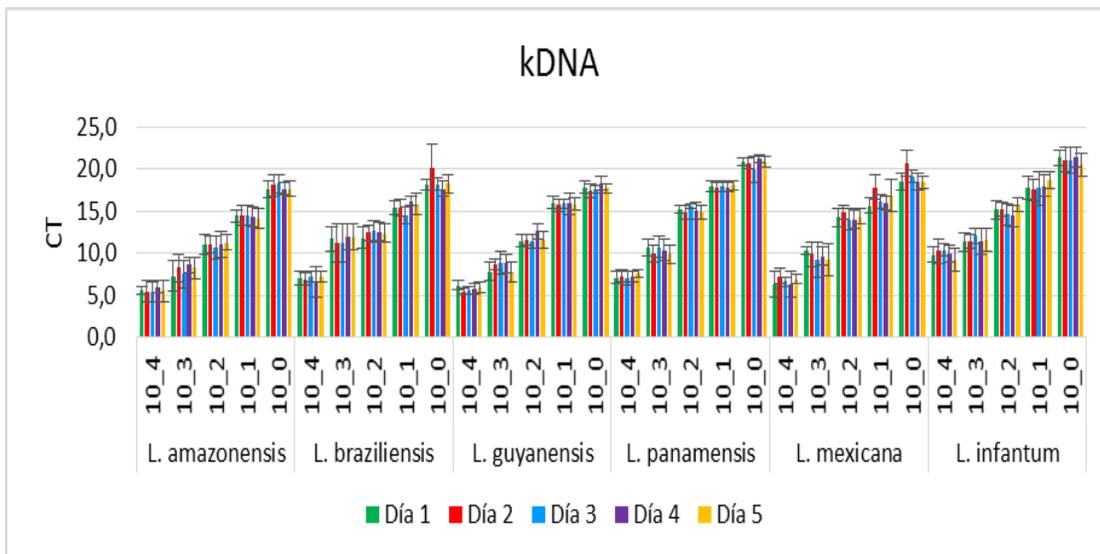


Figura 44. Diferencia de medias para el marcador ADNk

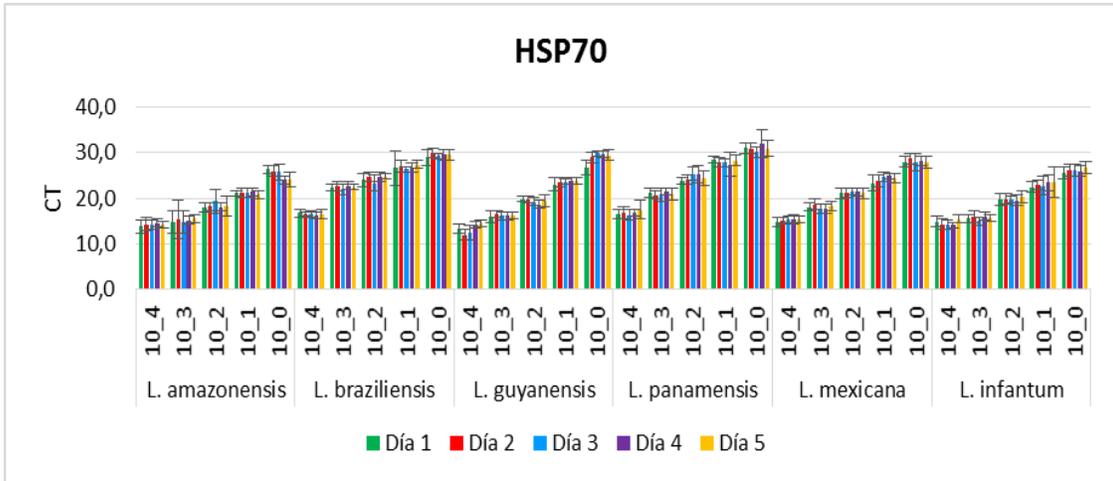


Figura 45. Diferencia de medias para el marcador HSP70

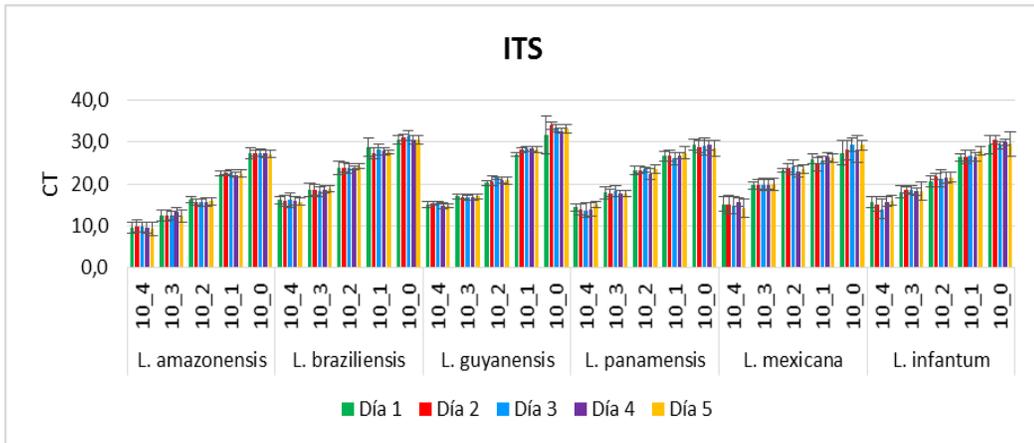


Figura 46. Diferencia de medias para el marcador ITS

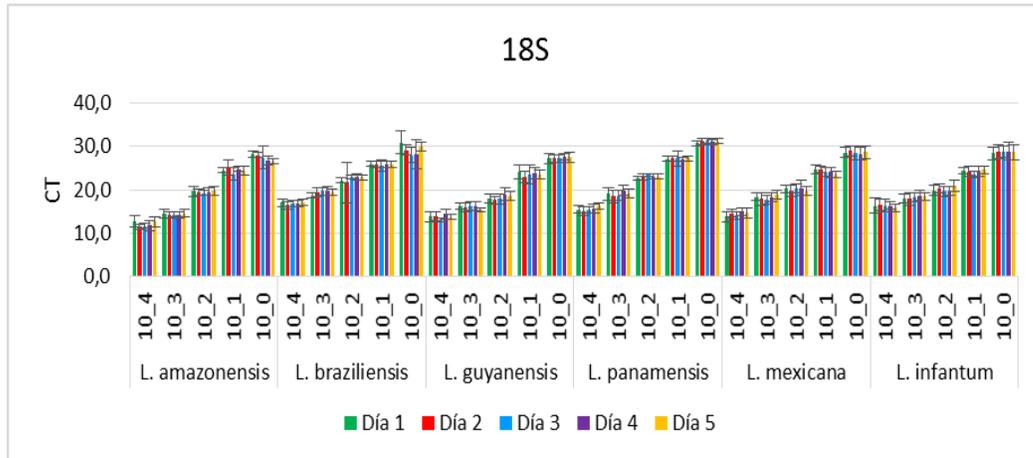


Figura 47. Diferencia de medias para el marcador 18S

Con los datos graficados (Figuras 44 – 47) se realizó una prueba de comparación de varianzas con un intervalo de confianza de 95%, se puede concluir que no se encontró diferencias estadísticamente significativas entre los días de realización de la prueba con los 4 marcadores moleculares en las 5 diluciones seriadas. (Estadístico F: 1,1480; valor P: 0,86)

6.4.2.2 Concentración del ADN molde utilizado

En todos los casos se analizó primero la homogeneidad de varianzas y posteriormente se aplicó las pruebas de comparación de medias. En la gráfica 48 se observa que las pruebas de comparación de medias permitieron identificar que la tendencia al aumento de Ct, es dependiente del incremento de la dilución, mostrando una diferencia significativa para todas las diluciones y en todos los marcadores (valor P < 0,05).

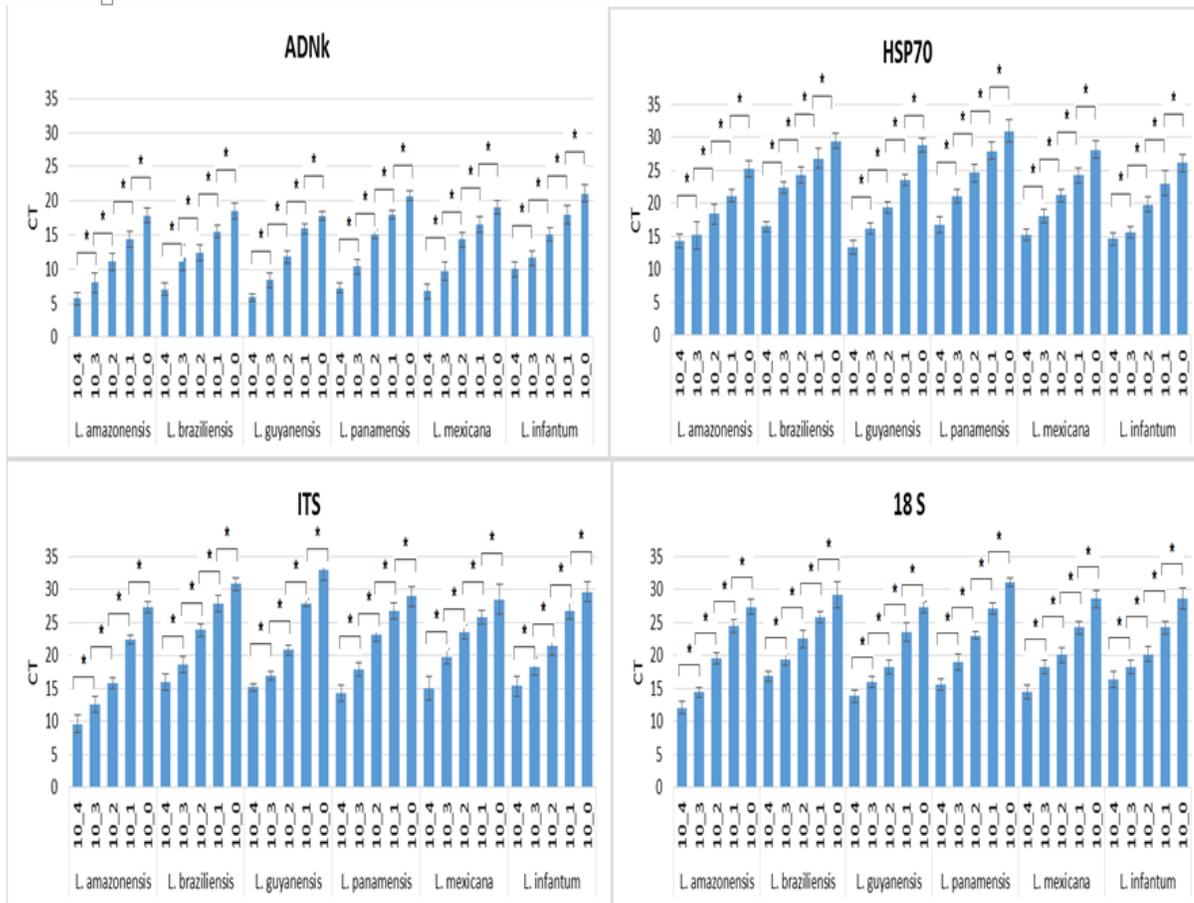


Figura 48. Comparación de Ct de cada dilución por cada marcador molecular.
* significancia estadística.

6.4.2.3 Marcador molecular usado para el diagnóstico.

Se analizó la homogeneidad de varianzas y posteriormente se aplicó las pruebas de comparación de medias. En la figura 49 se observa que al comparar las medias de Ct de cada marcador molecular empleado en cada dilución evaluada, se encontró que la mayoría tienen un comportamiento diferente (diferencias estadísticamente significativas valor $P < 0,05$), excepto los que se marcan en las figuras, en donde las medias no mostraron esa diferencia.

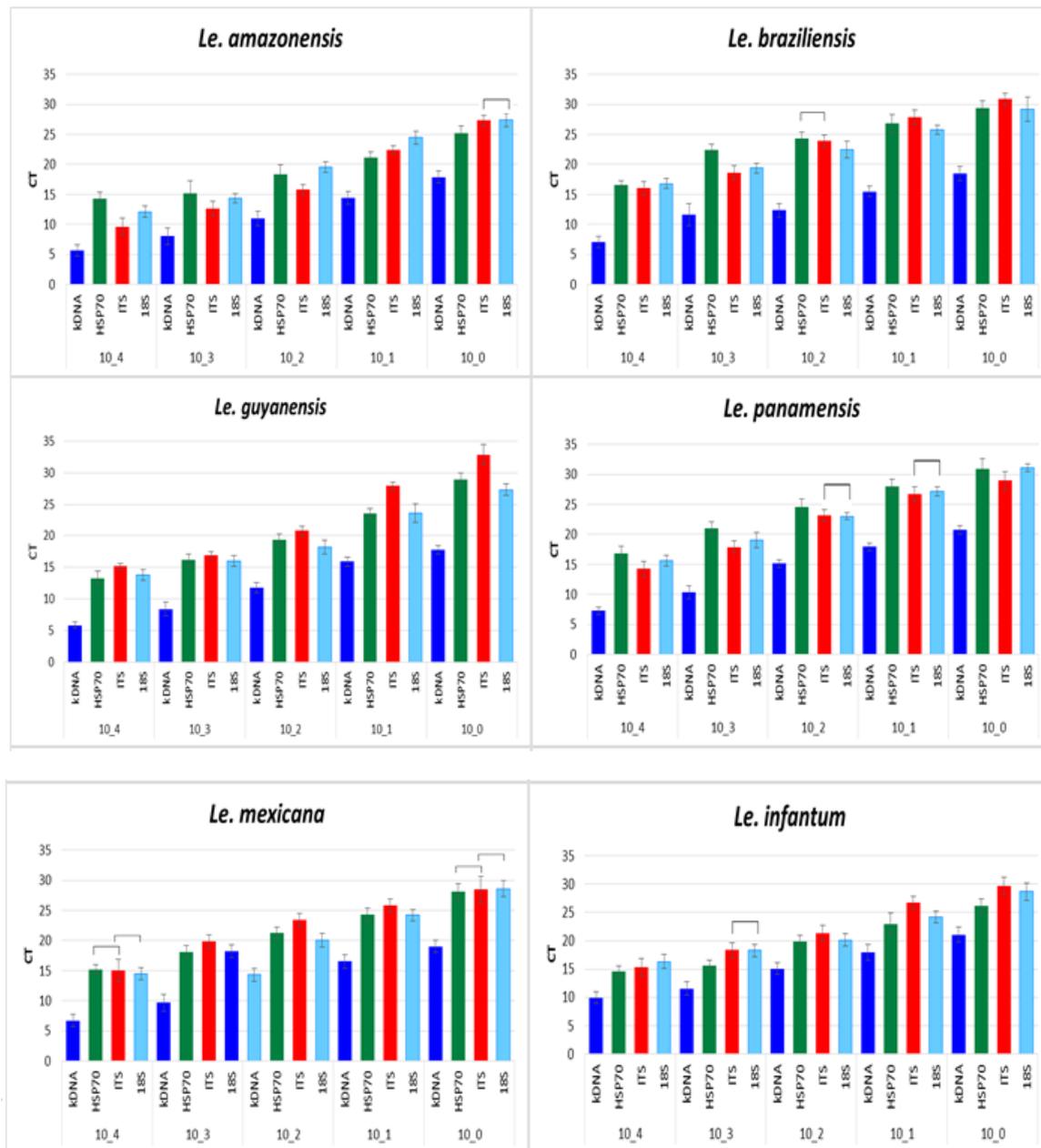


Figura 49. Comparación por marcador molecular utilizado. Las marcas horizontales en las gráficas denotan donde **No** hubo significancia estadística.

6.4.3 Análisis de regresión Probit para determinar el límite de detección.

Para determinar el límite de detección de la plataforma qPCR, se realizó un análisis de regresión Probit y con los datos obtenidos se construyó la tabla 20.

Tabla 20. Límite de detección determinada por análisis de regresión Probit.

Marcador	Cepa	Días	No. replicas	LoD	Párasitos/mL	Intercepto con Y (Ct) [IC 95%]	F	p
ADNk	<i>Le. amazonensis</i>	5	8	-1,83	1×10^{-2}	26,3 [24,8 - 27,9]	422	0,00025
	<i>Le. braziliensis</i>	5	8	-1,85	1×10^{-2}	26,4 [25 - 27,7]	449,5	0,00022
	<i>Le. guyanensis</i>	5	8	-1,86	1×10^{-2}	27,2 [25,2 - 29,1]	277,2	0,0004
	<i>Le. panamensis</i>	5	8	-1,94	1×10^{-2}	27,2 [25,5 - 28,6]	342,7	0,0002
	<i>Le. mexicana</i>	5	8	-1,83	1×10^{-2}	26,7 [25,3 - 28,1]	393,7	0,00027
	<i>Le. infantum</i>	5	8	-1,79	1×10^{-2}	27,3 [25,9 - 28,7]	223,7	0,0001
HSP70	<i>Le. amazonensis</i>	5	8	-0,89	1×10^{-1}	30,4 [29,5 - 31,3]	789,2	0,00009
	<i>Le. braziliensis</i>	5	8	-0,96	1×10^{-1}	31,3 [30,4 - 32,2]	649,4	0,00006
	<i>Le. guyanensis</i>	5	8	-0,98	1×10^{-1}	30,8 [29,9 - 31,7]	724,5	0,00006
	<i>Le. panamensis</i>	5	8	0,89	1×10^{-1}	29,8 [28,9 - 30,7]	764,4	0,00007
	<i>Le. mexicana</i>	5	8	-1,0	1×10^{-1}	30,2 [29,3 - 31,1]	689,3	0,00007
	<i>Le. infantum</i>	5	8	-0,97	1×10^{-1}	30,4 [29,5 - 31,3]	783,3	0,00008
ITS	<i>Le. amazonensis</i>	5	8	-0,87	1×10^{-1}	35,4 [34 - 37,1]	567,4	0,00008
	<i>Le. braziliensis</i>	5	8	-0,89	1×10^{-1}	34,6 [33,2 - 36,3]	474,6	0,0002
	<i>Le. guyanensis</i>	5	8	-1,0	1×10^{-1}	34,4 [33 - 36,1]	510,1	0,0002
	<i>Le. panamensis</i>	5	8	-0,96	1×10^{-1}	34,7 [33,3 - 36,4]	420,3	0,0004
	<i>Le. mexicana</i>	5	8	-0,98	1×10^{-1}	34,5 [33,1 - 36,2]	484,6	0,0002
	<i>Le. infantum</i>	5	8	-0,89	1×10^{-1}	34,2 [32,8 - 35,9]	521,7	0,0004
18 S	<i>Le. amazonensis</i>	5	8	-1,74	1×10^{-2}	35,8 [34,2 - 37,2]	363,3	0,0003
	<i>Le. braziliensis</i>	5	8	-1,87	1×10^{-2}	35,6 [34,2 - 37]	314,3	0,0003
	<i>Le. guyanensis</i>	5	8	-1,95	1×10^{-2}	34,9 [33,2 - 36,6]	354	0,0003
	<i>Le. panamensis</i>	5	8	-1,78	1×10^{-2}	36 [34,2 - 37,7]	323,7	0,0003
	<i>Le. mexicana</i>	5	8	-1,84	1×10^{-2}	35,7 [33 - 36,4]	413,5	0,0003
	<i>Le. infantum</i>	5	8	-1,87	1×10^{-2}	35,8 [34,1 - 37,5]	392,4	0,0003

F: Estadístico F

p: Valor P

Se determinó que el límite de detección para los marcadores moleculares ADNk y 18S en PCR en tiempo real es de 1×10^{-2} parásitos/mL y para HSP70 e ITS es de 1×10^{-1} parásitos/mL.

6.5 Precisión

Para determinar la precisión de las técnicas, se realizó PCR convencionales y qPCR con los 4 marcadores moleculares con una dilución por encima y una por debajo del LoD de cada ADN de las 6 cepas de referencia por triplicado y durante 10 días a las mismas condiciones.

6.5.1 Precisión PCR convencional.

Para el caso de la PCR convencional se realizó la misma metodología utilizada en RRA y LoD para establecer los datos consenso y elaborar la tabla 21.

Tabla 21. Precisión de la PCR convencional para los cuatro marcadores moleculares

	ADNk			ITS-1			18S			HSP70		
	10 ¹	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ¹	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ¹	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ²	10 ¹	10 ⁰
<i>L. amazonensis</i>	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0
<i>L. braziliensis</i>	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0
<i>L. guyanensis</i>	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0
<i>L. panamensis</i>	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0
<i>L. mexicana</i>	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0
<i>L. infantum</i>	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0

1= obtención de banda 0= no banda

En la tabla se ubica el LoD en el centro de cada marcador molecular, a su izquierda se encuentra la dilución inferior y a la derecha una dilución superior al LoD.

Una vez realizado el consenso de los resultados para cada uno de los marcadores moleculares, se puede observar que la precisión de la técnica PCR convencional durante los 10 días de análisis es baja, no se obtuvieron datos homogéneos ni precisos según lo obtenido en el RRA y LoD, en algunos días no se obtuvo amplificación en el límite de detección establecido anteriormente.

6.5.2 Precisión q PCR

Para el caso de la precisión de la PCR en tiempo real se realizaron dos tablas (22 y 23) donde se compara la media, desviación estándar y precisión de las 6 especies de *Leishmania* en cada uno de los cuatro marcadores moleculares, la justificación por la cual se realiza dos tablas es debido a la obtención de diferentes límites de detección en los 4 marcadores.

Tabla 22. Precisión de la qPCR para HSP70 e ITS

Marcador	Cepa	Días	No. replicas	10 ⁻² (0,01 parásitos/mL)			10 ⁻¹ (0,1) parásitos/mL			10 ⁰ (1 parásitos/mL)		
				Media (Ct)	DE	CV%	Media (Ct)	DE	CV%	Media (Ct)	DE	CV%
HSP70	<i>L. amazonensis</i>	10	3	33,32	1,76	5,29	29,87	0,95	3,19	27,45	0,37	1,34
	<i>L. braziliensis</i>	10	3	33,29	1,60	4,82	30,09	0,74	2,44	27,56	0,47	1,69
	<i>L. guyanensis</i>	10	3	31,88	1,79	5,60	29,92	1,01	3,36	27,5	0,52	1,88
	<i>L. panamensis</i>	10	3	31,75	2,66	8,37	30,26	0,86	2,83	27,59	0,43	1,55
	<i>L. mexicana</i>	10	3	33,99	1,46	4,29	30,38	0,68	2,24	28,05	0,48	1,71
	<i>L. infantum</i>	10	3	34,29	2,19	6,39	30,03	0,63	2,10	27,43	0,45	1,66
ITS	<i>L. amazonensis</i>	10	3	36,76	0,84	2,30	34	0,37	1,07	30,14	0,37	1,24
	<i>L. braziliensis</i>	10	3	36,56	0,80	2,19	34,22	0,39	1,15	30,07	0,33	1,09
	<i>L. guyanensis</i>	10	3	37,58	0,85	2,26	34,43	0,39	1,13	30,14	0,35	1,17
	<i>L. panamensis</i>	10	3	37,14	0,79	2,13	33,93	0,41	1,21	30,03	0,47	1,57
	<i>L. mexicana</i>	10	3	37,55	0,65	1,74	34,48	0,39	1,14	30,21	0,44	1,46
	<i>L. infantum</i>	10	3	36,77	0,75	2,03	34,38	0,43	1,26	29,98	0,36	1,21

DE: Desviación estándar

CV: Coeficiente de variación

En la tabla se ubica el LoD en el centro de cada marcador molecular, a su izquierda se encuentra la dilución inferior y a la derecha una dilución superior al LoD.

En la tabla 22 se puede observar que a diluciones muy bajas el coeficiente de variación entre replicas aumenta y para el caso del marcador HSP70 las variaciones no son homogéneas.

Tabla 23. Precisión de la qPCR para ADNk y 18 S

Marcador	Cepa	Días	No. replicas	10 ⁻³ (0,001 parásitos/mL)			10 ⁻² (0,01) parásitos/mL			10 ⁻¹ (0,1 parásitos/mL)		
				Media (Ct)	DE	CV%	Media (Ct)	DE	CV%	Media (Ct)	DE	CV%
ADNk	<i>L. amazonensis</i>	10	3	29,57	0,34	1,14	23,83	0,24	0,99	20,3	0,22	1,07
	<i>L. braziliensis</i>	10	3	29,85	0,31	1,04	24,52	0,11	0,46	19,46	0,20	1,00
	<i>L. guyanensis</i>	10	3	30,1	0,37	1,24	24,67	0,34	1,39	19,44	0,26	1,32
	<i>L. panamensis</i>	10	3	29,99	0,45	1,49	24,54	0,26	1,09	20,18	0,21	1,05
	<i>L. mexicana</i>	10	3	30,41	0,40	1,33	24,09	0,30	1,24	20,21	0,22	1,11
	<i>L. infantum</i>	10	3	29,99	0,40	1,35	24,09	0,31	1,27	19,99	0,21	1,06
18 S	<i>L. amazonensis</i>	10	3	39,03	0,63	1,61	34,91	0,45	1,30	31,51	0,43	1,35
	<i>L. braziliensis</i>	10	3	38,74	0,56	1,44	35,03	0,37	1,05	31,27	0,39	1,24
	<i>L. guyanensis</i>	10	3	38,89	0,78	2,01	34,83	0,46	1,33	31,25	0,58	1,84
	<i>L. panamensis</i>	10	3	39,06	0,49	1,24	35,72	0,41	1,17	31,44	0,45	1,44
	<i>L. mexicana</i>	10	3	38,67	0,81	2,10	34,77	0,61	1,76	31,32	0,40	1,28
	<i>L. infantum</i>	10	3	39,62	0,76	1,92	34,75	0,47	1,36	31,53	0,48	1,51

DE: Desviación estándar

CV: Coeficiente de variación

En la tabla se ubica el LoD en el centro de cada marcador molecular, a su izquierda se encuentra la dilución inferior y a la derecha una dilución superior al LoD.

En la tabla 23 se puede observar que los resultados que se obtienen son muy homogéneos (Coeficiente de variación cercano a 1) lo cual se puede inferir que al utilizar los marcadores ADNk y 18S no se obtendrá demasiada variación de los resultados independiente del día que se realice la prueba (técnica reproducible).

6.6 Amplificación Isotérmica mediada por Loop.

Para evaluar el desempeño analítico de la LAMP se realizó el diseño de cebadores LAMP para los marcadores HSP70 e ITS que a la fecha del diseño no se encontraron reporte en la literatura, para el marcador ADNk existen reportes de cebadores LAMP pero solo para leishmaniasis visceral.

6.6.1 Diseño de cebadores para los blancos moleculares ADNk, HSP70 e ITS-1

El diseño de cebadores de LAMP se describió en la metodología, una vez obtenida la secuencia consenso se eligieron los siguientes cebadores LAMP para cada marcador molecular (tablas 24-26 y figuras 50-52).

Tabla 24. Cebador LAMP HSP70 seleccionados en el software Primer Explorer

Label	5'pos	3'pos	len	Tm	5' ΔG	3' ΔG	GC rate	Sequence
F3	384	399	16	61.08	-7.36	-5.08	0.69	CGACGCAGGCGACGAT
B3	552	567	16	60.79	-6.45	-6.33	0.69	CCCACCAGCACCACGT
F1P			38					ACAGCTCCTCGAAGCGCGC-GAGATCGACGCGCTGTTCG
B1P			38					CCTGTTCCGCAGCAGATTCA-ACGGAGCGCTTGCCAT
F2	401	419	19	62.65	-4.10	-5.35	0.63	GAGATCGACGCGCTGTTCG
F1c	452	470	19	67.20	-5.63	-8.67	0.68	ACAGCTCCTCGAAGCGCGC
B2	530	546	17	60.59	-6.02	-4.90	0.59	ACGGAGCGCTTGCCAT
B1c	478	498	21	65.11	-5.00	-3.92	0.57	CCTGTTCCGCAGCAGATTCA

Tm: Temperatura melting Len: Longitud

El color en la secuencia de los cebadores muestra la localización de los mismos en la secuencia consenso



Figura 50. Secuencia consenso para el gen HSP70 y localización de los cebadores LAMP

Tabla 25. Cebador LAMP ITS seleccionados en el software Primer Explorer

Label	5'pos	3'pos	len	Tm	5' Δ G	3' Δ G	GC rate	Sequence
F3	32	49	18	56.87	-3.29	-6.98	0.50	AACATACAACCTCCGGGGA
B3	238	255	18	56.23	-5.75	-5.68	0.50	AAGCCAAGTCATCCATCG
FIP			43					GGCCTTTTTCTACTGTATGTTGTGT-TCTAGCAAGCCTTTCCCA
BIP			43					ATCGACGTTAACATATCGCGTATAC-ATGTGAGCCGTTATCCAC
F2	61	78	18	57.22	-4.67	-5.37	0.50	TCTAGCAAGCCTTTCCCA
F1c	118	142	25	61.47	-6.19	-4.72	0.40	GGCCTTTTTCTACTGTATGTTGTGT
B2	211	228	18	55.90	-4.46	-4.90	0.50	ATGTGAGCCGTTATCCAC
B1c	144	168	25	60.62	-5.08	-2.53	0.40	ATCGACGTTAACATATCGCGTATAC

Tm: Temperatura melting Len: Longitud

El color en la secuencia de los cebadores muestra la localización de los mismos en la secuencia consenso

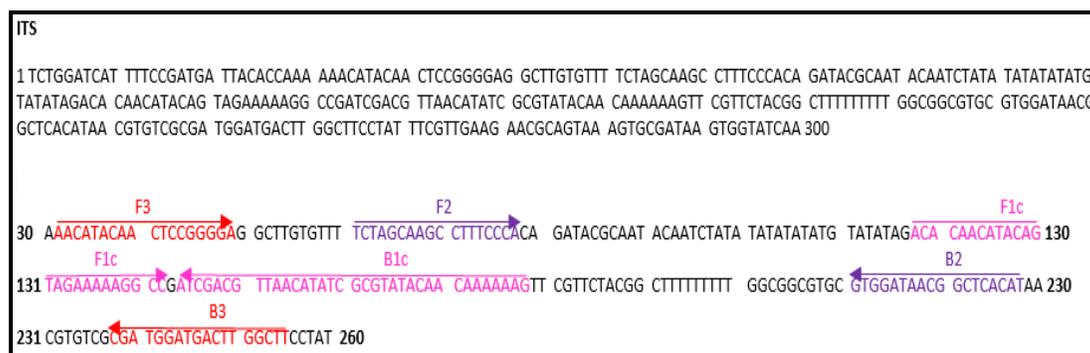


Figura 51. Secuencia consenso para el gen ITS y localización de los cebadores LAMP

Tabla 26. Cebador LAMP ADNk seleccionados en el software Primer Explorer

Label	5'pos	3'pos	len	Tm	5' Δ G	3' Δ G	GC rate	Sequence
F3	27	46	20	55.01	-4.46	-4.01	0.40	CGAAAAATGAGTGCCAGAAAC
B3	199	216	18	55.90	-3.83	-5.69	0.44	AAAACAAGACCCAACCGA
FIP			43					CACCAACCCCCAGTTGTGAC-GTTTCATATTTTTGGGCAAAAATCC
BIP			41					GGCTGCTCTGGAGGTTTGTAT-ATCAACACAATCAAGACATCA
F2	50	72	23	56.85	-4.06	-4.01	0.35	GTTTCATATTTTTGGGCAAAAATCC
F1c	91	110	20	62.85	-5.17	-5.07	0.60	CACCAACCCCCAGTTGTGAC
B2	178	198	21	55.08	-4.06	-4.46	0.33	ATCAACACAATCAAGACATCA
B1c	123	142	20	61.86	-7.09	-3.57	0.55	GGCTGCTCTGGAGGTTTGTAT

Tm: Temperatura melting Len: Longitud

El color en la secuencia de los cebadores muestra la localización de los mismos en la secuencia consenso

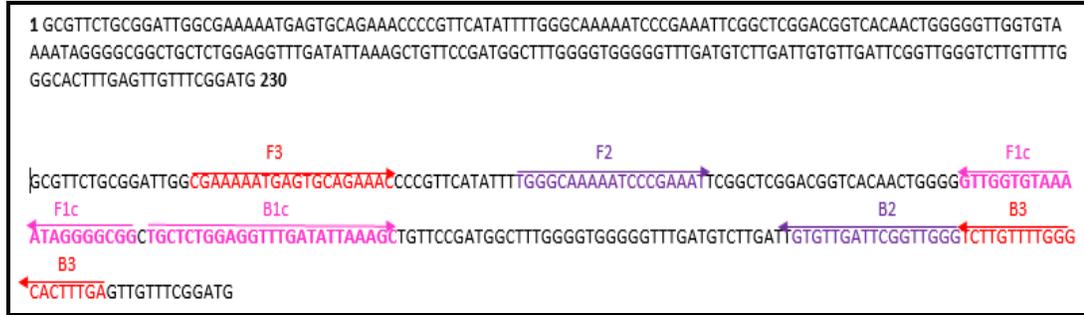


Figura 52. Secuencia consenso para el gen ADNk y localización de los cebadores LAMP

6.6.2 Estandarización de la LAMP para el marcador 18S

Como se describió en la metodología, los cebadores de LAMP ya están reportados en la literatura, se inició la estandarización de la técnica para determinar la concentración óptima de los cebadores externos, para esto se realizaron ensayos a tres diferentes concentraciones (10, 15 y 20 pMol). Una vez realizados los ensayos se determinó que la mejor concentración de trabajo es a 15 pMol, la mezcla de LAMP PCR se realizó con el kit Loopamp de Eiken y para revelar los resultados se utilizó el Fluorescent Reagent también proporcionado por Eiken®, las condiciones de mezcla se describen en la tabla 27.

Tabla 27. Condiciones de la Master mix con Loopamp de Eiken®

Reactivo Mezcla	[] Inicial	[] Final	Volumen por tubo (µL)
Reaction Mix (RM)	2x	1x	12,5
Cebador FIP	40 pMol	1,6 pMol	4
Cebador BIP	40 pMol	1,6 pMol	4
Cebador F3	15 pMol	0,6 pMol	0,75
Cebador B3	15 pMol	0,6 pMol	0,75
<i>Bst</i> DNA Polimerasa	8 U		1
Fluorescent reagent			1
ADN			2
Volumen final			25 µL

Para determinar la temperatura óptima de reacción se realizó la estandarización de la técnica a tres diferentes temperaturas (60, 63 y 65°C) y a tres tiempos diferentes (1 hora, hora 15 minutos y hora 30 minutos) obteniendo mejores resultados a 63°C por 1 hora y 80°C por 5 min para la inactivación de la enzima.

Una vez realizada la amplificación isotérmica se observó una fluorescencia en los tubos que contenían ADN de *Leishmania* (Figura 53) obteniendo hasta el momento resultados positivos, pero para comprobar estos resultados es necesario realizar un corrido electroforético para observar los amplicones de LAMP que se forman en la reacción.

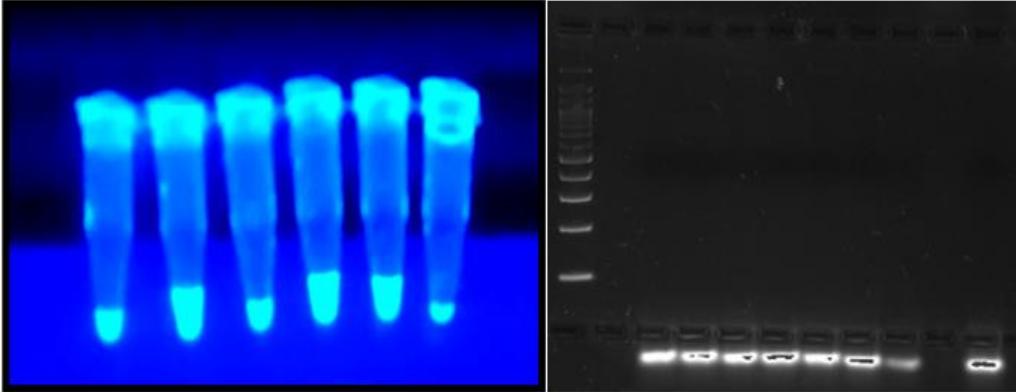


Figura 53. Estandarización de la técnica LAMP con reactivo fluorescente.
Izquierda: Fluorescencia emitida en LAMP Derecha: Corrido electroforético

En la figura 53 se puede observar la emisión de fluorescencia pero no se observó la amplificación en el gel. Después de realizar varios ensayos no se pudo obtener resultados favorables con el uso del Fluorescent Reagent como método de revelado para la LAMP.

Después de revisar la literatura se decidió utilizar Verde de malaquita como lo describe Nzelu y colaboradores (68), aquí describen que las muestras positivas se tornaran de un color azul oscuro a un azul turquesa, mientras que las muestras negativas no presentaran ninguna coloración. Las condiciones de mezcla se describieron previamente en la metodología.

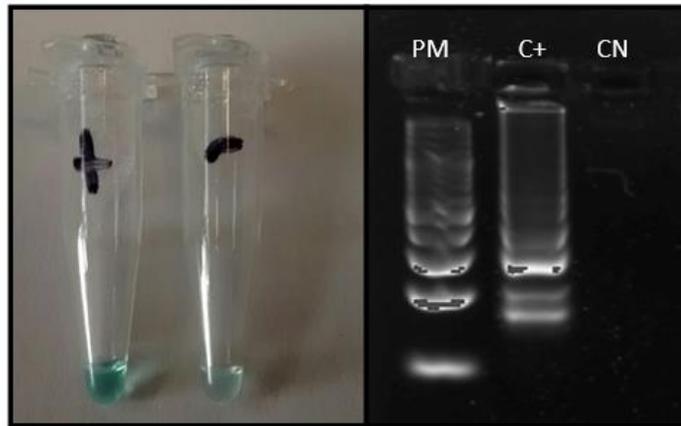


Figura 54. Estandarización de la técnica LAMP con verde de malaquita. Izquierda: Presencia de color (Azul turquesa) en la muestra positiva en LAMP con verde de malaquita. Derecha: Corrido electroforético.

Como se observa en la figura 54 al utilizar el verde de malaquita como método de revelado de la LAMP se puede corroborar con la detección de los amplicones de LAMP en el gel.

6.6.3 Estandarización de la LAMP para los marcadores HSP70, ADNk e ITS-1.

Utilizando como referencia las condiciones de mezcla del marcador molecular 18S se iniciaron los ensayos de estandarización para los tres marcadores moleculares. Se obtuvo resultados de amplificación para HSP70, pero no se logró obtener resultados favorables para ADNk e ITS-1.

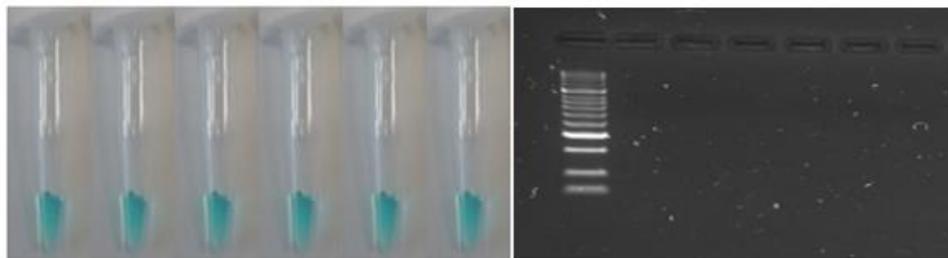


Figura 55. Estandarización de la técnica LAMP para ADNk e ITS-1. Izquierda: LAMP con los marcadores moleculares ADNk e ITS. Derecha: corrido electroforético.

En la figura 55 se observa un color azul turquesa en los tubos de reacción, pero no se logró obtener un bandeo para comprobar dicha amplificación.

Para comprobar que el diseño de los cebadores fue el adecuado, se decidió realizar una PCR convencional con solo los cebador externos (los cuales cubren toda la región de amplificación figuras 51 y 52) utilizando como molde ADN de *L. panamensis* para observar la presencia de banda.

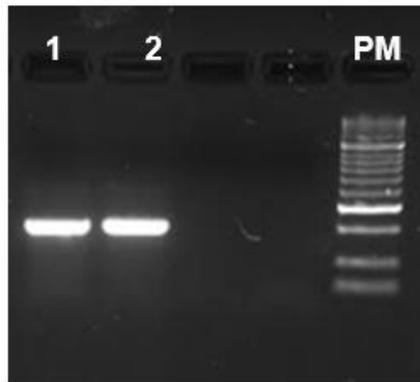


Figura 56. PCR convencional con cebadores externos.

1: cebador para ADNk; 2: cebador para ITS; PM: peso molecular. Tamaño de banda esperado: 250 pb aprox.

En la figura se observa la obtención de banda para los dos marcadores, posteriormente se envió a secuenciar, una vez editada la secuencia se realizó un Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) y dio como resultado *Le. panamensis*, lo anterior se puede inferir que posiblemente el problema se encuentra en el diseño de los cebadores internos (FIP y BIP).

6.6.4 Rango reportable Anticipado

Se realizó LAMP con los marcadores moleculares HSP70 y 18S en un rango de diluciones seriadas entre 1×10^4 y 1×10^{-2} parásitos/mL de cada una de las 6 especies de *Leishmania* (Figuras 57 y 58), los ensayos moleculares se efectuaron por triplicado en un solo día.

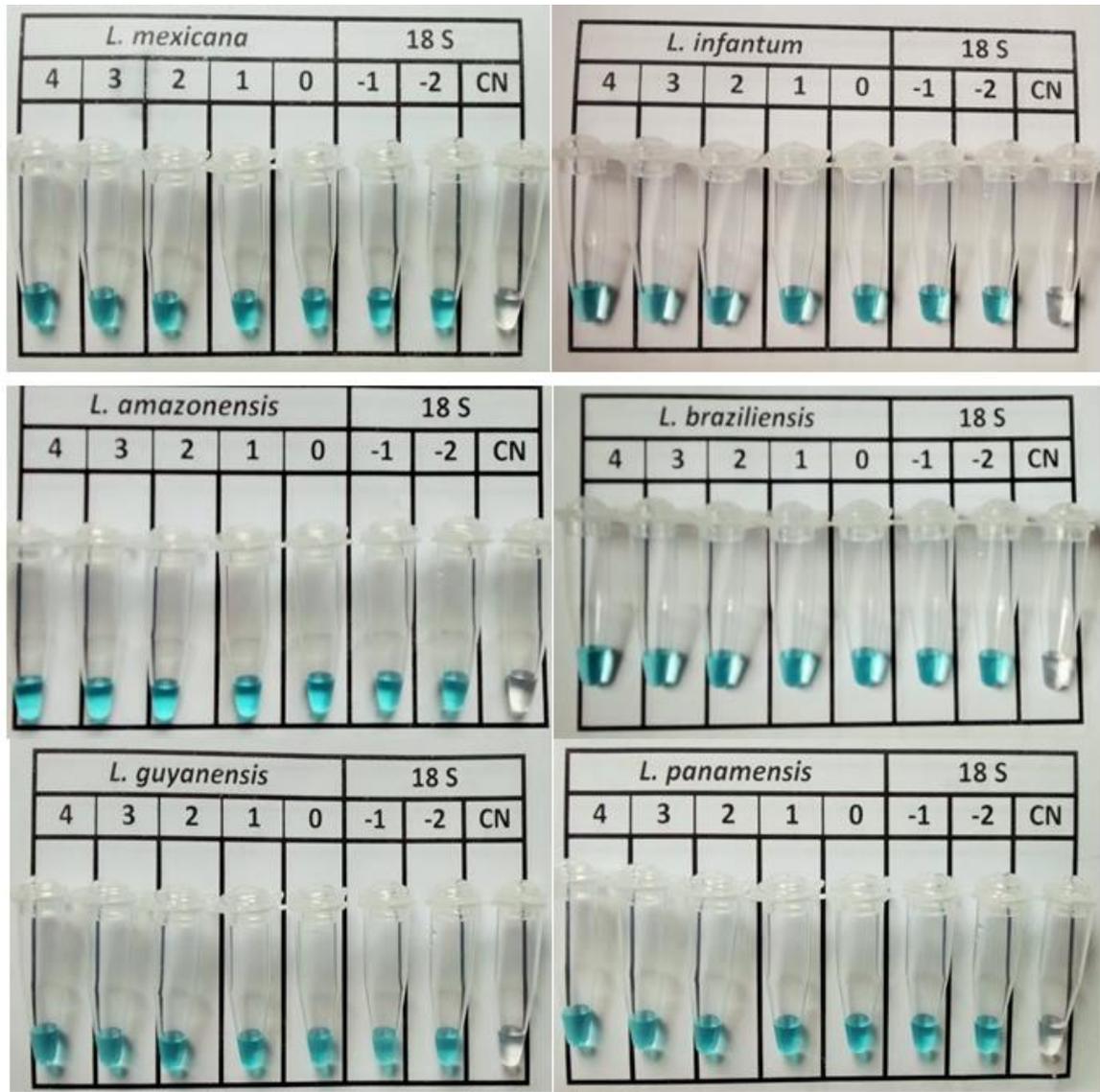


Figura 57. Rango reportable anticipado para el marcador 18S



Figura 58. Rango reportable anticipado para el marcador HSP70

Una vez obtenido todos los resultados de las tres replicas con las 7 diluciones seriadas se realizó la tabla consenso de resultados (Tabla 28) siguiendo la misma metodología propuesta para el RRA de PCR convencional.

Tabla 28. Rango Reportable Anticipado para LAMP con HSP70 y 18S

Cepas	Marcador	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ¹	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²
<i>L. amazonensis</i>	18S	1	1	1	1	1	1	1
	HSP70	1	1	1	1	1	1	0
<i>L. braziliensis</i>	18S	1	1	1	1	1	1	1
	HSP70	1	1	1	1	1	1	0
<i>L. guyanensis</i>	18S	1	1	1	1	1	1	1
	HSP70	1	1	1	1	1	1	0
<i>L. panamensis</i>	18S	1	1	1	1	1	1	1
	HSP70	1	1	1	1	1	1	0
<i>L. mexicana</i>	18S	1	1	1	1	1	1	1
	HSP70	1	1	1	1	1	1	0
<i>L. infantum</i>	18S	1	1	1	1	1	1	1
	HSP70	1	1	1	1	1	1	0

1= obtención de banda 0= no banda

Una vez analizado los datos se puede concluir que el rango reportable anticipado más amplio se obtiene con el marcador 18S obteniendo amplificación hasta la dilución 1×10^{-2} para todas las especies de *Leishmania*, para el marcador HSP70 el rango se reporta desde las diluciones 1×10^4 hasta 1×10^{-1} .

6.6.5 Inclusividad

A partir de los ADN de las 6 cepas de *Leishmania* se realizó LAMP con los dos marcadores, se puede concluir que la técnica es inclusiva al amplificar todos los ADN de interés para la estandarización de la técnica (Figura 59).

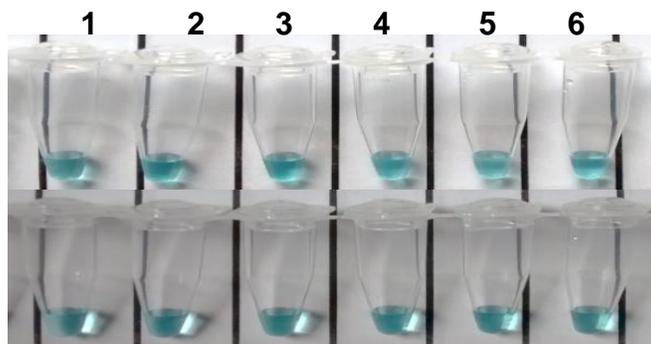


Figura 59. Inclusividad de la LAMP.

1: *L. amazonensis*; 2: *L. braziliensis*; 3: *L. guyanensis*; 4: *L. panamensis*; 5: *L. mexicana*; 6: *L. infantum*. Arriba: 18S; Abajo: HSP70.

6.6.6 Exclusividad

A partir de los ADN de los 8 microorganismos de diagnóstico diferencial se realizó LAMP con los dos marcadores (Figuras 60 y 61) se observa que para el marcador molecular HSP70, la técnica no es exclusiva para la amplificación de *Leishmania* (Figura 60), pues se observa un color azul turquesa correspondiente a ADN de *T. cruzi* y *S. schenckii*.

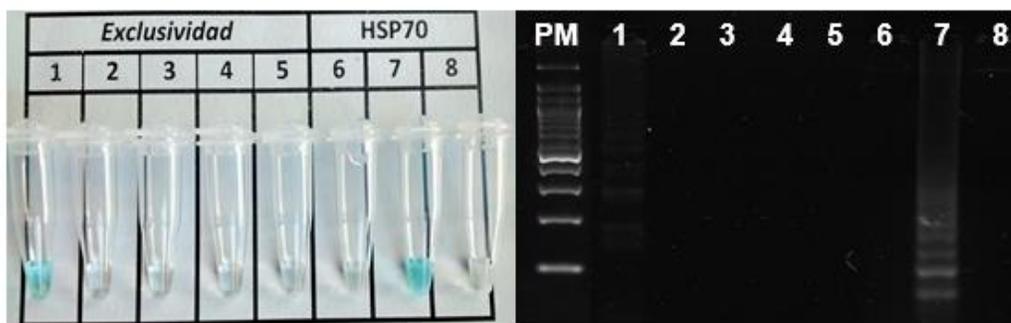


Figura 60. Exclusividad de la LAMP con el marcador HSP70.

PM: 100 bp; 1: *T. cruzi*; 2: *T. rangeli*; 3: *S. aureus*; 4: *S. pyogenes*; 5: *H. capsulatum*; 6: *M. tuberculosis*; 7: *S. schenckii*; 8: *F. pedrosoi*.



Figura 61. Exclusividad de la LAMP con el marcador 18 S.

PM: 100 bp; 1: *T. cruzi*; 2: *T. rangeli*; 3: *S. aureus*; 4: *S. pyogenes*; 5: *H. capsulatum*; 6: *M. tuberculosis*; 7: *S. schenckii*; 8: *F. pedrosoi*.

6.6.7 Límite de detección.

Se realizó LAMP con los dos marcadores moleculares (Figuras 62 y 63) en un rango de diluciones seriadas entre 1×10^2 y 1×10^{-2} parásitos/mL de cada una de las 6 cepas de referencia de *Leishmania*, los ensayos moleculares se realizaron con 8 réplicas por dilución por 5 días.

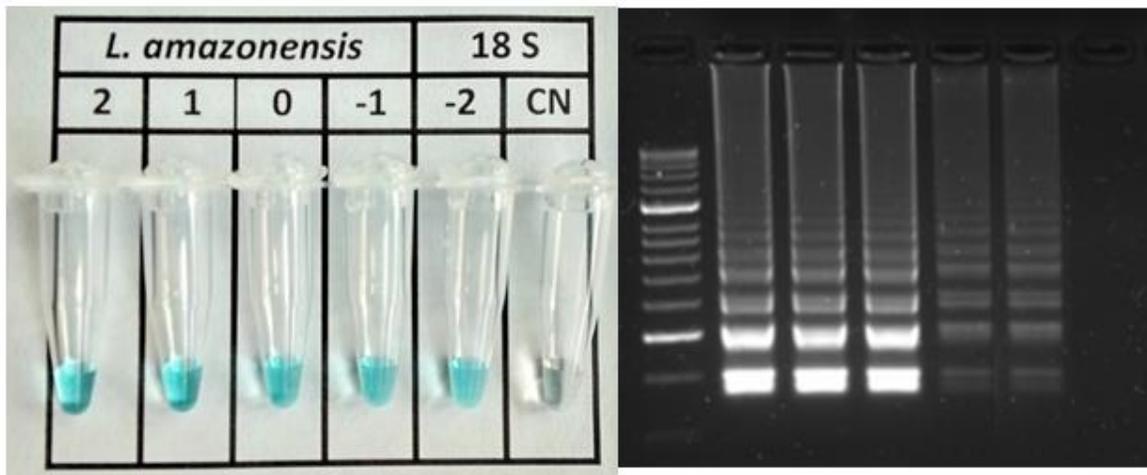


Figura 62. Límite de detección de 18S en LAMP

Izquierda: límite de detección con el marcador 18S para LAMP. Derecha: corrido electroforético, observe los amplicones de LAMP.



Figura 63. Límite de detección de HSP70 en LAMP

Izquierda: límite de detección con el marcador HSP70 para LAMP, nótese la diferencia de color al comparar con el marcador 18S. Derecha: corrido electroforético, observe los amplicones de LAMP no tan definidos.

Una vez obtenido todos los resultados de las ocho replicas por dilución con las 5 diluciones seriadas de las cepas de referencia, con los dos marcadores moleculares por 5 días se realizó la tabla consenso de resultados (Tabla 29).

Tabla 29. Límite de detección para LAMP

Cepas	Marcador	10 ²	10 ¹	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²
<i>L. amazonensis</i>	18S	1	1	1	1	1
	HSP70	1	1	1	1	0
<i>L. brazilienses</i>	18S	1	1	1	1	1
	HSP70	1	1	1	1	0
<i>L. guyanensis</i>	18S	1	1	1	1	1
	HSP70	1	1	1	1	0
<i>L. panamensis</i>	18S	1	1	1	1	1
	HSP70	1	1	1	1	0
<i>L. mexicana</i>	18S	1	1	1	1	1
	HSP70	1	1	1	1	0
<i>L. infantum</i>	18S	1	1	1	1	1
	HSP70	1	1	1	1	0

De acuerdo a los resultados obtenidos, se pudo determinar que el límite de detección para los marcadores 18 S fue hasta la dilución 1×10^{-2} parásitos/mL, para el caso del marcador HSP70 el límite de detección fue de 1×10^{-1} parásitos/mL para todas las

especies de *Leishmania*, estos resultados son consistentes con el RRA descrito anteriormente.

6.6.8 Precisión.

Para determinar la precisión de la técnica, se realizó LAMP con los 2 marcadores moleculares con una dilución por encima y una por debajo del LoD de cada ADN de las 6 cepas de referencia por triplicado y durante 10 días a las mismas condiciones (Tabla 30).

Tabla 30. Precisión de LAMP con los marcadores 18S y HSP70

	18 S			HSP70		
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²
<i>Le. amazonensis</i>	1	1	0	1	1	0
<i>Le. braziliensis</i>	1	1	0	1	1	0
<i>Le. guyanensis</i>	1	1	0	1	1	0
<i>Le. panamensis</i>	1	1	0	1	1	0
<i>Le. mexicana</i>	1	1	0	1	1	0
<i>Le. infantum</i>	1	1	0	1	1	0

1= presencia de color azul turquesa 0= ausencia de color

En la tabla se ubica el LoD en el centro de cada marcador molecular, a su izquierda se encuentra la dilución inferior y a la derecha una dilución superior al LdD.

Una vez realizado el consenso de los resultados para cada uno de los marcadores moleculares, se puede observar que la precisión de la LAMP durante los 10 días de análisis es buena, no se obtuvieron variaciones con el transcurso de los días.

6.7 Porcentaje de positividad.

Para dar cumplimiento al objetivo No. 4 (Evaluar el porcentaje de positividad de la PCR, qPCR y LAMP para el diagnóstico de leishmaniasis cutánea a partir de frotis directos) se determinó que el mejor desempeño analítico lo tuvo el marcador molecular 18S ribosomal.

El ADN extraído de 50 frotis directos coloreados con Giemsa (Tabla 31), se sometieron a PCR convencional qPCR y LAMP utilizando como blanco molecular el gen 18S, con los

resultados obtenidos se evaluó la concordancia de las técnicas mediante Índice Kappa (Tabla 32).

Tabla 31 Comparación de resultados LAMP con el marcador 18S a partir de ADN de frotis directos y flebotomos.

ID	Tipo de muestra	Resultado microscopía	Resultado qPCR	Ct (promedio)	Resultados LAMP
1	Lámina	Negativo	Negativo	ND	Negativo
2	Lámina	Positivo	Positivo	29,92	Positivo
3	Lámina	Positivo	Positivo	29,2	Positivo
4	Lámina	Positivo	Positivo	30,89	Positivo
5	Lámina	Negativo	Negativo	ND	Negativo
6	Lámina	Positivo	Positivo	25,47	Positivo
7	Lámina	Positivo	Positivo	29,62	Positivo
8	Lámina	Positivo	Positivo	27,35	Positivo
9	Lámina	Negativo	Negativo	ND	Negativo
10	Lámina	Positivo	Positivo	29,4	Positivo
11	Lámina	Positivo	Positivo	29,14	Positivo
12	Lámina	Negativo	Negativo	ND	Negativo
13	Lámina	Positivo	Positivo	26,56	Positivo
14	Lámina	Negativo	Negativo	ND	Negativo
15	Lámina	Negativo	Negativo	ND	Negativo
16	Lámina	Positivo	Positivo	29,4	Positivo
17	Lámina	Positivo	Positivo	30,54	Positivo
18	Lámina	Positivo	Positivo	27,29	Positivo
19	Lámina	Negativo	Positivo	30,62	Positivo
20	Lámina	Positivo	Positivo	30,03	Positivo
21	Lámina	Positivo	Positivo	29,85	Positivo
22	Lámina	Positivo	Positivo	28,11	Positivo
23	Lámina	Negativo	Negativo	ND	Negativo
24	Lámina	Positivo	Positivo	29,23	Positivo
25	Lámina	Positivo	Positivo	30,79	Positivo
26	Lámina	Negativo	Positivo	29,07	Positivo
27	Lámina	Positivo	Positivo	27,25	Positivo
28	Lámina	Positivo	Positivo	29,33	Positivo
29	Lámina	Positivo	Positivo	26,48	Positivo
30	Lámina	Negativo	Negativo	ND	Negativo

31	Lámina	Positivo	Positivo	29,27	Positivo
32	Lámina	Positivo	Positivo	30,47	Positivo
33	Lámina	Positivo	Positivo	27,42	Positivo
34	Lámina	Positivo	Positivo	26,07	Positivo
35	Lámina	Negativo	Negativo	ND	Negativo
36	Lámina	Positivo	Positivo	29,89	Positivo
37	Lámina	Positivo	Positivo	29,27	Positivo
38	Lámina	Positivo	Positivo	30,03	Positivo
39	Lámina	Negativo	Positivo	29,7	Positivo
40	Lámina	Positivo	Positivo	25,28	Positivo
41	Lámina	Negativo	Negativo	ND	Negativo
42	Lámina	Positivo	Positivo	30,43	Positivo
43	Lámina	Positivo	Positivo	28,37	Positivo
44	Lámina	Positivo	Positivo	29,62	Positivo
45	Lámina	Positivo	Positivo	29,35	Positivo
46	Lámina	Negativo	Negativo	ND	Positivo
47	Lámina	Positivo	Positivo	29,4	Positivo
48	Lámina	Positivo	Positivo	29,14	Positivo
49	Lámina	Positivo	Positivo	27,45	Positivo
50	Lámina	Positivo	Positivo	28,65	Positivo

ND: No detectable

Tabla 32. Concordancia entre el examen microscópico y las técnicas moleculares

		CONVEN 18S		QPCR 18S		LAMP 18 S	
		Positivo n (%)	Negativo n (%)	Positivo n (%)	Negativo n (%)	Positivo n (%)	Negativo n (%)
Exámen directo	Positivo	32 (64)	0 -	32 (64)	0 -	32 (64)	0 -
	Negativo	3 (6)	15 (30)	7 (14)	11 (22)	8 (16)	10 (20)
	Porcentaje de concordancia (%)	91,4		82,1		80	
	Kappa index	0,865		0,668		0,615	
	95%CI	[0,71 - 1,0]		[0,45 - 0,88]		[0,39 - 0,84]	
	Porcentaje de positividad (%)	70		78		80	

En general las técnicas moleculares fueron más sensibles que el examen directo, la concordancia fue muy buena entre PCR convencional y la microscopía tradicional (I kappa: 0,865) y buena para qPCR y LAMP (I Kappa: 0,668 y 0,615 respectivamente).

El porcentaje de positividad fue mayor para LAMP al comparar los resultados obtenidos por microscopia convencional, se detectó una muestra positiva que había sido hasta el momento negativa por examen directo, PCR convencional y qPCR.

7 Discusión

En la literatura se ha reportado la detección de parásitos del genero *Leishmania* por métodos basados en PCR los cuales se caracterizados por poseer alta sensibilidad en comparación con los métodos parasitológicos tradicionales (93) y se ha determinado su capacidad de detectar ADN del parásito en una variedad de muestras clínicas (biopsia de piel, material de úlcera, sangre, hueso médula, ganglios linfáticos, frotis directos) (106, 107). Para el diagnóstico molecular se han evaluado varios blancos genéticos entre los que encontramos el ITS-1, kDNA, el HSP70, SSUrRNA, Miniexón entre otros, en estos estudios se reporta las capacidades operativas de la técnica, se llega a evaluar máximo dos marcadores por técnica en una sola especie de *Leishmania* además, no se realiza una adecuada evaluación del desempeño analítico de la técnica y blancos genéticos empleados los cuales son parámetros necesarios para hablar de sensibilidad y especificidad analítica (15, 18, 19, 21-25, 80, 93, 94, 108). Sólo unos pocos estudios han evaluado parámetros de exclusividad de la técnica (109), evaluación del Rango reportable anticipado (99) y determinación del límite de detección (80, 103, 110, 111), Cruz y col en el 2013 reporta el único estudio multicentrico sobre elvaluación de herramientas diagnósticas para leishmaniasis (112). En este estudio, evaluamos el desempeño analítico de la PCR convencional y qPCR mediante el uso de 4 blancos genéticos.

7.1 PCR convencional

El límite de detección (LoD) fue determinado en un RRA de 7 diluciones seriadas del ADN de las 6 especies de *Leishmania* según parámetros establecidos por el CLIA (33). Santamaría y colaboradores en el año 2005 determinaron el LoD de 1 parásito en la PCR convencional con el marcador molecular ADNk, a diferencia de los hallazgos de este estudio, el LoD de esta técnica con el mismo marcador se estableció en 1×10^{-1} parásitos/mL (113). Estos resultados son consistentes con lo descrito por otros autores donde se reporta que este marcador molecular por su elevado número de copias puede detectar hasta menos de un parasito en la PCR convencional (114-116). El LoD para los marcadores 18S e ITS fue de 1×10^0 parásitos/mL, resultados similares fueron reportados por Deborggraeve en el año 2008 donde la técnica logró detectar hasta 1 parásito/180 μ L (117). Un estudio realizado con *L. siamensis* determino un LoD de 0.05 parásitos/ μ L con

estos dos marcadores pero hay que resaltar que esta especie de *Leishmania* no circula en nuestro país (110). Por otro lado el LoD con el marcador HSP70 fue bajo al detectar hasta 1×10^1 parásitos/mL; estos hallazgos soportan lo encontrado en otros estudios donde se estableció que el límite de detección se encuentra en un rango más bajo que los demás marcadores moleculares (103, 110). En cuanto a exclusividad de la técnica con los cuatro marcadores, se pudo concluir que la técnica convencional no es exclusiva para amplificación de ADN de *Leishmania* al utilizar el banco molecular ADNk, pues se obtuvo resultados positivos con ADN de *T. cruzi* posiblemente por su cercanía filogenética al ser parásitos del orden kinetoplastida (Carlos Gustavo Vieira de Morais, *The Dialogue of the Host-Parasite Relationship*: 2015) y *M. tuberculosis* debido al polimorfismo intraespecie en el KDNA como se describe por Srivastava et al. (118) y la presencia de subclases en el minicírculo (119), lo cual contrasta con lo encontrado por Salotra y col. en el año 2001, donde no se obtuvo reacción cruzada al someter ADN de *M. tuberculosis* y *M. leprae* (109). Los demás marcadores fueron exclusivos para la detección de ADN de *Leishmania*; resultados similares a los reportados por Hitakarun y col. (110).

7.2 qPCR

Cuando se evaluaron los mismos parámetros en la PCR en tiempo real se pudo establecer que la técnica es más sensible y reproducible que la PCR convencional (Figuras 38-41; tabla No. 20). Estudios previos han descrito estos mismos hallazgos no solo para *Leishmania* sino para otros microorganismos (*T. cruzi*, *Helicobacter pylori*) ((112, 120-125) y virus como ZIKV y DENV (126, 127).

En los resultados obtenidos en el RRA, se observó que cuando se utiliza el marcador molecular ADNk este presenta un Ct entre 5 a 27, rango mucho más bajo que el reportado para los demás marcadores moleculares, datos concordantes con lo reportado por Jara y col. en el año 2013 donde su rango de amplificación estuvo entre un Ct de 7 y 27 (99). Para los demás marcadores se presentó mayor variabilidad del rango entre cepas como es el caso de *L. panamensis* y *L. braziliensis* en HSP70 y una baja eficiencia en las especies de *L. amazonensis* y *L. guyanensis* en ITS-1 (Figura 39 y 40). Estos hallazgos se fundamentan en el mayor número de copias presentes en el ADNk el cual se ha establecido en 10.000 copias por célula (123, 128, 129). En cuanto a datos

obtenidos de reproducibilidad de los ensayos de qPCR son similares a los reportados por Bezerra en el año 2011 (120).

El LoD de la qPCR fue de 1×10^{-2} parásitos/mL para los marcadores ADNk y 18S, y de 1×10^{-1} parásitos/mL para HSP70 e ITS; resultados congruentes con los hallados por Bezerra y Mary en el 2011 y 2013 al utilizar el ADNk como blanco genético. En estos estudios se reportó un LoD de 0.0125 parásitos/mL, pero diferente al encontrado por Nicolas y col. en el 2011 donde solo reportan un límite de 0,1 parásitos (130). Para el marcador molecular HSP70, el LoD fue más bajo en comparación al ADNk y 18S, pero más alto que el reportado por Hernández y col en el 2014, donde reporta que para este marcador molecular, el LoD es de 10 parásitos/mL (103).

La literatura reporta que cada parásito contiene gran número de copias del gen 18S ribosomal (~160), por lo tanto, varios estudios eligen este marcador como blanco ideal para estudios moleculares. En el año 2011, Bezerra y col, estableció un LoD de 40 parásitos/mL al utilizar este blanco genético a diferencia de lo encontrado por Schulz y col en el 2003 donde reporta un LoD de 10^0 parásitos/mL (131), nuestros resultados difieren de estos dos estudios al determinar un límite de detección más alto para este gen (1×10^{-2} parásitos/mL). En otros estudios se reporta un LoD de 10 a 100 fentogramos (fg) de ADN de *Leishmania* con este gen (117, 129) pero no podemos comparar nuestros hallazgos debido al factor de dilución que utilizamos (diluciones seriadas en base 10).

Para el parámetro de precisión, no observamos variación entre las réplicas de los ensayos, independiente del día de ejecución de la técnica (coeficiente de correlación promedio de 0,98), pero al manejar diluciones más bajas el coeficiente de variación aumenta en los días de repetición de la técnica. Esto se ha demostrado en estudios donde se evalúan el desempeño de la qPCR en *T. cruzi* y en *Leishmania* (36, 99). El mayor coeficiente de variación se obtuvo con el marcador HSP70.

En cuanto a la exclusividad de la técnica, varios estudios incluyen en sus ensayos moleculares ADN de microorganismos de reacción cruzada (109, 110, 117) este es el primer estudio donde incluimos 8 microorganismos de diagnóstico diferencial para ser evaluados con los cuatro marcadores moleculares, corroborando lo obtenido en la PCR convencional al emplear el ADNk, en qPCR también detectamos la amplificación de ADN

de *T. cruzi* y *M. tuberculosis* concluyendo que no es recomendable utilizar este marcador en el diagnóstico molecular de leishmaniasis cutánea.

7.3 LAMP

Se ha reportado que LAMP tiene ventajas sobre la PCR desde el punto de vista de diagnóstico en campo, pues la reacción ocurre a condiciones isotérmicas prescindiendo de la utilización de termocicladores (26), algunos estudios demuestran el uso directo de extractos crudos de ADN sin purificación (26, 32) y ofrece varias alternativas para la visualización de los resultados ya sea por turbidez, fluorescencia y color (26, 30, 132-135).

La medición de la fluorescencia requiere en muchas ocasiones colorantes de alto costo como por ejemplo SYBR Green I (136), calceína (135), yoduro de propidio (137) entre otros, por otra parte la técnica es poco práctica debido a la necesidad de iluminación con luz UV. Se ha reportado que estos reactivos pueden producir efectos de inhibición en la amplificación (132), por tal motivo estos colorantes deben ser introducidos después culminar la reacción, aumentando así los posibles riesgos de contaminación. En contraste, el verde de malaquita utilizado en este trabajo para estandarizar la LAMP sólo requiere la distinción entre el azul en muestras positivas y la ausencia de color en muestras negativas (68, 134, 138).

Para la LAMP se diseñaron cebadores dirigidos al gen ADNk, HSP70 e ITS-1 al no encontrar un reporte de estos en la literatura al momento de la revisión bibliográfica, en la literatura solo se reporta el uso del 18S ribosomal como marcador ideal para LAMP. Abassi en el 2016, diseñó unos primers dirigidos al ITS obteniendo un ensayo capaz de detectar > de 100 fg de ADN de *Leishmania*, pero no establece criterios de exclusividad ni inclusividad de la técnica (132), por tal motivo se determinó que realizaría el diseño de cebadores para este gen. Una vez realizado los ensayos moleculares no se logró obtener resultados positivos para ITS-1 y ADNk como se describió en los resultados, por tal motivo se realizó la evaluación del desempeño analítico con los marcadores 18S y HSP70.

Para LAMP, el RRA para el marcador 18S fue más amplio que el hallado para el gen HSP70, rangos similares a los encontrados en este estudio con los mismos genes en la PCR en tiempo real pero más alto que el de la PCR convencional. El límite de detección al utilizar el gen 18S se estableció en 1×10^{-2} parasites/ml, estos mismos resultados se reportan en el estudio de Nzelu (68, 139), para HSP70 el límite de detección fue de 1×10^{-1} parasites/mL, límite más alto que el encontrado por PCR convencional.

En el parámetro de exclusividad de la técnica se observó que el marcador 18S es exclusivo para la amplificación de ADN de *Leishmania* al no observar amplificación en ningún ADN de los microorganismos de diagnóstico diferencial. Nzelu en el 2014 solo incluye en este parámetro ADN de *Trypanosoma sp* obteniendo los mismos resultados. (68), Por el contrario, se evidenció la amplificación por LAMP para *T. cruzi* y *S. schenckii* con el uso del marcador HSP70. No hubo variación en las réplicas con ninguno de los marcadores. En todas las reacciones se utilizó el verde de malaquita como medio de revelado, ofreciendo una gran ventaja en cuanto a la adquisición del reactivo así como su implementación en campo (138).

Finalmente, una vez analizados los resultados del desempeño analítico de las tres plataformas moleculares con los cuatro marcadores, se realizó la determinación del porcentaje de positividad entre ADN extraído de frotis directos con la PCR convencional, PCR en tiempo real y LAMP utilizando como único marcador el gen 18S ribosomal, la concordancia se evaluó mediante índice Kappa. En general las técnicas moleculares fueron más sensibles que el examen directo, lo cual ya ha sido evaluado en otros ensayos (18, 140, 141), la concordancia fue muy buena entre PCR convencional y la microscopía tradicional (I. kappa: 0,86) y buena para qPCR y LAMP (I. kappa: 0,66 y 0,61 respectivamente), pero el porcentaje de positividad fue mayor para LAMP al comparar los resultados obtenidos por microscopía convencional, pues se logró detectar una muestra positiva que había sido hasta el momento negativa por examen directo, PCR convencional y qPCR.

En general la comparación analizada en este trabajo muestra las limitaciones por parte de la sensibilidad de detección en la PCR convencional y qPCR para el marcador HSP70 y la exclusividad del marcador ADNk para la detección correcta de especies de

Leishmania, pero reporta el buen desempeño analítico que cumple el marcador 18S para el diagnóstico molecular.

Como se mencionó inicialmente, estudios sobre la completa evaluación del desempeño analítico de los métodos moleculares para el diagnóstico de leishmaniasis cutánea son escasos y se ven afectados por la dificultad de no contar con un consenso de pruebas diagnósticas establecidas. Por consiguiente estos resultados apoya la necesidad de aplicar técnicas de diagnóstico más sensibles; pues si bien la microscopia sigue siendo el patrón dorado para el diagnóstico de rutina, la alta incidencia de casos de leishmaniasis cutánea en distintas regiones de suramerica, ponen en evidencia la necesidad de replantear la implementación de estrategias específicas para el correcto y oportuno diagnóstico de esta enfermedad tropical desatendida así, con los resultados obtenidos de este trabajo dan la base para la subsecuente evaluación del desempeño diagnóstico con un panel de muestra variado y su comparación interlaboratorio de la PCR en tiempo real y LAMP con el marcador 18S.

8 Conclusiones.

Mediante la evaluación del desempeño analítico de las técnicas se logró establecer rango reportable anticipado, exclusividad e inclusividad límite de detección y precisión de las técnicas empleadas para diagnóstico molecular de leishmaniasis cutánea empleando 4 marcadores moleculares diferentes para determinar cuál de las técnicas moleculares y que marcador molecular cumplen con el mejor desempeño y rendimiento para el diagnóstico.

Se determinó que el marcador molecular ADNk a pesar de ser el más sensible (rango reportable y límite de detección más alto), no cumple con el criterio de exclusividad de la técnica.

El marcador HSP70 presenta un límite de detección bajo en PCR convencional y similar en qPCR y LAMP, pero posee una baja reproducibilidad al presentar un mayor coeficiente de variación entre replicas, además en la LAMP no cumplió con el criterio de exclusividad.

El marcador 18S ribosomal al ser comparado con el ITS-1 tuvo un mejor desempeño analítico al poseer mejor rango reportable y límite de detección, además se pudo observar que al utilizar este gen en los ensayos de LAMP se obtiene una buena sensibilidad y especificidad.

9 Recomendaciones.

En futuros estudios se recomienda diseñar los cebadores internos para LAMP (FIP y BIP) a partir de la secuencia obtenida con la amplificación de los cebadores externos (F3 y B3) para los marcadores ADNk e ITS-1.

Refinar el diseño de cebadores LAMP para el marcador HSP70 para que sea una técnica exclusiva de amplificación de ADN de *Leishmania*.

Aumentar en número de frotis directos para evaluar el porcentaje de positividad y someter a estas mismas técnicas otro tipo de muestras (biopsias, flebotomos etc).

Realizar posterior evaluación del desempeño diagnóstico con un panel variado de muestras y su comparación interlaboratorio de la PCR en tiempo real y LAMP con el marcador 18S.

10 Bibliografía

1. WHO. Parasitic disease information: fact sheet on Leishmania infection. 2008.
2. Alvar J, Velez 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.
3. WHO. Report of a meeting of the WHO experts committee on the control of leishmaniasis. 2010:22-6 March 2010.
4. Corredor A, Gallego JF, Tesh RB, Morales A, De Carrasquilla CF, Young DG, et al. Epidemiology of visceral leishmaniasis in Colombia. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 1989;40(5):480-6.
5. PHO. Leishmaniasis: epidemiological report of the Americas. Report No 1. 2013.
6. Alexander B, Agudelo LA, Navarro JF, Ruiz JF, Molina J, Aguilera G, et al. Relationship between coffee cultivation practices in Colombia and exposure to infection with *Leishmania*. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 2009;103(12):1263-8.
7. Saravia NG, Weigle K, Navas C, Segura I, Valderrama L, Valencia AZ, et al. Heterogeneity, geographic distribution, and pathogenicity of serodemes of *Leishmania viannia* in Colombia. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 2002;66(6):738-44.
8. Ovalle CE, Porrás L, Rey M, Ríos M, YC C. Distribución geográfica de especies de *Leishmania* aisladas de pacientes consultantes al Instituto Nacional de Dermatología Federico Lleras Acosta. 1995-2005. Biomédica. 2006;26(1):145-51.
9. Szargiki R, Castro EA, Luz E, Kowalthuk W, Machado AM, Thomaz-Soccol V. Comparison of serological and parasitological methods for cutaneous leishmaniasis diagnosis in the state of Paraná, Brazil. The Brazilian Journal of Infectious Diseases: an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases. 2009;13(1):47-52.
10. Salud Md, y, Social. P. Guías de promoción de la salud y prevención de enfermedades en la salud pública de atención de la leishmaniasis. 2005:185.
11. Ramirez JR, Agudelo S, Muskus C, Alzate JF, Berberich C, Barker D, et al. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis in Colombia: the sampling site within lesions influences the sensitivity of parasitologic diagnosis. Journal of Clinical Microbiology. 2000;38(10):3768-73.
12. Ríos Yuil JM, Yuil de Ríos E. Parasitologic, immunologic, histopathologic and molecular diagnosis of cutaneous leishmaniasis. Revista Médico Científica. 2011(2):45-6.
13. Olga Z, Rafael B, Nahir L, Wilmer Galindo, Doris Belisario, Noris Rodríguez, et al. Comparación de cinco métodos para el diagnóstico de leishmaniasis cutánea. Dermatología Venezolana. 2002;30:40.
14. Navin TR, Arana FE, de Merida AM, Arana BA, Castillo AL, Silvers DN. Cutaneous leishmaniasis in Guatemala: comparison of diagnostic methods. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 1990;42(1):36-42.

15. Marfurt J, Nasereddin A, Niederwieser I, Jaffe CL, Beck HP, Felger I. Identification and differentiation of *Leishmania* species in clinical samples by PCR amplification of the miniexon sequence and subsequent restriction fragment length polymorphism analysis. *Journal of Clinical Microbiology*. 2003;41(7):3147-53.
16. Wortmann G, Sweeney C, Houg HS, Aronson N, Stiteler J, Jackson J, et al. Rapid diagnosis of leishmaniasis by fluorogenic polymerase chain reaction. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2001;65(5):583-7.
17. Xavier SC, de Andrade HM, Monte SJ, Chiarelli IM, Lima WG, Michalick MS, et al. Comparison of paraffin-embedded skin biopsies from different anatomical regions as sampling methods for detection of *Leishmania* infection in dogs using histological, immunohistochemical and PCR methods. *BMC Veterinary Research*. 2006;2:17.
18. Bensoussan E, Nasereddin A, Jonas F, Schnur LF, Jaffe CL. Comparison of PCR assays for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Journal of Clinical Microbiology*. 2006;44(4):1435-9.
19. Berzunza-Cruz M, Cabrera N, Crippa-Rossi M, Sosa Cabrera T, Perez-Montfort R, Becker I. Polymorphism analysis of the internal transcribed spacer and small subunit of ribosomal RNA genes of *Leishmania mexicana*. *Parasitology Research*. 2002;88(10):918-25.
20. Chena L, Nara E, Canese A, Oddone R, Moran M, G. R. Caracterización de cepas de *Leishmania*, por medio de la técnica de PCR-RFLP de la región del Spliced Leader Miniexon (SLME), aisladas de humanos y caninos en Paraguay. *Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud*. 2012;10(1):14-23.
21. Garcia AL, Parrado R, De Doncker S, Bermudez H, Dujardin JC. American tegumentary leishmaniasis: direct species identification of *Leishmania* in non-invasive clinical samples. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2007;101(4):368-71.
22. Adams ER, Gomez MA, Scheske L, Rios R, Marquez R, Cossio A, et al. Sensitive diagnosis of cutaneous leishmaniasis by lesion swab sampling coupled to qPCR. *Parasitology*. 2014;141(14):1891-7.
23. Chargui N, Bastien P, Kallel K, Haouas N, Akrouf FM, Masmoudi A, et al. Usefulness of PCR in the diagnosis of cutaneous leishmaniasis in Tunisia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2005;99(10):762-8.
24. Mouttaki T, Morales-Yuste M, Merino-Espinosa G, Chiheb S, Fellah H, Martin-Sanchez J, et al. Molecular diagnosis of cutaneous leishmaniasis and identification of the causative *Leishmania* species in Morocco by using three PCR-based assays. *Parasites & Vectors*. 2014;7:420.
25. Ovalle Bracho C, Porrás de Quintana L, Muvdi Arenas S, Rios Parra M. Polymerase chain reaction with two molecular targets in mucosal leishmaniasis' diagnosis: a validation study. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2007;102(5):549-54.
26. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*. 2000;28(12):E63.

27. Kuboki N, Inoue N, Sakurai T, Di Cello F, Grab DJ, Suzuki H, et al. Loop-mediated isothermal amplification for detection of African trypanosomes. *Journal of Clinical Microbiology*. 2003;41(12):5517-24.
28. Kurosaki Y, Takada A, Ebihara H, Grolla A, Kamo N, Feldmann H, et al. Rapid and simple detection of Ebola virus by reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification. *Journal of Virological Methods*. 2007;141(1):78-83.
29. Saito R, Misawa Y, Moriya K, Koike K, Ubukata K, Okamura N. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of *Mycoplasma pneumoniae*. *Journal of Medical Microbiology*. 2005;54(Pt 11):1037-41.
30. Adams ER, Schoone GJ, Ageed AF, Safi SE, Schallig HD. Development of a reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the sensitive detection of *Leishmania* parasites in clinical samples. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2010;82(4):591-6.
31. Khan MG, Bhaskar KR, Salam MA, Akther T, Pluschke G, Mondal D. Diagnostic accuracy of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for detection of *Leishmania* DNA in buffy coat from visceral leishmaniasis patients. *Parasites & vectors*. 2012;5:280.
32. Mikita K, Maeda T, Yoshikawa S, Ono T, Miyahira Y, Kawana A. The Direct Boil-LAMP method: a simple and rapid diagnostic method for cutaneous leishmaniasis. *Parasitology International*. 2014;63(6):785-9.
33. Burd EM. Validation of laboratory-developed molecular assays for infectious diseases. *Clinical Microbiology Reviews*. 2010;23(3):550-76.
34. NCCLS. Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantification: Approved Guideline. 2004;24(34):2-18.
35. Sterkers Y, Varlet-Marie E, Cassaing S, Brenier-Pinchart MP, Brun S, Dalle F, et al. Multicentric comparative analytical performance study for molecular detection of low amounts of *Toxoplasma gondii* from simulated specimens. *Journal of Clinical Microbiology*. 2010;48(9):3216-22.
36. Duffy T, Cura CI, Ramirez JC, Abate T, Cayo NM, Parrado R, et al. Analytical performance of a multiplex Real-Time PCR assay using TaqMan probes for quantification of *Trypanosoma cruzi* satellite DNA in blood samples. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2013;7(1):e2000.
37. Bates PA. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *International Journal for Parasitology*. 2007;37(10):1097-106.
38. Weyers W. William Boog Leishman-A Brief Reminder of His Life and Work on the Occasion of His 150th Birthday. *The American Journal of Dermatopathology*. 2016;38(6):436-43.
39. Rioux JA, Lanotte G, Serres E, Pratlong F, Bastien P, Perieres J. Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparee*. 1990;65(3):111-25.
40. Akhoundi M, Kuhls K, Cannet A, Votycka J, Marty P, Delaunay P, et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2016;10(3):e0004349.
41. Van der Auwera G, Dujardin JC. Species typing in dermal leishmaniasis. *Clinical Microbiology Reviews*. 2015;28(2):265-94.

42. Laskay T, van Zandbergen G, Solbach W. Neutrophil granulocytes--Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? Trends in Microbiology. 2003;11(5):210-4.
43. de Almeida MC, Vilhena V, Barral A, Barral-Netto M. Leishmanial infection: analysis of its first steps. A review. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 2003;98(7):861-70.
44. Awasthi A, Mathur RK, Saha B. Immune response to Leishmania infection. The Indian Journal of Medical Research. 2004;119(6):238-58.
45. Akopyants NS, Kimblin N, Secundino N, Patrick R, Peters N, Lawyer P, et al. Demonstration of genetic exchange during cyclical development of *Leishmania* in the sand fly vector. Science. 2009;324(5924):265-8.
46. Barral A, Costa JM, Bittencourt AL, Barral-Netto M, Carvalho EM. Polar and subpolar diffuse cutaneous leishmaniasis in Brazil: clinical and immunopathologic aspects. International Journal of Dermatology. 1995;34(7):474-9.
47. Barral A, Guerreiro J, Bomfim G, Correia D, Barral-Netto M, Carvalho EM. Lymphadenopathy as the first sign of human cutaneous infection by *Leishmania braziliensis*. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 1995;53(3):256-9.
48. Goto H, Lauletta Lindoso JA. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. Infectious Disease Clinics of North America. 2012;26(2):293-307.
49. Goto H, Lindoso JA. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. Expert review of anti-infective therapy. 2010;8(4):419-33.
50. Berman J. Visceral leishmaniasis in the New World & Africa. The Indian Journal of Medical Research. 2006;123(3):289-94.
51. Oddone R, Schweynoch C, Schonian G, de Sousa Cdos S, Cupolillo E, Espinosa D, et al. Development of a multilocus microsatellite typing approach for discriminating strains of *Leishmania (Viannia)* species. Journal of Clinical Microbiology. 2009;47(9):2818-25.
52. Saravia NG, Segura I, Holguin AF, Santrich C, Valderrama L, Ocampo C. Epidemiologic, genetic, and clinical associations among phenotypically distinct populations of *Leishmania (Viannia)* in Colombia. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 1998;59(1):86-94.
53. Ramirez JD, Hernandez C, Leon CM, Ayala MS, Florez C, Gonzalez C. Taxonomy, diversity, temporal and geographical distribution of Cutaneous Leishmaniasis in Colombia: A retrospective study. Scientific Reports. 2016;6:28266.
54. Salud. INd. Boletín Epidemiológico Semanal, semana 52. . SIVIGILA. 2016.
55. Fernández G, Maidana H, Perez Valega E, Maccio O, Gorordner J. Examen parasitológico directo en el estudio de la Leishmaniasis tegumentaria en animales y humanos. Descripción y análisis. Universidad Nacional del Noreste. 2004;012.
56. Rodríguez Gersain, Arenas Claudia, Ovalle C, Hernandez C, C. C. Las leishmaniasis atlas y texto. Hospital Universitario Centro dermatológico Federico Lleras Aosta. Panamericana formas e impresos. 2016.
57. Cuba C. Diagnóstico Parasitológico de la Leishmaniasis Tegumentaria Americana. Revista Médica Experimental. 2000;17:1-4.

58. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986. *Biotechnology*. 1992;24:17-27.
59. Tamay de Dios L, Ibarra C, Velasquillo C. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en Discapacidad*. 2013;2(2):70-8.
60. Giglio S, Monis PT, Saint CP. Demonstration of preferential binding of SYBR Green I to specific DNA fragments in real-time multiplex PCR. *Nucleic Acids Research*. 2003;31(22):e136.
61. Costa J. eacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real- Real-time PCRss. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2004;22(5):299-305.
62. Adams ER, Schoone GJ, Ageed AF, Safi SE, H SHDF. Use of Loop-Mediated Isothermal Amplification for Detection of *Ophiostoma clavatum*, the Primary Blue Stain Fungus Associated with *Ips acuminatus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2013;79(8): 2527–33.
63. Villari C, Tomlinson JA, Battisti A, Boonham N, Capretti P, Faccoli M. Use of loop-mediated isothermal amplification for detection of *Ophiostoma clavatum*, the primary blue stain fungus associated with *Ips acuminatus*. *Appl Environ Microbiol*. 2013;79(8):2527-33.
64. Wozniakowski G, Samorek-Salamonowicz E, Kozdrun W. Comparison of loop-mediated isothermal amplification and PCR for the detection and differentiation of Marek's disease virus serotypes 1, 2, and 3. *Avian Diseases*. 2013;57(2 Suppl):539-43.
65. Zhang W, Chen C, Cui J, Bai W, Zhou J. Application of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the rapid diagnosis of pathogenic bacteria in clinical sputum specimens of acute exacerbation of COPD (AECOPD). *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*. 2015;8(5):7881-9.
66. Parida MM. Rapid and real-time detection technologies for emerging viruses of biomedical importance. *Journal of Biosciences*. 2008;33(4):617-28.
67. Mori Y, Nagamine K, Tomita N, T. N. Detection of Loop-Mediated Isothermal Amplification Reaction by Turbidity Derived from Magnesium Pyrophosphate Formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2001;289:150-4.
68. Nzelu CO, Gomez EA, Caceres AG, Sakurai T, Martini-Robles L, Uezato H, et al. Development of a loop-mediated isothermal amplification method for rapid mass-screening of sand flies for *Leishmania* infection. *Acta Tropica*. 2014;132:1-6.
69. Arroyo M, Morales G, Sosa P, Carmona F, Maestre A. Amplificación isotérmica de ácidos nucleicos tipo LAMP para la detección de *Plasmodium*: nueva técnica diagnóstica. *MÉD UIS*. 2008;21:158-75.
70. Aphasizhev R, Aphasizheva I. Mitochondrial RNA processing in trypanosomes. *Research in Microbiology*. 2011;162(7):655-63.
71. Baldwin BG, Sanderson MJ, Porter JM, Wojciechowski MF, Campbell CS, Donoghue MJ. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: A valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Ann Missouri Bot Gard*. 1995;82:247-77.
72. el Tai NO, Osman OF, el Fari M, Presber W, Schonian G. Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms and

sequencing. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 2000;94(5):575-9.

73. Zilberstein D, Shapira M. The role of pH and temperature in the development of *Leishmania* parasites. Annual Review of Microbiology. 1994;48:449-70.

74. Folgueira C, Canavate C, Chicharro C, Requena JM. Genomic organization and expression of the HSP70 locus in New and Old World *Leishmania* species. Parasitology. 2007;134(Pt 3):369-77.

75. Montalvo A, Fraga J, JA R, L M, I M, JC D. PCR-RFLP/HsP70 para identificar y tipificar *Leishmania* de la región neotropical. Rev Cub Med Trop. 2006;58:226-34.

76. Garcia L, Kindt A, Bermudez H, Llanos-Cuentas A, De Doncker S, Arevalo J, et al. Culture-independent species typing of neotropical *Leishmania* for clinical validation of a PCR-based assay targeting heat shock protein 70 genes. Journal of Clinical Microbiology. 2004;42(5):2294-7.

77. Meyer A, Todt C, Mikkelsen NT, Lieb B. Fast evolving 18S rRNA sequences from Solenogastres (Mollusca) resist standard PCR amplification and give new insights into mollusk substitution rate heterogeneity. BMC Evolutionary Biology. 2010;10:70.

78. Hillis DM, Dixon MT. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. The Quarterly Review of Biology. 1991;66(4):411-53.

79. Moore PB, Steitz TA. The involvement of RNA in ribosome function. Nature. 2002;418(6894):229-35.

80. Deborggraeve S, Laurent T, Espinosa D, Van der Auwera G, Mbuchi M, Wasunna M, et al. A simplified and standardized polymerase chain reaction format for the diagnosis of leishmaniasis. The Journal of Infectious Diseases. 2008;198(10):1565-72.

81. Souto RP, Fernandes O, Macedo AM, Campbell DA, Zingales B. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. Molecular and Biochemical Parasitology. 1996;83(2):141-52.

82. Fernandes O, Murthy VK, Kurath U, Degraeve WM, Campbell DA. Mini-exon gene variation in human pathogenic *Leishmania* species. Molecular and Biochemical Parasitology. 1994;66(2):261-71.

83. Katakura K, Kawazu SI, Sanjyoba C, Naya T, Matsumoto Y, Ito M, et al. *Leishmania* mini-exon genes for molecular epidemiology of leishmaniasis in China and Ecuador. The Tokai Journal of Experimental and Clinical Medicine. 1998;23(6):393-9.

84. Crowter JR, Unguer H, GJ V. Aspects of kit validation for test used for the diagnosis and surveillance of livestock disease: producer and end-user responsibilities. Rev sci tech Off int Epiz. 2006;25:913-35

85. Jacobson RH, P W. Manual de pruebas de diagnóstico para los animales acuáticos. Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). 2013:1-20.

86. Harper DGC. Some comments on the repeatability of measurements. . Ringing & Migration. 1994;15:84-90.

87. Westgard J. Method validation: the decision on method performance. Basic Method Validation. 2008:188-96.

-
88. Danzer K. Selectivity and specificity in analytical chemistry. General considerations and attempt of a definition and quantification. *Fresenius'Journal of Analytical Chemistry*. 2001;369(5):397-402.
89. da Silva LA, de Sousa Cdos S, da Graca GC, Porrozzi R, Cupolillo E. Sequence analysis and PCR-RFLP profiling of the hsp70 gene as a valuable tool for identifying *Leishmania* species associated with human leishmaniasis in Brazil. *Infection, genetics and evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*. 2010;10(1):77-83.
90. Shahbazi F, Shahabi S, Kazemi B, Mohebbali M, Abadi AR, Zare Z. Evaluation of PCR assay in diagnosis and identification of cutaneous leishmaniasis: a comparison with the parasitological methods. *Parasitology Research*. 2008;103(5):1159-62.
91. Marques MJ, Volpini AC, Genaro O, Mayrink W, Romanha AJ. Simple form of clinical sample preservation and *Leishmania* DNA extraction from human lesions for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis via polymerase chain reaction. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2001;65(6):902-6.
92. Rodriguez N, De Lima H, Aguilar CM, Rodriguez A, Barker DC, Convit J. Molecular epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Venezuela. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2002;96 Suppl 1:S105-9.
93. Kumar R, Bumb RA, Ansari NA, Mehta RD, Salotra P. Cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania tropica* in Bikaner, India: parasite identification and characterization using molecular and immunologic tools. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2007;76(5):896-901.
94. Al-Hucheimi SN, Sultan BA, Al-Dhalimi MA. A comparative study of the diagnosis of Old World cutaneous leishmaniasis in Iraq by polymerase chain reaction and microbiologic and histopathologic methods. *International Journal of Dermatology*. 2009;48(4):404-8.
95. Lemrani M, Hamdi S, Laamrani A, Hassar M. PCR detection of *Leishmania* in skin biopsies. *Journal of Infection in Developing Countries*. 2009;3(2):115-22.
96. Espinosa D, Boggild AK, Deborggraeve S, Laurent T, Valencia C, Pacheco R, et al. *Leishmania* OligoC-Test as a simple, rapid, and standardized tool for molecular diagnosis of cutaneous leishmaniasis in Peru. *Journal of Clinical Microbiology*. 2009;47(8):2560-3.
97. Boggild AK, Valencia BM, Espinosa D, Veland N, Ramos AP, Arevalo J, et al. Detection and species identification of *Leishmania* DNA from filter paper lesion impressions for patients with American cutaneous leishmaniasis. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2010;50(1):e1-6.
98. Chena L, Nara E, Canese A, Oddone R, Morán M, G R. Characterization of *Leishmania* strains using PCR-RFLP of Spliced Leader Miniexon(SLME) in human and canine isolates in Paraguay. *Mem Inst Investig Cienc Salud*. 2012;10(1):14-23.
99. Jara M, Adui V, Valencia BM, Martinez D, Alba M, Castrillon C, et al. Real-time PCR assay for detection and quantification of *Leishmania* (*Viannia*) organisms in skin and mucosal lesions: exploratory study of parasite load and clinical parameters. *Journal of Clinical Microbiology*. 2013;51(6):1826-33.

100. Takagi H, Itoh M, Islam MZ, Razzaque A, Ekram AR, Hashighuchi Y, et al. Sensitive, specific, and rapid detection of *Leishmania donovani* DNA by loop-mediated isothermal amplification. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2009;81(4):578-82.
101. Verma S, Avishek K, Sharma V, Negi NS, Ramesh V, Salotra P. Application of loop-mediated isothermal amplification assay for the sensitive and rapid diagnosis of visceral leishmaniasis and post-kala-azar dermal leishmaniasis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2013;75(4):390-5.
102. Ministerio de Protección Social. Guía de atención de la leishmaniasis. 2007:59-117.
103. Hernandez C, Alvarez C, Gonzalez C, Ayala MS, Leon CM, Ramirez JD. Identification of six New World *Leishmania* species through the implementation of a High-Resolution Melting (HRM) genotyping assay. *Parasites & Vectors*. 2014;7:501.
104. Medeiros AR, Silva WA, Jr., Roselino AM. DNA sequencing confirms the involvement of *Leishmania (L.) amazonensis* in American tegumentary leishmaniasis in the state of Sao Paulo, Brazil. *Clinics (Sao Paulo)*. 2008;63(4):451-6.
105. Cruz I, Canavate C, Rubio JM, Morales MA, Chicharro C, Laguna F, et al. A nested polymerase chain reaction (Ln-PCR) for diagnosing and monitoring *Leishmania infantum* infection in patients co-infected with human immunodeficiency virus. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2002;96 Suppl 1:S185-9.
106. Mohammadiha A, Mohebbali M, Haghghi A, Mahdian R, Abadi AR, Zarei Z, et al. Comparison of real-time PCR and conventional PCR with two DNA targets for detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* infection in human and dog blood samples. *Experimental Parasitology*. 2013;133(1):89-94.
107. Pérez DB, Sosa Tordoya LF, Choquehuanca Quispe JL. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis by Polymerase Chain Reaction, using genetic material derived from smears of lesions stained with Giemsa. *BIOFARBO*. 2011;19((2)):28-38.
108. Akhoundi M, Downing T, Votycka J, Kuhls K, Lukes J, Cannet A, et al. *Leishmania* infections: Molecular targets and diagnosis. *Molecular Aspects of Medicine*. 2017.
109. Salotra P, Sreenivas G, Pogue GP, Lee N, Nakhasi HL, Ramesh V, et al. Development of a species-specific PCR assay for detection of *Leishmania donovani* in clinical samples from patients with kala-azar and post-kala-azar dermal leishmaniasis. *Journal of Clinical Microbiology*. 2001;39(3):849-54.
110. Hitakarun A, Tan-ariya P, Siripattanapipong S, Mungthin M, Piyaraj P, Naaglor T, et al. Comparison of PCR methods for detection of *Leishmania siamensis* infection. *Parasites & Vectors*. 2014;7:458.
111. Santamaria E, Ponce N, Puerta C, Ferro C. Validation of PCR as a tool for the detection of *Leishmania (Vianna) spp.* parasites in the *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae) vector. *Biomédica*. 2005;25((2)):271-9.
112. Cruz I, Millet A, Carrillo E, Chenik M, Salotra P, Verma S, et al. An approach for interlaboratory comparison of conventional and real-time PCR assays for diagnosis of human leishmaniasis. *Experimental Parasitology*. 2013;134(3):281-9.

-
113. Santamaria E, Ponce N, Puerta C, Ferro C. [Validation of PCR as a tool for the detection of *Leishmania (Vianna)* spp. parasites in the *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae) vector]. *Biomédica*. 2005;25(2):271-9.
 114. de Bruijn MH, Barker DC. Diagnosis of New World leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. *Acta Tropica*. 1992;52(1):45-58.
 115. Oliveira DM, Lonardoni MV, Teodoro U, Silveira TG. Comparison of different primers for PCR-based diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases*. 2011;15(3):204-10.
 116. Gualda KP, Marcussi LM, Neitzke-Abreu HC, Aristides SM, Lonardoni MV, Cardoso RF, et al. New primers for detection of *Leishmania infantum* using polymerase chain reaction. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*. 2015;57(5):377-83.
 117. Deborggraeve S, Boelaert M, Rijal S, De Doncker S, Dujardin JC, Herdewijn P, et al. Diagnostic accuracy of a new *Leishmania* PCR for clinical visceral leishmaniasis in Nepal and its role in diagnosis of disease. *Tropical medicine & international health : TM & IH*. 2008;13(11):1378-83.
 118. Srivastava P, Mehrotra S, Tiwary P, Chakravarty J, Sundar S. Diagnosis of Indian visceral leishmaniasis by nucleic acid detection using PCR. *PloS one*. 2011;6(4):e19304.
 119. Ceccarelli M, Galluzzi L, Migliazzo A, Magnani M. Detection and characterization of *Leishmania (Leishmania)* and *Leishmania (Viannia)* by SYBR green-based real-time PCR and high resolution melt analysis targeting kinetoplast minicircle DNA. *PloS one*. 2014;9(2):e88845.
 120. Bezerra-Vasconcelos DR, Melo LM, Albuquerque ES, Luciano MC, Bevilacqua CM. Real-time PCR to assess the *Leishmania* load in *Lutzomyia longipalpis* sand flies: screening of target genes and assessment of quantitative methods. *Experimental Parasitology*. 2011;129(3):234-9.
 121. Eroglu F, Uzun S, Koltas IS. Comparison of clinical samples and methods in chronic cutaneous leishmaniasis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2014;91(5):895-900.
 122. Hernandez C, Cucunuba Z, Florez C, Olivera M, Valencia C, Zambrano P, et al. Molecular Diagnosis of Chagas Disease in Colombia: Parasitic Loads and Discrete Typing Units in Patients from Acute and Chronic Phases. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2016;10(9):e0004997.
 123. Mary C, Faraut F, Lascombe L, Dumon H. Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a real-time PCR assay with high sensitivity. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004;42(11):5249-55.
 124. Moreira OC, Ramirez JD, Velazquez E, Melo MF, Lima-Ferreira C, Guhl F, et al. Towards the establishment of a consensus real-time qPCR to monitor *Trypanosoma cruzi* parasitemia in patients with chronic Chagas disease cardiomyopathy: a substudy from the BENEFIT trial. *Acta Tropica*. 2013;125(1):23-31.
 125. Lascols C, Lamarque D, Costa JM, Copie-Bergman C, Le Glaunec JM, Deforges L, et al. Fast and accurate quantitative detection of *Helicobacter pylori* and identification of

- clarithromycin resistance mutations in *H. pylori* isolates from gastric biopsy specimens by real-time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 2003;41(10):4573-7.
126. Bai Z, Liu L, Tu Z, Yao L, Liu J, Xu B, et al. Real-time PCR for detecting circulating dengue virus in the Guangdong Province of China in 2006. *Journal of Medical Microbiology*. 2008;57(Pt 12):1547-52.
127. Faye O, Diallo D, Diallo M, Weidmann M, Sall AA. Quantitative real-time PCR detection of Zika virus and evaluation with field-caught mosquitoes. *Virology Journal*. 2013;10:311.
128. Francino O, Altet L, Sanchez-Robert E, Rodriguez A, Solano-Gallego L, Alberola J, et al. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*. 2006;137(3-4):214-21.
129. Prina E, Roux E, Mattei D, Milon G. *Leishmania* DNA is rapidly degraded following parasite death: an analysis by microscopy and real-time PCR. *Microbes and Infection*. 2007;9(11):1307-15.
130. Nicolas L, Milon G, Prina E. Rapid differentiation of Old World *Leishmania* species by LightCycler polymerase chain reaction and melting curve analysis. *Journal of Microbiological Methods*. 2002;51(3):295-9.
131. Schulz A, Mellenthin K, Schonian G, Fleischer B, Drosten C. Detection, differentiation, and quantitation of pathogenic *Leishmania* organisms by a fluorescence resonance energy transfer-based real-time PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology*. 2003;41(4):1529-35.
132. 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 Tropica*. 2016;162:20-6.
133. Ghasemian M, Gharavi MJ, Akhlaghi L, Mohebbali M, Meamar AR, Aryan E, et al. Development and Assessment of Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assay for the Diagnosis of Human Visceral Leishmaniasis in Iran. *Iranian Journal of Parasitology*. 2014;9(1):50-9.
134. Sriworarat C, Phumee A, Mungthin M, Leelayoova S, Siriyasatien P. Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for simple detection of *Leishmania* infection. *Parasites & Vectors*. 2015;8:591.
135. Tomita N, Mori Y, Kanda H, Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nature Protocols*. 2008;3(5):877-82.
136. Tsai SM, Chan KW, Hsu WL, Chang TJ, Wong ML, Wang CY. Development of a loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of orf virus. *Journal of Virological Methods*. 2009;157(2):200-4.
137. Hill J, Beriwal S, Chandra I, Paul VK, Kapil A, Singh T, et al. Loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of common strains of *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology*. 2008;46(8):2800-4.
138. Lucchi NW, Ljolje D, Silva-Flannery L, Udhayakumar V. Use of Malachite Green-Loop Mediated Isothermal Amplification for Detection of *Plasmodium spp.* *Parasites. PloS one*. 2016;11(3):e0151437.

139. Nzelu CO, Caceres AG, Guerrero-Quincho S, Tineo-Villafuerte E, Rodriguez-Delfin L, Mimori T, et al. A rapid molecular diagnosis of cutaneous leishmaniasis by colorimetric malachite green-loop-mediated isothermal amplification (LAMP) combined with an FTA card as a direct sampling tool. *Acta Tropica*. 2016;153:116-9.
140. Aviles H, Belli A, Armijos R, Monroy FP, Harris E. PCR detection and identification of *Leishmania* parasites in clinical specimens in Ecuador: a comparison with classical diagnostic methods. *The Journal of Parasitology*. 1999;85(2):181-7.
141. Medeiros AC, Rodrigues SS, Roselino AM. Comparison of the specificity of PCR and the histopathological detection of *Leishmania* for the diagnosis of American cutaneous leishmaniasis. *Brazilian journal of medical and biological research. Revista Brasileira de Pesquisas Medicas e Biologicas*. 2002;35(4):421-4.

Anexo 2: Ficha técnica de equipo FOR-A04.0000-010.

 INSTITUTO NACIONAL DE SALUD	PROCESO GESTIÓN DE MANTENIMIENTO	FICHA TECNICA DE EQUIPO		Versión 02	
		FOR-A04.0000-010		2012 - Sep - 18	
				Página 1 de 1	
IDENTIFICACION DEL EQUIPO					
EQUIPO:			SOFTWARE:		
NUMERO METROLÓGICO:			NUMERO INVENTARIO		
MARCA	MODELO:		SERIE:		
CENTRO DE COSTO:		UBICACIÓN ESPECIFICA:			
FECHA DE INGRESO:			FECHA FIN GARANTÍA:		
FAMILIA:			TIPO DE INGRESO:		
INFORMACION DEL PROVEEDOR					
FABRICANTE:			PAÍS:		
PROVEEDOR:			DIRECCION:		
TELEFONO:			CORREO:		
CONTACTO DIRECTO:					
ESPECIFICACIONES TÉCNICAS DEL EQUIPO					
MAGNITUD A CONTROLAR:					
CARACTERÍSTICAS METROLÓGICAS:					
ALARMAS:			ACCESORIOS:		
CONSUMIBLES:					
FREC. DE MANTENIMIENTO:		Cada	Meses	FRECUENCIA DE VERIFICACION	
FREC. DE CALIBRACIÓN:		Cada	Meses	INTERNA	EXTERNA
FREC. DE CALIFICACION:		Cada	Meses	Cada	Meses
SERVICIO	TIPO	PRESION	FLUJO/CAUDAL	OTROS SERVICIOS	CARACTERISTICAS MOTOR
INSTALACIÓN					
DIMENSIONES EXTERNAS LxHxA (c			PESO(Kg):		TIPO DE TOMA CORRIENTE(A-M
POTENCIA(W)		CORRIENTE(A)	VOLTAJE(V):		CONEXIÓN:
LOCALIZACIÓN DE INSTRUCCIONES DE USO					
MANUAL :					
INSTRUCTIVO:			FLUJOGRAMA:		
OBSERVACIONES ADICIONALES					

Anexo 3: Preparación de soluciones agarosa y TBE 5X

BUFFERS Y SOLUCIONES REQUERIDAS

Es necesario preparar los siguientes reactivos

Gel Agarosa:

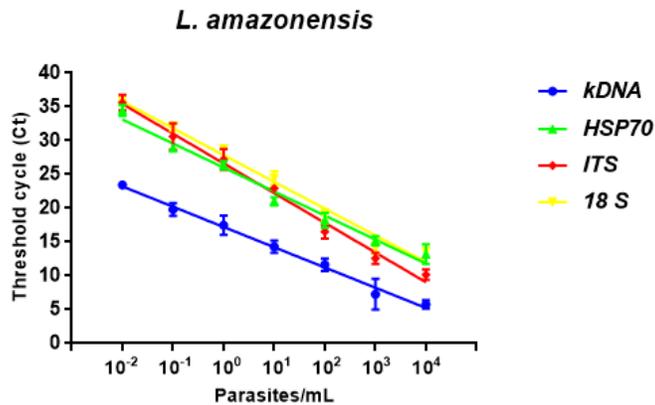
- ✓ Preparar la agarosa al 2%: pesar 2 gramos de agarosa por cada 100 mL de agua MiliQ en un frasco Schott estéril de 500 mL.
- ✓ Coloque la agarosa dentro del microondas hasta su completa disolución.
- ✓ Cuando la solución de agarosa haya alcanzado una temperatura soportable al contacto, agregue 0,5 µl de Syber Safe por cada 40 mL de agarosa, mezcle agitando el frasco en forma circular.

Buffer TBE 5X:

Para preparar un litro pesar:

- ✓ 54 grm de TRIS Base
- ✓ 27,5 gr de Ácido Bórico
- ✓ 3,75 gr de EDTA Sódico.
- ✓ Mezclar y aforar con agua hasta 1000 mL
- ✓ Ajustar el pH a 8,3

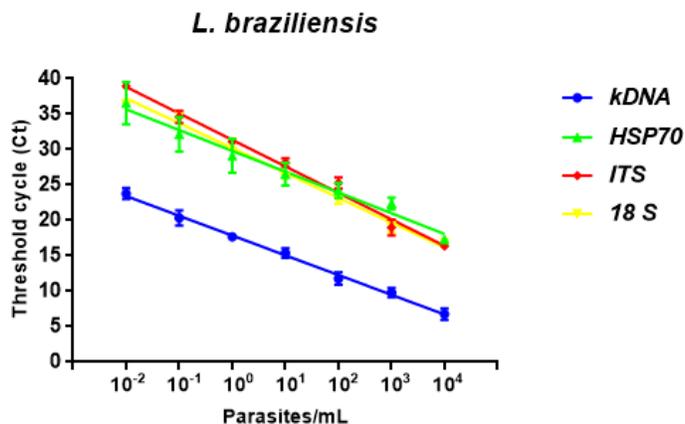
Anexo 4: Comparación entre cada especie de *Leishmania*



Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
<i>kDNA</i> vs. <i>HSP70</i>	-8,236	-20,3 to 3,828	No	ns	0,2615
<i>kDNA</i> vs. <i>ITS</i>	-8,005	-20,07 to 4,059	No	ns	0,2842
<i>kDNA</i> vs. <i>18 S</i>	-9,669	-21,73 to 2,396	No	ns	0,1490
<i>HSP70</i> vs. <i>ITS</i>	0,231	-11,83 to 12,3	No	ns	>0,9999
<i>HSP70</i> vs. <i>18 S</i>	-1,432	-13,5 to 10,63	No	ns	0,9876
<i>ITS</i> vs. <i>18 S</i>	-1,663	-13,73 to 10,4	No	ns	0,9808

ANOVA summary

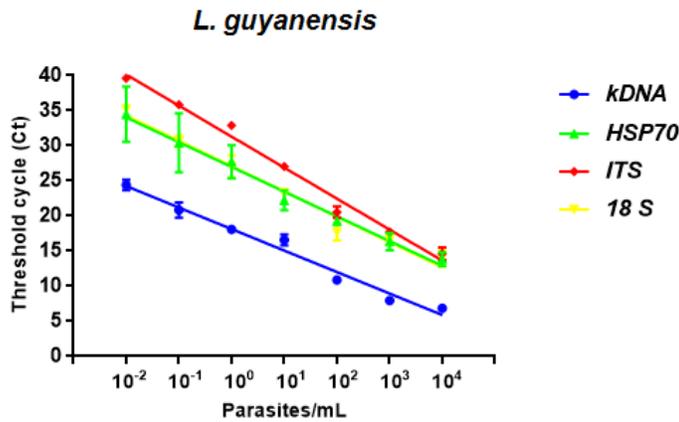
F	2,007
P value	0,1399
P value summary	ns
Significant diff. among means (P < 0.05)?	No
R square	0,2005



Sidak's multiple comparisons test	Mean Diff, 95,00% CI of diff, Significant?	Summary	Adjusted P Value
<i>kDNA</i> vs. <i>HSP70</i>	-11,81 -22,68 to -0,9418	Yes *	0,0280
<i>kDNA</i> vs. <i>ITS</i>	-12,55 -23,42 to -1,687	Yes *	0,0175
<i>kDNA</i> vs. <i>18 S</i>	-11,63 -22,5 to -0,7661	Yes *	0,0312
<i>HSP70</i> vs. <i>ITS</i>	-0,7448 -11,61 to 10,12	No ns	>0,9999
<i>HSP70</i> vs. <i>18 S</i>	0,1757 -10,69 to 11,04	No ns	>0,9999
<i>ITS</i> vs. <i>18 S</i>	0,9205 -9,946 to 11,79	No ns	>0,9999

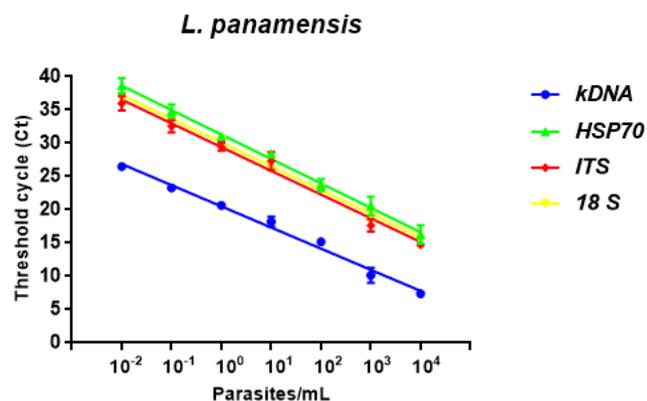
ANOVA summary

F	5,029
P value	0,0076
P value summary	**
Significant diff. among means (P < 0.05)?	Yes
R square	0,386



Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff, 95,00% CI of diff, Significant?	Summary	Adjusted P Value	
kDNA vs. HSP70	-8,39 -20,22 to 3,437 No	ns	0,2320	A-B
kDNA vs. ITS	-11,81 -23,64 to 0,01671 No	ns	0,0504	A-C
kDNA vs. 18 S	-8,419 -20,25 to 3,409 No	ns	0,2295	A-D
HSP70 vs. ITS	-3,42 -15,25 to 8,407 No	ns	0,8547	B-C
HSP70 vs. 18 S	-0,02857 -11,86 to 11,8 No	ns	>0,9999	B-D
ITS vs. 18 S	3,392 -8,436 to 15,22 No	ns	0,8578	C-D

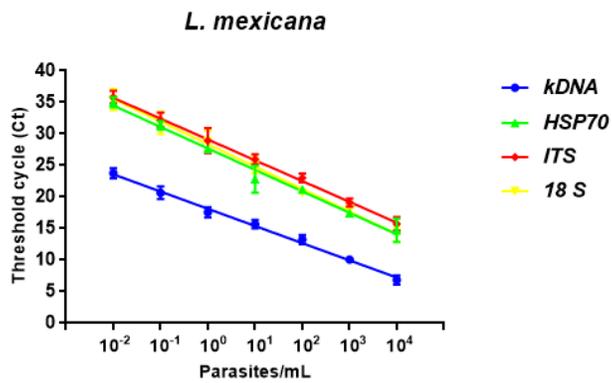
ANOVA summary	
F	2,756
P value	0,0644
P value summary	ns
Significant diff. among means (P < 0.05)?	No
R square	0,2562



Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
<i>kDNA</i> vs. <i>HSP70</i>	-10,3	-21,49 to 0,8977	No	ns	0,0792
<i>kDNA</i> vs. <i>ITS</i>	-8,514	-19,71 to 2,682	No	ns	0,1825
<i>kDNA</i> vs. <i>18 S</i>	-9,207	-20,4 to 1,99	No	ns	0,1339
<i>HSP70</i> vs. <i>ITS</i>	1,784	-9,412 to 12,98	No	ns	0,9710
<i>HSP70</i> vs. <i>18 S</i>	1,092	-10,1 to 12,29	No	ns	0,9930
<i>ITS</i> vs. <i>18 S</i>	-0,6924	-11,89 to 10,5	No	ns	0,9982

ANOVA summary

F	2,713
P value	0,0673
P value summary	ns
Significant diff. among means (P < 0.05)?	No
R square	0,2533



Dunnett's multiple
comparisons test

kDNA* vs. *HSP70

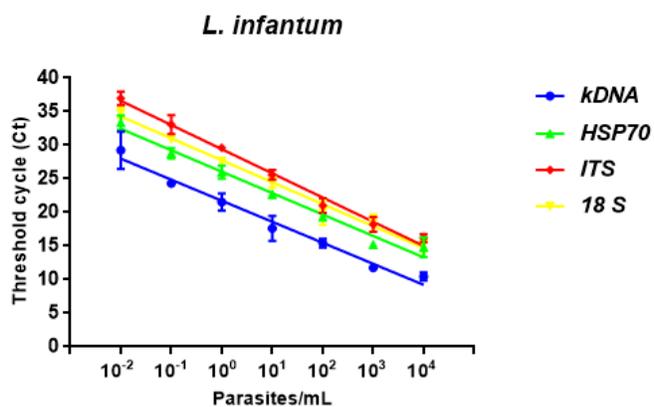
kDNA* vs. *ITS

kDNA* vs. *18 S

Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
-8,888	-18,36 to 0,5842	No	ns	0,0691
-10,41	-19,88 to -0,9401	Yes	*	0,0291
-9,41	-18,88 to 0,06137	No	ns	0,0518

ANOVA summary

F	3,264
P value	0,0389
P value summary	*
Significant diff. among means (P < 0.05)?	Yes
R square	0,2898



Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff, 95,00% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
<i>kDNA</i> vs. <i>HSP70</i>	-4,265 -14,85 to 6,316	No	ns	0,6858
<i>kDNA</i> vs. <i>ITS</i>	-7,202 -17,78 to 3,379	No	ns	0,2639
<i>kDNA</i> vs. <i>18 S</i>	-5,885 -16,47 to 4,696	No	ns	0,4336
<i>HSP70</i> vs. <i>ITS</i>	-2,937 -13,52 to 7,644	No	ns	0,8690
<i>HSP70</i> vs. <i>18 S</i>	-1,62 -12,2 to 8,961	No	ns	0,9741
<i>ITS</i> vs. <i>18 S</i>	1,317 -9,264 to 11,9	No	ns	0,9857

ANOVA summary

F	1,333
P value	0,2869
P value summary	ns
Significant diff. among means (P < 0.05)?	No
R square	0,1428

Anexo 5: Presentación poster Memoria XVI Congreso Colombiano de Parasitología y Medicina Tropical

67. Evaluación de parámetros de inclusividad y exclusividad para el diagnóstico molecular de leishmaniasis cutánea en Colombia

Cielo Maritza León^{1,2}, Diana Carolina Hernández^{1,2}, Myriam Consuelo López², Martha Stella Ayala⁴, Juan David Ramírez¹

¹ Grupo de Investigaciones Microbiológicas-UR (GIMUR), Universidad del Rosario, Bogotá, D.C., Colombia

² Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia

³ Red Chagas Colombia, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia

⁴ Grupo de Parasitología, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia

Introducción. Los métodos moleculares se utilizan ampliamente en el diagnóstico de la leishmaniasis, al detectar ADN en cantidades mínimas (fg). Para un óptimo diagnóstico molecular, es necesario hacer ensayos de inclusión con todas las especies de *Leishmania* de importancia en salud pública y someter a los mismos ensayos a aquellos microorganismos que se reporten para el diagnóstico diferencial.

Objetivo. Hacer pruebas de inclusión y exclusión para el diagnóstico molecular de leishmaniasis cutánea, utilizando cuatro blancos genéticos mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional y en tiempo real.

Métodos. Ensayo de inclusión: se utilizaron seis cepas de *Leishmania* (*L. braziliensis* MHOM/BR/75/M2903, *L. panamensis* MHOM/PA/71/LS94, *L. guyanensis* MHOM/BR/75/M4147, *L. amazonensis* IFLA/BR/67/PH8, *L. mexicana* MHOM/BZ/82/BEL21, *L. infantum* MHOM/TN/80/IPT1), las cuales se sometieron a PCR convencional y en tiempo real, utilizando como blancos genéticos el gen que codifica para la proteína de choque térmico HSP-70, el gen *ITS-1*, la región hipervariable del ADN del cinetoplasto (ADNk) y la subunidad pequeña

de ARN ribosómico 18S. Ensayo de exclusión: se sometieron a los mismos ensayos moleculares ADN de *Trypanosoma cruzi*, de *Trypanosoma rangeli*, de *Mycobacterium tuberculosis* y de *Sporothrix schenckii*.

Resultados. Después de analizar los perfiles de PCR de las cepas de *Leishmania* y de los organismos de diagnóstico diferencial de la leishmaniasis cutánea, se observó que los cuatro blancos genéticos amplifican todas las cepas de *Leishmania* en ambas plataformas moleculares, mientras que no se observa perfil de amplificación para los cuatro microorganismos de diagnóstico diferencial.

Conclusiones. La inclusión de todas las especies de *Leishmania* de importancia médica en el diagnóstico molecular utilizando blancos genéticos específicos para el organismo diana, proporciona una importante herramienta para obtener resultados con gran sensibilidad diagnóstica y es recomendable hacer el diagnóstico diferencial con enfermedades que suelen presentar sintomatología similar a la de la leishmaniasis cutánea. En el futuro, se incluirán en el diagnóstico diferencial *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Histoplasma capsulatum*, y *Fonsecaea pedrosoi*.

Anexo 6: Artículo publicado en Revista Frontiers in Microbiology

Analytical Performance of Four Polymerase Chain Reaction (PCR) and Real Time PCR (qPCR) Assays for the Detection of Six *Leishmania* Species DNA in Colombia.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01907>



ORIGINAL RESEARCH
published: 04 October 2017
doi: 10.3389/fmicb.2017.01907



Analytical Performance of Four Polymerase Chain Reaction (PCR) and Real Time PCR (qPCR) Assays for the Detection of Six *Leishmania* Species DNA in Colombia

Cielo M. León^{1,2}, Marina Muñoz¹, Carolina Hernández^{1,3}, Martha S. Ayala⁴, Carolina Flórez⁴, Aníbal Teherán^{5,6}, Juan R. Cubides^{3,7} and Juan D. Ramírez^{1*}

¹ Universidad del Rosario, Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas, Programa de Biología, Grupo de Investigaciones Microbiológicas-UR (GIMUR), Bogotá, Colombia, ² Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia, ³ Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas y Biológicas, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia, ⁴ Grupo de Parasitología, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, Colombia, ⁵ Residente de Medicina de Emergencias, Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia, ⁶ Grupo de Investigación COMPLEXUS, Fundación Universitaria Juan N. Corpas, Bogotá, Colombia, ⁷ Molecular Biology and Immunology Department, Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC), Bogotá, Colombia