

Universidad Católica de Santa María

Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas

Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica



Técnicas de diagnóstico para la Leishmaniasis: Una revisión sistemática y metaanálisis

Tesis presentada por la Bachiller:

Roque Pumahuanca, Brychs Milagros

ORCID: 0000-0002-3976-007X

Para optar el Título Profesional de Ingeniero Biotecnólogo

Asesor:

Mg. Candia Puma, Mayron Antonio

ORCID: 0000-0002-6328-3840

Arequipa – Perú

2024

UCSM-ERP

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

INGENIERIA BIOTECNOLOGICA

TITULACIÓN CON TESIS

DICTAMEN APROBACIÓN DE BORRADOR

Arequipa, 20 de Diciembre del 2023

Dictamen: 006339-C-EPIB-2023

Visto el borrador del expediente 006339, presentado por:

2015246922 - ROQUE PUMAHUANCA BRYCHS MILAGROS

Titulado:

**TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO PARA LA LEISHMANIASIS: UNA REVISIÓN SISTEMÁTICA Y
METAANÁLISIS**

Nuestro dictamen es:

APROBADO

**29520165 - TORRES VELA FERNANDO ANTERO
DICTAMINADOR**



**29630612 - TERAN DIANDERAS ADILMI MILAGRO
DICTAMINADOR**



**43668681 - PAREDES FUENTES JULITZA LINDSEY
DICTAMINADOR**



Técnicas de diagnóstico para la Leishmaniasis: Una revisión sistemática y metaanálisis

ORIGINALITY REPORT

20%

SIMILARITY INDEX

25%

INTERNET SOURCES

23%

PUBLICATIONS

13%

STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

1	www.arca.fiocruz.br Internet Source	3%
2	cris.maastrichtuniversity.nl Internet Source	2%
3	bora.uib.no Internet Source	2%
4	journals.plos.org Internet Source	2%
5	profiles.tdr-global.net Internet Source	1%
6	apps.searo.who.int Internet Source	1%
7	www.wjgnet.com Internet Source	1%
8	arca.icict.fiocruz.br Internet Source	1%
9	www.scielo.br Internet Source	1%

Dedicatoria

Dedico este trabajo a mis padres y hermanos, cuya influencia positiva en todo sentido además del apoyo constante ha dejado una marca indeleble en mi desarrollo académico y personal.

A todos ustedes, mi más profundo agradecimiento por formar parte de este importante capítulo en mi vida académica.



Agradecimiento

Quisiera expresar mi sincero agradecimiento a mi asesor y co-asesor de tesis al Mg. Mayron Antonio Candia Puma y al Dr. Miguel Angel Chavez Fumagalli que han contribuido de manera significativa a la realización de este trabajo de tesis, por su orientación, paciencia y sabios consejos a lo largo de este viaje académico. Su guía ha sido fundamental para dar forma a este proyecto.

Agradezco también a mis compañeros de proyecto, cuyas discusiones y comentarios enriquecedores han sido una fuente invaluable de inspiración y crecimiento académico.



RESUMEN

Las leishmaniasis son un conjunto de enfermedades zoonóticas que representan un problema global, solo en el 2021 más de medio millar de casos fueron registrados en sus diferentes características clínicas y generaron un gran número de consecuencias desde la muerte a deformaciones físicas, repercutiendo incluso en la economía familiar, el estado mental del paciente y su aceptación social, sobre todo porque las áreas endémicas son en mayoría zonas vulnerables, por ende el diagnóstico específico de esta enfermedad es trascendente en el tratamiento y cuidado de los pacientes por su similitud en síntomas con la Malaria, Lepra Esquistosomiasis o Tuberculosis. Por ello el objetivo de este trabajo fue realizar una revisión sistemática y metaanálisis en la precisión diagnósticas de técnicas serológicas y moleculares de Leishmaniasis humana desde 1990 hasta finales del 2021, así se determinó la cadena de búsqueda en Pubmed y tras obtenerse 175 artículos de investigación según los criterios de inclusión y exclusión, se combinaron y examinaron en este metaanálisis donde la precisión diagnóstica se comparó mediante estadísticas de características operativas del receptor (ROC) de ello se obtuvieron 9 técnicas de diagnóstico que fueron la Intradermorreacción de Montenegro (IDR), Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA), Test de inmunofluorescencia de anticuerpos (IFAT), Técnicas de diagnóstico rápido (RDT), Test de aglutinación directa (DAT), Western blot (WB), Reacción en cadena de la polimerasa (PCR), PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) y Amplificación isotérmica mediada por lazo (LAMP), que proporcionaron valores de Sensibilidad y Especificidad con una media del 95% y 79%, 86% y 88%, 79% y 83%, 83% y 94%, 92% y 93%, 89% y 86%, 82% y 95%, 81% y 95%, y 91% y 99% correspondientemente con el 95% del intervalo de confianza (IC), así mismo a partir de sus curvas ROC, se obtuvieron el valor del área bajo la curva (AUC) y AUC_{PFR} relacionada a la capacidad de minimizar los falsos positivos, LAMP fue superior en $AUC(0.990)$ seguida de DAT(0.975) que en AUC_{PFR} obtuvo el primer lugar con 0.967, ello concuerda con la predominancia de técnicas serológicas, especialmente DAT y RDT como las mejores alternativas por la variación en su conformación con nuevos antígenos a explorar, de este modo la investigación y subsecuente producción de estas mejorará la calidad de vida de pacientes y población endémica en países como Perú donde la salud pública es preocupante.

Palabras clave: Leishmaniasis, diagnóstico, técnica.

ABSTRACT

Leishmaniasis are a group of zoonotic diseases that represent a global problem. In 2021 alone, more than half a thousand cases were recorded in their different clinical characteristics and generated many consequences from death to physical deformations, even with repercussions on the family economy, the patient's mental state and their social acceptance because the endemic areas are mostly vulnerable areas so the specific diagnosis of this disease is important for the treatment and care of patients due to its similarity in symptoms with Malaria, Leprosy, Schistosomiasis or Tuberculosis. Therefore, the objective of this work was to carry out a systematic review and meta-analysis about the diagnostic accuracy of serological and molecular techniques of human Leishmaniasis from 1990 to the end of 2021. Thus the search string in Pubmed was determined and after obtaining 175 research articles according to the inclusion and exclusion criteria, these were combined and examined in this meta-analysis where the diagnostic accuracy was compared using receiver operating characteristic statistics (ROC). From this, 9 diagnostic techniques were obtained which were the Intradermal Montenegro test (IDR), Assay by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), Immunofluorescence antibody test (IFAT), Rapid diagnostic techniques (RDT), Direct agglutination test (DAT), Western blot (WB), Polymerase chain reaction (PCR), PCR quantitative real-time (qPCR) and Loop-mediated isothermal amplification (LAMP), which provided Sensitivity and Specificity values with a mean of 95% and 79%, 86% and 88%, 79% and 83%, 83% and 94 %, 92% and 93%, 89% and 86%, 82% and 95%, 81% and 95%, and 91% and 99% correspondingly with the 95% confidence interval (CI), likewise from its ROC curves, the value of the area under the curve (AUC) and AUCPFR were obtained because they relate to the ability to minimize false positives in this way LAMP was superior in AUC (0.990) followed by DAT (0.975) which in AUCPFR obtained the first place with 0.967, this is consistent with the predominance of serological techniques, especially DAT and RDT as the best alternatives due to the variation in their conformation with new antigens to explore. And as a result the research and subsequent production of these will improve the quality of life of patients and the population endemic in countries like Peru where public health is worrying.

Key words: Leishmaniasis, diagnosis, technique.

INDICE

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTO

RESUMEN

ABSTRACT

1. Introducción	1
2. Metodología	6
2.1 Cadena de Búsqueda	6
2.2. Criterios de Inclusión y exclusión	7
2.3 Extracción de datos y metaanálisis	7
3. Resultados y Discusión	8
3.1 Estrategia de búsqueda	8
3.2. Técnicas de diagnóstico de Leishmaniasis	16
3.2.1. Intradermorreacción de Montenegro (IDR)	16
3.2.2. Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA)	16
3.2.3. Prueba de anticuerpos fluorescentes indirectos (IFAT)	19
3.2.4. Prueba de diagnóstico rápido (RDT)	20
3.2.5. Prueba de aglutinación directa (DAT)	21
3.2.6. Western Blot	22
3.2.7. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	22
3.2.8. PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)	23
3.2.9. Amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP)	24
3.3. CURVAS ROC	25
4. Perspectivas futuras	30
5. Conclusiones	31

6. Referencias bibliográficas..... 32



INDICE DE FIGURAS

Fig.1. Mapa bibliométrico en base a la coocurrencia de términos MeSH de técnicas de diagnóstico de Leishmaniasis por VOS viewer.....	9
Fig.2. Número de publicaciones por año relacionadas a técnicas de diagnóstico de Leishmaniasis humana desde el año 1990 al 2021.....	12
Fig. 3. Producción científica en diferentes técnicas de diagnóstico de Leishmaniasis	13
Fig. 4 Diagrama de Flujo de la Revisión sistemática y metaanálisis	13
Fig. 5. Distribución geográfica de estudios abordados para metaanálisis. La variación del color esta denotada por el número de investigaciones que se traslucen en cada ubicación. 15	
Fig. 6. Número de publicaciones por país	15
Fig. 7. Diagrama de bosque e información de estudios sobre IDR como técnica de diagnóstico de Leishmaniasis. La Se y Sp de IDR se muestran con un límite de confianza del 95%, y en el diagrama como círculos negros.	16
Fig. 8. Diagrama de bosque e información de estudios sobre ELISA como técnica de diagnóstico de Leishmaniasis. La Se y Sp de ELISA se muestran con un límite de confianza del 95%, y en el diagrama como círculos negros. *El mismo estudio presentó diferentes variaciones en la prueba estudiada, controles, especie, tipo de muestra y leishmaniasis.....	18
Fig. 9. Diagrama de bosque e información de estudios sobre IFAT como técnica de diagnóstico de Leishmaniasis. La Se y Sp de IFAT se muestran con un límite de confianza del 95%, y en el diagrama como círculos negros. *El mismo estudio presentó diferentes variaciones en la prueba estudiada, controles, especie, tipo de muestra y leishmaniasis.....	19
Fig. 10. Diagrama de bosque e información de estudios sobre RDT como técnicas de diagnóstico de Leishmaniasis. La Se y Sp de RDT se muestran con un límite de confianza del 95%, y en el diagrama como círculos negros. *El mismo estudio presentó diferentes variaciones en la prueba estudiada, controles, especie, tipo de muestra y leishmaniasis.....	20
Fig. 11. Diagrama de bosque e información de estudios sobre DAT como técnica de diagnóstico de Leishmaniasis. La Se y Sp de DAT se muestran con un límite de confianza	

del 95%, y en el diagrama como círculos negros. *El mismo estudio presentó diferentes variaciones en la prueba estudiada, controles, especie, tipo de muestra y leishmaniasis..... 22

Fig. 12. Diagrama de bosque e información de estudios sobre WB como técnica de diagnóstico de Leishmaniasis. La Se y Sp de WB se muestran con un límite de confianza del 95%, y en el diagrama como círculos negros. *El mismo estudio presentó diferentes variaciones en la prueba estudiada, controles, especie, tipo de muestra y leishmaniasis..... 22

Fig. 13. Diagrama de bosque e información de estudios sobre PCR como técnica de diagnóstico de Leishmaniasis. La Se y Sp de PCR se muestran con un límite de confianza del 95%, y en el diagrama como círculos negros. *El mismo estudio presentó diferentes variaciones en la prueba estudiada, controles, especie, tipo de muestra y leishmaniasis..... 23

Fig. 14. Diagrama de bosque e información de estudios sobre qPCR como técnica de diagnóstico de Leishmaniasis. La Se y Sp de qPCR se muestran con un límite de confianza del 95%, y en el diagrama como círculos negros. *El mismo estudio presentó diferentes variaciones en la prueba estudiada, controles, especie, tipo de muestra y leishmaniasis..... 24

Fig. 15. Diagrama de bosque e información de estudios sobre LAMP como técnica de diagnóstico de Leishmaniasis. La Se y Sp de LAMP se muestran con un límite de confianza del 95%, y en el diagrama como círculos negros. *El mismo estudio presentó diferentes variaciones en la prueba estudiada, controles, especie, tipo de muestra y leishmaniasis..... 24

Fig. 16. Metaanálisis de las pruebas de diagnóstico de Leishmaniasis, resumen de curvas ROC de cada una de las técnicas identificadas según un color característico, la línea amarilla es para IDR, azul para ELISA, roja para IFAT, verde para RDT, naranja para DAT, oro para WB, morada para PCR, rosa para qPCR y turquesa para LAMP..... 25

LISTA DE ABREVIATURAS

LV	Leishmaniasis Visceral
LC	Leishmaniasis Cutánea
LT	Leishmaniasis Tegumentaria
LPKD	Leishmaniasis Post Kala Azar
LM	Leishmaniasis Mucosa
MeSH	Medical Subject Headings
RDT	Técnicas de diagnóstico rápido
DAT	Test de aglutinación directa
IFAT	Test de inmunofluorescencia de anticuerpos
ELISA	Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas
WB	Western blot
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
qPCR	PCR cuantitativa en tiempo real
LAMP	Amplificación isotérmica mediada por lazo
IDR	Intradermorreacción de Montenegro
ROC	Características operativas del receptor
Se	Sensibilidad
Sp	Especificidad
VP	Verdaderos positivos
FP	Falsos positivos
VN	Verdaderos negativos
FN	Falsos negativos
AUC	Área bajo la curva
IC	Intervalo de confianza

1. Introducción

Las leishmaniasis son un conjunto de enfermedades con dos tipos de transmisión, una antroponótica y la otra zoonótica, siendo esta última de mayor incidencia, así se produce por la transferencia de un protozoo intracelular perteneciente al género *Leishmania* de la familia Trypanosomatidaeo y del orden Kinetoplastida que, a través de la picadura del flebótomo hembra (vector) logra ingresar al cuerpo humano¹. De las 800 especies de flebótomos, 98 son descritas como vectores permisibles de *Leishmania*, es así que en el interior del flebótomo estos parásitos pasan por tres estadios, en el primero son amastigotes pequeños, inmóviles y de forma circular, progresan a un segundo donde muestran promastigotes procíclicos no infectivos y por último en promastigotes metacíclicos infecciosos móviles y flagelados^{2,3}. La movilidad que les brinda el flagelo les sirve para trasladarse del intestino al esófago y la faringe del flebótomo, así cuando este promastigote es introducido y posteriormente fagocitado por los neutrófilos, como primer fagocito partícipe en la respuesta inmunitaria, cambia a su forma amastigote, se tiene en cuenta también la ocurrencia de otros fagocitos de linaje mielóide como monocitos, macrófagos y células dendríticas como cooperadoras en la replicación activa de los amastigotes, acentuando la infección en células adyacentes⁴⁻⁶. Esto es lo que continuamente ocurre por lo que se origina un ciclo, en donde el insecto hematófago pica a un vertebrado infectado en el que ingiere macrófagos infectados con amastigotes que se transforman en promastigotes dentro de las 24 y 48 horas después de la ingestión para luego multiplicarse por división binaria longitudinal en el intestino del vector y estar listos para transferirse, de este modo llegan a ingresar hasta 100 protozoos que puede ser de una o varias especies que posteriormente van a producir todas las manifestaciones o síndromes clínicos de esta enfermedad de acuerdo a la especie de *Leishmania* causante de la infección en el huésped; se considera incluso que el paciente con Leishmaniasis puede ser parte de un ciclo adicional, ya que es una contenedor de este parásito^{1,7}.

Solo en 2016 la incidencia de Leishmaniasis fue de 12 millones de personas; de los 10 países con un número elevado de casos a nivel mundial, 4 están en América (Brasil, Colombia, Nicaragua y Perú); hasta el 2021, en las Américas se tiene registrado 55000

(cincuenta y cinco mil) casos de Leishmaniasis cutánea (LC) y Leishmaniasis mucosa (LM), y unos 3500 casos de Leishmaniasis Visceral anuales, en esta forma clínica se tiene una letalidad media de 7%. La LC está presente en 20 países, en 18 de ellos se considera endémica (Colombia, Costa Rica, Brasil, Argentina, Ecuador, Venezuela, Bolivia, Perú, Paraguay, El Salvador, Honduras, Nicaragua, Panamá, Guyana, Surinam, Guatemala, Guyana Francesa y México) y con respecto a la Leishmaniasis Visceral afecta a 13 países (Argentina, Bolivia, Brasil, Colombia, Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras, México, Paraguay, Nicaragua, Venezuela y Uruguay)⁸. La manifestación clínica de cada caso es diferente y dependiente de la especie de Leishmania, el estado del paciente que al presentar una coinfección adicional como el VIH puede desarrollar una presentación clínica atípica y la carga parasitaria en la inoculación, por ello puede ser compleja, así según su denominación produce lesiones cutáneas, mucosas y viscerales⁹.

Entre las manifestaciones clínicas comunes tenemos a Leishmaniasis Visceral (LV), LC y LM pero como se mencionó, la diversidad en especies de Leishmania produce más de un síndrome clínico, del mismo modo cada síndrome puede no ser ocasionado por solo una especie, por lo que también se reconoce a la Leishmaniasis Dérmica Pos-Kala Azar y Para-Kala Azar todas ellas causan desde lesiones, incapacidad, mutilaciones y hasta la muerte^{10,11}. A pesar de ellos la mayor cantidad de pacientes permanecen asintomáticos, es decir, no se presentan signos de enfermedad, sin embargo, las pruebas serológicas, PCR, prueba cutánea de Montenegro resultan positivas, por lo que se reivindica el papel de reservorio del paciente con Leishmaniasis conservando la transmisión de la Leishmania¹².

En Perú, los casos reportados como leishmaniasis del 2016 al 2021 bordearon los 30.000 (treinta mil), en el 2020 el 93.29% de las ocurrencias fueron de LC y el 6.71% atañeron a L. mucocutánea (LMC) de un total de 4.220, es visible su prevalencia en 19 de nuestros 24 departamentos que son los que continuamente exhiben casos de leishmaniasis tegumentaria americana (LC y LMC) desde el 2011, con respecto a LC, la Región de San Martín lidera el ranking con 8266, seguida de Cusco, Madre de Dios, Piura, Cajamarca y Junín que superan las 5000 incidencias, por otro lado, la LM se ha manifestado considerablemente en Cusco y Madre de Dios excediendo los 1.000 diagnósticos de la enfermedad; en nuestro país la LV

es endémica sin embargo por su forma de expresión no es tan notable a comparación de las otras formas clínicas, por lo tanto, no pueden evidenciarse por mucho tiempo porque los casos no se registran o si se realizan son solo algunos¹³. Teniendo en cuenta que el diagnóstico o designación de caso en nuestro país se realiza de forma tradicional como indica el MINSA (Tabla 1).

Tabla 1. Definición de caso de Leishmaniasis

Caso	Descripción	Técnica diagnóstica
L. cutánea confirmada	El caso confirmado se da a partir de un resultado positivo (1 o más técnicas) de un caso probable (residencia o procedencia de un área endémica con antecedentes y lesiones compatibles).	-Parasitología: Frotis y/o cultivo -Serológica: IFI
L. cutánea descartada	Caso probable de L. cutánea con resultado negativo. *	-IFI -IDRM
L. mucosa confirmada y descartada	El caso confirmado se da a partir de un resultado positivo de un caso probable (residencia o procedencia de un área endémica con antecedentes y lesiones compatibles). El caso probable con resultado negativo. *	-IDRM ** -IFI
L. visceral confirmada	El caso confirmado se da a partir de un resultado positivo de un caso sospechoso (residencia o	-Prueba rápida inmunocromatográfica específica rK 39 para Leishmania infantum o Leishmania infantum chagasi.

procedencia de un área endémica con sintomatología compatible).

-Frotis con tinción Giemsa o May-Grunwald–Giemsa muestra de aspirado de médula ósea.

-Cultivo in vitro en medio agar sangre, con identificación de promastigotes en NNN (Novy, Nicolle y McNeal),

-Seneckjie, por punción lumbar de médula ósea.

-Prueba de Inmunofluorescencia indirecta con título igual o mayor a 1:80 con antígenos específicos para *Leishmania (Leishmania) infantum* o *Leishmania infantum chagasi*.

-Detección molecular de ADN de *Leishmania (Leishmania) infantum* o *Leishmania infantum chagasi*. ***

Fuente: MINSA

*El descarte también está sujeto a la positividad a otras patologías.

** La IDMR es condicional a una primoinfección

*** *Leishmania (Leishmania) infantum* o *Leishmania infantum chagasi*, agente etiológico de leishmaniasis visceral en América sinónimo *Leishmania chagasi*, agente etiológico de leishmaniasis visceral en Asia, África y Europa.

El impacto de la leishmaniosis conlleva a calificarla como una de las enfermedades tropicales desatendidas más importantes, que sigue incrementando sus casos año tras año, llegando incluso hasta los 12 y 15 millones, además de tener una incidencia anual de hasta 1 millón de casos en 100 países, ello por estar muy relacionada con la pobreza^{14,15}, inclusive se ubica detrás de la malaria por causas parasitarias de muerte, siendo perceptible en regiones de la cuenca del Mediterráneo, África Oriental, América y el sudeste asiático donde las condiciones de salubridad no son adecuadas o no se posee un establecimiento de salud equipado por la lejanía y porque la inversión en salud pública no sea la idónea¹⁶, además debido a la pandemia de COVID-19 que obligó en algunos casos la movilización de personas a sus regiones de origen, como en Brasil donde la migración se dio hacia las áreas forestales

incrementando la exposición a vectores infectados y a los mismos hospederos de este parásito obligado, como los animales domésticos, de igual modo, se llegó a observar una mayor prevalencia de casos en zonas aledañas a la selva amazónica que presentaban viviendas marginales y donde había un alto porcentaje de deforestación¹⁷. Es por ello, que esta enfermedad es uno de los problemas de salud pública más preocupantes a nivel mundial, ya que, agrava la situación económica y financiera de las personas de los sectores más vulnerables, a causa de la inversión monetaria, de tiempo o la misma pérdida del paciente que constituía el sustento económico de su familia afectándola directamente, por lo tanto se visibiliza la necesidad de un manejo estandarizado de la enfermedad por parte del sistema de salud de los países más afectados, al mismo tiempo se debe tener en cuenta que existe un riesgo que pueden correr un gran número de personas en las áreas donde se esté dando una mayor ocurrencia siendo posible afectar alrededor de 350 millones de personas¹⁸.

Si bien la tasa de letalidad anual de Leishmaniasis llega al 10% con una estimación de 20.000 (veinte mil) a 40.000 (cuarenta mil) muertes, existen otro tipo de efectos que pueden repercutir mucho en la vida del paciente que van desde aspectos económicos, sociales hasta psicológicos que incluso están muy ligados al género y la cultura de cada paciente^{18,19}. Lo cual es solo la consecuencia de un inadecuado diagnóstico, ya que este se realiza de forma presuntiva y puede confundirse con otras enfermedades que también se desarrollan en zonas endémicas, propias de Leishmaniasis, por sus mismos síntomas clínicos como miasis furunculares, úlceras tropicales bacterianas, la lepra, el queiloide, el lupus vulgar, lupus eritematoso discoide, esquistosomiasis hepatoesplénica, fiebre tifoidea, la tuberculosis, sífilis, leucemia mieloide crónica, entre muchos otros que se parecen a la LC o LV²⁰. Por consiguiente, es menester originar un diagnóstico temprano y determinar el tipo de leishmaniasis que presente cada paciente para poder disminuir los gastos innecesarios en el mismo diagnóstico y tratamiento para mejorar el manejo y prevención de esta.

El objetivo general de esta tesis es contribuir con evidencia en parámetros de validez diagnóstica de Leishmaniasis, a partir de las diferentes técnicas de diagnóstico registradas desde 1990 hasta el 2021 en una revisión sistemática y posterior metaanálisis que a través del procesamiento estadístico de sus datos, propio del metaanálisis, brinda un resultado más

objetivo en investigación clínica donde las publicaciones aumentan progresivamente y se vuelve complejo el determinar un estudio adecuado y reproducible, así el metaanálisis con características cuantitativas y cualitativas más desarrolladas que solo una revisión sistemática, mostrando la eficiencia y eficacia en su procedimiento al tratar con una gran carga de información²¹. Por ende, esta evidencia servirá para incentivar la investigación, producción o uso de la tecnología resultante en Perú y en el mundo, aunque como un país en vías de desarrollo, la generación de tecnología propia en Perú es reciente, por ello adecuarnos a nuestro contexto nos permitirá evaluar las posibilidades de una tecnología de diagnóstico sensible y específica aceptable.

2. Metodología

2.1 Cadena de Búsqueda

En primer lugar, se generó la cadena de búsqueda para los términos Medical Subject Headings (MeSH) de Leishmaniasis y diagnóstico, en medio el operador “AND” para que los 2 estén incluidos en los resultados:

(Leishmaniasis[MeSH Terms]) **AND** (diagnosis [MeSH Terms])

La finalidad es encontrar las palabras clave vinculadas a esos términos, con mayor a 5 coocurrencias en un mapa bibliométrico, generado por el software VOSviewer (Versión 1.6.16) a partir de la búsqueda en PubMed, la cual es parte de las bases de datos de NCBI (National Center for Biotechnology Information), esta especializada en ciencias de la salud con más de 5300 de revistas científicas en el área de la medicina, enfermería y odontología y en la actualidad ya brinda más de 34 millones de citas entre literatura biomédica, ciencias de la vida y libros en línea que pueden estar expresos como un texto completo o redireccionados a las mismas revistas²².

Así la estructura de la cadena de búsqueda final estará dada por los términos MeSH de la técnica de diagnóstico en cuestión y el operador “AND” para adicionar los demás términos MeSH de Sensibilidad y Especificidad:

(Leishmaniasis[MeSH Terms]) **AND** (sensitivity and specificity [MeSH Terms]) **AND** (ELISA[MeSH Terms])

Esta cadena será inicialmente evaluada para tener la seguridad de que la búsqueda nos genere los artículos según los términos MeSH establecidos.

2.2. Criterios de Inclusión y exclusión

Los artículos revisados estuvieron comprendidos del año 1990 al 2021, en idioma inglés, publicados en revistas indexadas, que no omitan información fundamental como autores, año de publicación, lugar de estudio, técnica de diagnóstico, manifestación clínica y especie de *Leishmania*²². La exclusión de los artículos se delimitó a los que eran revisiones o metaanálisis, estaban redactados en un idioma diferente al inglés, sean libros o capítulos de libros, no ofrezcan el texto completo encontrado en las bases de datos, no contengan palabras clave, estén orientados al diagnóstico de la enfermedad en animales, lleven a cabo un seguimiento a pacientes con tratamiento para esta patología y solo estén incluidos por semejanza a otras enfermedades con manifestaciones clínicas parecidas.

2.3 Extracción de datos y metaanálisis

La validez diagnóstica está determinada por los conceptos de Sensibilidad (Se) y especificidad (Sp)²³, la Se está definida como la proporción de individuos que padecen de la enfermedad y tienen una prueba positiva y la Sp se designa como la proporción de individuos que no tienen la enfermedad y poseen una prueba negativa o normal²⁴. Estas son determinadas matemáticamente por los Verdaderos positivos (VP), Verdaderos negativos (VN), Falsos positivos (FP) y Falsos negativos (FN) como podemos ver en las ecuaciones 1 y 2, los VP son el número de casos que la prueba dio como positivos y que ciertamente son

positivos, lo mismo ocurre con los VN rectificando su carácter negativo, en cambio los FP son los casos positivos que arroja la prueba pero en sí son negativos y los FN que son positivos pero se muestran como negativos tras la prueba²⁵.

$$\text{Sensibilidad} = \frac{VP}{VP + FN} \dots \text{Ec. 1}$$

$$\text{Especificidad} = \frac{VN}{VN + FP} \dots \text{Ec. 2}$$

Entonces estos parámetros son los que fueron recopilados manualmente de los artículos que lograron pasar por los criterios de exclusión e inclusión, además se tomó en cuenta el número de controles positivos, negativos y el número de pacientes con Leishmaniasis (según su presentación clínica) para poder determinar y/o confirmar los índices de evaluación de la prueba como son los VP, VN, FP y FN.

Los datos propios de los artículos de investigación se analizaron con el paquete R “mada” (Versión 0.5.9), su función es realizar el metaanálisis de la validez diagnóstica haciendo uso de los índices de evaluación ya mencionados. Cada técnica diagnóstica se procesó por separado y dependiendo de su volumen, para que se visualice correctamente, obteniendo la Se, Sp y el intervalo de confianza (IC). Adicionalmente la validez diagnóstica de todas ellas se cotejó por intermedio de estadísticas de la curva de características operativas del receptor resumidas (sROC), que fueron estimadas usando un modelo bivariado preestablecido por el modelo reitsma del paquete R “mada” con un nivel de confianza del 95%²⁶.

3. Resultados y Discusión

3.1 Estrategia de búsqueda

La generación del mapa bibliométrico resultado del análisis de las coincidencias de los términos MeSH como palabras clave sobre técnicas de diagnóstico de Leishmaniasis generó 7 principales clústeres, entre los cuales predominan ELISA, diagnóstico diferencial, técnicas

resultados, incluso con algunas modificaciones, como se realizó en DAT, RDT e IHA. Así las cadenas de búsqueda a utilizar fueron las siguientes:

Tabla 2. Cadenas de búsqueda según pruebas diagnósticas

Técnica diagnóstica	Prueba diagnóstica	Cadena de búsqueda
		(Leishmaniasis[MeSH Terms])
	Prueba intradérmica (IDR) de Montenegro	AND (sensitivity and specificity [MeSH Terms]) AND (Intradermal Tests[MeSH Terms])
		(Leishmaniasis[MeSH Terms])
	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA)	AND (sensitivity and specificity [MeSH Terms]) AND (ELISA[MeSH Terms])
		(Leishmaniasis[MeSH Terms])
	Prueba de anticuerpos fluorescentes indirectos (IFAT)	AND (sensitivity and specificity [MeSH Terms]) AND (Fluorescent Antibody Technique, Indirect [MeSH Terms])
Serológica		(Leishmaniasis[MeSH Terms])
	Ensayo de hemaglutinación indirecta (IHA)	AND (sensitivity and specificity [MeSH Terms]) AND (Hemagglutination Tests [MeSH Terms])
		(Leishmaniasis[MeSH Terms])
	Prueba de diagnóstico rápido (RDT) rK39 / K26	AND (sensitivity and specificity [MeSH Terms]) AND (rK39 protein, Leishmania[MeSH Terms])
		(Leishmaniasis[MeSH Terms])
		AND (sensitivity and specificity

	[MeSH Terms]) AND (K26 protein, Leishmania chagasi [MeSH Terms])
Prueba de aglutinación directa (DAT)	(Leishmaniasis[MeSH Terms]) AND (sensitivity and specificity [MeSH Terms]) AND (Agglutination Tests[MeSH Terms])
Western Blot	(Leishmaniasis[MeSH Terms]) AND (sensitivity and specificity [MeSH Terms]) AND (Blotting, Western[MeSH Terms])
PCR	(Leishmaniasis[MeSH Terms]) AND (sensitivity and specificity [MeSH Terms]) AND (Polymerase Chain Reaction[MeSH Terms])
PCR en tiempo real o qPCR	(Leishmaniasis[MeSH Terms]) AND (sensitivity and specificity [MeSH Terms]) AND (Real-Time Polymerase Chain Reaction[MeSH Terms])
Molecular	(Leishmaniasis[MeSH Terms])
Amplificación isotérmica mediada en lazo (LAMP)	AND (sensitivity and specificity [MeSH Terms]) AND (LAMP assay[MeSH Terms])

Con el conocimiento de estos, se efectuó la pesquisa de estudios en la base de datos de PubMed, manejando las cadenas de búsqueda, obteniendo un total de 1024 artículos donde se puede observar el aumento de la producción científica a partir del 2002 (Fig. 2). A partir de ello se realizó una caracterización por año de publicación y número de artículos publicados por técnica, así en IDR, ELISA, IFAT, IHA, RDT, DAT, WB, PCR, qPCR y LAMP se obtuvieron 5, 277, 89, 10, 78, 138, 33, 389, 64 y 1 respectivamente (Fig. 3), claramente la

PCR está por sobre las demás a causa del avance que ha tenido su tecnología en la integración de la misma en países en vías de desarrollo, así mismo porque tiene más demanda en las formas subclínicas como a LV y no solo Leishmaniasis Tegumentaria Americana (LTA)²⁷.

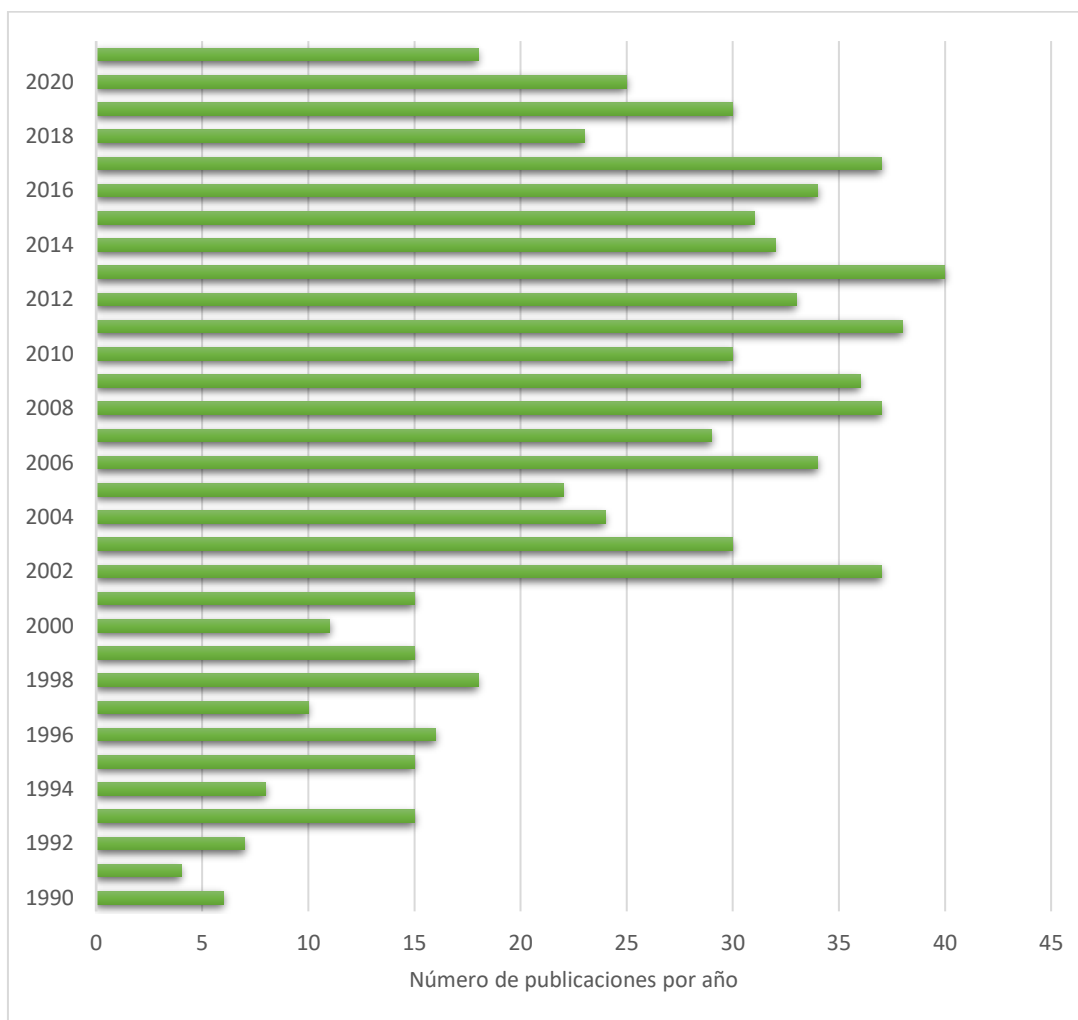


Fig.2. Número de publicaciones por año relacionadas a técnicas de diagnóstico de Leishmaniasis humana desde el año 1990 al 2021.

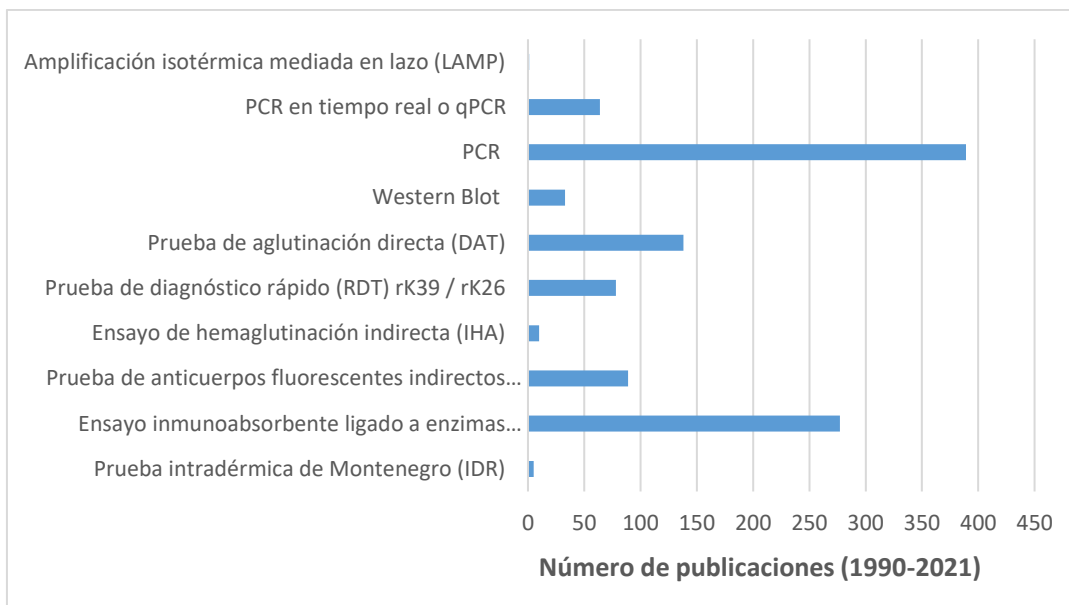


Fig. 3. Producción científica en diferentes técnicas de diagnóstico de Leishmaniasis

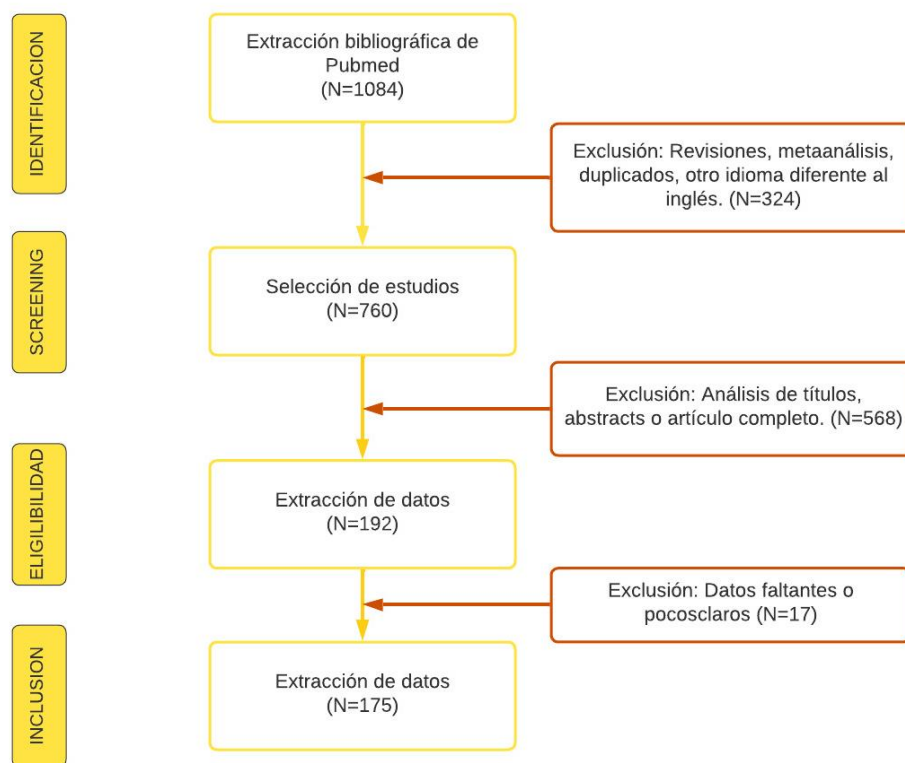


Fig. 4 Diagrama de Flujo de la Revisión sistemática y metaanálisis

En paralelo se procedió a distinguir los estudios de acuerdo con los criterios de inclusión, exclusión en la disposición que se muestra en la Fig. 4. Cabe destacar que muchos de ellos presentaban más de una técnica diagnóstica considerada para poder cotejar su Se Y Sp obtenidas, por ello de los 175 estudios finales, se duplicaron o triplicaron dependiendo del número de técnicas que contenían, así fueron designadas y adicionadas a cada tabla de información correspondiente, esta acción permitió que IDR, WB y LAMP puedan tener más de un artículo y se pueda efectuar el metaanálisis, descartando a IHA por solo tener uno.

La distribución geográfica a nivel mundial del número de estudios diferenciados según su país reveló la variabilidad de participes en la investigación en torno a esta enfermedad (Fig. 5), adicionalmente en los de mayor preponderancia de casos se ve una atención proporcional, como se presenta en Brasil, India y Sudan (Fig. 6.), focos activos o de gran presencia a nivel mundial de Leishmaniasis del viejo y nuevo mundo; Perú solo presenta un estudio en este aspecto, lo que sugiere la poca o nula importancia en la investigación o desarrollo de una prueba diagnóstica funcional y accesible para este grupo de enfermedades. Sin embargo, si contamos con protocolos de designación de casos como se mostró en la Tabla 1²⁸ en donde las técnicas serológicas y parasitológicas son las de mayor uso en nuestro país, sobre todo la inmunofluorescencia indirecta (IFI) y la Intradermorreacción de Montenegro (IDRM) de las que se disponen en gran cantidad por la predominancia de la LTA o también conocida como “uta” y “spundia” en sierra y selva²⁹. La detección molecular de ADN o inclusive la PCR es utilizada inferiormente por los requerimientos en reactivos, instalaciones y programas de estandarización y capacitación que aborden los establecimientos de salud primordiales, de la misma manera la obtención de las muestras incluye métodos invasivos que requieren a personal capacitado³⁰.

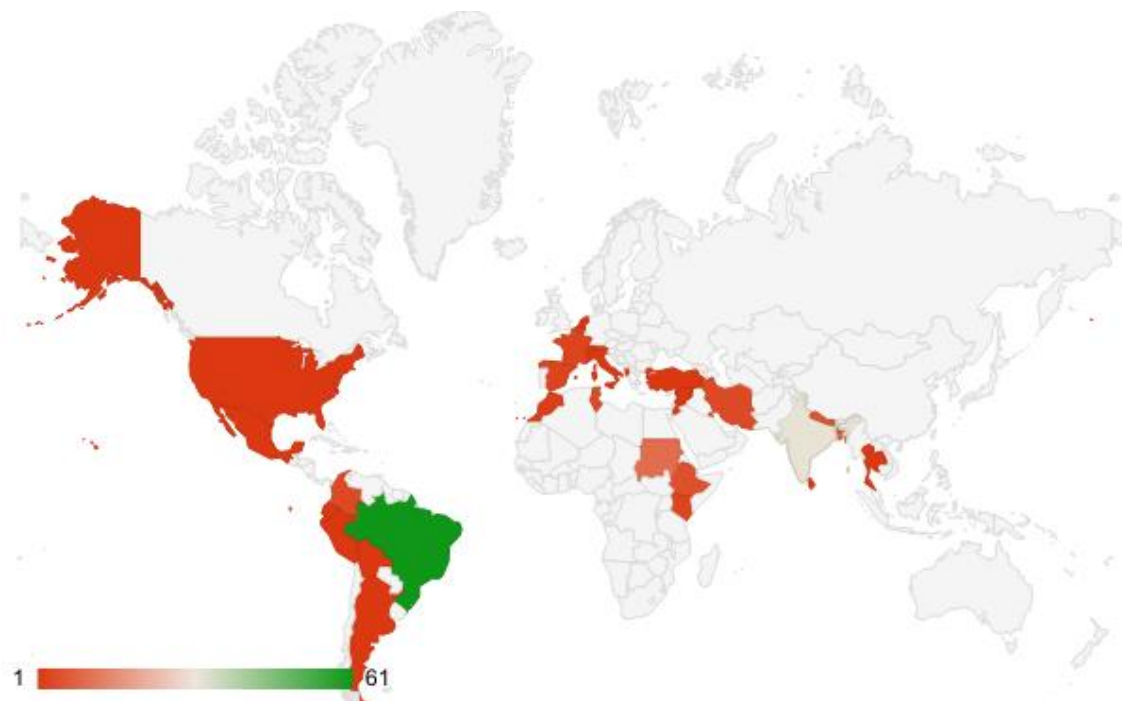


Fig. 5. Distribución geográfica de estudios abordados para el metaanálisis. La variación del color esta denotada por el número de investigaciones que se traslucen en cada ubicación.

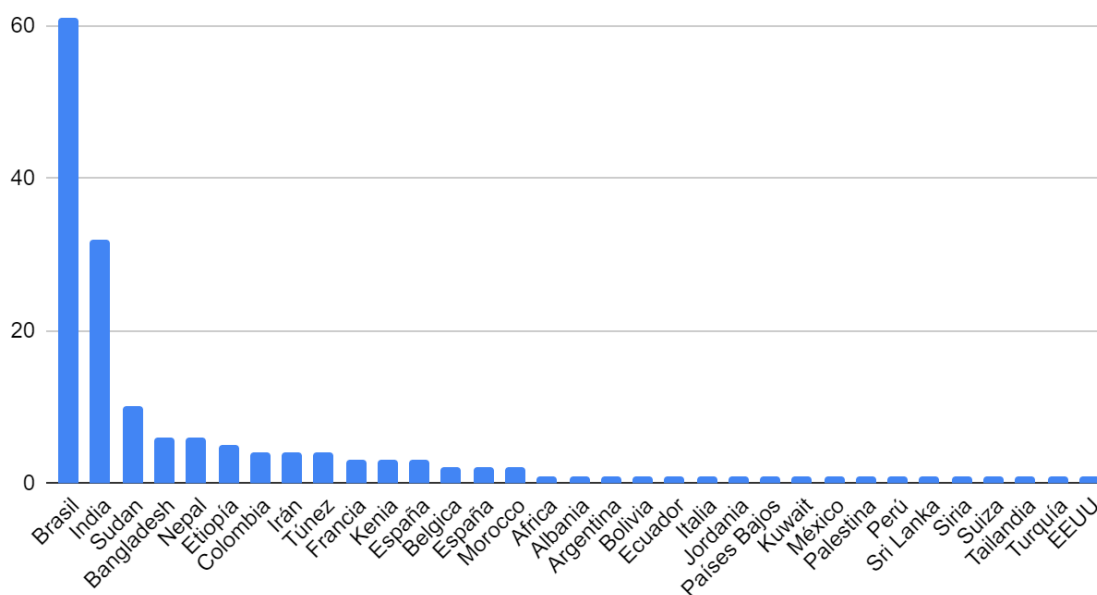


Fig. 6. Número de publicaciones por país

3.2. Técnicas de diagnóstico de Leishmaniasis

3.2.1. Intradermorreacción de Montenegro (IDR)

Se obtuvieron cinco estudios³¹⁻³⁵, en los cuales se evaluaron a 289 sujetos, generando una Se y Sp de 88 a 99% y del 63 al 95% respectivamente, la media en cada una fue del 95% y 79% con un límite de confianza 95% como se puede ver en la Fig. 7. En este caso cada uno de los estudios no tuvo más de un grupo control positivo o negativo, se realizó en pacientes con LC, LT y LM con 3, 2 y 1 correspondientemente; solo se registró reactividad cruzada en uno de ellos.

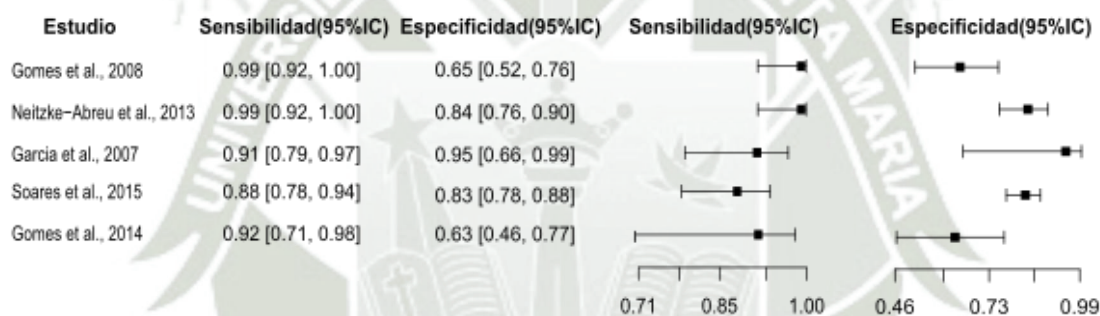
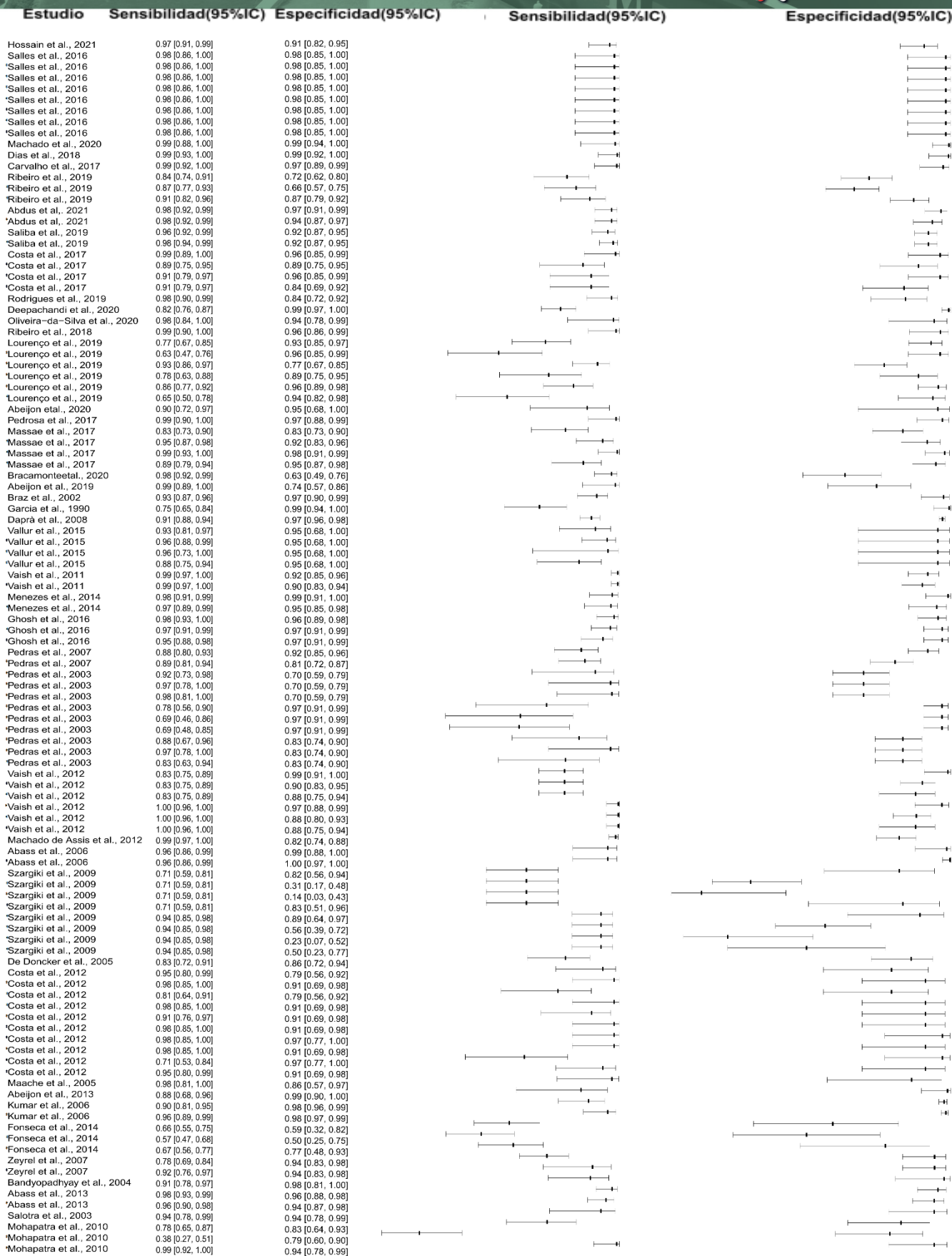


Fig. 7. Diagrama de bosque e información de estudios sobre IDR como técnica de diagnóstico de Leishmaniasis. La Se y Sp de IDR se muestran con un límite de confianza del 95%, y en el diagrama como círculos negros.

3.2.2. Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA)

Se obtuvieron 76 estudios^{34,36-110}, con 18688 muestras de pacientes, hallando una media en la Se y Sp de 86% y 88% respectivamente, teniendo un mínimo y máximo de 32% y 100% en Se y 14% a 100% en Sp, con un 95% de IC como se muestra en la Fig. 8.



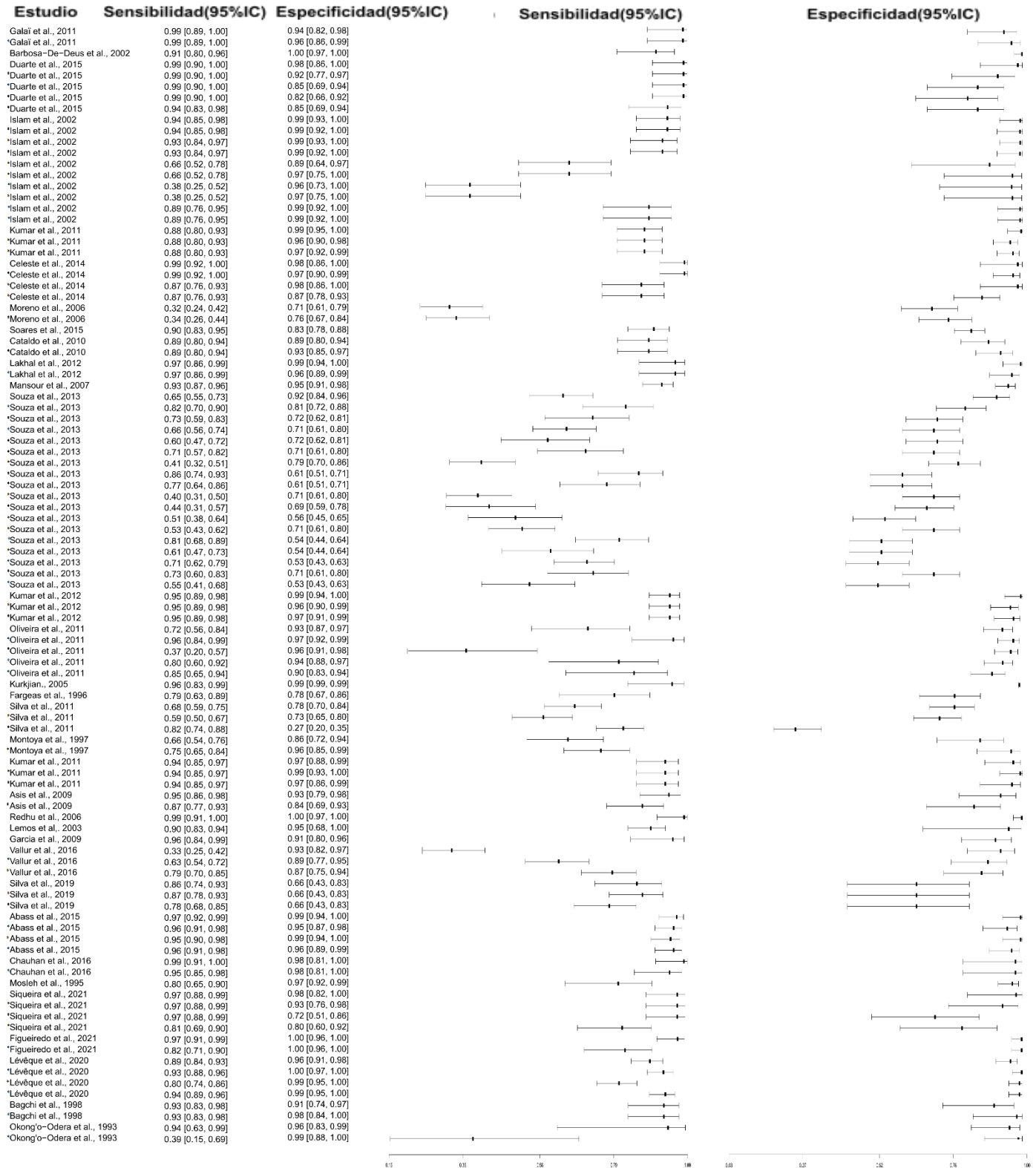


Fig. 8. Diagrama de bosque e información de estudios sobre ELISA como técnica de diagnóstico de Leishmaniasis. La Se y Sp de ELISA se muestran con un límite de confianza

del 95%, y en el diagrama como círculos negros. *El mismo estudio presentó diferentes variaciones en la prueba estudiada, controles, especie, tipo de muestra y leishmaniasis.

3.2.3. Prueba de anticuerpos fluorescentes indirectos (IFAT)

Se obtuvieron 18 estudios^{32,35,37,55,57,59,60,73,102,105,111-118}, en los cuales se contemplaron 4930 individuos, en los cuales se encontró un 79% de Se y 83% de Sp entre 30% y 99% con respecto a la primera, y de 23% y 100% en la segunda, con un 95% de IC. (Fig. 9)

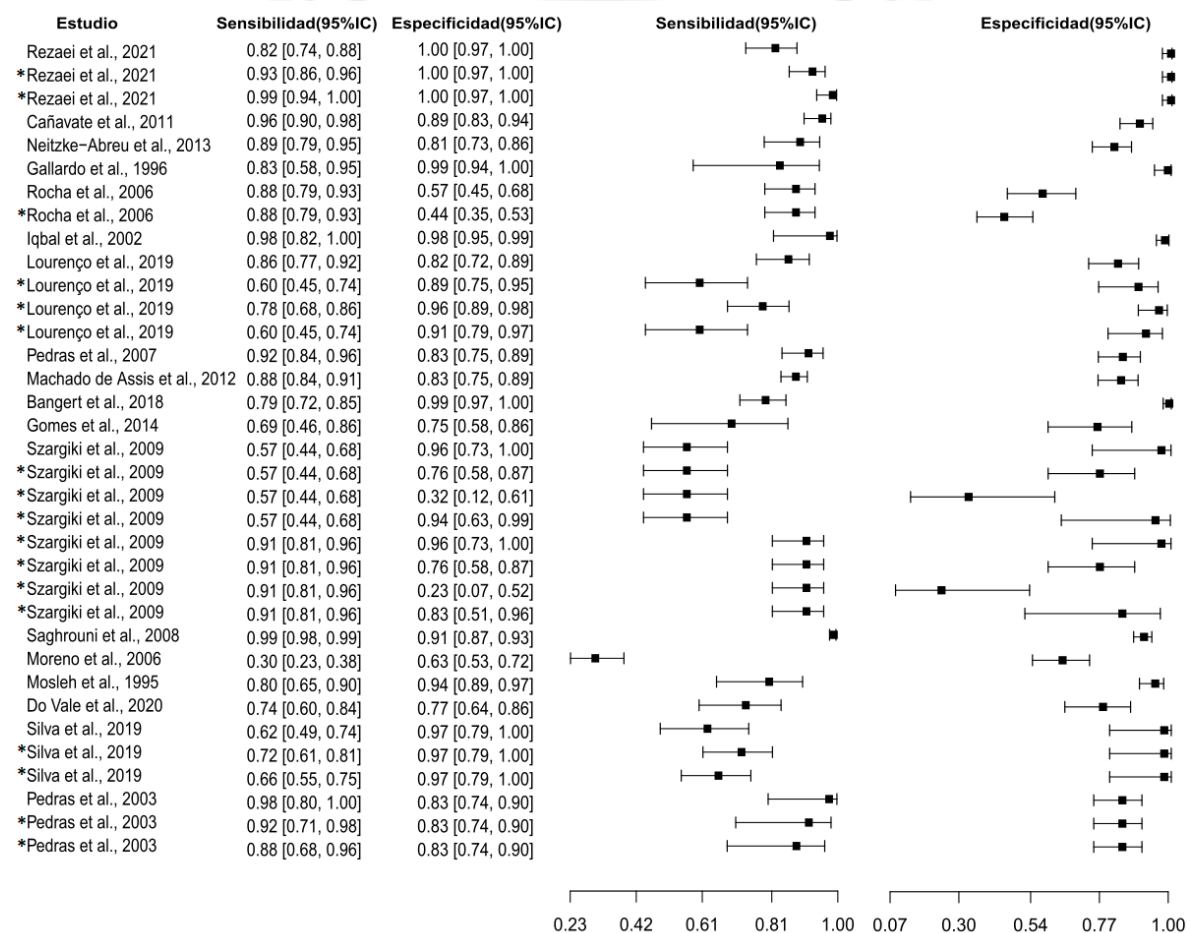


Fig. 9. Diagrama de bosque e información de estudios sobre IFAT como técnica de diagnóstico de Leishmaniasis. La Se y Sp de IFAT se muestran con un límite de confianza del 95%, y en el diagrama como círculos negros. *El mismo estudio presentó diferentes variaciones en la prueba estudiada, controles, especie, tipo de muestra y leishmaniasis.

3.2.4. Prueba de diagnóstico rápido (RDT)

Se obtuvieron 36 estudios^{46,57,58,73,80,81,99,102,103,106,108,111,112,115-137}, fueron incluidos 10907 individuos obteniendo 83% de Se media y 94% de Sp media, estando el primero entre el 20% y 100% y el segundo entre 41% y el 100%, con un 95% de IC. (Fig. 10)

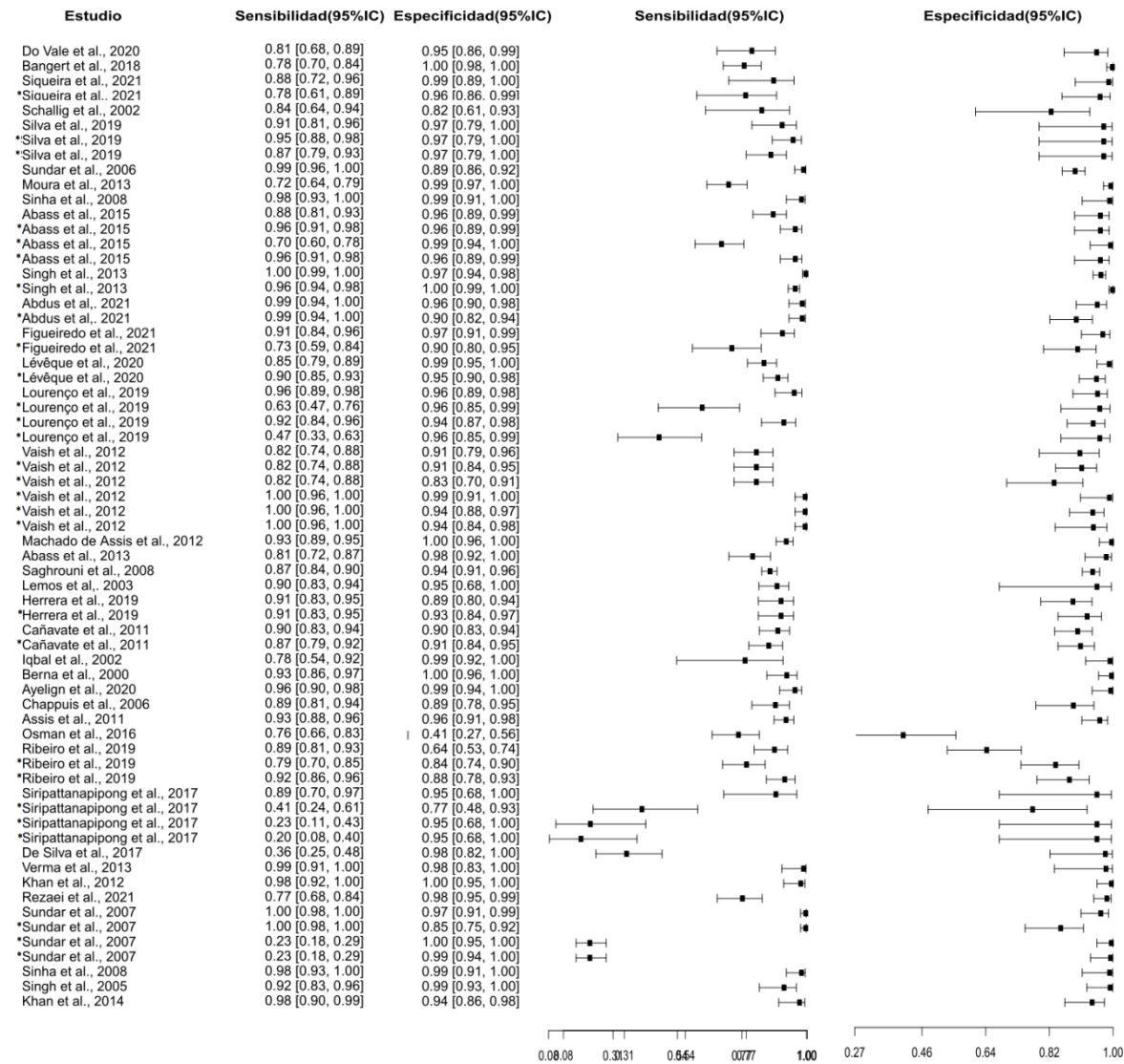


Fig. 10. Diagrama de bosque e información de estudios sobre RDT como técnicas de diagnóstico de Leishmaniasis. La Se y Sp de RDT se muestran con un límite de confianza

del 95%, y en el diagrama como círculos negros. *El mismo estudio presentó diferentes variaciones en la prueba estudiada, controles, especie, tipo de muestra y leishmaniasis.

3.2.5. Prueba de aglutinación directa (DAT)

Se obtuvieron 47 estudios^{46,57,60,73,88,102,103,109,110,112,117-119,122,126,127,129,130,135,138-165}, en donde 12020 pacientes participaron, obteniendo un valor del 92% en la Se media y 93% en Sp. Los límites que alcanzaron fueron del 48% al 100% en Se y 43% a 100% en Sp con un 95% de IC. (Fig. 11)

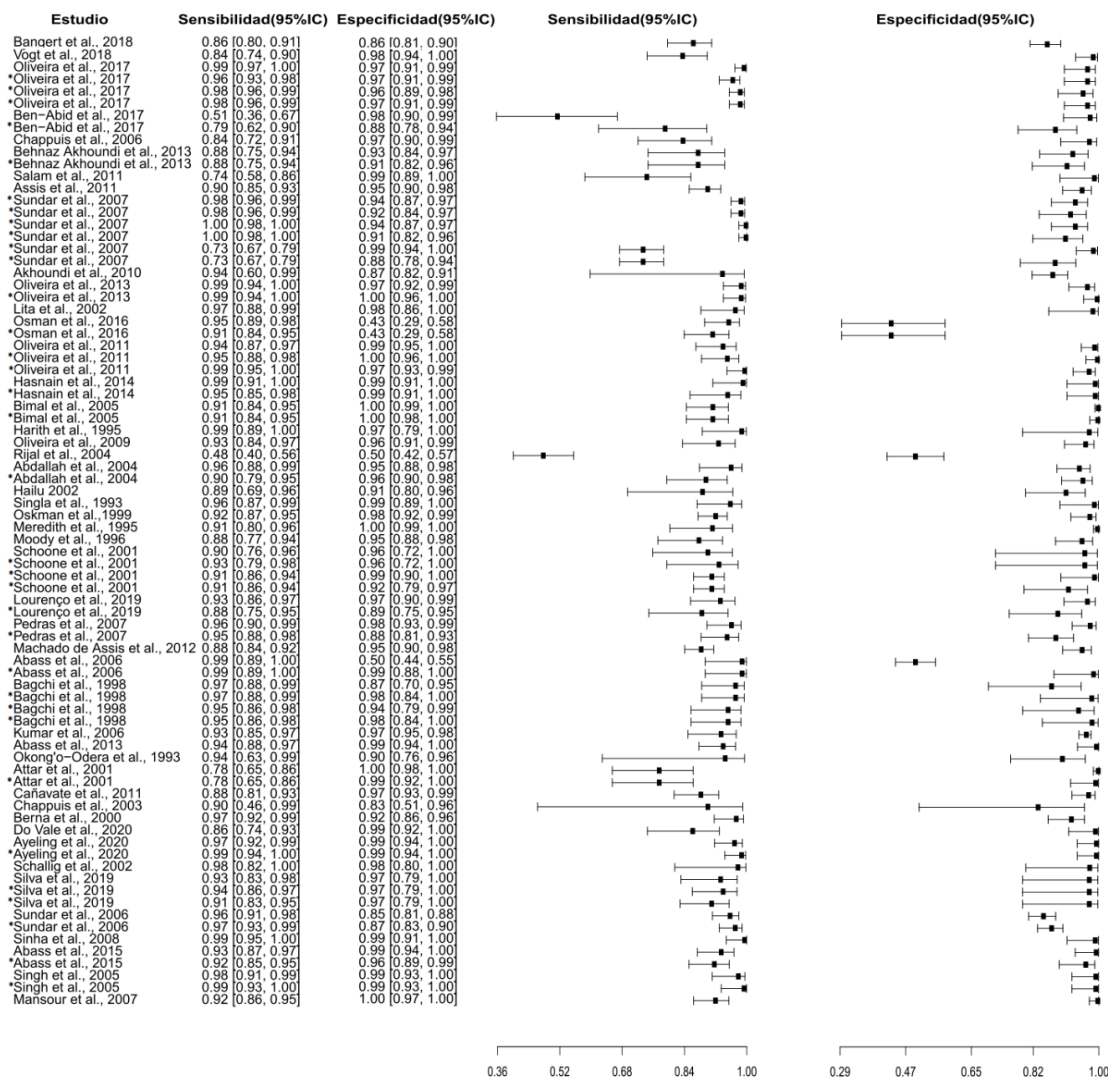


Fig. 11. Diagrama de bosque e información de estudios sobre DAT como técnica de diagnóstico de Leishmaniasis. La Se y Sp de DAT se muestran con un límite de confianza del 95%, y en el diagrama como círculos negros. *El mismo estudio presentó diferentes variaciones en la prueba estudiada, controles, especie, tipo de muestra y leishmaniasis.

3.2.6. Western Blot

Se obtuvieron 3 estudios^{48,55,166}, en estos participaron 571 pacientes, la Se de la técnica promedio fue de 89%, variando de 77% al 99% y con la Sp del 86%, entre un 59% y 99% con un 95% de IC. (Fig. 12)

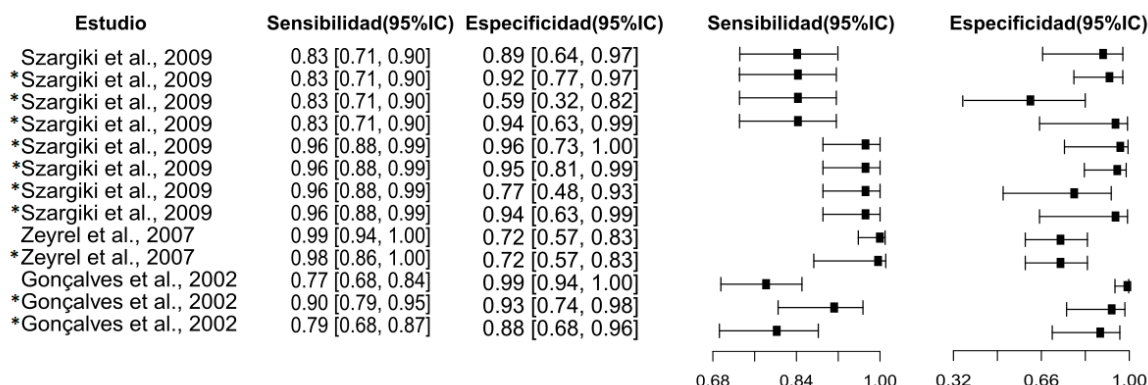


Fig. 12. Diagrama de bosque e información de estudios sobre WB como técnica de diagnóstico de Leishmaniasis. La Se y Sp de WB se muestran con un límite de confianza del 95%, y en el diagrama como círculos negros. *El mismo estudio presentó diferentes variaciones en la prueba estudiada, controles, especie, tipo de muestra y leishmaniasis.

3.2.7. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Se obtuvieron 44 estudios^{32-35,45,80,112,134,137,167-201}, con la participación de 7028 pacientes, generando una Se media del 82% (entre un 8% y 99%) y una Sp media del 89% (entre 12% y 100%) con un 95% de IC. (Fig. 13)

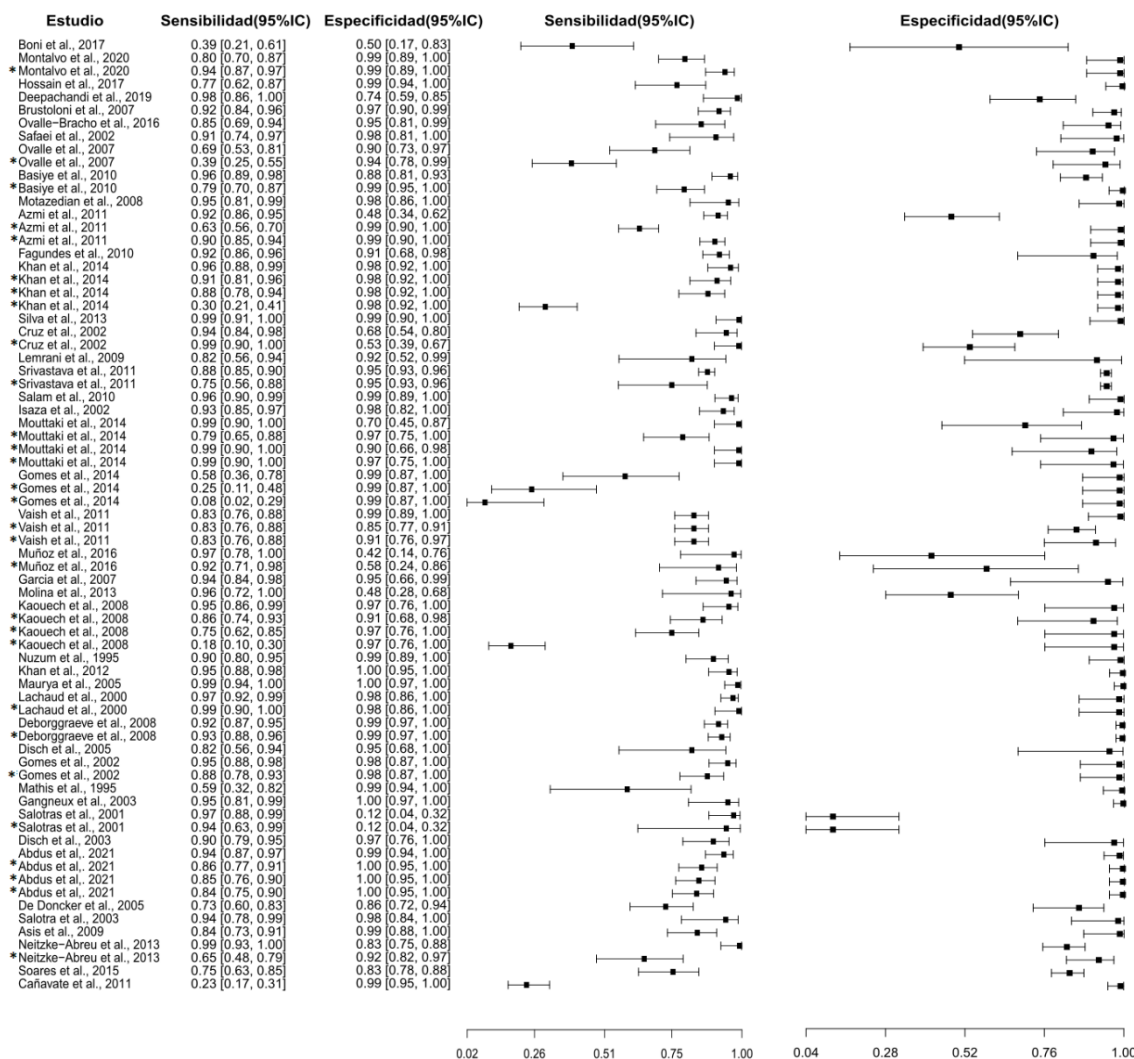


Fig. 13. Diagrama de bosque e información de estudios sobre PCR como técnica de diagnóstico de Leishmaniasis. La Se y Sp de PCR se muestran con un límite de confianza del 95%, y en el diagrama como círculos negros. *El mismo estudio presentó diferentes variaciones en la prueba estudiada, controles, especie, tipo de muestra y leishmaniasis.

3.2.8. PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)

Se obtuvieron 9 estudios^{36,43,111,133,167,169,202-204}, en los cuales 1145 pacientes fueron evaluados con esta técnica, obteniendo una Se promedio del 81%, entre los valores de 38% y 99%, así como la Sp del 95% con un rango de 67.6% al 99.7%, con un 95% de IC. (Fig. 14)

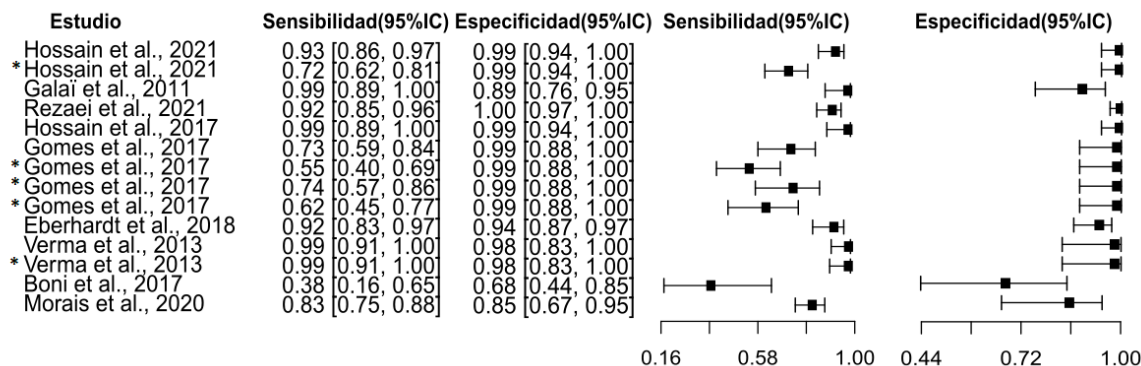


Fig. 14. Diagrama de bosque e información de estudios sobre qPCR como técnica de diagnóstico de Leishmaniasis. La Se y Sp de qPCR se muestran con un límite de confianza del 95%, y en el diagrama como círculos negros. *El mismo estudio presentó diferentes variaciones en la prueba estudiada, controles, especie, tipo de muestra y leishmaniasis.

3.2.9. Amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP)

Se obtuvieron 3 estudios^{36,80,134} donde participaron 536 pacientes, generando una Se media del 91% y Sp del 99%, entre los extremos de 85% al 96% y del 99% al 100% respectivamente y con un 95% de IC. (Fig. 15)

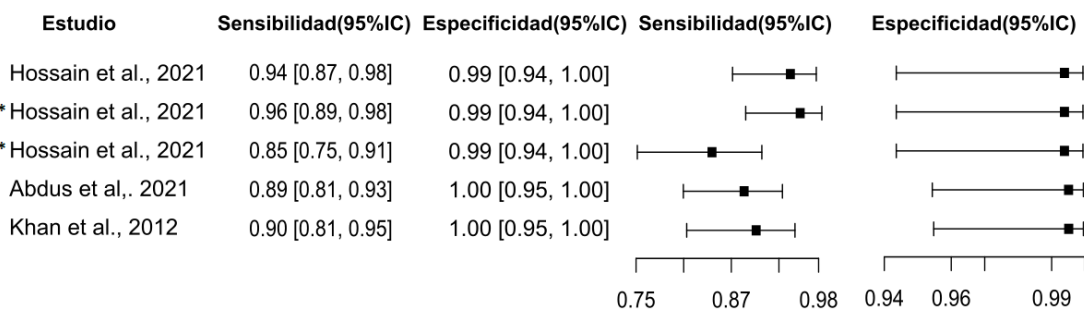


Fig. 15. Diagrama de bosque e información de estudios sobre LAMP como técnica de diagnóstico de Leishmaniasis. La Se y Sp de LAMP se muestran con un límite de confianza del 95%, y en el diagrama como círculos negros. *El mismo estudio presentó diferentes variaciones en la prueba estudiada, controles, especie, tipo de muestra y leishmaniasis.

3.3. CURVAS ROC

Se realizó las curvas ROC para poder contrastar las sensibilidades de cada prueba con sus falsos positivos relacionados con su especificidad (Fig. 16), así la técnica con mayor Se coherente con sus AUC fue LAMP, seguida de DAT, RDT, qPCR, PCR, ELISA, WB, IDR e IFAT siendo sus valores 0.990, 0.975, 0.971, 0.969, 0.959, 0.955, 0.942, 0.932 y 0.916 correspondientemente, adicionalmente se obtuvo sus AUC_{FPR} , este valor representa la precisión global de cada técnica, de modo que el incremento de este refleje una mayor discriminación de la prueba en su capacidad de minimizar los falsos positivos mientras los verdaderos positivos se maximizan, así DAT encabeza la lista, seguida de RDT, PCR, ELISA, qPCR, IFAT, WB, IDR y LAMP con 0.967, 0.959, 0.956, 0.952, 0.934, 0.900, 0.882, 0.872 y 0.499 respectivamente.

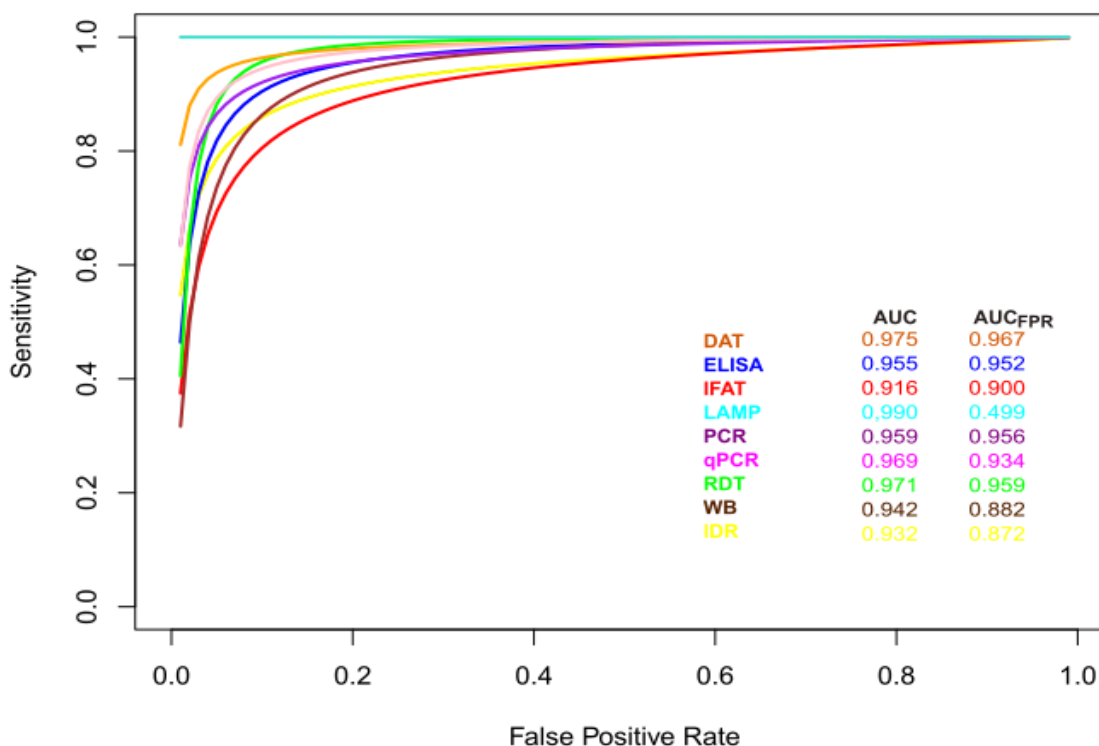


Fig. 16. Metaanálisis de las pruebas de diagnóstico de Leishmaniasis, resumen de curvas ROC de cada una de las técnicas identificadas según un color característico, la línea amarilla es para IDR, azul para ELISA, roja para IFAT, verde para RDT, naranja para DAT, oro para WB, morada para PCR, rosa para qPCR y turquesa para LAMP.

Según los datos recopilados solo fueron 3 artículos de los 175 filtrados que están enfocados en LAMP, y todos indicaron Se y Sp mayor al 85% corroborando lo obtenido por las curvas ROC, contrario a ello su valor de su AUC_{FPR} fue superado por DAT y RDT que tuvieron muchos más estudios con los cuales es posible desarrollar una mayor diferenciación con sus datos y como corresponde la minimización de FP es mejor en estas. Si bien LAMP, como técnica a nivel molecular es más sensible y específica por el número de cebadores que identifican mayor cantidad de secuencias específicas y a una misma temperatura²⁰⁵, puede presentar reacciones cruzadas en la contaminación del proceso por agentes externos²⁰⁶, en el caso de Leishmaniasis, RDT son las que han avanzado considerablemente por su sencilla aplicación sin ser necesario un laboratorio o personal en gran medida capacitado²⁰⁷, así la configuración que han adoptado, por la agregación de antígenos específicos estudiados a mayor profundidad, después del más común rK39, fueron rKE16, rK28, rFc, rC9, rA2, rHSP70, rHSP83, rGP63 y rK26 en 30 de los 36 artículos de esta técnica, dando a conocer la inclinación a la mejora y continuidad en investigación y producción. En paralelo proteínas recombinantes como rLiHyG, rLiHyS, LiHypA, rPHB, rPK, rLiHyE, rLbHyM, rLB8E, rLb6H, rKRP42, rC1, rC8, C9, rKLO8, rK9, rK26, enolasa, triparedoxina peroxidasa, factor de iniciación eucariota 5a, β -tubulina, BHUP3, rHsp83, CLH, rHSP70, rH2A, rH2B, rH3, rH4, rKMP11, rLci1A-NH6-ELISA, rLci2B-NH6, rLci3A-R3-NH6, rLci4A-NH6, rLci5A-I-NH6, rT26-U2, rT26-U4, rBHUP2, rKE-16, rTR18, rKR95, rKLO8, rLdRab6, rKDDR-plus, rKDDR, rDTL-4 y rpiridoxina fueron parte central de investigación en ELISA para evaluar el grado de compatibilidad con los antígenos presentes, exhibiendo la última mayor notabilidad debido al grado de conservación en el género *Leishmania*⁶² siendo aplicable no solo en LC con muestras de tejido de lesiones²⁰⁸, sino también en LV con muestras de suero. Así mismo, algunos biomarcadores proteicos como *L. donovani*/*L. infantum* Liisd1, Li-txn1, Li-ntf2, Ld-mao1 y Ld-ppi1 fueron adicionados a una diferencia en procedimiento denominado ELISA de captura que solo tuvo más desarrollo en manos de los mismos autores que lo presentaron en años posteriores, en contraparte la interacción de fagos (parte de una librería) con epítomos fue analizada en 2 trabajos donde la identificación de anticuerpos en pacientes sanos o con sintomatología semejante tuvo igual implicancia que aquellos que poseían la enfermedad, la inclusión de exo antígenos (Exo-Ag) no pasó desapercibida presentando su análisis elevados porcentajes en Se y Sp (mayor al 90%); estos tuvieron un

estudio previo y fueron perfeccionando su proceso de identificación mediante cultivo celular evaluando su comportamiento in vivo, su importancia radica en la diferencia de su especificidad, siendo estos mejores porque son transportados desde el mismo vector mediante la secreción, excreción y metabolismo y no solo liberados por la lisis celular cuando el proceso de infección ha comenzado en la LTA³⁴. Se denotó además otro contraste a nivel de uso de reactivos como fue micro ELISA, Beta-mercaptoetanol y dot-ELISA en las tres la Se y Sp bordeo los 100%, indicativo como un potencial procedimiento a seguir perfeccionado, dado que estos no disponen de un mayor gasto o equipos adicionales, porque solo difieren en algunos reactivos de bajo volumen, dependiendo también del fabricante, por ejemplo dot-ELISA adiciona una suspensión de promastigotes de *Leishmania donovani* como antígeno de manera saturada distribuida puntualmente en filtros de celulosa en forma de disco (marca Millipore) presentando sencillez en su interpretación de resultados además de la portabilidad, el bajo costo del equipo y su característica adaptable al antígeno deseado^{209,210}.

Por otro lado, la identificación de antígenos convencionales como el Ig G, Ig M e IgA en LV también formaron parte de los trabajos revisados con valores de Se y Sp entre 70% y 100%, debido a la gran cantidad generada para la activación del complemento en esta manifestación clínica²¹¹, sin embargo, se sabe que una fracción de promastigotes inoculados desequilibra e inclusive puede detener el proceso de la cascada de activación aún con una elevada cantidad de anticuerpos²¹² o requerir la opsonización para poder continuar con su multiplicación dependiendo de la especie infectiva de *Leishmania*²¹³. La pluralidad en la interacción del parásito con las células inmunes del parásito ha impulsado de estudio de otras proteínas hipotéticas en gran medida conservadas como ya las describimos, como también a un antígeno recombinante quimérico (ARQ) el cual es el resultado, en este caso, de la mixtura de epítopes de AR ELISA de antígenos recombinantes (K9, K39sub y K26) con mejores resultados que IFAT.^{65,214}

Del mismo modo, encontramos a DAT como segunda técnica representativa en sensibilidad, en los 47 artículos encontrados se ha observado la adición a su principio general en anticuerpos A2-LAT, Pro-LAT y variaciones como el látex, generando KATEX, esta última estuvo presente en 7 artículos donde generó una Se baja, contraria a su Sp que llegó a alcanzar

el 100%, la Se disminuida aún está en investigación puesto que aún con la muestra con una alta concentración de antígenos (orina)²¹⁵ los resultados no son los esperados en contraste al test convencional (DAT) que sí está próxima del 100% en ambos casos. En paralelo este cambio en la unión a antígenos recombinantes (DAT-FDF9) y no recombinantes liofilizados de origen promastigote (DAT-LPC), así como el incremento en concentración de parásitos y decremento en el número de diluciones (FAST), cambio en reactivos tóxicos como el 2-ME, por kaolin y N-acetylcysteine (NAC) con la misma función en la aglutinación de anticuerpos correspondientes (Ig M)²¹⁶ arrojaron valores mayores al 90% en Se y Sp e incluso 100% con el tratamiento con Kaolin, solución usada en la industria de plásticos y pintura¹⁴⁷.

De la misma manera, qPCR aunque sin un número sobresaliente de artículos, ocupó el cuarto lugar dentro de las 9 técnicas con mayor precisión en la identificación de Leishmaniasis, las diferencias que tuvieron los trabajos de investigación se visualizaron en el procedimiento (uso de sondas) así SYBR Green superó a TaqMan, por su mayor capacidad de reconocimiento, es decir no solo a productos específicos sino también a los inespecíficos²¹⁷, las otras diferencias fueron el objetivo, así en SL-RNA, se tomó como secuencia a miniexones con una alta conservación y expresión, contrario a los anteriores ensayos las muestras fueron invasivas, por ello es posible su mejor rendimiento, ya que por esa misma razón las de la primera técnica mostraron una baja Se por la concentración de parásitos mucho menor. En los 44 artículos que usaron PCR como técnica diagnóstica, además de la convencional, se sumaron 6 variaciones en las proteínas diana como HSP70, HSP20, HSP20S, miniexon, kDNA, ITS rDNA, 7SL, its1, its2, SSUrRNA, , todos ellos fragmentos altamente conservados en Leishmaniasis que pueden incluso llegar a diferenciar las especies de este parásito^{218,219}; con respecto a la diferenciación en los tipos de PCR, dos artículos trabajaron con un tipo de PCR anidada (Ln-PCR y Mo-STNPCR), la diferencia radica en el número de cebadores usados, los cuales son un par adicional diferente al original que participa en una segunda ronda de amplificación²²⁰, en ambos casos la Se y Sp fue variable, entre el 75% y 100% con respecto a solo una manifestación clínica, el resumen en más de una manifestación si llegó al 100% en la precisión diagnóstica. Entre los demás artículos con mudanza en sus protocolos, se indagó en la diana 18S, en este sentido Leishmania Oligo-Test y NASBA-OC como herramientas de detección, contenían una última etapa en la cual

la localización de la secuencia amplificada se realiza en una tira reactiva con fundamento en oligocromatografía, un procedimiento práctico sin embargo aún con equipo necesario para la amplificación²²¹. Con respecto a WB, IDR e IFAT como las últimas técnicas en demostrar una menor precisión en la identificación de Leishmaniasis, no se observaron diferencias o mejoras en su procedimiento y la obtención de muestras, que fue en su mayoría suero, con algunas técnicas invasivas como la biopsia.

Un aspecto resaltante observado fue la manifestación clínica más estudiada que fue LV, más del 70% de los artículos fue dirigido a este, siguiendo después LC, con el 10.5%, LT con 7.1%, y L. Post Kala Azar con 3.4% además de algunas combinaciones entre ellas por falta de muestras, ello fue congruente con las especies que trabajaron, siendo la de mayor presencia la *L. donovani*, continuada por *L. infantum*, *L. chagasi*, *L. braziliensis*, *L. Viannia*, estas nos indican la importancia de tener una especie seleccionada en cuestión, aunque no todos tuvieron esta información debido a que gran parte de ellos son de investigaciones de 1990 o 2000, en tanto la identificación de una especie en específica ha tenido relevancia para que según el cuadro clínico se pueda discriminar enfermedades con manifestaciones similares y brindar un tratamiento certero, ya que también existe dependencia de la virulencia de la cepa, la diferente respuesta inmunitaria en cada paciente ya sea por estilo de vida, genética o enfermedades preexistentes que pueden involucrar otros diagnósticos que solo empeoren el estado del paciente²²². En Perú existen 5 especies reconocidas *L(V). peruviana*, *L.(V.) braziliensis*, *L.(V.) guyanensis*, *L.(V.) lainsoni* y *L.(V.) amazonensis*, así mismo una mayor evidencia de *L. Cutánea andina* (75%) y el 25% en formas selváticas, en grupo etarios a menores de 15 años y a partir de 15 años hasta los 44 años de edad respectivamente, que son infectados por el vector en zonas de trabajo en su mayoría y no acuden a centros de salud por desinformación y desconfianza, ya que optan por tratamientos más rudimentarios por no tener acceso a establecimiento de salud equipado y con especialistas encargados, ello porque en estos casos las muestras son derivadas generalmente a la capital de provincias o la misma capital, donde las pruebas de detección por defecto son el frotis o cultivo celular siendo la más precisa pero no la más prudente por el requerimiento de los resultados. La reactividad cruzada se exploró solo en 42 artículos, en ellos el rango de valores se dio desde el 1% al

92%, Chagas fue la principal enfermedad con la que se tuvo compatibilidad, seguida de malaria, tifoidea, lepra y tuberculosis, el 95% de ellas abordaron pruebas serológicas.

Finalmente, la heterogeneidad de los datos en la muestra, tipo de muestra y manifestación clínica presentaron algunas limitaciones en el análisis, por ejemplo, los controles negativos no solo fueron tipificados como pacientes sanos sino pacientes con alguna manifestación de leishmaniasis que fue concordante o no al control positivo, enfermedades de características relacionadas sin mostrarse como reactividad cruzada a explorar, según el criterio de los investigadores, de igual modo se halló controles negativos a sanos de zonas endémicas y no endémicas que en conjunto se analizaron como un único valor en algunos casos pero en otras si se denotó la diferencia para la Sp; el tipo de muestra como la procedencia de la misma (laboratorio) también comprendieron otro factor de variabilidad, así el tipo de muestra varió de suero, orina, sangre periférica, sangre seca, capa leucocitaria, impresión de papel de filtro oral, biopsia, fluido dérmico, aspirado de medula ósea a hisopado bucal en todas las técnicas, por consiguiente en cada estudio no solo se contó con una técnica sino un comparativo adicional con otras de tipo molecular, serológica o de observación directa por ello es que la diferencia marcada entre estudios de la misma técnica con diferentes rasgos en presentación clínica, muestra, tipo de muestra y existencia de la reactividad cruzada.

4. Perspectivas futuras

En la actualidad el Perú no tiene un protocolo eficiente para el diagnóstico de Leishmaniasis en zonas vulnerables, donde incluso su incidencia es mayor, por falta de equipamiento y profesionales, sumado a ello la inseguridad del mismo paciente por el tratamiento y según su cuadro clínico su posterior fallecimiento. Por ello, el impulsar la continuación de investigación y producción de pruebas o kits basados en LAMP, DAT y RDT con dianas con mayor rendimiento como rk39, rk28, rpidoxina, o la modificación en su procedimiento es determinante para disminuir los efectos de este conjunto de enfermedades en personas en situación vulnerable, puesto que a través de la evidencia de los más de 170 artículos estas componen la mejor alternativa por su mayor precisión frente a las demás técnicas y la menor o nula reactividad cruzada hallada en comparación de ELISA o IDR.

5. Conclusiones

La heterogeneidad en la sintomatología de Leishmaniasis frente a enfermedades con presentación semejante impide un diagnóstico y por ende un tratamiento efectivo, lo que en cuestión representa un desafío para países en vías de desarrollo como Perú que no cuenta con la tecnología apropiada para sectores vulnerables en las cuales se intensifica en gran manera la necesidad de una identificación eficaz y eficiente, además de disminuir la tasa de mortalidad, sobre todo en LV, donde la letalidad producto del desarrollo de la enfermedad por un nulo tratamiento supera el 95% de casos según la OMS. Así tras el análisis de los trabajos relacionados se pudo demostrar que DAT y RDT se han mostrado como las mejores vías diagnósticas en parámetros de validez diagnóstica de Leishmaniasis, por su flexibilidad, mejora y la misma precisión diagnóstica que generaron en el resumen de sus resultados relacionados a sus valores de AUC y AUC_{FPR} , con respecto a las técnicas moleculares como PCR, qPCR y LAMP, se ha visto en paralelo el cambio en su procedimiento (dirigido a nuevas dianas moleculares con diferentes reactivos) y componentes (proteínas solas o conjunto de proteínas recombinantes), además como tecnología la adaptación a diferentes medios de aplicación; si bien muchos de los trabajos abarcaron más de una técnica para brindar un contraste en sus resultados, las características de su muestra poblacional, manifestación clínica de Leishmaniasis, como la obtención del tipo de muestra a analizar ha generado demasiada variabilidad que hace necesario contar con más estudios con los mismos parámetros para ofrecer un análisis más orientado a sus objetivos, en la misma línea ofrecer la especie de Leishmania contribuye aminorando el tiempo de respuesta al tratamiento, sin dejar de lado el estado del paciente en la transición por la enfermedad como el estilo de vida, la genética o enfermedades subyacentes como el VIH que exacerba los síntomas de todo el grupo de enfermedades que en sí es la Leishmaniasis.

6. Referencias bibliográficas

1. Leonardo Sánchez-Saldaña D, ana Sáenz-Anduaga E, Pancorbo-Mendoza J, Zegarra-Del-Carpio R, Garcés-Velasco N, berto Regis-Roggero A. LEISHMANIASIS. *Leishmaniasis Dermatología Peruana*. 2004;14(2).
2. Vaselek S, Prudhomme J, Myskova J, Lestinova T, Spitzova T, Bañuls AL, et al. Comparative Study of Promastigote- and Amastigote-Initiated Infection of *Leishmania infantum* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in *Phlebotomus perniciosus* (Diptera: Psychodidae) Conducted in Different Biosafety Level Laboratories. *J Med Entomol* [Internet]. 2020 Feb 27 [cited 2021 Oct 24];57(2):601–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31702779/>
3. Kaye P, Scott P. Leishmaniasis: complexity at the host–pathogen interface. *Nature Reviews Microbiology* 2011 9:8 [Internet]. 2011 Jul 11 [cited 2021 Dec 13];9(8):604–15. Available from: <https://www.nature.com/articles/nrmicro2608>
4. Borghi S, Fattori V, Conchon-Costa I, Pinge-Filho P, Pavanelli W, Verri W. *Leishmania* infection: painful or painless? *Parasitol Res* [Internet]. 2017 Feb 1 [cited 2021 Oct 24];116(2):465–75. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27933392/>
5. Loría-Cervera EN, Andrade-Narvaez F. The role of monocytes/macrophages in *Leishmania* infection: A glance at the human response. *Acta Trop* [Internet]. 2020 Jul 1 [cited 2021 Dec 13];207. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32222362/>
6. Toepp AJ, Petersen CA. The balancing act: Immunology of leishmaniosis. *Res Vet Sci* [Internet]. 2020 Jun 1 [cited 2021 Dec 13];130:19–25. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32109759/>
7. Sunter J, Gull K. Shape, form, function and *Leishmania* pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding. *Open Biol* [Internet]. 2017 Sep 1 [cited 2021 Oct 24];7(9). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28903998/>
8. Leishmaniasis - OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud [Internet]. [cited 2021 Oct 13]. Available from: <https://www.paho.org/es/temas/leishmaniasis>
9. Galluzzi L, Ceccarelli M, Diotallevi A, Menotta M, Magnani M. Real-time PCR applications for diagnosis of leishmaniasis. *Parasit Vectors* [Internet]. 2018 May 2 [cited 2021 Oct 13];11(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29716641/>
10. Ferreras González A, García Cuartero I, Gato Díez A, Ferreras Fernández P. Infecciones por protozoos hemoflagelados: leishmaniasis, enfermedad de Chagas y tripanosomiasis africana. *Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*. 2014 Apr 1;11(54):3194–207.
11. Aguilar D, Arenas C, Lopes L, Camargo C, Carvalho E, Castro M del M, et al. Atlas interactivo de leishmaniasis en las Américas: aspectos clínicos y diagnósticos diferenciales [Internet]. Atlas interactivo de leishmaniasis en las Américas: aspectos clínicos y diagnósticos diferenciales. Organización Panamericana de la Salud; 2020 [cited 2021 Oct 13]. Available from: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/52645>

12. Mannan S, Elhadad H, Loc T, Sadik M, Mohamed M, Nam N, et al. Prevalence and associated factors of asymptomatic leishmaniasis: a systematic review and meta-analysis. *Parasitol Int* [Internet]. 2021 Apr 1 [cited 2021 Oct 19];81. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33144197/>
13. Yon C. Situación epidemiológica de la Leishmaniasis en el Perú [Internet]. 2021 [cited 2022 Nov 15]. Available from: <https://www.dge.gob.pe/portalnuevo/wp-content/uploads/2021/10/Situaci%C3%B3n-epidemiol%C3%B3gica-de-la-Leishmaniasis-en-el-Per%C3%BA-SE-40.pdf>
14. Sánchez MB, Germanó MJ, Salomón MC, Scelta J, García Bustos MF, Ginevro PM, et al. Leishmania (L.) amazonensis infection impairs reproductive and fetal parameters in female mice. *Rev Argent Microbiol* [Internet]. 2021 Jul 1 [cited 2021 Oct 12];53(3):194–201. Available from: <https://www.elsevier.es/es-revista-revista-argentina-microbiologia-372-articulo-leishmania-l-amazonensis-infection-impairs-S0325754120300948>
15. Burza S, Croft S, Boelaert M. Leishmaniasis. *Lancet* [Internet]. 2018 Sep 15 [cited 2021 Oct 13];392(10151):951–70. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30126638/>
16. Ghorbani M, Farhoudi R. Leishmaniasis in humans: drug or vaccine therapy? *Drug Des Devel Ther* [Internet]. 2017 [cited 2021 Oct 13];12:25–40. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29317800/>
17. Andrade MC, Bonan PRF, Hilan E, Marques NP, de Carvalho SFG, Junior HM. COVID-19 Pandemic Causes Increased Clinic Visits with Diagnosis of Tegumentary Leishmaniasis in Brazil in 2020. *International Journal of Infectious Diseases* [Internet]. 2021 Oct 7 [cited 2021 Oct 13]; Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1201971221007955>
18. Okwor I, Uzonna J. Social and Economic Burden of Human Leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 2016 Mar 1 [cited 2021 Oct 5];94(3):489–93. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26787156/>
19. Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PLoS One* [Internet]. 2012 May 31 [cited 2021 Oct 5];7(5):e35671. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0035671>
20. Akhoundi M, Downing T, Votýpka J, Kuhls K, Lukeš J, Cannet A, et al. Leishmania infections: Molecular targets and diagnosis. *Mol Aspects Med* [Internet]. 2017 Oct 1 [cited 2021 Oct 13];57:1–29. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28159546/>
21. Lee YH. An overview of meta-analysis for clinicians. *Korean J Intern Med* [Internet]. 2018 Mar 1 [cited 2023 Oct 23];33(2):277. Available from: [/pmc/articles/PMC5840596/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30126638/)
22. Trueba-Gómez R, Estrada-Lorenzo JM. La base de datos PubMed y la búsqueda de información científica. Vol. 11, Seminarios de la Fundación Española de Reumatología. 2010. p. 49–63.
23. Pita Fernández S, Pértegas Díaz S. Pruebas diagnósticas: Sensibilidad y especificidad. In: *Metodología de la Investigación*. España: Fisterra; 2003. p. 120–4.

24. Vizcaíno-Salazar GJ. Importancia del cálculo de la sensibilidad, la especificidad y otros parámetros estadísticos en el uso de las pruebas de diagnóstico clínico y de laboratorio. *Medicina & Laboratorio* [Internet]. 2017 Aug 30 [cited 2023 Oct 11];23:365–86. Available from: <https://docs.bvsalud.org/biblioref/2018/05/883697/importancia-calculo-sensibilidad-y-especificidad.pdf>
25. XLSTAT. ANÁLISIS DETALLADO DE SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD [Internet]. ANÁLISIS DETALLADO DE SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD. [cited 2023 Oct 9]. Available from: <https://www.xlstat.com/es/soluciones/funciones/analisis-detallado-de-sensibilidad-y-especificidad>
26. Shim SR, Kim SJ, Lee J. Diagnostic test accuracy: application and practice using R software. *Epidemiol Health*. 2019;41:e2019007.
27. Organización Mundial de Sanidad Animal. Leishmaniasis. In: *Manual Terrestre de la OIE 2021* [Internet]. 2021 [cited 2022 Nov 17]. p. 1–13. Available from: https://www.woah.org/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/3.01.11_Leishmaniosis.pdf
28. MINISTERIO DE SALUD DEL PERÚ. Vigilancia, prevención y control de Leishmaniasis [Internet]. [cited 2022 Nov 18]. Available from: <https://www.dge.gob.pe/portalnuevo/vigilancia-epidemiologica/subsistema-de-vigilancia/enfermedades-metaxenicas-o-arbovirosis/vigilancia-prevencion-y-control-de-leishmaniasis/>
29. Cubas S, Centeno-Leguía D, Arteaga-Levis K, Depaz-López E. Revisión clínica y epidemiológica de la leishmaniasis tegumentaria en una región central del Perú. *Rev Chilena Infectol* [Internet]. 2019 [cited 2022 Nov 18];36(6):707–15. Available from: https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182019000600707#B10
30. Organización Panamericana de la Salud. Manual de procedimientos para vigilancia y control de Leishmaniasis en las américas [Internet]. Washington, D.C.; 2019 [cited 2022 Nov 18]. Available from: https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/50524/9789275320631_spa.pdf
31. Gomes AHS, Armelin IM, Menon SZ, Pereira-Chioccola VL. Leishmania (V.) braziliensis: detection by PCR in biopsies from patients with cutaneous leishmaniasis. *Exp Parasitol*. 2008 Jul;119(3):319–24.
32. Neitzke-Abreu HC, Venazzi MS, Bernal MVZ, Reinhold-Castro KR, Vagetti F, Mota CA, et al. Detection of DNA from Leishmania (Viannia): accuracy of polymerase chain reaction for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *PLoS One*. 2013;8(7):e62473.
33. Garcia AL, Parrado R, de Doncker S, Bermudez H, Dujardin JC. American tegumentary leishmaniasis: direct species identification of Leishmania in non-invasive clinical samples. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2007 Apr;101(4):368–71.
34. Soares KA, Urdapilleta AAA, Santos GM dos, Carneiro AL, Gomes CM, Roselino AM, et al. Field validation of a Leishmania (Leishmania) mexicana exo-antigens ELISA for diagnosing tegumentary leishmaniasis in regions of Leishmania (Viannia) predominance. *Braz J Infect Dis*. 2015;19(3):302–7.

35. Gomes CM, de Paula NA, Cesetti M v, Roselino AM, Sampaio RNR. Mucocutaneous leishmaniasis: accuracy and molecular validation of noninvasive procedures in a L. (V.) braziliensis-endemic area. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2014 Aug;79(4):413–8.
36. Hossain F, Picado A, Owen SI, Ghosh P, Chowdhury R, Maruf S, et al. Evaluation of Loopamp™ Leishmania Detection Kit and Leishmania Antigen ELISA for Post-Elimination Detection and Management of Visceral Leishmaniasis in Bangladesh. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021;11:670759.
37. Moreno EC, Melo MN, Lambertucci JR, Serufo JC, Andrade ASR, Antunes CMF, et al. Diagnosing human asymptomatic visceral leishmaniasis in an urban area of the State of Minas Gerais, using serological and molecular biology techniques. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2006;39(5):421–7.
38. Celeste BJ, Arroyo Sanchez MC, Ramos-Sanchez EM, Castro LGM, Lima Costa FA, Goto H. Recombinant *Leishmania infantum* heat shock protein 83 for the serodiagnosis of cutaneous, mucosal, and visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*. 2014 May;90(5):860–5.
39. Kumar D, Kumar S, Chakravarty J, Sundar S. A novel 12.6-kDa protein of *Leishmania donovani* for the diagnosis of Indian visceral leishmaniasis. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2011 Oct;11(10):1359–64.
40. Islam MZ, Itoh M, Shamsuzzaman SM, Mirza R, Matin F, Ahmed I, et al. Diagnosis of visceral leishmaniasis by enzyme-linked immunosorbent assay using urine samples. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2002 Jul;9(4):789–94.
41. Duarte MC, Pimenta DC, Menezes-Souza D, Magalhães RDM, Diniz JLCP, Costa LE, et al. Proteins Selected in *Leishmania (Viannia) braziliensis* by an Immunoproteomic Approach with Potential Serodiagnosis Applications for Tegumentary Leishmaniasis. *Clin Vaccine Immunol*. 2015 Nov;22(11):1187–96.
42. Barbosa-De-Deus R, dos Mares-Guia ML, Nunes AZ, Costa KM, Junqueira RG, Mayrink W, et al. *Leishmania major*-like antigen for specific and sensitive serodiagnosis of human and canine visceral leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2002 Nov;9(6):1361–6.
43. Galai Y, Chabchoub N, Ben-Abid M, Ben-Abda I, Ben-Alaya-Bouafif N, Amri F, et al. Diagnosis of mediterranean visceral leishmaniasis by detection of leishmania antibodies and leishmania DNA in oral fluid samples collected using an Oracol device. *J Clin Microbiol*. 2011 Sep;49(9):3150–3.
44. Mohapatra TM, Singh DP, Sen MR, Bharti K, Sundar S. Comparative evaluation of rK9, rK26 and rK39 antigens in the serodiagnosis of Indian visceral leishmaniasis. *J Infect Dev Ctries*. 2010 Mar 8;4(2):114–7.
45. Salotra P, Sreenivas G, Beena KR, Mukherjee A, Ramesh V. Parasite detection in patients with post kala-azar dermal leishmaniasis in India: a comparison between molecular and immunological methods. *J Clin Pathol*. 2003 Nov;56(11):840–3.
46. Abass E, Bollig N, Reinhard K, Camara B, Mansour D, Visekruna A, et al. rKLO8, a novel *Leishmania donovani* - derived recombinant immunodominant protein for sensitive detection of visceral leishmaniasis in Sudan. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(7):e2322.

47. Bandyopadhyay S, Chatterjee M, Pal S, Waller RF, Sundar S, McConville MJ, et al. Purification, characterization of O-acetylated sialoglycoconjugates-specific IgM, and development of an enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis and follow-up of indian visceral leishmaniasis patients. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2004 Sep;50(1):15–24.
48. Zeyrek FY, Korkmaz M, Ozbel Y. Serodiagnosis of anthroponotic cutaneous leishmaniasis (ACL) caused by *Leishmania tropica* in Sanliurfa Province, Turkey, where ACL Is highly endemic. *Clin Vaccine Immunol*. 2007 Nov;14(11):1409–15.
49. Fonseca AM, Faria AR, Rodrigues FTG, Nagem RAP, Magalhães RDM, Cunha JLR, et al. Evaluation of three recombinant *Leishmania infantum* antigens in human and canine visceral leishmaniasis diagnosis. *Acta Trop*. 2014 Sep;137:25–30.
50. Kumar R, Pai K, Kumar P, Pandey HP, Sundar S. Sero-epidemiological study of kala-azar in a village of Varanasi district, India. *Trop Med Int Health*. 2006 Jan;11(1):41–8.
51. Abeijon C, Campos-Neto A. Potential non-invasive urine-based antigen (protein) detection assay to diagnose active visceral leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(5):e2161.
52. Maache M, Azzouz S, Diaz de la Guardia R, Alvarez P, Gil R, de Pablos LM, et al. Host humoral immune response to *Leishmania* lipid-binding protein. *Parasite Immunol*. 2005 Jun;27(6):227–34.
53. Costa MM, Penido M, dos Santos MS, Doro D, de Freitas E, Michalick MSM, et al. Improved canine and human visceral leishmaniasis immunodiagnosis using combinations of synthetic peptides in enzyme-linked immunosorbent assay. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(5):e1622.
54. de Doncker S, Hutse V, Abdellati S, Rijal S, Singh Karki BM, Decuyper S, et al. A new PCR-ELISA for diagnosis of visceral leishmaniasis in blood of HIV-negative subjects. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2005 Jan;99(1):25–31.
55. Szargiki R, Castro EA de, 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. *Braz J Infect Dis*. 2009 Feb;13(1):47–52.
56. Abass EM, Mansour D, el Mutasim M, Hussein M, el Harith A. Beta-mercaptoethanol-modified ELISA for diagnosis of visceral leishmaniasis. *J Med Microbiol*. 2006 Sep;55(Pt 9):1193–6.
57. Machado de Assis TS, Rabello A, Werneck GL. Latent class analysis of diagnostic tests for visceral leishmaniasis in Brazil. *Trop Med Int Health*. 2012 Oct;17(10):1202–7.
58. Vaish M, Singh OP, Chakravarty J, Sundar S. rK39 antigen for the diagnosis of visceral leishmaniasis by using human saliva. *Am J Trop Med Hyg*. 2012 Apr;86(4):598–600.
59. Junqueira Pedras M, Orsini M, Castro M, Passos VMA, Rabello A. Antibody subclass profile against *Leishmania braziliensis* and *Leishmania amazonensis* in the diagnosis and follow-up of mucosal leishmaniasis. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2003 Nov;47(3):477–85.
60. Pedras MJ, de Gouvêa Viana L, de Oliveira EJ, Rabello A. Comparative evaluation of direct agglutination test, rK39 and soluble antigen ELISA and IFAT for the diagnosis of visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2008 Feb;102(2):172–8.

61. Ghosh P, Bhaskar KRH, Hossain F, Khan MAA, Vallur AC, Duthie MS, et al. Evaluation of diagnostic performance of rK28 ELISA using urine for diagnosis of visceral leishmaniasis. *Parasit Vectors*. 2016 Jul 4;9(1):383.
62. Menezes-Souza D, Mendes TA de O, Nagem RAP, Santos TT de O, Silva ALT, Santoro MM, et al. Mapping B-cell epitopes for the peroxidoxin of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and its potential for the clinical diagnosis of tegumentary and visceral leishmaniasis. *PLoS One*. 2014;9(6):e99216.
63. Vaish M, Bhatia A, Reed SG, Chakravarty J, Sundar S. Evaluation of rK28 antigen for serodiagnosis of visceral Leishmaniasis in India. *Clin Microbiol Infect*. 2012 Jan;18(1):81–5.
64. Vallur AC, Tutterrow YL, Mohamath R, Pattabhi S, Hailu A, Abdoun AO, et al. Development and comparative evaluation of two antigen detection tests for Visceral Leishmaniasis. *BMC Infect Dis*. 2015 Sep 22;15:384.
65. Daprà F, Scalone A, Mignone W, Ferroglio E, Mannelli A, Biglino A, et al. Validation of a recombinant based antibody ELISA for diagnosis of human and canine leishmaniasis. *J Immunoassay Immunochem*. 2008;29(3):244–56.
66. Garcia-Miss MR, Andrade-Narvaez FJ, Esquivel-Viñas RE, Simmonds-Diaz EB, Canto-Lara SB, Cruz-Ruiz AL. Localized cutaneous leishmaniasis (chiclero's ulcer) in Mexico: sensitivity and specificity of ELISA for IgG antibodies to *Leishmania mexicana mexicana*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1990;84(3):356–8.
67. Braz RFS, Nascimento ET, Martins DRA, Wilson ME, Pearson RD, Reed SG, et al. The sensitivity and specificity of *Leishmania chagasi* recombinant K39 antigen in the diagnosis of American visceral leishmaniasis and in differentiating active from subclinical infection. *Am J Trop Med Hyg*. 2002 Oct;67(4):344–8.
68. Abeijon C, Alves F, Monnerat S, Wasunna M, Mbui J, Viana AG, et al. Development of a Multiplexed Assay for Detection of *Leishmania donovani* and *Leishmania infantum* Protein Biomarkers in Urine Samples of Patients with Visceral Leishmaniasis. *J Clin Microbiol*. 2019 May;57(5).
69. Bracamonte ME, Álvarez AM, Sosa AM, Hoyos CL, Lauthier JJ, Cajal SP, et al. High performance of an enzyme linked immunosorbent assay for American tegumentary leishmaniasis diagnosis with *Leishmania (Viannia) braziliensis* amastigotes membrane crude antigens. *PLoS One*. 2020;15(5):e0232829.
70. Sato CM, Sanchez MCA, Celeste BJ, Duthie MS, Guderian J, Reed SG, et al. Use of Recombinant Antigens for Sensitive Serodiagnosis of American Tegumentary Leishmaniasis Caused by Different *Leishmania* Species. *J Clin Microbiol*. 2017 Feb;55(2):495–503.
71. Lima MP, Costa LE, Duarte MC, Menezes-Souza D, Salles BCS, de Oliveira Santos TT, et al. Evaluation of a hypothetical protein for serodiagnosis and as a potential marker for post-treatment serological evaluation of tegumentary leishmaniasis patients. *Parasitol Res*. 2017 Apr;116(4):1197–206.
72. Abeijon C, Alves F, Monnerat S, Mbui J, Viana AG, Almeida RM, et al. Urine-based antigen detection assay for diagnosis of visceral leishmaniasis using monoclonal antibodies specific

- for six protein biomarkers of *Leishmania infantum* / *Leishmania donovani*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2020 Apr;14(4):e0008246.
73. Freire ML, Machado de Assis T, Oliveira E, Moreira de Avelar D, Siqueira IC, Barral A, et al. Performance of serological tests available in Brazil for the diagnosis of human visceral leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019 Jul;13(7):e0007484.
 74. Ribeiro PAF, Dias DS, Lage DP, Costa LE, Salles BCS, Steiner BT, et al. A conserved *Leishmania* hypothetical protein evaluated for the serodiagnosis of canine and human visceral and tegumentary leishmaniasis, as well as a serological marker for the posttreatment patient follow-up. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2018 Nov;92(3):196–203.
 75. Oliveira-da-Silva JA, Machado AS, Ramos FF, Tavares GS v, Lage DP, Ludolf F, et al. Evaluation of *Leishmania infantum* pyridoxal kinase protein for the diagnosis of human and canine visceral leishmaniasis. *Immunol Lett*. 2020 Apr;220:11–20.
 76. Deepachandi B, Weerasinghe S, Ranasinghe S, Andrahennadi TP, Wickramanayake MN, Siri S, et al. First Serological Study Revealing High Humoral Response and Evidence for Antigenic Heterogeneity in *Leishmania donovani* Induced CL in Sri Lanka. *Biomed Res Int*. 2020;2020:5271657.
 77. Rodrigues MR, Santos LMO, Miyazaki CK, Martins VT, Ludolf FR, Kursancew AC, et al. Immunodiagnosis of human and canine visceral leishmaniasis using recombinant *Leishmania infantum* Prohibitin protein and a synthetic peptide containing its conformational B-cell epitope. *J Immunol Methods*. 2019 Nov;474:112641.
 78. Costa LE, Salles BCS, Santos TTO, Ramos FF, Lima MP, Lima MIS, et al. Antigenicity of phage clones and their synthetic peptides for the serodiagnosis of canine and human visceral leishmaniasis. *Microb Pathog*. 2017 Sep;110:14–22.
 79. Saliba JW, Lopes KF, Silva-Pereira RA, Teixeira LAS, Oliveira E. *Leishmania infantum* exo-antigens: application toward serological diagnosis of visceral leishmaniasis. *Parasitol Res*. 2019 Jul;118(7):2317–23.
 80. Salam MA, Huda MM, Khan MGM, Shomik MS, Mondal D. Evidence-based diagnostic algorithm for visceral leishmaniasis in Bangladesh. *Parasitol Int*. 2021 Feb;80:102230.
 81. Santos ARR dos, Serufo ÂV, Figueiredo MM, Godoi LC, Vitória JG, Marcelino AP, et al. Evaluation of three recombinant proteins for the development of ELISA and immunochromatographic tests for visceral leishmaniasis serodiagnosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2019 Feb 4;114:e180405.
 82. Carvalho AMRS, Costa LE, Salles BCS, Santos TTO, Ramos FF, Lima MP, et al. An ELISA immunoassay employing a conserved *Leishmania* hypothetical protein for the serodiagnosis of visceral and tegumentary leishmaniasis in dogs and humans. *Cell Immunol*. 2017 Aug;318:42–8.
 83. Dias DS, Ribeiro PAF, Salles BCS, Santos TTO, Ramos FF, Lage DP, et al. Serological diagnosis and prognostic of tegumentary and visceral leishmaniasis using a conserved *Leishmania* hypothetical protein. *Parasitol Int*. 2018 Jun;67(3):344–50.

84. Machado AS, Ramos FF, Santos TTO, Costa LE, Ludolf F, Lage DP, et al. A new Leishmania hypothetical protein can be used for accurate serodiagnosis of canine and human visceral leishmaniasis and as a potential prognostic marker for human disease. *Exp Parasitol*. 2020 Sep;216:107941.
85. Salles BCS, Costa LE, Alves PT, Dias ACS, Vaz ER, Menezes-Souza D, et al. Leishmania infantum mimotopes and a phage-ELISA assay as tools for a sensitive and specific serodiagnosis of human visceral leishmaniasis. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2017 Mar;87(3):219–25.
86. Cataldo JI, de Queiroz Mello FC, Mouta-Confort E, de Fátima Madeira M, de Oliveira Schubach A, da Silva Genestra M, et al. Immunoenzymatic assay for the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis using soluble and membrane-enriched fractions from infectious Leishmania (Viannia) braziliensis. *J Clin Lab Anal*. 2010;24(5):289–94.
87. Lakhali S, Mekki S, Ben-Abda I, Mousli M, Amri F, Aoun K, et al. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay based on crude Leishmania histone proteins for serodiagnosis of human infantile visceral leishmaniasis. *Clin Vaccine Immunol*. 2012 Sep;19(9):1487–91.
88. Mansour D, Abass EM, el Mutasim M, Mahamoud A, el Harith A. Use of a newly developed beta-mercaptoethanol enzyme-linked immunosorbent assay to diagnose visceral leishmaniasis in patients in eastern Sudan. *Clin Vaccine Immunol*. 2007 Dec;14(12):1592–5.
89. Souza AP, Soto M, Costa JML, Boaventura VS, de Oliveira CI, Cristal JR, et al. Towards a more precise serological diagnosis of human tegumentary leishmaniasis using Leishmania recombinant proteins. *PLoS One*. 2013;8(6):e66110.
90. Kumar S, Kumar D, Chakravarty J, Rai M, Sundar S. Identification and characterization of a novel Leishmania donovani antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*. 2012 Apr;86(4):601–5.
91. Oliveira GGS, Magalhães FB, Teixeira MCA, Pereira AM, Pinheiro CGM, Santos LR, et al. Characterization of novel Leishmania infantum recombinant proteins encoded by genes from five families with distinct capacities for serodiagnosis of canine and human visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*. 2011 Dec;85(6):1025–34.
92. Kurkjian KM, Vaz LE, Haque R, Cetre-Sossah C, Akhter S, Roy S, et al. Application of an improved method for the recombinant k 39 enzyme-linked immunosorbent assay to detect visceral leishmaniasis disease and infection in Bangladesh. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2005 Dec;12(12):1410–5.
93. Fargeas C, Hommel M, Maingon R, Dourado C, Monsigny M, Mayer R. Synthetic peptide-based enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol*. 1996 Feb;34(2):241–8.
94. Silva LA, Romero HD, Nogueira Nascentes GA, Costa RT, Rodrigues V, Prata A. Antileishmania immunological tests for asymptomatic subjects living in a visceral leishmaniasis-endemic area in Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 2011 Feb;84(2):261–6.
95. Montoya Y, Leon C, Talledo M, Nolasco O, Padilla C, Muñoz-Najar U, et al. Recombinant antigens for specific and sensitive serodiagnosis of Latin American tegumentary leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1997;91(6):674–6.

96. Kumar S, Kumar D, Chakravarty J, Sundar S. Identification and Characterization of a Novel, 37-Kilodalton *Leishmania donovani* antigen for diagnosis of Indian visceral leishmaniasis. *Clin Vaccine Immunol*. 2011 May;18(5):772–5.
97. de Assis TSM, Caligiorne RB, Romero GAS, Rabello A. Detection of *Leishmania* kDNA in human serum samples for the diagnosis of visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2009 Dec;103(12):1269–72.
98. Redhu NS, Dey A, Balooni V, Singh S. Use of immunoglobulin g avidity to determine the course of disease in visceral and post-kala-azar dermal leishmaniasis patients. *Clin Vaccine Immunol*. 2006 Aug;13(8):969–71.
99. Lemos EM, Carvalho SFG, Corey R, Dietze R. [Evaluation of a rapid test using recombinant k39 antigen in the diagnosis of visceral leishmaniasis in Brazil]. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2003;36 Suppl 2:36–8.
100. Garcia LM, Coelho-Dos-Reis JGA, Peruhype-Magalhães V, Teixeira-Carvalho A, Rocha RDR, Araújo MSS, et al. Anti-fixed *Leishmania chagasi* promastigotes IgG antibodies detected by flow cytometry (FC-AFPA-IgG) as a tool for serodiagnosis and for post-therapeutic cure assessment in American visceral leishmaniasis. *J Immunol Methods*. 2009 Oct 31;350(1–2):36–45.
101. Vallur AC, Reinhart C, Mohamath R, Goto Y, Ghosh P, Mondal D, et al. Accurate Serodetection of Asymptomatic *Leishmania donovani* Infection by Use of Defined Antigens. *J Clin Microbiol*. 2016 Apr;54(4):1025–30.
102. Silva ED, Oliveira BC, Oliveira AP, Santos WJT, Diniz GT, de Melo Neto OP, et al. Performance evaluation of anti-fixed *Leishmania infantum* promastigotes immunoglobulin G (IgG) detected by flow cytometry as a diagnostic tool for visceral Leishmaniasis. *J Immunol Methods*. 2019 Jun;469:18–25.
103. Abass E, Kang C, Martinkovic F, Semião-Santos SJ, Sundar S, Walden P, et al. Heterogeneity of *Leishmania donovani* parasites complicates diagnosis of visceral leishmaniasis: comparison of different serological tests in three endemic regions. *PLoS One*. 2015;10(3):e0116408.
104. Chauhan IS, Shukla R, Krishna S, Sekhri S, Kaushik U, Baby S, et al. Recombinant *Leishmania* Rab6 (rLdRab6) is recognized by sera from visceral leishmaniasis patients. *Exp Parasitol*. 2016 Nov;170:135–47.
105. Mosleh IM, Saliba EK, al-Khateeb MS, Bisharat Z, Oumeish OY, Bitar W. Serodiagnosis of cutaneous leishmaniasis in Jordan using indirect fluorescent antibody test and the enzyme-linked immunosorbent assay. *Acta Trop*. 1995 May;59(2):163–72.
106. Siqueira WF, Viana AG, Reis Cunha JL, Rosa LM, Bueno LL, Bartholomeu DC, et al. The increased presence of repetitive motifs in the KDDR-plus recombinant protein, a kinesin-derived antigen from *Leishmania infantum*, improves the diagnostic performance of serological tests for human and canine visceral leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2021 Sep;15(9):e0009759.
107. Figueiredo MM, dos Santos ARR, Godoi LC, de Castro NS, de Andrade BC, Sergio SAR, et al. Improved Performance of ELISA and Immunochromatographic Tests Using a New

- Chimeric A2-Based Protein for Human Visceral Leishmaniasis Diagnosis. *J Immunol Res.* 2021;2021:5568077.
108. Lévêque MF, Battery E, Delaunay P, Lmimouni BE, Aoun K, L'Ollivier C, et al. Evaluation of six commercial kits for the serological diagnosis of Mediterranean visceral leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2020 Mar;14(3):e0008139.
 109. Bagchi AK, Tiwari S, Gupta S, Katiyar JC. The latex agglutination test: standardization and comparison with direct agglutination and dot-ELISA in the diagnosis of visceral leishmaniasis in India. *Ann Trop Med Parasitol.* 1998 Mar;92(2):159–63.
 110. Okong'o-Odera EA, Wamachi A, Kagai JM, Kurtzhals JA, Githure JI, Hey AS, et al. Field application of an ELISA using redefined *Leishmania* antigens for the detection of visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1993;87(4):423–4.
 111. Rezaei Z, Pourabbas B, Asaei S, Kühne V, Sepehrpour S, Pouladfar G, et al. Pediatric visceral leishmaniasis: a retrospective study to propose the diagnostic tests algorithm in southern Iran. *Parasitol Res.* 2021 Apr;120(4):1447–53.
 112. Cañavate C, Herrero M, Nieto J, Cruz I, Chicharro C, Aparicio P, et al. Evaluation of two rK39 dipstick tests, direct agglutination test, and indirect fluorescent antibody test for diagnosis of visceral leishmaniasis in a new epidemic site in highland Ethiopia. *Am J Trop Med Hyg.* 2011 Jan;84(1):102–6.
 113. Gallardo JA, Pineda JA, Macías J, Torronteras R, Lissen E. Specificity of a commercial indirect immunofluorescence technique in the diagnosis of visceral leishmaniasis in patients infected with HIV-1. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1996;90(4):383.
 114. Rocha RDR, Gontijo CMF, Elói-Santos SM, Teixeira-Carvalho A, Corrêa-Oliveira R, Ferrari TCA, et al. Clinical value of anti-live *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* immunoglobulin G subclasses, detected by flow cytometry, for diagnosing active localized cutaneous leishmaniasis. *Trop Med Int Health.* 2006 Feb;11(2):156–66.
 115. Iqbal J, Hira PR, Saroj G, Philip R, Al-Ali F, Madda PJ, et al. Imported visceral leishmaniasis: diagnostic dilemmas and comparative analysis of three assays. *J Clin Microbiol.* 2002 Feb;40(2):475–9.
 116. Saghrouni F, Gaïed-Meksi S, Fathallah A, Amri F, Ach H, Guizani I, et al. Immunochromatographic rK39 strip test in the serodiagnosis of visceral leishmaniasis in Tunisia. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2009 Dec;103(12):1273–8.
 117. do Vale INPC, Saliba JW, Fonseca GSF, Peruhype-Magalhães V, de Araújo FF, Pascoal-Xavier MA, et al. Laboratorial algorithm for serological diagnosis of visceral leishmaniasis using rK39-ICT, DAT-LPC and FC-Simplex IgG1. *J Immunol Methods.* 2020 May;480:112765.
 118. Bangert M, Flores-Chávez MD, Llanes-Acevedo IP, Arcones C, Chicharro C, García E, et al. Validation of rK39 immunochromatographic test and direct agglutination test for the diagnosis of Mediterranean visceral leishmaniasis in Spain. *PLoS Negl Trop Dis.* 2018 Mar;12(3):e0006277.

119. Schallig HDFH, Canto-Cavalheiro M, da Silva ES. Evaluation of the direct agglutination test and the rK39 dipstick test for the sero-diagnosis of visceral leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2002 Oct;97(7):1015–8.
120. Sundar S, Singh RK, Maurya R, Kumar B, Chhabra A, Singh V, et al. Serological diagnosis of Indian visceral leishmaniasis: direct agglutination test versus rK39 strip test. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2006 Jun;100(6):533–7.
121. Moura AS, Lopes HMR de O, Mourão MVA, Morais MHF. Performance of a rapid diagnostic test for the detection of visceral leishmaniasis in a large urban setting. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2013;46(5):589–93.
122. Sinha PK, Bimal S, Pandey K, Singh SK, Ranjan A, Kumar N, et al. A community-based, comparative evaluation of direct agglutination and rK39 strip tests in the early detection of subclinical *Leishmania donovani* infection. *Ann Trop Med Parasitol.* 2008 Mar;102(2):119–25.
123. Singh D, Pandey K, Das VNR, Das S, Verma N, Ranjan A, et al. Evaluation of rK-39 strip test using urine for diagnosis of visceral leishmaniasis in an endemic region of India. *Am J Trop Med Hyg.* 2013 Feb;88(2):222–6.
124. Figueiredo MM, dos Santos ARR, Godoi LC, de Castro NS, de Andrade BC, Sergio SAR, et al. Improved Performance of ELISA and Immunochromatographic Tests Using a New Chimeric A2-Based Protein for Human Visceral Leishmaniasis Diagnosis. *J Immunol Res.* 2021;2021:5568077.
125. Herrera G, Castillo A, Ayala MS, Flórez C, Cantillo-Barraza O, Ramirez JD. Evaluation of four rapid diagnostic tests for canine and human visceral Leishmaniasis in Colombia. *BMC Infect Dis.* 2019 Aug 27;19(1):747.
126. Bern C, Jha SN, Joshi AB, Thakur GD, Bista MB. Use of the recombinant K39 dipstick test and the direct agglutination test in a setting endemic for visceral leishmaniasis in Nepal. *Am J Trop Med Hyg.* 2000;63(3–4):153–7.
127. Ayelign B, Jemal M, Negash M, Genetu M, Wondmagegn T, Zeleke AJ, et al. Validation of in-house liquid direct agglutination test antigen: the potential diagnostic test in visceral Leishmaniasis endemic areas of Northwest Ethiopia. *BMC Microbiol.* 2020 Apr 15;20(1):90.
128. Chappuis F, Rijal S, Jha UK, Desjeux P, Karki BMS, Koirala S, et al. Field validity, reproducibility and feasibility of diagnostic tests for visceral leishmaniasis in rural Nepal. *Trop Med Int Health.* 2006 Jan;11(1):31–40.
129. de Assis TSM, Braga AS da C, Pedras MJ, Oliveira E, Barral A, de Siqueira IC, et al. Multi-centric prospective evaluation of rk39 rapid test and direct agglutination test for the diagnosis of visceral leishmaniasis in Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2011 Feb;105(2):81–5.
130. Osman HA, Mahamoud A, Abass EM, Madi RR, Semiao-Santos SJ, el Harith A. Local Production of a Liquid Direct Agglutination Test as a Sustainable Measure for Control of Visceral Leishmaniasis in Sudan. *Am J Trop Med Hyg.* 2016 May 4;94(5):982–6.
131. Siripattanapipong S, Kato H, Tan-Ariya P, Mungthin M, Leelayoova S. Comparison of Recombinant Proteins of Kinesin 39, Heat Shock Protein 70, Heat Shock Protein 83, and

- Glycoprotein 63 for Antibody Detection of *Leishmania martiniquensis* Infection. *J Eukaryot Microbiol.* 2017 Nov;64(6):820–8.
132. de Silva G, Somaratne V, Senaratne S, Vipuladasa M, Wickremasinghe R, Wickremasinghe R, et al. Efficacy of a new rapid diagnostic test kit to diagnose Sri Lankan cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania donovani*. *PLoS One.* 2017;12(11):e0187024.
 133. Verma S, Bhandari V, Avishek K, Ramesh V, Salotra P. Reliable diagnosis of post-kala-azar dermal leishmaniasis (PKDL) using slit aspirate specimen to avoid invasive sampling procedures. *Trop Med Int Health.* 2013 Mar;18(3):268–75.
 134. Khan MGM, Bhaskar KRH, 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. *Parasit Vectors.* 2012 Dec 3;5:280.
 135. Sundar S, Singh RK, Bimal SK, Gidwani K, Mishra A, Maurya R, et al. Comparative evaluation of parasitology and serological tests in the diagnosis of visceral leishmaniasis in India: a phase III diagnostic accuracy study. *Trop Med Int Health.* 2007 Feb;12(2):284–9.
 136. Singh R, Subba Raju B v, Jain RK, Salotra P. Potential of direct agglutination test based on promastigote and amastigote antigens for serodiagnosis of post-kala-azar dermal leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2005 Oct;12(10):1191–4.
 137. Khan MGM, Bhaskar KRH, Kikuchi M, Salam MA, Akther T, Haque R, et al. Comparison of PCR-based diagnoses for visceral leishmaniasis in Bangladesh. *Parasitol Int.* 2014 Apr;63(2):327–31.
 138. Vogt F, Mengesha B, Asmamaw H, Mekonnen T, Fikre H, Takele Y, et al. Antigen Detection in Urine for Noninvasive Diagnosis and Treatment Monitoring of Visceral Leishmaniasis in Human Immunodeficiency Virus Coinfected Patients: An Exploratory Analysis from Ethiopia. *Am J Trop Med Hyg.* 2018 Oct;99(4):957–66.
 139. Oliveira E, Oliveira D, Cardoso FA, Barbosa JR, Marcelino AP, Dutra T, et al. Multicentre evaluation of a direct agglutination test prototype kit (DAT-LPC) for diagnosis of visceral leishmaniasis. *Parasitology.* 2017 Dec;144(14):1964–70.
 140. Ben-Abid M, Galai Y, Habboul Z, Ben-Abdelaziz R, Ben-Sghaier I, Aoun K, et al. Diagnosis of Mediterranean visceral leishmaniasis by detection of *Leishmania*-related antigen in urine and oral fluid samples. *Acta Trop.* 2017 Mar;167:71–2.
 141. Chappuis F, Rijal S, Jha UK, Desjeux P, Karki BMS, Koirala S, et al. Field validity, reproducibility and feasibility of diagnostic tests for visceral leishmaniasis in rural Nepal. *Trop Med Int Health.* 2006 Jan;11(1):31–40.
 142. Akhouni B, Mohebbali M, Shojaee S, Jalali M, Kazemi B, Bandehpour M, et al. Rapid detection of human and canine visceral leishmaniasis: assessment of a latex agglutination test based on the A2 antigen from amastigote forms of *Leishmania infantum*. *Exp Parasitol.* 2013 Mar;133(3):307–13.
 143. Salam MA, Khan MGM, Mondal D. Urine antigen detection by latex agglutination test for diagnosis and assessment of initial cure of visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2011 May;105(5):269–72.

144. Akhoundi B, Mohebal M, Babakhan L, Edrissian GH, Eslami MB, Keshavarz H, et al. Rapid detection of human *Leishmania infantum* infection: a comparative field study using the fast agglutination screening test and the direct agglutination test. *Travel Med Infect Dis*. 2010 Sep;8(5):305–10.
145. Oliveira E, Saliba SW, Saliba JW, Rabello A. Validation of a direct agglutination test prototype kit for the diagnosis of visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2013 Apr;107(4):243–7.
146. Lito G, Davachi F, Sulcebe G, Bregu H, Basha M. Pediatric visceral leishmaniasis in Albania. *International Journal of Infectious Diseases*. 2002 Mar;6(1):66–8.
147. Oliveira E, Saliba SW, Andrade CF de, Rabello A. Direct agglutination test (DAT): improvement of biosafety for laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2011 Jul;105(7):414–6.
148. Hasnain MG, Ghosh P, Baker J, Mondal D. An evaluation of the performance of direct agglutination test on filter paper blood sample for the diagnosis of visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*. 2014 Aug;91(2):342–4.
149. Bimal S, Das VNR, Sinha PK, Gupta AK, Verma N, Ranjan A, et al. Usefulness of the direct agglutination test in the early detection of subclinical *Leishmania donovani* infection: a community-based study. *Ann Trop Med Parasitol*. 2005 Dec;99(8):743–9.
150. el Harith A, Chowdhury S, al-Masum A, Semião-Santos S, Karim E, el-Safi S, et al. Evaluation of cleaving agents other than trypsin in direct agglutination test for further improving diagnosis of visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol*. 1995 Aug;33(8):1984–8.
151. Oliveira E, Pedras MJ, de Assis IEM, Rabello A. Improvement of direct agglutination test (DAT) for laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis in Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2009 Dec;103(12):1279–81.
152. Rijal S, Boelaert M, Regmi S, Karki BMS, Jacquet D, Singh R, et al. Evaluation of a urinary antigen-based latex agglutination test in the diagnosis of kala-azar in eastern Nepal. *Trop Med Int Health*. 2004 Jun;9(6):724–9.
153. Abdallah KAA, Nour BYM, Schallig HDFH, Mergani A, Hamid Z, Elkarim AA, et al. Evaluation of the direct agglutination test based on freeze-dried *Leishmania donovani* promastigotes for the serodiagnosis of visceral leishmaniasis in Sudanese patients. *Trop Med Int Health*. 2004 Oct;9(10):1127–31.
154. Hailu A. The use of direct agglutination test (DAT) in serological diagnosis of Ethiopian cutaneous leishmaniasis. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2002 Apr;42(4):251–6.
155. Singla N, Singh GS, Sundar S, Vinayak VK. Evaluation of the direct agglutination test as an immunodiagnostic tool for kala-azar in India. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1993;87(3):276–8.
156. Oskam L, Nieuwenhuijs JL, Hailu A. Evaluation of the direct agglutination test (DAT) using freeze-dried antigen for the detection of anti-*Leishmania* antibodies in stored sera from various patient groups in Ethiopia. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1999;93(3):275–7.

157. Meredith SE, Kroon NC, Sondorp E, Seaman J, Goris MG, van Ingen CW, et al. Leish-KIT, a stable direct agglutination test based on freeze-dried antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol.* 1995 Jul;33(7):1742–5.
158. Moody AH, el-Safi SH. A latex agglutination test for the serodiagnosis of visceral leishmaniasis in Sudan. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1996;90(5):522.
159. Schoone GJ, Hailu A, Kroon CC, Nieuwenhuys JL, Schallig HD, Oskam L. A fast agglutination screening test (FAST) for the detection of anti-*Leishmania* antibodies. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2001;95(4):400–1.
160. Abass EM, Mansour D, el Mutasim M, Hussein M, el Harith A. Beta-mercaptoethanol-modified ELISA for diagnosis of visceral leishmaniasis. *J Med Microbiol.* 2006 Sep;55(Pt 9):1193–6.
161. Kumar R, Pai K, Kumar P, Pandey HP, Sundar S. Sero-epidemiological study of kala-azar in a village of Varanasi district, India. *Trop Med Int Health.* 2006 Jan;11(1):41–8.
162. Attar ZJ, Chance ML, el-Safi S, Carney J, Azazy A, El-Hadi M, et al. Latex agglutination test for the detection of urinary antigens in visceral leishmaniasis. *Acta Trop.* 2001 Jan 15;78(1):11–6.
163. Chappuis F, Rijal S, Singh R, Acharya P, Karki BMS, Das ML, et al. Prospective evaluation and comparison of the direct agglutination test and an rK39-antigen-based dipstick test for the diagnosis of suspected kala-azar in Nepal. *Trop Med Int Health.* 2003 Mar;8(3):277–85.
164. Sundar S, Singh RK, Maurya R, Kumar B, Chhabra A, Singh V, et al. Serological diagnosis of Indian visceral leishmaniasis: direct agglutination test versus rK39 strip test. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2006 Jun;100(6):533–7.
165. Singh R, Subba Raju B v, Jain RK, Salotra P. Potential of direct agglutination test based on promastigote and amastigote antigens for serodiagnosis of post-kala-azar dermal leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2005 Oct;12(10):1191–4.
166. Gonçalves CCM, Reiche EMV, de Abreu Filho BA, Silveira TGV, Felizardo TC, Maia KR, et al. Evaluation of antigens from various *Leishmania* species in a Western blot for diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 2002 Jan;66(1):91–102.
167. Boni SM, Oyafuso LK, Soler R de C, Lindoso JAL. Efficiency of noninvasive sampling methods (swab) together with Polymerase Chain Reaction (PCR) for diagnosing American Tegumentary Leishmaniasis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2017 Jun 1;59:e38.
168. Montalvo AM, Alba A, Fraga J, Marzoa A, Torres C, Muskus C. Improving the sensitivity of an hsp20-based PCR for genus detection of *Leishmania* parasites in cutaneous clinical samples: a proof of concept. *Parasitol Res.* 2020 Jan;119(1):345–9.
169. Hossain F, Ghosh P, Khan MAA, Duthie MS, Vallur AC, Picone A, et al. Real-time PCR in detection and quantitation of *Leishmania donovani* for the diagnosis of Visceral Leishmaniasis patients and the monitoring of their response to treatment. *PLoS One.* 2017;12(9):e0185606.
170. Deepachandi B, Weerasinghe S, Soysa P, Karunaweera N, Siriwardana Y. A highly sensitive modified nested PCR to enhance case detection in leishmaniasis. *BMC Infect Dis.* 2019 Jul 15;19(1):623.

171. Brustoloni YM, Lima RB, da Cunha RV, Dorval ME, Oshiro ET, de Oliveira ALL, et al. Sensitivity and specificity of polymerase chain reaction in Giemsa-stained slides for diagnosis of visceral leishmaniasis in children. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007 Jun;102(4):497–500.
172. Ovalle-Bracho C, Díaz-Toro YR, Muvdi-Arenas S. Polymerase chain reaction-miniexon: a promising diagnostic method for mucocutaneous leishmaniasis. *Int J Dermatol*. 2016 May;55(5):531–9.
173. Safaei A, Motazedian MH, Vasei M. Polymerase chain reaction for diagnosis of cutaneous leishmaniasis in histologically positive, suspicious and negative skin biopsies. *Dermatology*. 2002;205(1):18–24.
174. Ovalle Bracho C, Porras de Quintana L, Muvdi Arenas S, Rios Parra M. Polymerase chain reaction with two molecular targets in mucosal leishmaniasis' diagnosis: a validation study. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007 Aug;102(5):549–54.
175. Basiye FL, Mbuchi M, Magiri C, Kirigi G, Deborggraeve S, Schoone GJ, et al. Sensitivity and specificity of the Leishmania OligoC-TesT and NASBA-oligochromatography for diagnosis of visceral leishmaniasis in Kenya. *Trop Med Int Health*. 2010 Jul;15(7):806–10.
176. Motazedian M, Fakhar M, Motazedian MH, Hatam G, Mikaeili F. A urine-based polymerase chain reaction method for the diagnosis of visceral leishmaniasis in immunocompetent patients. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2008 Feb;60(2):151–4.
177. Azmi K, Nasereddin A, Ereqat S, Schnur L, Schonian G, Abdeen Z. Methods incorporating a polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism and their use as a “gold standard” in diagnosing Old World cutaneous leishmaniasis. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2011 Oct;71(2):151–5.
178. Fagundes A, Schubach A, Paula CC de, Bogio A, Antonio L de F, Schiavoni PB, et al. Evaluation of polymerase chain reaction in the routine diagnosis for tegumentary leishmaniasis in a referral centre. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2010 Feb;105(1):109–12.
179. Pedrosa CMS, Ximenes RA de A, Almeida WAP de, Rocha EMM da. Validity of the polymerase chain reaction in the diagnosis of clinically suspected cases of American visceral leishmaniasis. *Braz J Infect Dis*. 2013;17(3):319–23.
180. Cruz I, Cañavate 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. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2002 Apr;96 Suppl 1:S185-9.
181. Lemrani M, Hamdi S, Laamrani A, Hassar M. PCR detection of *Leishmania* in skin biopsies. *J Infect Dev Ctries*. 2009 Sep 15;3(2):115–22.
182. Srivastava P, Mehrotra S, Tiwary P, Chakravarty J, Sundar S. Diagnosis of Indian visceral leishmaniasis by nucleic acid detection using PCR. *PLoS One*. 2011 Apr 29;6(4):e19304.
183. Salam MA, Mondal D, Kabir M, Ekram ARMS, Haque R. PCR for diagnosis and assessment of cure in kala-azar patients in Bangladesh. *Acta Trop*. 2010 Jan;113(1):52–5.

184. Isaza DM, Arboleda M, Restrepo M, McCann SHE, Barker DC. Validation of the polymerase chain reaction for the diagnosis of human cutaneous leishmaniasis in north-west Colombia. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2002 Apr;96 Suppl 1:S165-8.
185. 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. *Parasit Vectors.* 2014 Sep 4;7:420.
186. Vaish M, Mehrotra S, Chakravarty J, Sundar S. Noninvasive molecular diagnosis of human visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol.* 2011 May;49(5):2003-5.
187. Muñoz EB, Santander S, Rojas-Silva P, Cardenas PA, Fornasini M, Cifuentes SC, et al. Diagnostic Efficacy of Molecular Techniques for Detection and Identification of *Leishmania* Species in Human Whole Blood and Skin Samples from Ecuador. *Am J Trop Med Hyg.* 2016 Oct 5;95(4):803-5.
188. Molina I, Fisa R, Riera C, Falcó V, Elizalde A, Salvador F, et al. Ultrasensitive real-time PCR for the clinical management of visceral leishmaniasis in HIV-Infected patients. *Am J Trop Med Hyg.* 2013 Jul;89(1):105-10.
189. Kaouech E, Kallel K, Toumi NH, Belhadj S, Anane S, Babba H, et al. Pediatric visceral leishmaniasis diagnosis in Tunisia: comparative study between optimised PCR assays and parasitological methods. *Parasite.* 2008 Jun;15(2):143-50.
190. Nuzum E, White F, Thakur C, Dietze R, Wages J, Grogl M, et al. Diagnosis of symptomatic visceral leishmaniasis by use of the polymerase chain reaction on patient blood. *J Infect Dis.* 1995 Mar;171(3):751-4.
191. Maurya R, Singh RK, Kumar B, Salotra P, Rai M, Sundar S. Evaluation of PCR for diagnosis of Indian kala-azar and assessment of cure. *J Clin Microbiol.* 2005 Jul;43(7):3038-41.
192. Lachaud L, Dereure J, Chabbert E, Reynes J, Mauboussin JM, Oziol E, et al. Optimized PCR using patient blood samples for diagnosis and follow-up of visceral Leishmaniasis, with special reference to AIDS patients. *J Clin Microbiol.* 2000 Jan;38(1):236-40.
193. 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. *Trop Med Int Health.* 2008 Nov;13(11):1378-83.
194. Disch J, Pedras MJ, Orsini M, Pirmez C, de Oliveira MC, Castro M, et al. *Leishmania* (*Viannia*) subgenus kDNA amplification for the diagnosis of mucosal leishmaniasis. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2005 Mar;51(3):185-90.
195. Rodrigues EHG, Felinto de Brito ME, Mendonça MG, Werkhäuser RP, Coutinho EM, Souza W v, et al. Evaluation of PCR for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis in an area of endemicity in northeastern Brazil. *J Clin Microbiol.* 2002 Oct;40(10):3572-6.
196. Mathis A, Deplazes P. PCR and in vitro cultivation for detection of *Leishmania* spp. in diagnostic samples from humans and dogs. *J Clin Microbiol.* 1995 May;33(5):1145-9.

197. Gangneux JP, Menotti J, Lorenzo F, Sarfati C, Blanche H, Bui H, et al. Prospective value of PCR amplification and sequencing for diagnosis and typing of old world *Leishmania* infections in an area of nonendemicity. *J Clin Microbiol.* 2003 Apr;41(4):1419–22.
198. 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. *J Clin Microbiol.* 2001 Mar;39(3):849–54.
199. Disch J, Maciel FC, de Oliveira MC, Orsini M, Rabello A. Detection of circulating *Leishmania chagasi* DNA for the non-invasive diagnosis of human infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2003;97(4):391–5.
200. de Doncker S, Hutse V, Abdellati S, Rijal S, Singh Karki BM, Decuyper S, et al. A new PCR-ELISA for diagnosis of visceral leishmaniasis in blood of HIV-negative subjects. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2005 Jan;99(1):25–31.
201. de Assis TSM, Caligiorne RB, Romero GAS, Rabello A. Detection of *Leishmania* kDNA in human serum samples for the diagnosis of visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2009 Dec;103(12):1269–72.
202. Gomes CM, Cesetti MV, de Paula NA, Vernal S, Gupta G, Sampaio RNR, et al. Field Validation of SYBR Green- and TaqMan-Based Real-Time PCR Using Biopsy and Swab Samples To Diagnose American Tegumentary Leishmaniasis in an Area Where *Leishmania (Viannia) braziliensis* Is Endemic. *J Clin Microbiol.* 2017 Feb;55(2):526–34.
203. Eberhardt E, van den Kerkhof M, Bulté D, Mabilille D, van Bockstal L, Monnerat S, et al. Evaluation of a Pan-*Leishmania* Spliced-Leader RNA Detection Method in Human Blood and Experimentally Infected Syrian Golden Hamsters. *J Mol Diagn.* 2018 Mar;20(2):253–63.
204. Morais RCS de, Melo MGN de, Goes TC de, Pessoa E Silva R, Morais RF de, Guerra JA de O, et al. Duplex qPCR for *Leishmania* species identification using lesion imprint on filter paper. *Exp Parasitol.* 2020 Dec;219:108019.
205. Soroka M, Wasowicz B, Rymaszewska A. Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP): The Better Sibling of PCR? *Cells.* 2021 Jul 29;10(8).
206. Dixit KK, Verma S, Singh OP, Singh D, Singh AP, Gupta R, et al. Validation of SYBR green I based closed tube loop mediated isothermal amplification (LAMP) assay and simplified direct-blood-lysis (DBL)-LAMP assay for diagnosis of visceral leishmaniasis (VL). *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2018 Nov 1 [cited 2023 Oct 30];12(11):e0006922. Available from: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0006922>
207. Boelaert M, Verdonck K, Menten J, Sunyoto T, van Griensven J, Chappuis F, et al. Rapid tests for the diagnosis of visceral leishmaniasis in patients with suspected disease. *Cochrane Database Syst Rev.* 2014 Jun 20;2014(6):CD009135.
208. Alvarez MBMFMAASElena. Diagnóstico de parasitosis importadas en España. In: *Procedimientos en Microbiología Clínica.* 2020. p. 9–25.
209. Walton BPMSMHRJPCR. La prueba Dot-Elisa para la detección de campo de Leishmaniasis Visceral en Honduras. *Bol of Sanit Panam.* 1987;102(1).

210. Cervantes-Landín AY, Martínez-Martínez I, Reyes PA, Shabib M, Espinoza-Gutiérrez B. Estandarización de la técnica Dot-ELISA para la detección de anticuerpos anti-*Trypanosoma cruzi* y su comparación con ELISA y Western blot. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2014 Jun;32(6):363–8.
211. Ellassad A. YS, SM, GJ, P& E& GH. The significance of blood levels of IgM, IgA, IgG and IgG subclasses in Sudanese visceral leishmaniasis patients. *Clin Exp Immunol*. 1994;95:294–9.
212. García M. INMUNOPARASITOLOGÍA DE LEISHMANIA. [España]: UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID; 2017.
213. Lenis A. La respuesta celular inmune en la leishmaniasis cutánea americana. *Biomédica*. 1998;18(4):274–84.
214. Boarino A, Scalone A, Gradoni L, Ferroglio E, Vitale F, Zanatta R, et al. Development of recombinant chimeric antigen expressing immunodominant B epitopes of *Leishmania infantum* for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2005 May;12(5):647–53.
215. Alonso CBRDJMLRNuria. RECOMENDACIONES DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y MICROBIOLOGIA CLINICA [Internet]. Cercenado Emilia, Cantón Rafael, editors. Madrid; 2005 [cited 2023 Sep 17]. 1–62 p. Available from: <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia19.pdf>
216. Herrera SCMarlene. Brucelosis: Diagnóstico Serológico y Vacunas [Internet]. Lima: INSTITUTO NACIONAL DE SALUD Centro Nacional de Productos Biológicos ; 2003 [cited 2023 Sep 17]. Available from: <https://aulavirtualhistorico.ins.gob.pe/bitstream/handle/20.500.14196/119/CNPB-0004.pdf?sequence=3&isAllowed=y>
217. Essentials of Real-Time PCR | Thermo Fisher Scientific - PE [Internet]. [cited 2023 Sep 17]. Available from: <https://www.thermofisher.com/pe/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/essentials-real-time-pcr.html>
218. Montalvo AM, Fraga J, Montano I, Monzote L, Van der Auwera G, Marín M, et al. Identificación molecular de aislamientos clínicos de *Leishmania* spp. procedentes de Colombia con base en el gen hsp70. *Biomédica*. 2016 Feb 23;36:37–44.
219. Van der Auwera G, Maes I, De Doncker S, Ravel C, Cnops L, Van Esbroeck M, et al. Heat-shock protein 70 gene sequencing for *Leishmania* species typing in European tropical infectious disease clinics. *Euro Surveill*. 2013 Jul 25;18(30):20543.
220. Jiménez BFMSMLMMACGabriel. Diagnóstico y tipos de PCR. Revisión bibliográfica. *Revista Sanitaria de Investigación*. 2021 Aug;2(8).
221. Mugasa CM, Deborgraeve S, Schoone GJ, Laurent T, Leeftang MM, Ekangu RA, et al. Accordance and concordance of PCR and NASBA followed by oligochromatography for the molecular diagnosis of *Trypanosoma brucei* and *Leishmania*. *Tropical Medicine & International Health*. 2010 Jul;15(7):800–5.

222. Armas R. Medicina Interna Basada en la Evidencia 2022/23 Compendio. 4.a. 2022.

