

**VALIDACION DEL DIAGNÓSTICO CLINICO EN LEISHMANIASIS CUTANEA,  
REALIZADO POR MEDIADORES COMUNITARIOS PARA USO EN EL AREA  
RURAL**

**JUANA PATRICIA SÁNCHEZ VILLAMIL**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
DEPARTAMENTO DE SALUD PÚBLICA  
ESCUELA DE MEDICINA  
MAESTRÍA EN EPIDEMIOLOGÍA  
BUCARAMANGA  
2006**

**VALIDACION DEL DIAGNÓSTICO CLINICO EN LEISHMANIASIS CUTANEA,  
REALIZADO POR MEDIADORES COMUNITARIOS PARA USO EN EL AREA  
RURAL**

**JUANA PATRICIA SÁNCHEZ VILLAMIL**

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar  
al título de Magíster en Epidemiología**

**Director:  
GERARDO MUÑOZ MANTILLA, PH.D. LSHTM  
Asesor:  
LUIS CARLOS OROZCO VARGAS, MD. MSC EPIDEMIOLOGÍA**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
DEPARTAMENTO DE SALUD PÚBLICA  
ESCUELA DE MEDICINA  
MAESTRÍA EN EPIDEMIOLOGÍA  
BUCARAMANGA  
2006**

## **DEDICATORIA**

Dedico este logro en mi vida a mis padres, quienes son mi ejemplo de amor, dedicación y camino hacia el continuo desarrollo personal

A mis hermanas, quienes me acompañan y alientan mis logros

y a mi esposo, quien me anima a seguir adelante en mis proyectos

Todos juntos, de quienes siempre he recibido el apoyo incondicional para el logro de mis sueños.

**JUANITA**

## **AGRADECIMIENTOS**

Doy gracias.....

A Dios, por ser esa fuerza interior y consejo divino que nos da la capacidad de transformar nuestros más bellos deseos en realidad.

A Dios, por tener la gracia de darme un seno familiar como el que me han brindado mis padres, quienes son el más bello deseo hecho realidad.

A mis padres Saúl y María Alix y a mis hermanas Erika y Sandra Milena, por su amor y apoyo, motivo y soporte de mi dedicación.

A mi compañero de maestría, novio y esposo, Jefferson Antonio Buendía, por ser siempre los oídos que me escucharon y la voz que me acompañó y orientó.

A los docentes de la maestría, por su generosidad y aporte valioso de conocimiento y experiencia. En especial a la Coordinadora de la Maestría Myriam Orostegui Arenas, quien fue ese brazo amigo y voz de compañía a la mitad del camino. Y al profesor Luis Carlos Orozco Vargas, quien me brindó sus sabios y oportunos consejos.

Al profesor Gerardo Muñoz por el recurso económico, tecnológico y humano para la realización de mi trabajo; además de las muchas enseñanzas que dejó para mi vida personal.

Al doctor Jorge Vásquez por su valiosa y desmedida colaboración.

A Don Expedito, Gabriel y Saúl Arce, mano derecha de todo el proceso operativo del trabajo de investigación.

A todas las personas habitantes de Landázuri, El Playón y Rionegro, que recibieron y acogieron al grupo de trabajo del profesor Muñoz y a mí, y que voluntariamente y sin deseo de retribución, formaron un equipo, trabajaron y a la vez lideraron un proyecto que, más que un aporte a la ciencia, es el reflejo de la lucha y el deseo por su salud y la de su comunidad, en aquellas zonas donde los problemas sociales, económicos y geográficos condicionan su bienestar.

## CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	
SUMMARY	
INTRODUCCION	1
2. OBJETIVOS	3
2.1 OBJETIVO GENERAL	3
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
3. MARCO TEORICO	4
3.1 PERSPECTIVA HISTÓRICA	3
3.2 DEFINICIÓN LEISHMANIASIS	5
3.2.1 Etiología de la leishmaniasis	5
3.2.2 Manifestaciones clínicas de la leishmaniasis	9
3.3 EPIDEMIOLOGIA DE LA ENFERMEDAD	11
3.4 CRITERIOS DE DIAGNOSTICO PARA LEISHMANIASIS CUTANEA	13
3.4.1 Diagnóstico Clínico	13
3.4.2 Diagnostico Parasitológico	14
3.5 MÉTODOS ANALÍTICOS – EVALUACIÓN DE TECNOLOGÍA DIAGNÓSTICA	15
3.5.1 Validez de una prueba diagnóstica. Sensibilidad y Especificidad	17
3.5.2 Seguridad de una prueba diagnóstica. Valores Predictivos.	17
3.5.3 Reproducibilidad	18
3.6 Evaluación de Tecnologías Diagnósticas en leishmaniasis cutánea	19
4. MATERIALES Y METODOS	27

4.1 TIPO DE ESTUDIO	24
4.2 TIPO DE MUESTREO	24
4.3 ESTÁNDAR DE REFERENCIA	24
4.4 POBLACIÓN Y MUESTRA	24
4.4.1 Cálculo de tamaño de muestra para Sensibilidad y Especificidad	25
4.5 CAPTACIÓN DE CASOS	27
4.6 RECOLECCIÓN DE LA INFORMACIÓN	29
4.7 CONTROL DE SESGOS	31
4.8 VARIABLES	32
4.9 PROCESAMIENTO DE LOS DATOS	33
4.10 PLAN DE ANÁLISIS	33
4.11 ASPECTOS ÉTICOS	34
5. RESULTADOS	36
5.1 POBLACION DE ESTUDIO	36
5.2 PREVALENCIA DEL DIAGNOSTICO DE LEISHMANIASIS CUTANEA	38
5.3 RESULTADOS DE LOS TESTS	38
5.4 INDICES DE VALIDEZ	40
5.5 REPRODUCIBILIDAD	43
6. DISCUSION	44
7. CONCLUSIONES	48
8. RECOMENDACIONES	49
ANEXOS	50
BIBLIOGRAFIA	66

## LISTA DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
Tabla 1. Desarrollo histórico de la leishmaniasis en el mundo	4
Tabla 2. Descripción cronológica de la clasificación de <i>Leishmania</i>	5
Tabla 3. Clasificación de las especies del género <i>Leishmania</i> , subgénero <i>Viannia</i> (V.)	7
Tabla 4. Principales especies del género <i>Leishmania</i> , subgénero <i>Leishmania</i> (L.)	8
Tabla 5. Distribución de los parásitos de leishmaniasis cutánea en los países amazónicos.	9
Tabla 6. Estudios de evaluación de métodos diagnósticos para <i>Leishmania</i>	21
Tabla 7. Sensibilidades y Especificidades de pruebas diagnósticas en leishmaniasis	22
Tabla 8. Estándares de referencia utilizados en evaluación de métodos diagnósticos para <i>Leishmania</i>	23
Tabla 9. Cálculos de tamaño de muestra iniciales	26
Tabla 10. Cálculos de tamaño de muestra ajustando prevalencia	27
Tabla 11. Descripción de variables utilizadas en este estudio	32
Tabla 12. Características personales y clínicas de la población del estudio	37
Tabla 13. Distribución de resultados por tipo de prueba parasitológica que compone el Estándar de referencia.	39
Tabla 14. Características clínicas observadas por los TSC, según diagnóstico definido por Estándar de referencia	40
Tabla 15. Escala de certeza del diagnóstico clínico por TSC	40
Tabla 16. Criterios de Validez de la escala de grado de certeza TSC	41
Tabla 17. Índices de calidad según punto de corte en Escala de grado de certeza	41

## LISTA DE GRAFICOS

	<b>Pág.</b>
Gráfico 1. Diagrama de flujo de la recolección de datos	36
Gráfico 2. Curva ROC, escala de precisión diagnóstica TSC	42
Gráfico 3. Curva QROC, escala de precisión diagnóstica TSC	42

## LISTA DE ANEXOS

	<b>Pág.</b>
Anexo A. Mapa de Distribución casos de Leishmaniasis, Santander 2005	51
Anexo B. Leishmaniasis cutánea localizada - ulcera granulomatosa en mano	52
Anexo C. Consentimiento Informado	53
Anexo D. Ficha Clínico – epidemiológica	54
Anexo E. Técnicas y Procedimientos de Obtención y procesamiento de Muestras Parasitológicas	55
Anexo F. Formato de Registro Diagnostico Laboratorio Clínico	59
Anexo G. Calculo criterios de validez por punto de corte en la escala de certeza diagnostica por el TSC	60
Anexo H. Tablas 2 x 2 evaluación reproducibilidad inter-evaluador por punto de corte en la escala de certeza diagnostica por el TSC	63
Anexo I. Índices de acuerdo proporcional en decisiones positivas y negativas entre dos observadores	65

## RESUMEN

**TITULO:** VALIDACION DEL DIAGNÓSTICO CLINICO EN LEISHMANIASIS CUTANEA, REALIZADO POR MEDIADORES COMUNITARIOS PARA USO EN EL AREA RURAL\*

**AUTORA:** Juana Patricia Sánchez Villamil †

**PALABRAS CLAVES:** Leishmaniasis cutánea; Pruebas Diagnósticos; Sensibilidad y Especificidad; Reproducibilidad; Validez.

### DESCRIPCION O CONTENIDO

**Objetivo.** Evaluar la reproducibilidad y validez del diagnóstico clínico de leishmaniasis cutánea realizado por Trabajadores Comunitarios en Salud (TSC), en tres municipios endémicas en Santander, tomando como Estándar de referencia el resultado positivo en al menos un método parasitológico. **Metodología:** Estudio de Evaluación de Tecnologías Diagnósticas. Se realizó el estudio en 196 personas con lesiones en piel y tiempo de evolución mayor a 15 días. A cada uno les fue hecho diagnóstico clínico por TSC capacitados, y pruebas parasitológicas como examen directo, cultivo y PCR. La validez del diagnóstico clínico se evaluó en una escala de certeza de 1 a 5. El poder de discriminación diagnóstica se evaluó mediante curvas ROC; y se evaluó la reproducibilidad, en 59 casos, entre dos TSC utilizando proporción de acuerdos positivos y negativos. **Resultados.** La prevalencia del diagnóstico positivo de leishmaniasis cutánea fue 83% (IC 95% 77 – 88). Para todos los grados de certeza del diagnóstico clínico, la sensibilidad estuvo entre 52% y 98% ( $k(1,0) = 39\%$ ) y la especificidad entre 9% y 55% ( $k(0,0) = 14\%$ ). El área bajo la curva ROC fue de 56.5% (IC95% 45.6 – 67.4) La proporción de acuerdos positivos y negativos fue de 86.3% y 43.5% respectivamente. **Conclusión.** El diagnóstico clínico realizado por TSC no tiene utilidad para establecer diagnóstico de leishmaniasis cutánea. Su mayor capacidad discriminatoria la obtienen cuando consideran como positivas aquellas lesiones en quienes tienen certeza y como negativas los casos en los que no se sabe, se sospecha o se tiene la certeza que no es leishmaniasis.

---

\* Trabajo de investigación.

† Facultad de Salud, Maestría en Epidemiología. Gerardo Muñoz Mantilla.

## SUMMARY

**TITLE: VALIDATION OF CLINICAL DIAGNOSIS IN CUTANEOUS LEISHMANIASIS, PERFORMED BY COMMUNITY HEALTH NETWORKS FOR USE IN RURAL POPULATION ‡**

**AUTHOR:** Juana Patricia Sánchez Villamil §

**KEY WORDS:** Cutaneous Leishmaniasis; diagnostic tests; Sensitivity and Specificity; Reliability; Reproducibility; Validity.

**Aim.** To evaluate reliability and validity of clinical diagnosis in cutaneous Leishmaniasis done by community health networks, in endemic rural areas in Santander, Colombia, taking as Gold Standard diagnosis by at least one of the parasitologic methods. **Methods.** Study of Assessment of diagnostic tests. Participants were 196 patients, with skin lesions and evolution time more than 15 days. At the same time, were practiced clinical diagnostic and tissue samples, culture and Polymerase Chain Reaction (PCR); all they were done by Community Health Workers (TSC). Clinical diagnostic by TSC was evaluate in diagnosis decision-making rating scale to 1 to 5, exploring four test points. The optimal test point was evaluated by Receiver (ROC) and Quality Operating Characteristic curve (QROC); also was evaluated the reproducibility between two TSC with Cohen's kappa and coefficient indexes of proportionate agreement in the observers' positive (Ppos) and negative decisions (Pneg). **Results.** Positive leishmaniasis diagnosis prevalence was 83% (IC 95% 77 – 88%). For all clinical diagnosis decision-making points by TSC, the sensitivity was between 52% y 98% ( $k(1,0) = 39\%$ ) y la especificidad entre 9% y 55% ( $k(0,0) = 14\%$ ). The capacity of discrimination was 56.5% (IC95% 45.6 – 67.4). In 59 patients was obtained two clinical diagnosis evaluated by different and independent TSC, on different times not upper than 15 days. We estimated Ppos 86.3% y Pneg 43.5%. **Conclusion.** The clinical diagnosis done by community health networks don't have utility in diagnosis of cutaneous leishmaniasis; Its upper diagnosis decision threshold, or capacity of discrimination between yes or not leishmaniasis, is obtained when TSC take like positive lesions which ones that are thinking like leishmaniasis with complete certainty and with probable suspicious that is cutaneous leishmaniasis; and take like negative lesions when TSC considered uncertainly diagnosis, or is probable or they are sure that is not a leishmanial lesion.

---

‡ Investigation

§ Health Faculty, Epidemiologist Master Degree. Director: Gerardo Muñoz Mantilla

## INTRODUCCION

La Leishmaniasis es una enfermedad de distribución mundial que afecta 88 países, 72 de estos en vía de desarrollo. Es altamente endémica en muchas regiones de Colombia, predominando la forma cutánea, para la cual se ha registrado incidencia de casos en 471 municipios del país.<sup>1</sup> Después de Brazil, entre los países andinos, Colombia reporta anualmente la mayor incidencia de casos, que durante la década del 90 y especialmente en los últimos años ha mostrado un comportamiento en progresivo aumento.<sup>2,3</sup> Informe del Instituto Nacional de Salud, con los datos obtenidos por medio del Sistema de Vigilancia en Salud Pública (SIVIGILA), dan cuenta a cierre del año 2005 de un total 18.100 casos notificados de leishmaniasis procedentes de todo el país; comparado con el año 2004 hubo un incremento de 3794 casos (21.85%). El 99.34% (17.983) fueron casos de Leishmaniasis Cutánea Localizada (LCL).<sup>4</sup> Para Santander, entre 1994 y 1998, el promedio de casos detectados por vigilancia en salud pública fue de 400, para el 2002 aumentó a 896 casos<sup>5,6</sup> y al 2005 ascendió a 1287 casos (ver Anexo A).

Estos datos sitúan a la leishmaniasis como un evento de salud de alto impacto para el país y específicamente para el Departamento de Santander, que junto con el dengue constituye una de las enfermedades de transmisión vectorial con el mayor reporte en número de casos.<sup>7</sup>

A pesar de que existen herramientas para diagnóstico, tratamiento y control de vectores, estas no han mostrado ser eficientes y se ha observado que el peso de la enfermedad persiste e incluso tiende a aumentar. Es por esto que, con el fin de fortalecer la capacidad de los países en vía de desarrollo para implementar las estrategias de prevención, control y manejo oportuno de la enfermedad, programas internacionales como el “Programa especial para Investigación y entrenamiento en Enfermedades Tropicales” (Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases - TDR)<sup>8</sup> y grupos de investigación, han establecido prioridades en áreas específicas de investigación, entre las que se encuentra el desarrollo, mejoramiento y validación de pruebas diagnósticas de leishmaniasis. La intención es asegurar la implementación y validación de estas y otras

acciones de intervención en la clínica para lograr mitigar los efectos de esta enfermedad, mejorando el pronóstico mediante tratamiento oportuno, y en la comunidad para mediar en la búsqueda activa; con lo cual lograr el control de la enfermedad.

Para el diagnóstico de leishmaniasis cutánea, ya se encuentran estudios previos de tecnologías diagnósticas, donde las técnicas parasitológicas y moleculares se les compara con el diagnóstico hecho por cualquier otra prueba entre ellas mismas; esto, debido a que no existe una prueba de oro definida. Se han determinado criterios de validez como la sensibilidad y en algunas oportunidades especificidad. Los resultados de las pruebas muestran gran variabilidad; datos de sensibilidad de frotis directos, varían de 18,7 a 78,3%;<sup>9, 10</sup> la sensibilidad de métodos de aislamiento como los cultivos, no supera el 60%; y otros métodos como la Reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la sensibilidad y especificidad son casi siempre de 100%. Hasta el momento, ningún estudio ha determinado la reproducibilidad de los pruebas, que es un criterio necesario para la evaluación de herramientas diagnósticas;<sup>11</sup> y algunos métodos han sido evaluados a nivel de infección experimental, donde la evolución de la lesión no se presenta de una forma natural, induciendo probablemente a un aumento en la sensibilidad del método evaluado<sup>12</sup>.

Desafortunadamente, métodos de aislamiento y diagnóstico molecular no se encuentran disponibles en áreas donde se presenta y es endémica la enfermedad. Otros métodos como reglas de predicción clínicas han sido evaluados en Colombia<sup>13</sup>, mostrando que éste método aunque tiene una alta sensibilidad (92.7%) no posee una muy buena especificidad (31.4%). Sin embargo, este método requiere ser evaluado en otros grupos poblacionales. Es por tal razón que el objetivo del presente estudio fue validar el método de diagnóstico clínico en nuestro departamento, con la posibilidad de su incorporación dentro del programa de control de la enfermedad en áreas rurales altamente endémicas.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 GENERAL**

Evaluar la reproducibilidad y validez del diagnóstico clínico de leishmaniasis cutánea realizado por Trabajadores Comunitarios en Salud (TSC), en áreas rurales endémicas en Santander, tomando como estándar de referencia el diagnóstico por al menos uno de los métodos parasitológicos (frotis directo, cultivo por aspirado y Reacción en cadena de la polimerasa).

### **2.2 ESPECIFICOS**

- Determinar la prevalencia del diagnóstico de leishmaniasis cutánea, en casos sospechosos de lesiones en piel en áreas endémicas de Santander.
  
- Evaluar la reproducibilidad del diagnóstico clínico realizado entre dos Trabajadores comunitarios en Salud.
  
- Evaluar la reproducibilidad inter-evaluador de la lectura microscópica del frotis directo de la lesión.
  
- Evaluar la validez de criterio del diagnóstico clínico realizado por TSC, en términos de sensibilidad y especificidad, VPP, VPN e índices de calidad, comparado con el diagnóstico dado por directo de la lesión, cultivo de aspirado de la lesión y Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

### 3. MARCO TEORICO

#### 3.1 PERSPECTIVA HISTÓRICA DE LAS LEISHMANIASIS

La leishmaniasis es una enfermedad que ha acompañado al hombre desde tiempos muy antiguos; su historia se remonta a textos bíblicos como el antiguo testamento y papiros Ebreos en los que se le denominó como forúnculos y granos del Nilo, respectivamente <sup>14</sup>. Pero, aunque la leishmaniasis en varias regiones del mundo y a través de los tiempos había sido descrita clínicamente, recibido diferentes nombres y atribuida a diferentes causas, fue sólo hasta 1903 que se descubrió su agente causal. El siguiente cuadro recoge la historia más relevante, desde entonces, que enmarca el estudio y conocimiento de la enfermedad en la actualidad:

**Tabla 1. Desarrollo histórico de la Leishmaniasis en el mundo**

Año	Descubrimientos
1903	Leishman y Donovan descubren un parásito ovalado en una coloración con Giemsa en macrófagos de pacientes con leishmaniasis visceral.
1903	Wright describe el primer caso de infección por <i>Leishmania tropica</i> .
1904	Roger cultiva por primera vez <i>Leishmania</i> a partir del bazo de un paciente con leishmaniasis visceral (se obtiene la forma promastigote).
1905	Presat por primera vez sugiere que los <i>Phlebotomus</i> serían los vectores o transmisores del Botón de Oriente.
1908	Nicolle cultivó <i>L. infantum</i> y <i>L. tropica</i> en el medio NNN y posteriormente en el medio semisólido para leptospiros de Noguchi.
1910	Nicolle en Túnez y Sergent en Argelia sugieren que el perro serían el reservorio.
1910	Vianna sugiere que la terapia con antimoniales es efectivo para el tratamiento de la leishmaniasis en el Brasil.
1911	Splendore diagnostica la forma mucosa de la enfermedad, obteniendo cultivos positivos a partir de lesiones mucosas.
1911	Vianna propone el nombre de <i>Leishmania braziliensis</i> para denominar al agente que produce la leishmaniasis tegumentaria americana, diferenciándola de la <i>L. tropica</i> .
1913	Pedroso en Brasil reporta por primera vez un perro infectado por <i>Leishmania</i> .
1924	Montenegro presenta su trabajo sobre intradermorreacción en el Brasil
1946	Medina reporta la infección natural con <i>L.(L.) enriettii</i> en conejillos de indias domésticos ( <i>Cavia porcellus</i> ).

Como se observa en la tabla 1, la primera forma de *Leishmania* (*L*) descrita se hizo obteniendo el parásito en pacientes de la India y con enfermedad visceral. El Nuevo Mundo suministró evidencia acerca de la existencia de varios agentes etiológicos

indistinguibles morfológicamente, y otras formas clínicas, cuando Gaspar Vianna en 1911 señaló que las lesiones mucocutáneas o espundia en Brazil, indicaban un parásito diferente llamado *L braziliensis*.

**Tabla 2. Descripción cronológica de la clasificación de *Leishmania***

Parásito	Año	Descubridor
<i>L. mexicana</i>	1953	Biagi
<i>L. mexicana pifanoi</i>	1959	Medina y Romero
<i>L. mexicana amazonensis</i>	1972	Lainson y Shaw
<i>L. mexicana venezuelensis</i>	1980	Bonfante-Garrido
<i>L. brasiliensis brasiliensis</i>	1911	Vianna
<i>L. brasiliensis peruviana</i>	1913	Vélez
<i>L. brasiliensis guyanensis</i>	1954	Floch
<i>L. brasiliensis panamensis</i>	1972	Lainson y Shaw

Lainson y Shaw reconocieron en 1972 que los parásitos de la enfermedad cutánea en las Américas se dividen en dos grupos: Complejo *L. brasiliensis* y *L. mexicana* (ver tabla 2), estableciendo de esta forma, la taxonomía de la *Leishmania* en el Nuevo Mundo <sup>15</sup>. Los criterios para esta clasificación fueron el vector, patogenicidad en hamsters y crecimiento en medio de cultivo.

### 3.2 DEFINICION LEISHMANIASIS

La leishmaniasis es un término con el cual se designa a un grupo de enfermedades producidas por protozoos flagelados del género *Leishmania*, identificados por el médico británico William Leishman en 1903. Esta antropozoonosis es una enfermedad de evolución crónica que se caracteriza por comprometer piel, mucosas y vísceras dependientes de la especie de *Leishmania* causante y de la respuesta inmune del huésped.

#### 3.2.1 ETIOLOGIA DE LA LEISHMANIASIS

La leishmaniasis es producida por la *Leishmania*, un parásito perteneciente a la familia *Trypanosomatidae* que es transmitido por la picadura de la hembra de especies de *Phlebotomus* en Europa, Asia y África, y por especies de *Lutzomyia* en América. Este

parásito se caracteriza porque adopta dos formas diferentes en el transcurso de su ciclo biológico, una denominada amastigote (tejidos del huésped) y otra denominada promastigote (artrópodo vector y cultivos).<sup>16</sup>

El siguiente esquema presenta la clasificación taxonómica del parásito *Leishmania*:

CLASIFICACION	TAXONOMIA
Reino	Protista
Sub-reino	Protozoa
Filo	Sarcomastigophora
Sub-filo	Mastigophora
Clase	Zoomastigophorea
Orden	Kinetoplastida
Sub-orden	Trypanosomatina
Familia	Trypanosamatidae
Género	<i>Leishmania</i>
Sub-género	Leishmania (L.) Viannia (V.)

Existen varias especies de *Leishmania* que se clasifican en dos grandes subgéneros, *Leishmania* y *Viannia*. Las especies de *Leishmania* se comenzaron a clasificar con base al cuadro clínico de la infección que causan, pero actualmente su clasificación se hace por criterios bioquímicos, moleculares<sup>17</sup> y de patrones electroforéticos de enzimas e isoenzimas parasitarias<sup>18</sup>. Existen en todo el mundo cerca de 30 especies de *Leishmania* que infectan a los animales, de las cuales 21 pueden infectar al hombre<sup>19</sup>.

En el Nuevo Mundo sólo 14 especies son conocidas y se asocian con ciertas características clínicas; estas especies de *Leishmania* se distribuyen afectando principalmente a los países latinoamericanos. Las dos siguientes tablas, producto de la revisión de la distribución actual de las principales especies de *Leishmania* en las

Américas realizado por Altamirano <sup>20</sup>, ilustran las especies pertenecientes a cada subgénero y su distribución geográfica en el continente Americano.

**Tabla 3. Clasificación de las especies del género *Leishmania*, subgénero *Viannia* (V.)**

<b>SUBGENERO <i>Viannia</i> (V.) (Lainson &amp; Shaw 1972)</b>	<b>ASPECTOS CLINICOS EN EL HOMBRE</b>	<b>DISTRIBUCION GEOGRAFICA</b>
<b><i>Leshmania</i> (V.) <i>braziliensis</i> (Vianna, 1911)</b>	Lesiones cutáneas y mucosas	Desde América Central hasta el Norte de Argentina.
<b><i>L. (V.) peruviana</i> (Vélez, 1913)</b>	Predominantemente lesiones cutáneas y también ataca las VADS.	Perú, en los valles elevados interandinos y la sierra de costa central, norte y sur de los Andes.
<b><i>L. (V.) guyanensis</i> (Floch, 1954)</b>	Predominantemente lesiones cutáneas	Norte de la cuenca amazónica, Guyanas y noroeste sudamericano.
<b><i>L. (V.) panamensis</i> (Lainson &amp; Shaw, 1972)</b>	Predominantemente lesiones cutáneas	América Central, costa Pacífica de América del Sur y valles interandinos.
<b><i>L. (V.) lainsoni</i> (Silveira et al., 1987)</b>	Lesiones cutáneas, pero raramente infectan al hombre	Región amazónica del Brasil.
<b><i>L. (V.) naiffi</i> (Lainson et al., 1990)</b>	Lesiones cutáneas, pero raramente infectan al hombre	Región amazónica del Brasil.
<b><i>L. (V.) shawi</i> (Shaw et al., 1991)</b>	Lesiones cutáneas, pero raramente acometen al hombre	Región amazónica del Brasil.
<b><i>L. (V.) colombiensis</i> (Kreutzer et al., 1991)</b>	_____	Colombia
<b><i>L. (V.) equatoriensis</i> (Grimaldi et al., 1992)</b>	_____	Ecuador

Fuente: Altamirano AJ.

**Tabla 4. Principales especies del género *Leishmania*, subgénero *Leishmania* (L.)**

<b>SUBGENERO <i>Leishmania</i> (L.) (Saf'yanova 1982)</b>	<b>ASPECTOS CLINICOS EN EL HOMBRE</b>	<b>DISTRIBUCION GEOGRAFICA</b>
<b><i>Leishmania</i> (L.) <i>enrietti</i> (Muniz &amp; Medina, 1948)</b>	¥	Brasil
<b><i>L. (L.) mexicana</i> (Biagi, 1953)</b>	Lesiones cutáneas (y eventualmente cutáneo-difusas)	México y América Central
<b><i>L. (L.) pifanoi</i> (Medina &amp; Romero, 1959)</b>	Lesiones cutáneas (y eventualmente cutáneo-difusas)	Venezuela
<b><i>L. (L.) hertigi</i> (Herrer, 1971)</b>	¥	Panamá
<b><i>L. (L.) amazonensis</i> (Lainson &amp; Shaw, 1972)</b>	Lesiones cutáneas (y eventualmente cutáneo-difusas)	América Central y regiones del norte, noreste y sudeste del Brasil.
<b><i>L. (L.) deanei</i> (Lainson &amp; Shaw, 1977)</b>	¥	Brasil
<b><i>L. (L.) aristidesi</i> (Lainson &amp; Shaw, 1979)</b>	¥	Brasil
<b><i>L. (L.) garnhami</i> (Scorza et al., 1979)</b>	¥	Venezuela
<b><i>L. (L.) venezuelensis</i> (Bonfante-Garrido, 1980)</b>	Lesiones cutáneas	Venezuela
<b><i>L. (L.) forattinii</i> (Yoshida et al., 1993)</b>	¥	Brasil

¥ Todavía no se han encontrado en casos humanos actuales.

Fuente: Altamirano AJ.

En Colombia, estudios de distribución de especies de *Leishmania* aisladas de animales salvajes y domésticos y de mosquitos flebótomos, indica que al menos seis diferentes especies están presentes en el territorio y causan la enfermedad <sup>21</sup>; las más comunes son la *L. panamensis* y la *L. braziliensis* que representan el 53.8% y el 30.3% del total de especies respectivamente, las otras son *L. guyanensis*, *L. mexicana*, *L. amazonensis* y *L. chagasi*. En el siguiente cuadro se observan las especies identificadas hasta el momento en Colombia.

**Tabla 5. Distribución de los parásitos de leishmaniasis cutánea en los países amazónicos.**

Parásitos	Bolivia	Brasil	Colombia	Ecuador	Guyana Francesa	Panamá	Perú	Venezuela
<i>L. amazonensis</i>	X	X	X	X	X	X	X?	X
<i>L. aristidesi</i>		∕						
<i>L. deanei</i>		∕						
<i>L. enrietti</i>		∕						
<i>L. forattinii</i>		∕						
<i>L. garnhami</i>								∕
<i>L. hertigi</i>						∕		
<i>L. mexicana</i>			X	X		X		
<i>L. pifanoi</i>								X
<i>L. Venezuelensis</i>								X
<i>L. braziliensis</i>	X	X	X	X	X?	X	X	X
<i>L. lainsoni</i>		X						
<i>L. naiffi</i>		X						
<i>L. shawi</i>		X						
<i>L. guyanensis</i>		X	X	X	X			
<i>L. peruviana</i>							X	
<i>L. panamensis</i>			X	X		X		X
<i>L. colombiensis</i>			∕			∕		
<i>L. equatoriensis</i>				∕				
<i>L. pifanoi</i>								X

∕: Todavía no se han encontrado en casos humanos actuales.

Fuente: Altamirano AJ

### 3.2.2 MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LAS LEISHMANIASIS

Las manifestaciones clínicas de la leishmaniasis varían y se relacionan con la especie responsable de la infección, el medio ambiente y la respuesta inmune del hospedero <sup>22</sup>. Tres grupos principales de enfermedades han sido descritas: Leishmaniasis cutánea

localizada (LCL), Leishmaniasis cutánea difusa (LCD), <sup>23</sup> Leishmaniasis mucocutánea (LMC), y Leishmaniasis visceral (LV).

La LCL, es aquella forma clínica que se caracteriza por la aparición de lesiones ulcerosas en la piel que dejan cicatrices y tienden a la curación espontáneamente. La úlcera es de de lenta evolución, con bordes regulares o irregulares pero bien definidos, indurados y enrojecidos (eritematosos infiltrados) y un fondo plano granulomatoso, que abarca piel y tejido subcutáneo, generalmente es circular, única y no dolorosa <sup>24</sup>. LCL es restringida a lesiones bien definidas en piel, en las cuales se observa una reacción inflamatoria de células plasmáticas y macrófagos con abundantes parásitos, y un patrón de citoquinas Th1 montada por linfocitos T activados CD4+ ayudadores <sup>25</sup>. Aproximadamente el 10% de pacientes con esta forma clínica, y cuya lesión es causada por *L. braziliensis*, experimentan recaída de la enfermedad después del tratamiento, lo que se ha encontrado asociado con una respuesta débil o negativa a la reacción de hipersensibilidad de tipo retardado a antígenos de promastigotes de *Leishmania* (reflejada por la respuesta al test Montenegro en piel: MST). <sup>26</sup>

La evolución de la enfermedad, es un producto de la interacción entre la respuesta inmunológica y la virulencia del parásito; y es dependiente de un conjunto complejo de interacciones entre las propiedades características de la epidermis <sup>27</sup> y eventos asociados con la inmunidad celular <sup>28</sup>. De las especies asociadas a leishmaniasis cutánea, la infección por *L. chagasi*, y *L. braziliensis* tiene generalmente mayor severidad que *L. panamensis*. Se ha observado que la infección por *L. braziliensis* es más crónica y cursa con lesiones cutáneas mas grandes; el tamaño medio de induración en la prueba de Montenegro también tiende a ser más grande en infecciones por *L. braziliensis* (aún después de controlar por duración de la lesión, tipo y tamaño) <sup>29</sup>. Sin embargo, las recurrencias son más frecuentes en infección por *L. panamensis*.

La LCD es una forma progresiva, anérgica, no ulcerativa de leishmaniasis cutánea, lo cual refleja una severa deficiencia células T antígeno específicas del huésped infectado, que se caracteriza clínicamente por presentar lesiones de largo tiempo de evolución tipo placa o nódulo, únicas o múltiples, en cualquier localización y no dolorosas. <sup>24</sup> Es seguida de lesiones satélites que con el tiempo tienden a cubrir gran parte de la superficie cutánea.

Está relacionada con *L. mexicana*, aunque algunos aislamientos de pacientes con esta forma de la enfermedad han sido recientemente caracterizados como *L. panamensis*.<sup>30</sup>

La LMC es la forma clínica que se manifiesta por la destrucción severa de las membranas nasofaríngeas. Las lesiones son a menudo crónicas y progresivas, reincidiendo después del tratamiento, por cuanto no responde bien al tratamiento con medicamentos antimoniales; en casi todos existe el antecedente de lesiones cutáneas, tratadas o no. La metástasis a los tejidos mucosos ocurre inmediatamente con una lesión crónica, aunque el daño puede presentarse muchos años después de la infección original. Un estudio prospectivo a cinco años de leishmaniasis cutánea en áreas endémicas en Brazil, reveló que la LMC ocurrió en el 2.7% de los pacientes con lesiones primarias y a una mediana de seis años después de esta lesión primaria<sup>31</sup>. Los casos más severos de LMC pueden presentarse con mutilación, deterioro del estado general de salud y aun la muerte, cuando existe un profundo compromiso del sistema respiratorio. LMC con una respuesta de hipersensibilidad de tipo retardada positiva, esta asociada más comúnmente con *L. braziliensis*, y está raramente asociada con otras especies de *Leishmania* al menos en la forma severa. Los agentes etiológicos aislados de pacientes con LMC son *L. braziliensis* y *L. panamensis*.

La LV fue descrita en 1903 por Charles Donovan y también se le denomina kala-azar ó fiebre dum-dum. Su periodo de incubación suele ser de unos 3 meses (4-10 meses) y en pocos casos la enfermedad es aguda y en su mayoría tiene una evolución crónica. Su reservorio doméstico es el perro y el salvaje es el zorro. Se caracteriza porque cursa con fiebre ondulante, pérdida de peso, anemia, ictericia, diarrea, lesiones purpúricas tegumentarias, adenomegalias, hepato y esplenomegalia, que puede causar la muerte por síndrome hemorrágico, sobreinfección y cirrosis. La piel se encuentra hiperpigmentada, signo que origino su nombre en la India.

### **3.3 EPIDEMIOLOGIA DE LA ENFERMEDAD**

La leishmaniasis, es importante en salud pública por la existencia de reservorios asintomáticos, por la transmisión mediada por vectores (mosquitos flebótomos) y por la gran cantidad de zonas aptas en el mundo para su existencia, especialmente las

poblaciones más pobres del mundo donde cada año hay dos millones de casos nuevos <sup>32</sup>. Mundialmente, se estima que existan 200 millones de personas expuestas al riesgo de infección y 300000 casos anuales de LCL <sup>33</sup>.

Esta enfermedad es encontrada en aproximadamente 90 países tropicales y subtropicales en el mundo y en el sur de Europa; más del 90% de los casos de leishmaniasis cutánea están en Afganistán, Algeria, Irán, Irak, Arabia Saudita, Brasil y Perú. En las Américas se presenta desde el sur de los Estados Unidos hasta el norte de la Argentina; Canadá, Chile, Uruguay y la mayoría de las islas del Caribe se encuentran libres de transmisión.

La leishmaniasis forma parte del grupo de enfermedades tropicales transmitidas por vectores (ETV), que suelen ser difíciles de prevenir o controlar debido a la variedad de focos de transmisión de la enfermedad y a factores de riesgo ambientales como el clima, de vivienda por la presencia de animales domésticos, y factores sociales y económicos por las condiciones de pobreza y sanitarias deficientes. Estos focos de transmisión son zonas de bosques tropicales primarios, donde se encuentran animales reservorios y vectores con ciclos de transmisión continuos; Zonas enzoóticas, como aquellas de explotación forestal en las que se establecen asentamientos humanos y se está expuesto a adquirir la infección; Zonas rurales en las cuales se desarrollan actividades pecuarias y agrícolas como la plantación de café y cacao, donde es posible que la transmisión ocurra en o alrededor de las casas.

Entre el periodo de 1996 a 1998, el número promedio de casos de leishmaniasis notificados anualmente en la región Andina fue de 14.082 (rango: 12,659-16,396), de los cuales 6.155 casos se presentaron en Colombia <sup>3</sup>. Se encuentra en el 91% de todo el territorio Colombiano, bajo los 1800 m sobre el nivel del mar y es endémica en muchas zonas rurales.

De las formas clínicas de la leishmaniasis, LCL es la forma más común y representa más del 90% de los casos registrados en países como Venezuela y Perú <sup>34</sup>, y el 95% o más del total de casos en Colombia <sup>35</sup>. Esta enfermedad también tiene importancia para la salud pública debido a la aparición de casos clínicos severos con compromiso mucoso y perforación del septo nasal. Para Santander, un estudio prospectivo realizado durante

1998 mostró que el 2.9% de casos de leishmaniasis cutánea tenían perforación del septo nasal <sup>36</sup>.

### **3.4 CRITERIOS DE DIAGNOSTICO PARA LEISHMANIASIS CUTANEA**

El diagnóstico de leishmaniasis en Colombia se remonta al año de 1893 cuando se hizo la primera descripción clínica bajo el nombre de “bubón de Vélez”. En 1929, se observó las primeras formas de amastigote del parásito en raspados de tejido; y en 1942, se logró el primer aislamiento exitoso del parásito en medios de cultivo, a partir de lesiones cutáneas. Por consiguiente, solo a partir de la mitad del siglo XX se dispone de métodos parasitológicos para el diagnóstico de la enfermedad.

Es importante diferenciar esta enfermedad de otras posibles etiologías (úlceras lepra, cáncer de piel, infecciones) porque su aspecto clínico es similar a estas que también están presentes en las áreas endémicas de leishmaniasis <sup>37</sup>. Es necesario promover la identificación temprana de las formas cutánea y mucosa, como mecanismo de prevención de la enfermedad en zonas de alto riesgo para disminuir las secuelas deformantes de la misma.

#### **3.4.1 DIAGNÓSTICO CLÍNICO**

Aunque antes de 1929, el diagnóstico de infección por leishmaniasis se realizaba teniendo en cuenta su distinción clínica con otros diagnósticos diferenciales de lesiones en piel, hoy en día algunos investigadores sugieren que dichos tempranos diagnósticos fueron probablemente correctos,<sup>37</sup> basados en el conocimiento actual de la distribución de la enfermedad, la referencia de las manifestaciones cutáneas y mucocutáneas, y el reporte de una respuesta favorable de estas lesiones a drogas antileishmaniales. Actualmente, para el diagnóstico se tienen en cuenta varios aspectos como los antecedentes epidemiológicos, las características clínicas y la observación o aislamiento parasitológico.

Los antecedentes epidemiológicos son los aspectos primarios relevantes para el diagnóstico de leishmaniasis, antes de la confirmación parasitológica. Los siguientes son los antecedentes epidemiológicos a considerar: el lugar de procedencia del paciente, las

residencias anteriores observando la permanencia o la visita a áreas endémicas de leishmaniasis, y los antecedentes ocupacionales relacionados como recolección de café o cacao y labores en las zonas selváticas de nuestro país<sup>38</sup>. Dentro de los antecedentes también se debe considerar la presencia de lesiones cutáneas anteriores que pueden haber sido catalogadas como leishmaniasis o no, que demoraron en cicatrizar teniendo el antecedente de haber estado en un área endémica de leishmaniasis.

Una vez considerados los antecedentes, se hace un diagnóstico clínico teniendo en cuenta criterios característicos de las lesiones como el tiempo de evolución mayor a dos semanas, bordes de la ulcera, ausencia de lesiones con ángulos de 90°, entre otras, nos inclinarán a definir si se puede tratar o no de una leishmaniasis cutánea o mucocutánea; es decir, se define si es o no un caso sospechoso. Finalmente, para confirmar si se trata de leishmaniasis, se procederá al diagnóstico de laboratorio por medio de métodos directos parasitológicos o métodos indirectos que son los métodos inmunológicos.

### **3.4.2 DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO**

La identificación del agente causal es requisito para estudiar la epidemiología de cualquier enfermedad; en leishmaniasis cutánea es fundamental la confirmación parasitológica para el estudio epidemiológico, diagnóstico y tratamiento terapéutico. Los métodos parasitológicos se basan en el hallazgo de la presencia de *Leishmania*, único criterio de certeza de infección, y consisten en frotis coloreados para examen microscópico directo ó cultivo en muestras tomadas de las lesiones sospechosas mediante raspado, aspirado o impronta, identificando *Leishmania* por tinción.

El parásito crece entre 24°C a 26°C, en medios de cultivo monofásicos MEM (Mínimal Essential Medium, 20%, SBF) y agar sangre, y medios bifásicos NNN (Novy-McNeal-Nicolle) y SNK (enriquecido con Bacto-peptona), que son particularmente valiosos para el aislamiento primario. El material puede ser obtenido por punción aspirativa o por biopsia y ser inoculado directamente en el medio de cultivo. A pesar que muchos organismos pueden crecer en una a dos semanas, los cultivos deben ser mantenidos y examinados por cuatro semanas. Se dificulta el aislamiento del parásito especialmente cuando las lesiones son crónicas o con infecciones secundarias, debido a que en las úlceras crónicas

los parásitos son escasos, y las infecciones agregan complicaciones para la visualización del parásito con contaminación de los medios de cultivo cuando se hace aislamiento primario.

La técnica del cultivo ofrece ventajas sobre los frotis coloreados por la fácil observación de gran número de formas promastigotes móviles, en contraste con la dificultad y el mayor cuidado empleado en la búsqueda de formas de amastigote; pero a diferencia de este, el frotis tiene como ventajas, la simpleza de uso, y el hecho de poder dar un diagnóstico en menor tiempo, y sin costos adicionales de medios de cultivo, que además requieren de un transporte y mantenimiento especial. Para ambas pruebas el éxito de su sensibilidad es inversamente proporcional al tiempo de evolución de la enfermedad.

Las pruebas inmunológicas son métodos indirectos como el método de ELISA/ DOT-ELISA y la inmunofluorescencia indirecta (IFI) que se basan en la detección de anticuerpos anti-leishmania circulantes en el suero de casos sospechosos, el método más empleado es el (IFI). Con las técnicas de inmunofluorescencia e inmunoperoxidasa se facilita la detección de la enfermedad por medio de la detección de anticuerpos, cuando con las técnicas de rutina se encuentran escasos parásitos; la desventaja de este tipo de métodos es que la *Leishmania sp* es un parásito celular y por tanto la circulación de anticuerpos es muy baja, lo que los hace deficientes y poco sensibles.

Otro método es una reacción de hipersensibilidad tardía, conocida con el nombre de prueba de Montenegro o leishmanina, que consiste en demostrar positividad a la intradermo-reacción mediante la aplicación de antígenos solubles de promastigotes de *Leishmania sp*; se aplica intradérmicamente en la cara anterior del antebrazo izquierdo del paciente y se hace la lectura entre 48 a 72 horas como máximo. Su principal desventaja es su inespecificidad diagnóstica debido a que no distingue entre pasadas y presentes infecciones.

### **3.5 MÉTODOS ANALÍTICOS – EVALUACIÓN DE TECNOLOGÍA DIAGNÓSTICA**

La Evaluación de Tecnologías Diagnósticas es un método epidemiológico desarrollado por Jacob Yerushalmy en 1947,<sup>39</sup> quien fue la primera persona en utilizar los términos

sensibilidad y especificidad. Este método se impulsó desde entonces ante la necesidad básica de evaluar la capacidad diagnóstica de nuevas pruebas disponibles, gracias al desarrollo científico y tecnológico. El proceso de evaluación de tecnologías diagnósticas se refiere tanto a las nuevas tecnologías como a las ya existentes, debido a la incertidumbre sobre su efectividad o en casos menos frecuentes por la demostración de efectos adversos que superan a los beneficios esperados.

Aunque al principio se enfocó hacia la validación de pruebas diagnósticas, el objeto de este método epidemiológico tiende cada vez más a la integralidad, abarcando también la validación de pruebas pronósticas, medicamentos y equipos médicos, y acciones preventivas. En este documento se hará referencia a la evaluación de tecnologías diagnósticas.

El objetivo consiste en evaluar una prueba comparada con un diagnóstico de referencia, que es dado por una o varias pruebas que determinan más usualmente el verdadero estado o criterio de interés, a evaluar en el paciente. Al momento de evaluar una prueba diagnóstica, tres condiciones deben ser exigidas a una prueba:

**Validez:** Es el grado en que una prueba mide lo que se supone que debe medir. ¿Con que frecuencia el resultado de la prueba es confirmado por procedimientos diagnósticos más complejos y rigurosos? La sensibilidad y la especificidad son medidas de su validez.

**Reproducibilidad:** Es la capacidad de una prueba para ofrecer los mismos resultados cuando se repite su aplicación en circunstancias similares. La variabilidad biológica del hecho observado, la introducida por el propio observador y la derivada de la propia prueba, determinan su reproducibilidad <sup>40</sup>.

**Seguridad:** Esta determinada por el valor predictivo de un resultado positivo o negativo; probabilidades introducidas por Vecchio<sup>2</sup> en 1966 tras la aplicación del Teorema de Bayes en la evaluación de tecnologías diagnósticas,<sup>41</sup> y que responden a la pregunta ¿Con que seguridad una prueba predecirá la presencia o ausencia de enfermedad?

### 3.5.1 VALIDEZ DE UNA PRUEBA DIAGNÓSTICA. SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD.

La Sensibilidad representa la proporción de verdaderos positivos que son correctamente clasificados por la prueba, y la Especificidad representa la proporción de verdaderos negativos que son correctamente clasificados por la prueba. Por ser proporciones, sus intervalos de confianza pueden ser calculados por métodos estándares para proporciones<sup>42</sup>.

$$\text{Sensibilidad} = \frac{VP}{VP + FN}$$

$$\text{Especificidad} = \frac{VN}{VN + FP}$$

### 3.5.2 SEGURIDAD DE UNA PRUEBA DIAGNÓSTICA. VALORES PREDICTIVOS.

El valor predictivo positivo es definido como la proporción de pacientes con resultado positivo de la prueba quienes son correctamente diagnosticados; y el valor predictivo negativo como la proporción de individuos con prueba negativa quienes son correctamente diagnosticados. Así pues, los valores predictivos permiten conocer la probabilidad de que la prueba dará el diagnóstico correcto y dependen críticamente de la prevalencia de la anomalía en los pacientes que están siendo evaluados<sup>43</sup>.

Si bien es sabido, estas medidas son indicadores válidos de la utilidad de una prueba diagnóstica, también es cierto que son magnitudes no calibradas que por sí solas no indican que tan correctamente la prueba está clasificando los sujetos a uno u otro diagnóstico; estas medidas dependen de factores como la prevalencia del evento en la población a estudio, el tamaño de la muestra de estudio, la población seleccionada para este, y el nivel de la prueba, por lo que se requiere de la especificación de la escala sobre la cual son medidas, de manera que ajuste y tenga en cuenta estos factores. El cálculo de estas magnitudes calibradas se conoce como los *índices de calidad*: calidad de la sensibilidad  $k(1,0)$  y calidad de la especificidad  $k(0,0)$ ; las cuales utilizan como escala de referencia el nivel de la prueba y su complemento, respectivamente. Los índices de

calidad complementan la información de la validez de una prueba en evaluación, y pueden ser usados para comparar varias pruebas que miden una única respuesta contra una prueba referente <sup>44</sup>.

Junto con estas medidas, se han desarrollado otras herramientas estadísticas importantes para la evaluación diagnóstica, como lo es la curva *Receiver-Operating Characteristic* (ROC). El análisis de las curvas ROC aporta, de manera sencilla, un magnífico indicador de la precisión o capacidad de discriminación de una prueba diagnóstica, en donde cada punto sobre la curva, ubicado por sus valores de sensibilidad y 1-especificidad, reconstruye completamente una tabla tetracórica por cada prueba (o puntos de corte para el caso de pruebas continuas); por lo tanto, una prueba o conjunto de pruebas será mejor cuanto mayor sea el área comprendida entre su curva ROC y aquella recta en la grafica de la curva, que representa el resultado de una clasificación aleatoria. Cuando cada prueba se localiza en la gráfica ROC por sus índices de calidad  $k(1,0)$  vs  $k(0,0)$  se denomina curva QROC, que permite identificar fácilmente la prueba con la óptima sensibilidad y especificidad.

### **3.5.3 REPRODUCIBILIDAD**

Otro elemento fundamental para la validación diagnóstica, es la medición de la reproducibilidad, que refleja la cantidad de error aleatorio y sistemático inherente a cualquier medición.

La reproducibilidad es la proporción del total de la varianza en las mediciones, la cual es debida a verdaderas diferencias entre los sujetos ó entre los observadores, en el caso en que se trate las observaciones como un factor aleatorio, es decir, que la aplicación o lectura de la prueba lo hagan varios observadores. Una forma de medir la reproducibilidad para pruebas con 2 niveles (positivo o negativo, presencia o ausencia) se obtiene determinando el *Coeficiente Kappa*, por medio del cual se examina la proporción de respuestas de acuerdo entre dos pruebas, en relación con la proporción de respuestas esperadas al azar dada la distribución de los marginales.

Finalmente, y conforme estándares metodológicos establecidos para investigación de tecnologías diagnósticas, un aspecto mínimo que se debe considerar son los diferentes

tipos de muestreo, que se utilizan con el fin de lograr estimados validos y precisos en las mediciones de sensibilidad, especificidad y valores predictivos. Para cada tipo de muestreo (corte transversal, retrospectivo, prospectivo y pseudoretrospectivo) hay una manera diferente de realizar los cálculos de las características de las pruebas.

### **3.6 EVALUACIÓN DE TECNOLOGÍAS DIAGNÓSTICAS EN LEISHMANIASIS CUTÁNEA**

Sin desconocer los retos que nos impone el diagnóstico de una enfermedad como la leishmaniasis, debido a las condiciones de acceso, desplazamiento y lejanía de las áreas de transmisión (lo que prolonga los tiempos de consulta y dificulta el acceso a más y mejores técnicas de diagnóstico), y a las características clínicas propias de la infección y a falencias de los mismos métodos de diagnóstico, ya mencionadas con anterioridad, se hace el siguiente análisis respecto a los métodos analíticos y evaluación de herramientas diagnósticas existentes.

Teniendo en cuenta los parámetros mínimos aquí considerados y haciendo una revisión metodológica a una serie de estudios de investigación hallados en la literatura científica (tabla 6), en los cuales se evalúa la utilidad clínica de métodos diagnósticos en LCL, se observa:

Primero, toda evaluación de pruebas diagnósticas debe seguir un proceso secuencial de cinco fases, como bien lo plantean Nierenberg y Feinstein,<sup>45</sup> donde en cada fase es conducido un estudio en el que se evalúa la prueba de interés a medida que se incrementa progresivamente el rango de severidad de la enfermedad y las condiciones comórbidas en los sujetos en quienes se aplica la prueba, que es la situación mas real a las condiciones en las que se va a emplear la prueba diariamente. A la revisión se encuentra que se han llevado a cabo tan solo en fases II o III, en donde a las diferentes pruebas se les ha evaluado en casos con una condición diagnostica previamente conocida, pero aún no de una forma enmascarada y en condiciones variables del estado y evolución de la lesión y patológicas de la población en quien se esta validando. Por consiguiente, casi ningún estudio utiliza un correcto muestreo para evaluación de

tecnologías diagnósticas y tampoco una adecuada determinación de sensibilidad y especificidad de acuerdo a éste <sup>46</sup>.

Hasta el momento, ningun estudio ha determinado la reproducibilidad de las pruebas, criterio indispensable para validez; <sup>47</sup> se hacen cálculos erróneos de sensibilidad de las pruebas; <sup>48</sup> se presentan sesgos de verificación por conocimiento previo del diagnóstico, e incluso algunos métodos han sido evaluados a nivel de infección experimental donde la infección no se presenta de una forma natural <sup>49</sup>.

**Tabla 6. Estudios de evaluación de métodos diagnósticos para *Leishmania***

Autor/ año	País	Tipo muestreo	Tamaño de muestra	Tipo de muestra	Prueba diagnóstica evaluada	Resultados		
						Sensibilidad	Especificidad	
Restrepo M 1983	Colombia	Pseudo retrospectivo	380	suero	Inmunofluorescencia Indirecta	98.7%	97.2%	
Lugo 1997	Venezuela	Reporte casos	6	suero	PCR	-	-	
Romero LI 2004	Panamá	Pseudo retrospectivo	100	suero	Serología L. mexicana L. braziliensis	89% 71%	-	
Cuba CA 1986	Brazil	Pseudo retrospectivo	33	Aspirado lesión	Cultivo	Medio Evans	12.7%	-
						Agar Sangre (DAB)	30.8%	-
Sierra GA 1999	Brazil	Pseudo retrospectivo	68	Aspirado lesión	Cultivo al vacío	47.1%	-	
Sierra GA 1999	Brazil	Pseudo retrospectivo	29	Aspirado úlcera en piel	Cultivo al vacío	34.5%	-	
Ramirez JR 2000	Colombia	Pseudo retrospectivo	115	Frotis raspado lesión	Directo	78.3%	-	
					Cultivo	67.5%	-	
					Histopatológico	64.3%	-	
Weigle KA 1984-87	Colombia	Transversal	177	Biopsia lesión	Directo	22%	-	
					Cultivo	58%	-	
					Histopatología	14%	-	
Pirmez C 1999	Brazil	Transversal	230	Biopsia lesión	PCR	94%	-	
Schubach 2001	Brazil	Pseudo retrospectivo	88	Biopsia lesión activa	Histopatológico Cultivo	30.2% 43.4%	-	
Romero G 2001	Brazil	Pseudo retrospectivo	35	Biopsia lesión	PCR Impresión biopsia	100% 100%	-	
Gomes EH 2002	Brazil	Pseudo retrospectivo	119	Biopsia lesión	PCR	Subg Viannia	95.4%	100%
						Espec género	88.2%	100%
Medeiros 2002	Brazil	Pseudo retrospectivo	54	Biopsia lesión	PCR	81.5%	-	
de Oliveira 2003	Brazil	Pseudo retrospectivo	50	Biopsia lesión	PCR	100%	100%	

En esta revisión también se evidencia que no se determinan otros criterios mas allá de la sensibilidad y algunas veces de especificidad, con una gran variabilidad en sus resultados; podría decirse que, no existe una técnica parasitológica que reúna criterios mínimos de validez necesarios para diagnosticar parasitológicamente 100% de los pacientes con LCL, y que el máximo rendimiento se consigue con la combinación de 2 ó más de ellas.

Ha podido observarse que la demostración parasitaria a través del frotis es variable y en gran medida depende del éxito de una buena toma de la muestra y de la destreza de la persona que realiza la lectura de la lámina. De aquí que la sensibilidad del frotis sea baja, con reportes en Colombia de un 19%.<sup>9</sup>

La siguiente tabla resume los resultados de la evaluación de las diferentes técnicas diagnósticas, que han arrojado los siguientes datos:

**Tabla 7. Sensibilidades y Especificidades de pruebas diagnósticas en leishmaniasis**

Técnica evaluada	Mínimas y máximas	
	Sensibilidades encontradas	Especificidad
Criterio clínico	92.7%	31.4%
Frotis Directo	47.7% - 78.3%	No evaluadas
Cultivo	34.5% - 54.6%	
PCR	82% - 100%	
IFI	41.4% - 97.7%	

Específicamente en la evaluación del diagnóstico clínico, tan solo se ha realizado un estudio para la derivación y validación de reglas de predicción clínicas para el diagnóstico de leishmaniasis cutánea en Colombia, el cual muestra que éste método aunque tiene una alta sensibilidad (92.7%) no posee una buena especificidad (31.4%) lo que nos señala que un resultado positivo tampoco excluye otras etiologías<sup>13</sup>. De todas formas es un estudio que presenta sesgos de exclusión de resultados indeterminados, que ponen en tela de juicio la validez de sus resultados, valiendo la pena determinar la verdadera eficiencia del criterio clínico diagnóstico en áreas endémicas.

Debido a que no existe un estándar de referencia definido para el diagnóstico de leishmaniasis cutánea,<sup>50</sup> se encuentra que se han utilizado diferentes y variados métodos de referencia para hacer la comparación de las pruebas sujetas a evaluación (Tabla 8), lo que hace aún más difícil comparar la validez de los métodos en base a una aceptada óptima prueba de referencia.

**Tabla 8. Estándares de referencia utilizados en evaluación de métodos diagnósticos para *Leishmania***

Estándar de Referencia	No. de estudios (%)
Presencia lesiones típicas en piel + Respuesta al tratamiento + Historia clínico-epidemiológica compatible y al menos una prueba positiva	3 (21.4%)
Cualquier prueba positiva (directo, cultivo, histopatológico ó IFI)	2 (14.2%)
Histopatología	1 (7.1%)
Diagnóstico clínico	2 (14.2%)
Diagnóstico clínico y Montenegro positivo	3 (21.4%)
Cultivo	1 (7.1%)
No definieron Estándar de Referencia	2
Total estudios analizados	14

Considerando lo anteriormente expuesto, se hace necesario aplicar criterios metodológicos estándares para la evaluación diagnóstica en leishmaniasis, con el fin de corroborar y establecer en nuestro grupo poblacional de áreas endémicas, la validez del diagnóstico.

## **4. MATERIALES Y METODOS**

### **4.1 TIPO DE ESTUDIO**

Se realizó un estudio de Evaluación de Tecnologías Diagnósticas

### **4.2 TIPO DE MUESTREO**

Se utilizó un muestreo de corte transversal, <sup>46</sup> en el que a todos los casos sospechosos de leishmaniasis (lesiones en piel de habitantes de áreas endémicas con duración mayor a 15 días) se les practicó, en forma independiente, las pruebas parasitológicas (estándar de referencia) y el diagnóstico clínico de leishmaniasis cutánea realizado por Trabajadores Comunitarios en Salud.

### **4.3 ESTÁNDAR DE REFERENCIA**

Diagnóstico confirmatorio por al menos uno de tres pruebas parasitológicas (frotis directo, cultivo, PCR).

### **4.4 POBLACIÓN Y MUESTRA**

La población la conformaron los casos de lesiones en piel, sospechosas de leishmaniasis cutánea, presentadas en población general de niños y adultos residentes en tres municipios del Departamento de Santander endémicos de Leishmaniasis (Rionegro, Playón y Landázuri). En personas con más de una lesión, se tomó muestra de la lesión con menor tiempo de evolución.

La muestra fueron 200 casos sospechosos, determinada teniendo en criterios sugeridos por Kraemer para el cálculo de tamaño de muestras para estudios de tecnologías diagnósticas, <sup>47</sup> considerando datos previos de sensibilidad y especificidad mínimas esperadas para el diagnóstico clínico.<sup>13</sup>

#### 4.4.1 Cálculo de tamaño de muestra para Sensibilidad y Especificidad

La muestra escogida fue de un total de 200 casos sospechosos de leishmaniasis, calculada teniendo en cuenta fórmulas generales para cálculo de tamaños de muestra basadas en el error estándar, Obuchowski.<sup>51, 52</sup> En este caso se tomó la fórmula del error estándar (EE) de la Sensibilidad (Sen) y Especificidad (Esp), propuestas por Kraemer<sup>44</sup> para determinar la precisión de cada uno de estos estimados; a partir de las cuales se despejó el número total de muestras necesarias (N) para el cálculo de estos parámetros. Las fórmulas son las siguientes:

Sensibilidad	Especificidad
$EE = \left[ \frac{Sen(1 - Sen)}{N * Prev} \right]^{1/2}$	$EE = \left[ \frac{Esp(1 - Esp)}{N * Prev} \right]^{1/2}$
Despejando de la fórmula el N:	Despejando de la fórmula el N:
$EE^2 = \frac{Sen(1 - Sen)}{N * Prev}$	$EE^2 = \frac{Esp(1 - Esp)}{N * Prev}$
$N = \frac{Sen(1 - Sen)}{EE^2 * Prev}$	$N = \frac{Esp(1 - Esp)}{EE^2 * Prev}$

El valor del error estándar fue calculado de acuerdo a la siguiente expresión matemática<sup>53</sup>:

$$EE = \frac{Precisión}{Z_{\infty/2}}$$

La precisión es la amplitud del intervalo de confianza esperado para el parámetro a determinar. En este caso se determinó el N, teniendo en cuenta varios niveles de precisión.

Inicialmente, los parámetros primarios tenidos en cuenta para el cálculo del tamaño de muestra, fueron los resultados previos del estudio de Weigle,<sup>13</sup> con un valor esperado de

sensibilidad y especificidad para el diagnóstico clínico de 92.7% y 31.4% respectivamente.

Se consideró como valor esperado de la prevalencia del diagnóstico de leishmaniasis, para áreas endémicas, un valor mínimo de 62%<sup>54</sup> y máximo de aproximadamente 75%<sup>13</sup>, debido a valores de prevalencia previamente determinados en otras investigaciones. Estos fueron los cálculos realizados para prevalencia de 75% y precisión de 0.05:

<i>Estimador</i>	<i>P, P', Q o Q'</i>	<i>N</i>	<i>Numerador</i>	<i>Denominador</i>	<i>EE</i>	<i>alfa</i>	<i>Precisión</i>	
<i>Sensibilidad</i>	0,92	0,75	150,79	0,0736	0,000488078	0,025510	1,96	0,050
<i>Especificidad</i>	0,31	0,75	438,24	0,2139	0,000488078	0,025510	1,96	0,050

De igual forma se realizaron los demás cálculos; estos fueron los estimados:

**Tabla 9. Cálculos de tamaño de muestra iniciales**

<b>Prevalencia</b>	<b>Precisión</b>	<b>Parámetro</b>		<b>Tamaño de Muestra</b>
75%	0.05	<i>Sensibilidad</i>	92%	151
		<i>Especificidad</i>	31%	438
	0.07	<i>Sensibilidad</i>	92%	77
		<i>Especificidad</i>	31%	224
	0.08	<i>Sensibilidad</i>	92%	59
		<i>Especificidad</i>	31%	171
62%	0.05	<i>Sensibilidad</i>	92%	182
		<i>Especificidad</i>	31%	530
	0.07	<i>Sensibilidad</i>	92%	93
		<i>Especificidad</i>	31%	270
	0.08	<i>Sensibilidad</i>	92%	71
		<i>Especificidad</i>	31%	207

Posteriormente, el tamaño de muestra fue ajustado considerando análisis primarios en un total de 96 pacientes, una vez se llegó aproximadamente a 50% de la muestra inicial, en los que se observó una prevalencia del diagnóstico parasitológico positivo en sospechosos del 89,3%. Esto se realizó debido a que el cálculo inicial se realizó con prevalencias halladas en otras poblaciones y criterios diagnósticos no similares al utilizado en este estudio<sup>13 54</sup>.

**Tabla 10. Cálculos de tamaño de muestra ajustando prevalencia**

Prevalencia	Precisión	Parámetro		Tamaño de Muestra
89.3%	0.05	<i>Sensibilidad</i>	92%	127
		<i>Especificidad</i>	31%	370
	0.07	<i>Sensibilidad</i>	92%	64
		<i>Especificidad</i>	31%	188
	0.08	<i>Sensibilidad</i>	92%	50
		<i>Especificidad</i>	31%	145

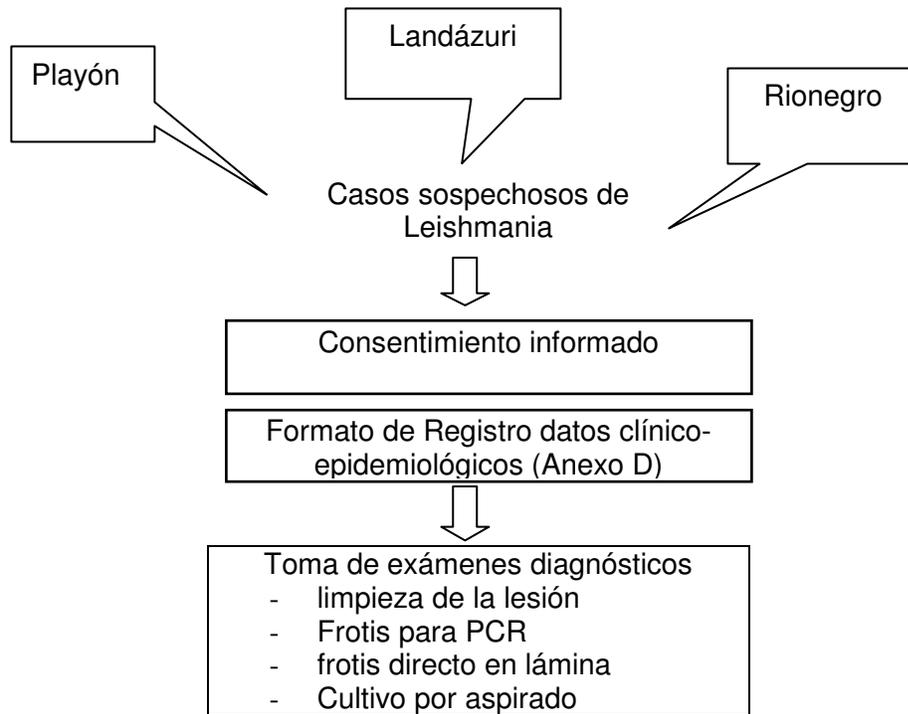
De estos cálculos se pudo determinar y escoger como tamaño de muestra 200 casos sospechosos, esperándose una precisión de 0.07 para la determinación de los criterios de validez.

#### **4.5 CAPTACIÓN DE CASOS**

Fueron ingresados aquellos casos de lesiones en piel, sospechosas de leishmaniasis, a través de búsqueda activa realizada por Trabajadores Comunitarios en Salud (TSC) en las veredas de los tres municipios en los que se realizó el estudio. Se definió como caso sospechoso toda lesión en piel, con un tiempo de evolución mayor a 15 días, aparecida en personas residentes en áreas endémicas de estos municipios. A cada caso, el TSC le solicitó consentimiento informado (Anexo B), le elaboró un diagnóstico clínico, y le obtuvo muestras para Frotis Directo en lámina, Cultivo y PCR de una lesión única o de la de menor tiempo de evolución en caso de presentar 2 o más lesiones, puesto que en las lesiones más recientes se encuentran con mayor frecuencia los parásitos que en aquellas lesiones antiguas.

La definición de caso sospechoso de leishmaniasis se rigió por la recomendada Organización Mundial de la Salud, en la que se define como caso “la aparición de una o varias lesiones en partes descubiertas del cuerpo. La cara, el cuello, los brazos y las piernas son los sitios más comunes. En el sitio de la inoculación se forma un nódulo, que se agranda y se convierte en una úlcera indolente. La llaga permanece en esta etapa por un tiempo variable antes de sanar y deja una cicatriz deprimida”.<sup>55</sup>

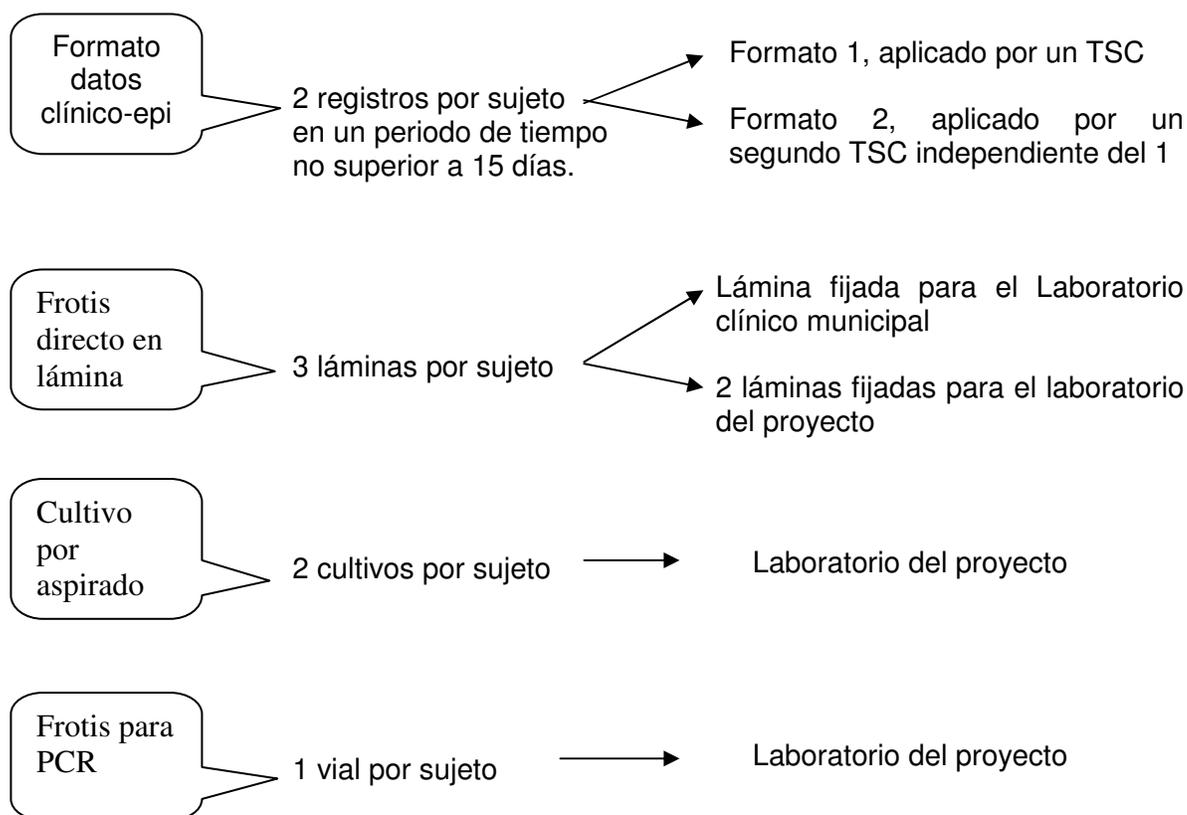
En el siguiente flujograma presenta el proceso de recolección de los datos:



En el Formato de Registro de datos clínico-epidemiológicos los TSC, basados en las características de la lesión, clasificarán en una escala de 5 niveles la certeza acerca del diagnóstico clínico y la compatibilidad de la lesión con una leishmaniasis.

1	2	3	4	5
no	quizá no	no sabe	quizá si	si

Una vez se ha realizado la primera fase de reclutamiento de sospechosos y toma de muestras para diagnóstico, los TSC movilizarán las muestras de cada sujeto para su procesamiento de la siguiente forma:



#### 4.6 RECOLECCIÓN DE INFORMACIÓN

Los procesos en los que fueron capacitados y se llevaron a cabo por los TSC durante el estudio, para recolección de la información, fueron: **i) Diagnóstico clínico:** Se elaboró una ficha clínico-epidemiológica (Anexo D) con la que se obtuvo los datos de identificación, características clínicas de la lesión conforme criterios clínicos para diagnóstico de leishmaniasis cutánea, evaluados en previos estudios<sup>13</sup> y criterio diagnóstico del TSC en una escala de grado de certeza de 1 a 5 (1= Certeza No leishmaniasis, 2= Probablemente No, 3= No sabe ó Cuestionable, 4= Probablemente Si, 5= Certeza Si leishmaniasis). **ii) Frotis Directo en lámina:** La toma de muestras se hizo por raspado con bisturí # 15 en la parte activa del borde de la lesión, escogiendo aquella con menor tiempo de evolución, bordes infiltrados y eritematosos. El material obtenido era extendido en tres láminas porta objetos para ser fijadas con azul de metileno fosfatado para posterior coloración por método de Field. Una de las láminas se remitía al laboratorio clínico del hospital local del

municipio (para el rápido diagnóstico y suministro de tratamiento al paciente); **iii**) PCR: La muestra para PCR se obtuvo por raspado e introducción del material obtenido en un vial con NET SDS 10%; y **iv**) Cultivo: Se obtuvo muestra por aspirado del borde de la lesión para cultivo en medios bifásicos NNN y SNK los cuales se observaron por 30 días. Para sembrar el aspirado en el medio se limpiaba la tapa de este y se inoculaba el contenido de la jeringa sin necesidad de destaparlos. Los procedimientos de toma de muestra y laboratorio son descritos en el Anexo E.

Una vez diligenciada la ficha de criterios para diagnóstico clínico de Leishmaniasis cutánea, era enviada lo más rápido posible, en un sobre junto con las muestras de cultivo, 2 láminas y un vial para análisis por PCR, al laboratorio clínico de la facultad de salud de la Universidad Industrial de Santander (UIS); allí se verificaba la coincidencia entre el código de las fichas y de las muestras, y se entregaban éstas al bacteriólogo para su procesamiento y diagnóstico. Formato de registro de datos se puede observar Anexo F.

Durante el periodo de duración del estudio, los profesionales quienes hicieron la lectura de las láminas en los hospitales locales de los municipios de El Playón y Rionegro siempre fueron los mismos, al igual que en el laboratorio UIS; En el municipio de Landázuri hubo dos bacteriólogas rurales quienes hicieron la lectura del frotis directo, una que permaneció durante los primeros seis meses del proyecto y la otra en los posteriores seis meses. Todos realizaron el mismo procedimiento de coloración y lectura, especificados en el anexo E. Los resultados de las láminas que se tomaron en cuenta para el análisis fueron: la lectura de la lámina enviada al hospital local y de otra de las láminas, con mejor cantidad de muestra, que se enviaba al laboratorio UIS.

Respecto a los TSC, quienes obtuvieron los datos y muestras, se presenta la siguiente información: - Conformación del equipo de TSC. En los municipios de Landázuri, Rionegro y Playón se inició un trabajo de información y educación en leishmaniasis, a manera de taller, durante el cual se hizo la selección de un equipo de hombres y mujeres campesinos (3 financiadas por el proyecto y las demás voluntarias), residentes en las veredas de estos municipios, y estables durante todo el periodo de recolección de datos, quienes interesados en el tema decidieron participar para la recolección de los datos. - Capacitación. Al equipo conformado se le brindó capacitación teórico-práctica continua,

en cinco momentos durante 1 año, referente a la infección por leishmaniasis, identificación de casos con manifestaciones clínicas sospechosas (búsqueda activa), definición e identificación de criterios de diagnóstico clínico, métodos diagnósticos en leishmaniasis y uso del material, obtención, manejo y envío de muestras al laboratorio. Además se les explicó y ejercitó para la utilización de la escala de diagnóstico 1 a 5 para calificar con criterio clínico el grado de sospecha desde una débil a una fuerte sospecha diagnóstica. El entrenamiento y supervisión de los procedimientos ejecutados por los TSC se realizó durante reuniones dirigidas hacia la comunidad como también específicamente al equipo de TSC, realizándose un total de 3 reuniones en los puestos de salud de las veredas de cada municipio y 2 encuentros en Bucaramanga.

Fueron un total de 19 personas, con una proporción casi similar de hombres (53%, n=10) y mujeres, y en su mayoría de 30 a 40 años de edad (31,6%, n=6) en un rango de mínimo 17 y máximo 53 años; el 57,8% de ellos de estado civil casados, con un nivel de escolaridad máximo de secundaria (47%, n=9), y dedicados principalmente a las labores del campo y el hogar. Respecto de la labor de estas personas en las actividades de búsqueda activa de casos para toma de muestras se observó que, el tiempo promedio de dedicación fue de 2 días (0.5 – 3 días) a la semana.

#### **4.7 CONTROL DE SESGOS**

Tomando como referencia los elementos claves requeridos cuando se evalúa una tecnología diagnóstica, descritos por Lossing et al <sup>56</sup> y Begg and McNeil <sup>57</sup>, se tuvo en cuenta y controlaron como fuentes de potenciales sesgos los siguientes:

- Espectro de la enfermedad: Los TSC valoraron, casa por casa, las personas habitantes de las veredas de los tres municipios endémicos de leishmaniasis, que presentaron lesiones en piel con o sin características típicas de leishmaniasis, sin diagnóstico previo y diferencial de otras enfermedades en piel de características clínicas similares como la esporotricosis, paracoccidiodomicosis, úlceras de lepra, úlceras piógenas, cromomicosis, entre otras.

- Sesgo de verificación: Por ser un muestreo de tipo transversal, a cada caso sospechoso se le practicó en un mismo tiempo la toma de muestra para la realización de todos los exámenes (diagnóstico clínico, directo, cultivo y PCR), de tal manera que al momento de ser evaluado el paciente por el TSC, éste no conocía su verdadera condición diagnóstica.
- Sesgo Interpretación: Para garantizar el enmascaramiento, el diagnóstico clínico lo realizó dos TSC independientes en momentos diferentes, uno a la captación del paciente y otro en un tiempo no superior a 15 días antes de la entrega del resultado del frotis directo. El TSC que realizó la toma de muestras, identificó las muestras con un código único para cada paciente, las cuales se enviaron para su lectura y procesamiento al laboratorio clínico del municipio y al laboratorio de la Facultad de Salud – UIS.

#### 4.8 VARIABLES

En este estudio se definieron como variables, los resultados de las mediciones básicas de cada una de las pruebas diagnósticas empleadas. Todas fueron variables aleatorias discretas, y de las cuales se obtuvieron los indicadores de validez y reproducibilidad. La siguiente tabla explicita cada una de ellas:

**Tabla 11. Descripción de variables utilizadas en este estudio**

VARIABLE	MEDICION	NIVEL DE MEDICION
Diagnóstico clínico	Criterios de definición de caso clínico-epidemiológico	Ordinal: si, quizá si, no sabe, quizá no, no.
Frotis Directo	Lectura microscópica presencia de amastigotes	Nominal: si / no
Cultivo	Observación de promastigotes	Nominal: si / no
PCR (Reacción en cadena de la polimerasa)	Detección de DNA Leishmania del grupo <i>L. Viannia</i> ( <i>panamensis</i> ) en raspado borde de la lesión.	Nominal: si / no

## 4.9 PROCESAMIENTO DE LOS DATOS

La información recolectada a través de la ficha y los resultados de laboratorio se digitó en una base de datos en Microsoft Office Excel 2003, la cual posteriormente se exportó para su análisis a Stata 8.0/SE (StataCorp. Stata Statistical Software, release 8.0. College Station, TX: Stata Corporation; 2003).<sup>58</sup>

## 4.10 ANÁLISIS

Para la determinación de la prevalencia del diagnóstico de leishmaniasis cutánea se realizó un conteo de frecuencia de los diagnósticos positivos obtenidos por el estándar de referencia; siendo el diagnóstico parasitológico una variable nominal, se describió como proporción con su respectivo intervalo de confianza del 95%. De acuerdo a lo propuesto por Kraemer <sup>44</sup> la prevalencia se define como la prevalencia del diagnóstico positivo de leishmaniasis cutánea, y no la prevalencia de esta patología en la población de estudio; por lo tanto, para su cálculo se utilizó la fórmula  $P = (\text{Verdaderos positivos} + \text{Falsos negativos}) / \text{Población Total}$ .

Para la validación del diagnóstico clínico se obtuvo datos de reproducibilidad y criterios de validez. Se evaluó la reproducibilidad Inter-evaluador al examen Clínico-epidemiológico (dos TSC), por medio de la aplicación de análisis estadísticos de coeficientes Kappa <sup>59</sup> y las Proporciones observadas de acuerdo positivo (Ppos) y negativo (Pneg).

Se calcularon valores de Sensibilidad, Especificidad y Valores Predictivos Positivo y Negativo para el diagnóstico clínico realizado por los TSC; teniendo en cuenta que se hizo dos diagnósticos clínicos realizados por dos trabajadores comunitarios en salud independientes, se tomó el dato reportado por el primero de ellos debido a dos razones principales: primero, evitar al máximo un posible sesgo de verificación, incluso en el diagnóstico dado por un segundo TSC que pudiera ser conocedor del criterio del primer TSC; y segundo, obtener la información completa para todos los casos incluidos en el estudio, debido a que no se pudo obtener ambos criterios en el 100% de los casos.

Dado que la clasificación diagnóstica por parte del TSC se evaluó a partir de una escala de grado de certeza o precisión diagnóstica de cinco ítems, y según lo propuesto por Kraemer <sup>44</sup>, se calculó y exploró los puntos de corte de la escala de 1 a 5, para poder ver en cual punto se logró la mejor clasificación; y se determinó el área bajo la curva ROC, como un estimador de la probabilidad global de una correcta clasificación. Se obtuvo además índices de calidad de la sensibilidad  $k(1,0)$  y especificidad  $k(0,0)$  que se ubicaron en la curva QROC, con el fin de identificar fácilmente la prueba con la óptima sensibilidad y especificidad.

Para determinar la reproducibilidad inter-evaluador de la lectura microscópica del frotis directo, se aplicó análisis estadístico con coeficiente Kappa; tomando como primera lectura la realizada por el bacteriólogo del municipio con la lámina enviada a este, y como segunda lectura la realizada por el laboratorio UIS con las otras dos láminas, que se le remitían.

#### **4.11 ASPECTOS ÉTICOS**

El presente estudio se realizó de forma anidada en un proyecto previamente avalado por Colciencias, con cod.11020412926, donde los procedimientos llevados a cabo se encuentran contemplados en éste, con aprobación del comité de ética de la facultad de Salud de la Universidad Industrial de Santander; por tanto no se solicitó nueva evaluación por comité de ética.

Conforme lo establecido en la resolución 008430/93 de las normas para la investigación en salud del Ministerio de Salud, se consideró una investigación con riesgo mínimo, puesto que se les realizó procedimientos rutinarios de diagnóstico en leishmaniasis, por medio de la obtención de muestras biológicas de lesiones en piel, que no implican ningún tipo de riesgo por daño físico, químico o emocional, ni aún siendo realizado por personal no profesional entrenado. Se contó con el consentimiento informado y por escrito del participante (Anexo B). Todas las labores fueron ejecutadas por personal entrenado en las diferentes actividades a desarrollar durante el estudio; descripción general de los trabajadores comunitarios y su capacitación se especifica en el numeral 4.6 páginas 30 y 31.

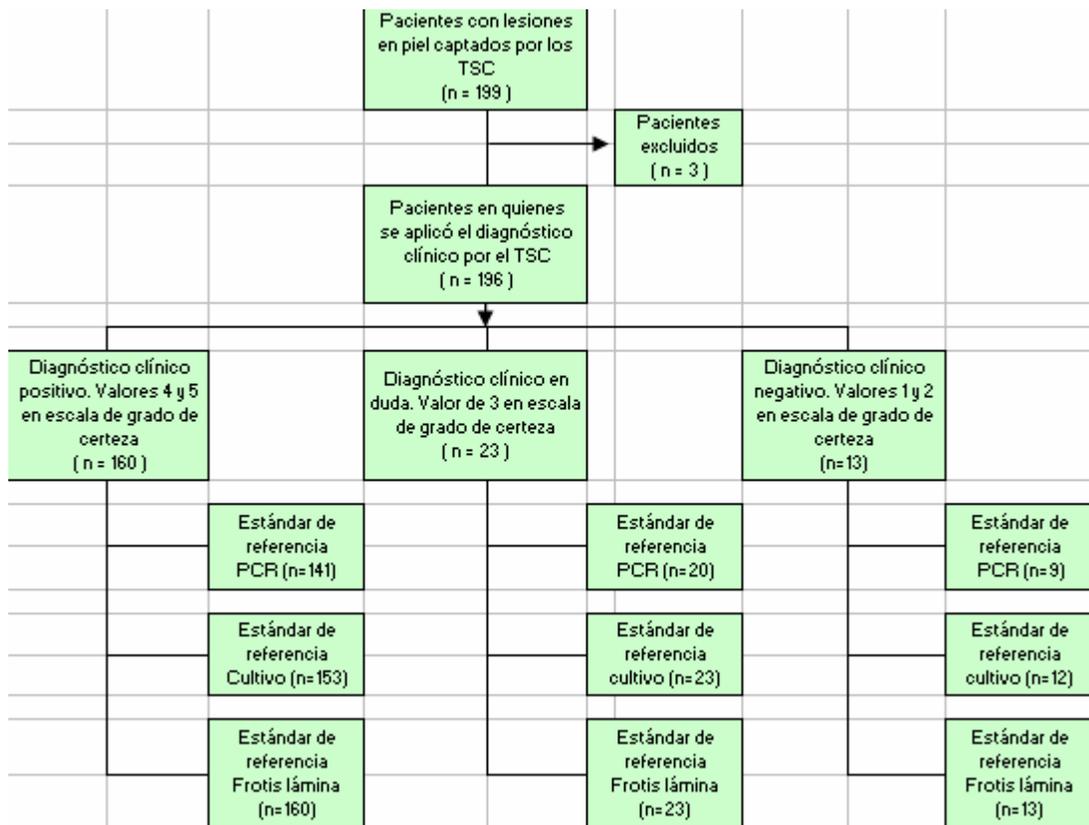
Se ajustó a principios científicos y éticos de autonomía, confidencialidad y bienestar. Autonomía del individuo para su libre aceptación de participación en la investigación y realización de pruebas diagnósticas para leishmaniasis; Confidencialidad de la información obtenida de los resultados de las pruebas; y bienestar durante el estudio, puesto que se contó con todos los recursos materiales y humanos que garantizaron la adecuada ejecución de los procedimientos. En todo momento se conservó la privacidad de la información de los pacientes en respeto a los principios éticos.<sup>60</sup>

## 5. RESULTADOS

### 5.1 POBLACION DE ESTUDIO

En un periodo de 14 meses, entre Octubre de 2004 y Noviembre de 2005, se capturaron un total de 199 casos sospechosos de leishmaniasis cutánea, en 37 veredas de los municipios de Landázuri, Rionegro y El Playón. De estos, en 196 se obtuvo datos del criterio clínico y uno o más pruebas parasitológicas que componían el estándar de referencia. 3 pacientes fueron excluidos pues uno de ellos no tuvo registro de criterios de diagnóstico clínico, y a los otros dos no se les obtuvo ninguna muestra para PCR, cultivo ni frotis en lámina. El gráfico 1 muestra el diagrama de flujo de los pacientes incluidos en el estudio y las muestras obtenidas en cada caso.

**Gráfico 1. Diagrama de flujo de la recolección de datos**



Los pacientes fueron incluidos en el estudio de forma consecutiva, por medio de búsqueda activa realizada por los Trabajadores Comunitarios en Salud (TSC). De los 196 pacientes, 129 (65.8%) residían en el municipio de Landázuri; 59% menores de 20 años en una gran proporción (50.5%) sin cobertura por ningún régimen de seguridad social y con una lesión en piel (47%). En la tabla 12 se observa detalladamente las características de persona y características clínicas relacionadas con las lesiones que presentaban los pacientes.

**Tabla 12. Características Personales y Clínicas de la población del estudio**

<b>Característica</b>	<b>n (% ± IC 95%)</b>
<b>Municipio de residencia</b>	
Landázuri	129 (65.8 ± 0.07 )
Rionegro	44 (22.4 ± 0.06)
Playón	23 (11.7 ± 0.04)
<b>Género masculino</b>	
	105 (53.5 ± 0.07)
<b>Promedio de Edad (± DE*)</b>	
	20,5 años ± 18 DE (rango 0 – 90 años)
<b>Seguridad social</b>	
No tiene	45 (23 ± 0.06)
Sisben	99 (50.5 ± 0.07)
ARS	45 (23 ± 0.06)
EPS	4 (2.0 ± 0.02)
No sabe/No responde	3 (1.5 ± 0.02 )
<b>Número de lesiones en piel</b>	
1 lesión en piel	92(47 ± 0.07)
2 lesiones en piel	45 (23 ± 0.06)
3 lesiones en piel	21 (10.7 ± 0.04)
4 lesiones en piel	10 (5.1 ± 0.03)
> 4 lesiones en piel	27 (13.8 ± 0.05)
<b>Localización de lesiones</b>	
Cabeza y cuello	18 (9.2 ± 0.04 )
Tronco	9 (4.6 ± 0.03)
Extremidades superiores	65 (32.9 ± 0.07)
Extremidades inferiores	51 (25.8 ± 0.06)
Dos localizaciones en el cuerpo	38 (19.3 ± 0.06)
Tres localizaciones en el cuerpo	12 (6.1 ± 0.03)
Sin dato	3 (1.5 ± 0.02)
<b>Duración evolución lesión</b>	
Menor igual a 2 meses	114 (58.1 ± 0.07)
> 2 meses	72 (36.7 ± 0.07)
No sabe/No responde	10 (5.1 ± 0.03)
<b>Porcentaje pacientes que consulta a un servicio médico</b>	
	36 (18.3 ± 0.05)
<b>Historia tratamiento con Glucantime</b>	
	25 (12.7 ± 0.05)
<b>Aplicación de ungüentos</b>	
	71 (36.2 ± 0.07)

\*DE = Desviación Estándar

## 5.2 PREVALENCIA DEL DIAGNOSTICO DE LEISHMANIASIS CUTANEA

		DX PARASITOLOGICO		
		POSITIVO	NEGATIVO	
DX CLINICO		137	23	160
		26	10	36
		163	33	196

$P = (\text{Verdaderos positivos} + \text{Falsos negativos}) / \text{Población Total}$

$P = 0.83$  (IC95% 0.77 – 0.88)

## 5.3 RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE DIAGNOSTICO

Las herramientas diagnósticas, tanto el diagnóstico clínico como las pruebas parasitológicas que conformaban el estándar de referencia, se realizaron al tiempo, al momento de la captación del caso. El diagnóstico clínico del TSC fue realizado y consignado en la ficha clínico-epidemiológica en ese mismo instante y los resultados de las láminas, cultivos y PCR se obtuvieron 1 día, 30 días y 3 meses después de su llegada al laboratorio clínico, respectivamente.

Para un total de 56 muestras, a las cuales se siguió y evaluó el tiempo promedio entre la toma de la muestra y su llegada al laboratorio clínico, se observó que: para las láminas que se remitían al laboratorio clínico del hospital del municipio, el tiempo promedio fue de 2.9 días  $\pm$  3.3 (M  $\pm$  DS), para los municipios de Rionegro y El Playón, y de 7.9  $\pm$  6.4 días para Landázuri; para las láminas, cultivos y PCR enviados a Bucaramanga al laboratorio de la facultad de Salud de la UIS, el tiempo promedio fue de 2.8 días  $\pm$  1.3 (El Playón), 4 días  $\pm$  7.4 (Rionegro) y 11 días  $\pm$  8.7 (Landázuri). Estos tiempos se tuvieron en cuenta, con el fin de valorar la realización del protocolo de toma de muestras de las pruebas de referencia y evaluar aspectos que pudieran incidir en una no adecuada ejecución de estas. Este tiempo entre la toma y la lectura no alteró los resultados de la lectura de la lámina, por llegar fijada con azul de metileno al laboratorio; ni tampoco del cultivo, porque se incubaban a temperatura ambiente protegidos de la luz por un tiempo máximo de 8 semanas, condiciones que eran conservadas por los TSC quienes una vez tomaban la

muestra, los mantenían en cajitas de icopor en las cuales llegaban al laboratorio. Estos tiempos muy probablemente expliquen porque el PCR no tuvo alta detección, debido a condiciones de refrigeración en las que debía conservarse y que no fueron posibles de implementar y mantener en campo.

Las pruebas que conformaron el Estándar de referencia discriminaron un total de 33 diagnósticos negativos y 163 positivos; la tabla 13 muestra los resultados para cada una de las pruebas, encontrándose 38 casos con una prueba positiva, 22 con las cuatro pruebas positivas y 26 con todas negativas. De 196 pacientes a quienes se les realizaron las pruebas, 163 (83%) fueron parasitológicamente diagnosticados por una o más de las cuatro pruebas componentes del estándar de referencia. Por consiguiente, se halló prevalencia del diagnóstico positivo de leishmaniasis del 83% (IC95% 77 – 88).

Teniendo en cuenta el diagnóstico final, la positividad de las pruebas fue de 79% para el Frotis Directo en lámina, 70.4% para el cultivo por aspirado y 42.5% para la PCR.

**Tabla 13. Distribución de resultados por tipo de prueba parasitológica que compone el Estándar de referencia.**

Estándar de Referencia	Lámina 1	Lámina 2	Cultivo	PCR	Total
Negativo	-	-	-	-	26
	-	-	-	NR	3
	-	-	NR	-	3
	-	-	NR	NR	1
Positivo	+	- ó NR	- ó NR	- ó NR	10
	-	+	-	-	3
	-	-	+	-	19
	-	-	-	+	6
	+	+	-	-	7
	-	-	+	+	3
	+	+	+	-	15
	+	+	+	NR	27
	-	+	+	+	1
	+	+	NR	NR	2
	+	+	+	+	22
Otras combinaciones					48

( + ) Positivo para leishmaniasis                      ( - ) Negativo para leishmaniasis                      (NR) No Realizado

Respecto a las características clínicas observadas en las lesiones, por medio de las cuales el TSC discriminaba entre un diagnóstico clínico positivo y negativo, se encontró que estas no mostraron ser criterios únicos o específicos sólo en aquellas lesiones que conforme al diagnóstico por estándar de referencia eran positivas (tabla 14). Por consiguiente no se analizarán de forma individual y solo se tendrá en cuenta el criterio clínico dado por el TSC en la escala de certeza.

**Tabla 14. Características clínicas observadas por los TSC, según diagnóstico definido por Estándar de Referencia**

Característica de la lesión	Estándar de referencia Positivo (n=163)	Estándar de referencia Negativo (n=33)
Aspecto de cráter de volcán	104 / 160 (65%)	24 / 33 (72,7%)
Forma redondeada	141 / 161 (87,6%)	32 / 33 (96,9%)
Bordes levantados	137 / 161 (85%)	31 / 33 (93,4%)
Bordes duros	144 / 161 (89,4%)	29 / 33 (87,8%)
Adenopatías	28 / 122 (22,9%)	4 / 29 (13,7%)
Presencia de dolor	58 / 159 (36,5%)	14 / 32 (43,7%)
Presencia de pus	40 / 160 (25%)	11 / 32 (34,4%)

#### 5.4 INDICES DE VALIDEZ

La tabla 15 ilustra los datos mostrando el criterio diagnóstico definido por los TSC, de acuerdo a la escala de certeza, para los 196 pacientes con lesiones sospechosas en piel.

**Tabla 15. Escala de certeza del diagnóstico clínico por TSC**

Están Referenc	Escala de certeza					Total
	1	2	3	4	5	
	Certeza No Leishmaniasis	Probablemente No leishmaniasis	No sabe Cuestionable	Probablemente Si leishmaniasis	Certeza Si leishmaniasis	
<b>Negativo</b>	3	2	5	8	15	33
<b>Positivo</b>	3	5	18	53	84	163
<b>Total</b>	6	7	23	61	99	196

Se determinó criterios de Sensibilidad, Especificidad y valores predictivos para cada valor en la escala de certeza diagnóstica TSC (Anexo G), observándose un mejor equilibrio entre estos criterios con un valor mayor o igual a 4 como punto de corte para positividad

(tabla 16). Los valores predictivos evidencian para el diagnóstico clínico, una mayor probabilidad de certeza para un criterio positivo por parte del TSC.

**Tabla 16. Criterios de Validez de la escala de certeza diagnóstica TSC**

Criterios de validez (IC 95%)	Punto de Corte			
	A (1 neg / >= 2 pos)	B (1,2 neg / >= 3 pos)	C (<4 neg / >= 4 pos)	D (<=4 neg / 5 pos)
<b>Sensibilidad</b>	98.16% (96,2–100%)	95.1% ( 92 – 98,1% )	84.05% (78,9– 89,1% )	51.5% (44,5 – 58,5%)
<b>Especificidad</b>	9% (5,0 – 13,1%)	15.15% (10.1 – 20,1%)	30.3% (23,8 – 36,7% )	54.5% (47,5 – 61,5%)
<b>Valor Predictivo Positivo</b>	84.2% (79.1 - 89.3%)	84.7% (79.6 - 89.7%)	85.6% (80.7 - 90.5%)	84.8% (79.8 - 89.8%)
<b>Valor Predictivo Negativo</b>	50% (43 - 57%)	38.46% (31.6 - 45.2%)	27.7% (21.5 - 34%)	18.5% (13.1 - 24%)

Se realizó determinación de índices de calidad. La máxima calidad de estos criterios de validez ( $k(1,0) = 13\%$ ;  $k(0,0) = 14\%$ ) se obtuvieron para el punto de corte “C”; en el cual, se consideró como diagnóstico positivo a aquellos casos en que el TSC tuvo probable sospecha y total certeza que la lesión sí fuera leishmaniasis, y como diagnóstico negativo a aquellos casos en los que no se sabía, se sospechaba ser otro tipo de lesión o se tenía total certeza que no fuera leishmaniasis (tabla 17).

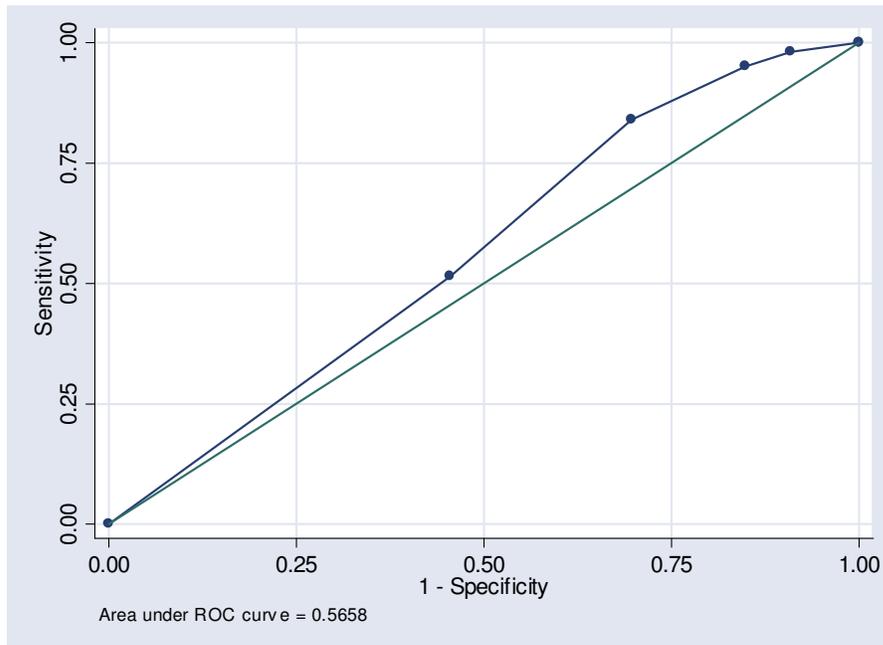
**Tabla 17. Índices de calidad según punto de corte en Escala de certeza diagnóstica TSC**

Punto de corte	K (1,0) Optima sensibilidad	K (0,0) Optima Especificidad	K (0,5) Eficiencia
A	0.39	0.062	0.107
B	0.26	0.091	0.135
C	0.13	0.141	0.138
D	0.02	0.100	0.034

Puntos de corte: (A) 1 negativos vs >=2 positivos; (B) 1 y 2 negativos vs >=3 positivos; (C) 1, 2 y 3 negativos vs >=4 positivos; (D) <=4 negativos vs 5 Positivos.

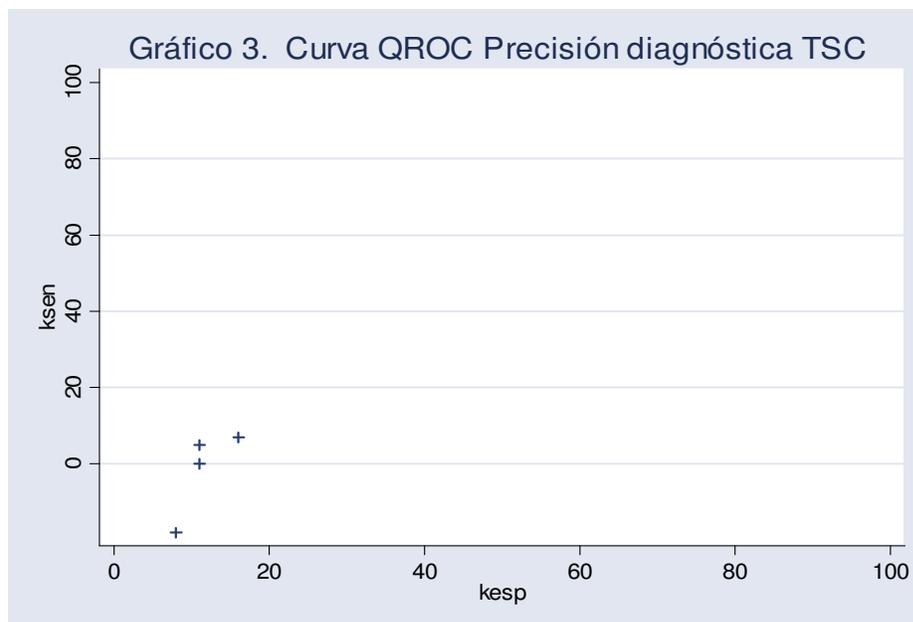
La Curva ROC (gráfico 2) ilustra que la capacidad de discriminación diagnóstica o probabilidad que el TSC diagnostique correctamente no fue diferencial de 0.5, la cual estimó un Área Bajo la Curva de 56.5% (IC95% 45.6 – 67.4).

**Gráfico 2. Curva ROC, Escala de certeza diagnóstica TSC**



El punto de corte "C" obtuvo la máxima calidad de sensibilidad y especificidad y se representa en la curva QROC (gráfico 3).

**Gráfico 3. Curva QROC, Precisión diagnóstica TSC**



## 5.5 REPRODUCIBILIDAD

Dado que la clasificación diagnóstica por parte del TSC se evaluó a partir de una escala de grado de certeza o precisión diagnóstica de cinco ítems, se evaluó reproducibilidad inter-evaluador en cada punto de corte ((A) 1 negativos vs  $\geq 2$  positivos; (B) 1 y 2 negativos vs  $\geq 3$  positivos; (C) 1, 2 y 3 negativos vs  $\geq 4$  positivos; (D)  $\leq 4$  negativos vs 5 Positivos); las tablas se presentan en el Anexo H.

Conforme los resultados obtenidos en los índices de validez para cada punto de corte, se toma como medida representativa de este indicador el punto de corte en “C”, para el cual se determinó la reproducibilidad del diagnóstico clínico entre dos TSC evaluadores por medio de la estimación de la Proporción Observada de acuerdo positivo ( $P_{pos}=86.3\%$ ) y la Proporción observada de acuerdo negativo ( $P_{neg}= 43.5\%$ ), en lugar del índice kappa, conforme sugerencias de Feinstein y Cicchetti,<sup>61</sup> debido a un imbalance simétrico<sup>62</sup> notado en la tabla 2x2 al momento de calcular el valor de kappa (Anexo I). Según lo descrito por estos autores, este fenómeno observado en los datos aquí presentados, obedece a la desventaja que tiene el índice Kappa de estar afectado por la prevalencia, al igual que parámetros como la sensibilidad, la especificidad; de tal manera que al ser alta la prevalencia, se subestima el valor de Kappa, aún si se posee un buen acuerdo inter-evaluador, y poco o ningún efecto e tiene al aplicar el  $K_{m\acute{a}x}$  (Kappa máximo). El estimado de Kappa fue de 30%, con un estimado por ajuste con de  $K_{m\acute{a}x} = 32.4\%$ .

Se calculó igualmente kappa inter-evaluador para el frotis directo, 0.469 (IC95% 0.33 – 0.60), que hizo parte del estándar de referencia y que es la única prueba que por sus características se le puede determinar reproducibilidad.

## 6. DISCUSION

Hasta el momento, la prevalencia de diagnóstico positivo de leishmaniasis cutánea en lesiones sospechosas en piel, no había sido determinada en municipios endémicos del Departamento de Santander. Aunque en otras regiones de Colombia ya se han evaluado métodos diagnósticos, este dato tampoco ha sido obtenido. Solo un estudio previo reporta una prevalencia del 67% de casos conjuntos de leishmaniasis cutánea y muco-cutánea en residentes de Tumaco (Departamento del Nariño).<sup>13</sup> La prevalencia aquí hallada es superior a la del 62% reportada en regiones endémicas en Brazil.<sup>63</sup> Esto sugiere que, es probable que un diagnóstico diferencial debido a otras etiologías se presente en menor porcentaje en nuestro Departamento comparado con otros municipios endémicos en el país; sin descartar la posibilidad de haberse incurrido en este estudio en un sesgo de selección debido a la alta endemicidad y previo conocimiento de lesiones características por padecimiento propio de la enfermedad y/o antecedentes de haberla padecido, por parte del TSC.

El gran número de casos de leishmaniasis cutánea notificados año a año en el Departamento de Santander y el hecho de una alta prevalencia de la enfermedad en casos sospechosos, pone de manifiesto la importancia y utilidad que tendría en estas áreas endémicas, la aplicación de métodos diagnósticos sencillos y accesibles para la mayoría de la población; sobre todo, cuando encontramos que el 81.7% de las personas con lesiones compatibles no habían solicitado atención médica y el 36.7% presentaban tiempo de evolución de la lesión superior a 2 meses. En población Colombiana se ha observado que debido a la lejanía y costos de transporte, el 20% de las personas consultan al “curandero ó medico de hierbas” y el 27% no consulta ni siquiera al hospital local,<sup>64</sup> señalando estos factores como posibles desencadenantes de cronicidad de la enfermedad.

La evidencia científica que aquí se presenta permite destacar tres principales características del diagnóstico clínico realizado por trabajadores comunitarios en salud, basados en las características clínicas de las lesiones: primero, que éste método supera en sensibilidad a los métodos de diagnóstico parasitológico de rutina en áreas endémicas

(frotis directo y cultivo) y no así en especificidad, concordando con los resultados de la investigación realizada por Weigle<sup>13</sup> en la que obtuvo similares hallazgos de baja especificidad para criterios clínicos; segundo, que el diagnóstico clínico brinda mayor seguridad para predecir la presencia de leishmaniasis cutánea, pero no así su ausencia debido a su alto valor predictivo positivo pero bajo valor predictivo negativo; y tercero, que a pesar de su alta sensibilidad, ni esta ni la especificidad son criterios de validez óptimos para diagnóstico de leishmaniasis. Finalmente se puede observar que proyecta un área bajo la curva ROC que es muy cercana a la línea diagonal, indicándonos que el diagnóstico clínico tiene una exactitud no diferente a la que se obtendría al azar. Por lo tanto, se concluye que el diagnóstico clínico realizado por mediadores comunitarios no tiene utilidad para establecer diagnóstico de leishmaniasis cutánea.

Investigaciones previas de métodos diagnósticos para leishmaniasis muestran que no se había determinado otros criterios de validez mas allá de la sensibilidad y en algunas oportunidades de especificidad; podría afirmarse que, tampoco existe una técnica parasitológica válida, o por lo menos correctamente validada que determine la presencia o ausencia de la infección en más del 70% de los casos <sup>13, 65</sup>. Sin embargo, existen métodos como la Reacción en cadena de la polimerasa <sup>66, 67</sup> y la Inmunofluorescencia Indirecta,<sup>68</sup> que debido a sus características se convierten en el único método de confirmación, aunque con el inconveniente que no están disponibles en aquellas zonas donde se necesitan, y que son difíciles de implementar debido a sus altos costos, infraestructura tecnológica y personal profesional capacitado necesarios para su ejecución. El siguiente esquema presenta las ventajas y desventajas de cada método diagnóstico, y contextualiza entonces el marco en el cual el diagnóstico clínico actúa:

**Ventajas y Desventajas de las Pruebas Diagnosticas en leishmaniasis cutánea**

PRUEBA	VENTAJAS	DESVENTAJAS
Diagnóstico clínico	Económico Aplicable en áreas endémicas Tamizaje inmediato / decisiones oportunas	Enf otras etiologías tienen similar aspecto clínico Amplio espectro clínico No es una prueba legítima para diagnóstico
Frotis Directo en lámina	Económico Diagnostico oportuno Procedimiento simple	Lector Numero y dispersión de parásitos Distorsión de amastigotes Aplicación de ungüentos en lesiones Sensibilidad variable

Cultivo	Altamente específico	Contaminación Bacteriana Sensibilidad varía de acuerdo al medio de cultivo utilizado Difícil aplicabilidad en áreas endémicas
PCR	Diagnóstico rápido Menor contaminación que un cultivo Altamente específico	Costoso Consume tiempo, equipos y personal profesional Sensibilidad depende del tipo de muestra, métodos extracción DNA y primers usados
Prueba de Montenegro	Procedimiento simple	No distingue entre pasadas y presentes infecciones

Por lo tanto, como bien se evidencia, el diagnóstico clínico de ninguna manera puede reemplazar la realización de técnicas parasitológicas, pero si puede entonces convertirse en una prueba de captación oportuna in situ, realizada con la participación activa de la misma comunidad. La participación comunitaria podría ser una herramienta de ayuda para mejorar la oportunidad del diagnóstico de leishmaniasis cutánea, en áreas altamente endémicas, con la aplicación de herramientas diagnósticas básicas como el frotis directo, que al ser aplicado por comunidad en general capacitada demuestra compararse a máximas positividad hasta ahora reportadas en previas investigaciones <sup>48</sup> y ser más reproducible que el diagnóstico clínico.

Uno de los grandes compromisos del estado para con la salud y calidad de vida de las poblaciones es el mejoramiento del comportamiento colectivo hacia sí mismo; incluso se contempla bajo algunos lineamientos nacionales para el Plan de Atención Básica, como la circular 018 de 2004, desde la cual se reglamenta el deber de desarrollar modelos de participación social efectivos para la promoción, prevención y control de Enfermedades de Transmisión Vectorial (ETV). El diagnóstico clínico realizado por intermediarios comunitarios serviría como herramienta sensible de intervención y control, con el fin de actuar oportunamente, además de ejercer apoyo a las intervenciones de comunicación, información y educación para la población, sobre todo en zonas como Landázuri donde estudios realizados en la zona, <sup>36</sup> demuestran una edad temprana de 7 años promedio de infección.

Para otros municipios del Departamento, donde gran carga de su morbilidad en ETV es debida a Dengue, se han llevado a cabo estrategias de movilización y comunicación

social, por organizaciones como la Organización Panamericana de la Salud (OPS), la cual pretendió percibir conductas orientadas a la prevención del dengue; sus resultados resaltaron que para la comunidad, la falta de educación y conocimiento sobre el tema de los zancudos es una sub-causa de la no realización de acciones preventivas adecuadas con respecto a la presencia de zancudos.<sup>69</sup> Estas experiencias de participación comunitaria en otras enfermedades como el Dengue, señalan la importancia de la participación comunitaria para el éxito y sostenibilidad de las acciones hacia los problemas de salud de mayor impacto en cada población.

A diferencia de otros estudios, en los que se ha vinculado a la comunidad como parte activa en estrategias de promoción de la salud,<sup>70</sup> se observó una aceptación y colaboración permanente por parte de los habitantes de estas veredas, resaltando la capacidad y posibilidad de hacer partícipe a estas comunidades dentro de los proyectos de promoción, prevención y control.

Este estudio, si bien mostró fortalezas por parte del trabajo comunitario, también evidenció oportunidades respecto a la utilización y acceso a métodos diagnósticos más sensibles como el cultivo; al igual que debilidades ya mencionadas respecto a la implementación en campo de pruebas moleculares como el PCR. Por consiguiente, en complementariedad a métodos de diagnóstico clínico, sólo técnicas como el frotis directo en lámina y el cultivo podrían fácilmente ser implementadas por la población e incorporadas en áreas de difícil acceso para los programas de control en leishmaniasis.

## 7. CONCLUSIONES

Hasta el momento, la evidencia en áreas endémicas nos muestra que el diagnóstico clínico de leishmaniasis cutánea, realizado por personas de la comunidad educadas en salud, no parece ser un buen criterio diagnóstico confirmatorio de la enfermedad, y por ende no debe considerarse como criterio por medio del cual proceder o no al tratamiento. Debido a un posible sesgo de selección presentado en este estudio, que incrementa la prevalencia afectando los estimados de validez que dependen de ella, es necesario concluir que la alta sensibilidad y baja especificidad puede deberse a este hecho; en concordancia con los resultados de evaluación de calidades de estos criterios, se evidencia que el diagnóstico clínico no posee la eficiencia necesaria para ejecutarse como prueba de diagnóstico para leishmaniasis cutánea.

Aunque las lesiones ocasionadas por este tipo de leishmaniasis, presentan unas características clínicas muy bien definidas y particulares, definitivamente no son un criterio suficiente e inequívoco para establecer la infección parasitaria; las lesiones cutáneas tienen diversas formas (úlceras francas, vegetantes, pápulas, nódulos, entre otras), pueden sobreinfectarse cambiando su aspecto característico, comparten un aspecto clínico muy similar con otras patologías, y evolucionan crónicamente hasta su espontánea desaparición o diseminación, lo que impide discriminar a simple vista entre esta y otras patologías.

Los métodos diagnósticos varían su capacidad de detectar el parásito, dependiendo del tiempo de evolución de la lesión, de los ungüentos y demás sustancias aplicadas sobre la lesión que dañan y modifican estructuras celulares y parasitarias, del estado de sobreinfección, de la experticia de la persona que toma la muestra y realiza el diagnóstico, e incluso de la misma prevalencia del diagnóstico entre casos sospechosos.

Por lo tanto, el diagnóstico de leishmaniasis cutánea en áreas endémicas debe apoyarse en la participación comunitaria, en el diagnóstico clínico como prueba oportuna de tamizaje y el consecuente uso de herramientas parasitológicas como prueba diagnóstica de esta enfermedad.

## **8. RECOMENDACIONES**

Teniendo en cuenta los resultados de este trabajo recomiendo se incentive y se evalúe los mecanismos de participación activa comunitaria como una estrategia para mejorar la oportunidad de detección y control de leishmaniasis.

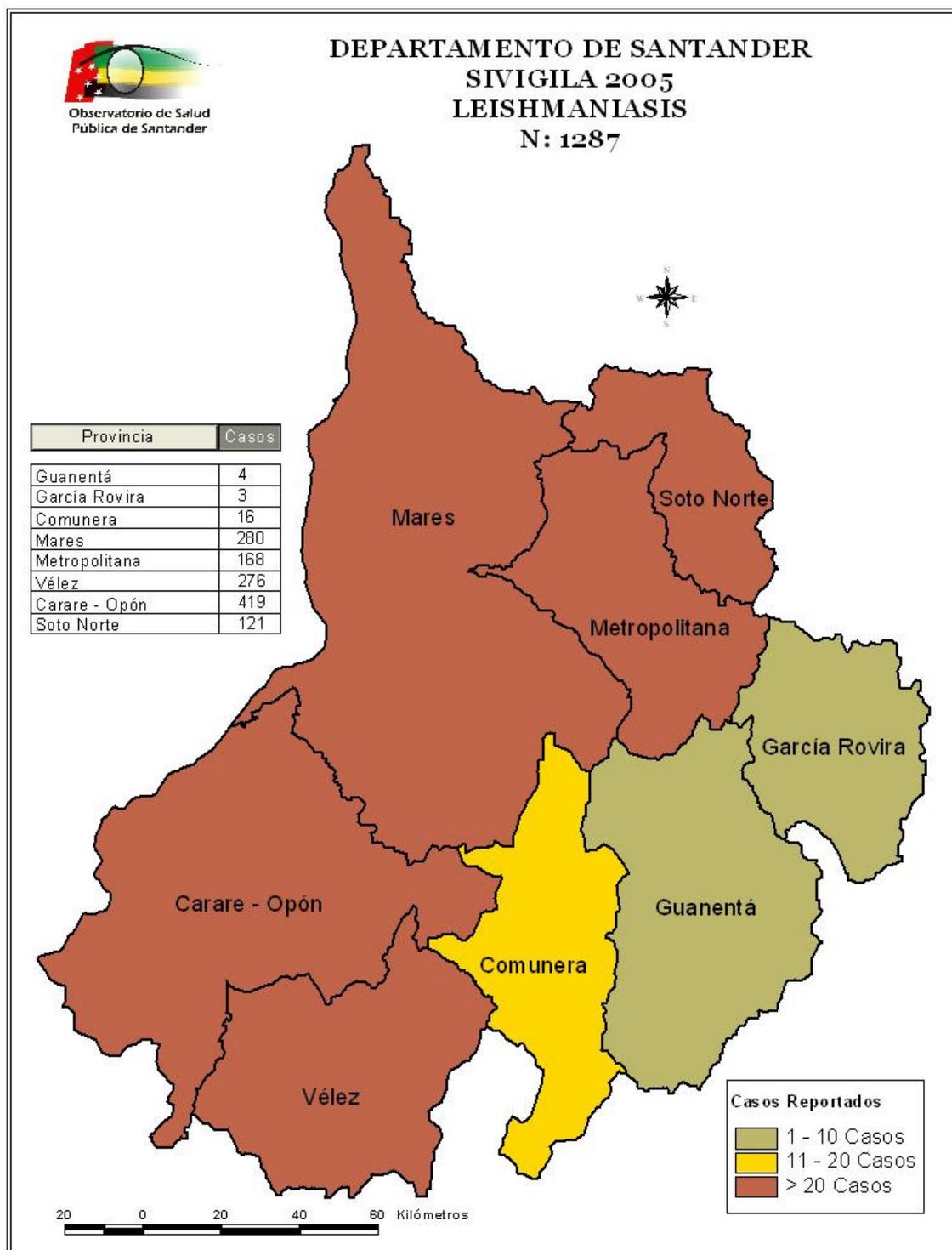
Debido a las características propias de la infección y de las zonas geográficas donde se presenta, en leishmaniasis al igual que en las otras ETV, se requiere de educación y participación por parte de la comunidad que padece este tipo de patologías. De esta manera propondría se evalúen intervenciones educativas en escolares para la adquisición de conocimientos, actitudes y prácticas preventivas en la comunidad, observando como indicadores la reducción de tasas de incidencia y cronicidad de leishmaniasis cutánea, en áreas endémicas en Santander.

Los entes responsables de la salud pública de estas comunidades, deben procurar el acercamiento de infraestructura, recurso humano capacitado y tecnología diagnóstica, que repercuta en oportunidades para un oportuno diagnóstico y tratamiento.

Financiación: Trabajo cofinanciado por COLCIENCIAS (Cod. 11020412926).

# **ANEXOS**

**ANEXO A. Mapa de Distribución casos de Leishmaniasis, Santander 2005**



**FUENTE: Observatorio de Salud Pública de Santander**

**ANEXO B**



**LEISHMANIASIS CUTANEA LOCALIZADA  
ULCERA GRANULOMATOSA EN MANO**

**ANEXO C**

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
EVALUACION DEL DIAGNOSTICO CLINICO EN LEISHMANIASIS  
TESIS MAESTRIA EN EPIDEMIOLOGIA CIE-UIS. JUANA P. SANCHEZ  
**CONSENTIMIENTO INFORMADO**

Declaro que otorgo consentimiento para que me sean practicados los exámenes diagnósticos para leishmaniasis. Estoy de acuerdo en que se me practique una incisión de 0.5 cm de largo y 0.5 cm de profundidad con un bisturí nuevo para extraer material que será coloreado y observado al microscopio. De la misma forma, permito que me sean tomados 2 aspirados para con jeringa de tuberculina en forma intradérmica en los bordes de la lesión para cultivo. Estoy informado que el procedimiento no implica riesgos. En caso de salir positivo en los exámenes me someteré al tratamiento (Glucantime<sup>o</sup>) suministrado por el gobierno a través del Hospital del área donde yo resido.

**DATOS DEL PACIENTE**

**TESTIGO 1**

\_\_\_\_\_  
**FIRMA PACIENTE O TUTOR**

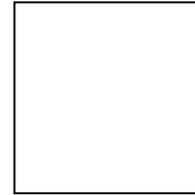
NOMBRE: \_\_\_\_\_  
APELLIDOS: \_\_\_\_\_  
# CÉDULA: \_\_\_\_\_



Espacio para huella dactilar

\_\_\_\_\_  
**FIRMA**

NOMBRE: \_\_\_\_\_  
APELLIDOS: \_\_\_\_\_  
# CÉDULA: \_\_\_\_\_

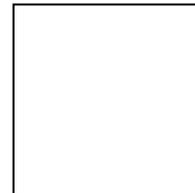


Espacio para huella dactilar

**TESTIGO 2**

**FIRMA** \_\_\_\_\_

NOMBRE \_\_\_\_\_  
APELLIDO \_\_\_\_\_  
CEDULA \_\_\_\_\_



## ANEXO D



**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER**  
**FICHA DE RECOLECCION DATOS CLINICO-EPIDEMIOLOGICOS**  
**EVALUACION DIAGNOSTICO CLINICO POR ACTORES COMUNITARIOS**  
**TESIS DE MAESTRIA CIE-UIS. JUANA PATRICIA SANCHEZ V**

Fecha:	día / mes / año	Municipio:			
Vereda:		Código paciente:			

### IDENTIFICACION DEL PACIENTE

Nombres y apellidos: \_\_\_\_\_

Edad:	Meses	Años	Fecha Nacimiento:	día / mes / año	
Género:	<input type="checkbox"/> Mujer	<input type="checkbox"/> Hombre			

Qué tipo de seguro tiene?: \_\_\_\_\_

### DESCRIPCION DE LESIONES

Cuántas llagas presenta en piel? 

1	2	3	4	>4
---	---	---	---	----

Sitio del cuerpo donde están las llagas (ver gráfica): \_\_\_\_\_

Ha ido al hospital a consultar por la(s) llaga(s)? 

si	no
----	----

Se aplicó glucantime? 

si	no
----	----

Se ha aplicado ungüentos? 

si	no
----	----

### EXAMEN FISICO DE LA LLAGA (En el gráfico encierre con un círculo la llaga a describir)

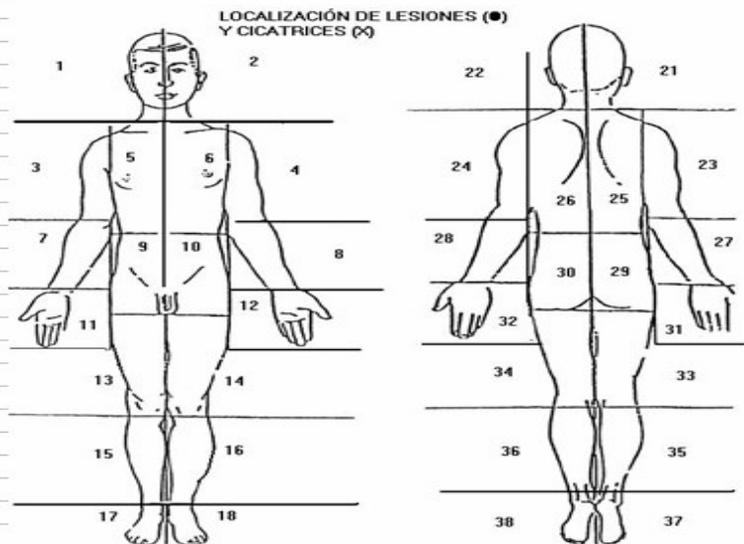
Hace cuánto tiempo presenta la llaga? 

1	2	3	4	5	6	7	8	>8
---	---	---	---	---	---	---	---	----

 sema

La llaga en piel tiene las siguientes características:

Tiene forma de crater de volcán	si	no	Presenta adenopatía local ó regional	si
tiene forma redondeada	si	no	duele la llaga	si
Los bordes son levantados	si	no	se produjo por golpe o cortadura	si
Los bordes son duros	si	no	Tiene pus	si



### DESCRIPCION MUESTRA PARA ENVIO (Llenar sólo el encuestador)

Es una lesión compatible con Leishmania?	no	quizá no	no sabe	quizá si	si
Tipo de muestra tomada:					
Directo del borde de la lesión	<input type="checkbox"/>	Raspado lesión para PCR		<input type="checkbox"/>	
Cultivo por aspirado lesión	<input type="checkbox"/>	Serología		<input type="checkbox"/>	

Responsable: \_\_\_\_\_  
 Bucaramanga. Facultad de Salud. 3er Piso Cra 32 entre Calle 28 y 29 Telf: (097) 6344000 Ext. 3205 ó 3209.  
 Maestría Epidemiología. E-mail: [juanipsan@hotmail.com](mailto:juanipsan@hotmail.com)

## **ANEXO E. Técnicas y Procedimientos de Obtención y Procesamiento de Muestras Parasitológicas**

### **DIAGNÓSTICO CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICO**

Lo hará extramuralmente los TSC en las zonas endémicas de Santander, en la vivienda del paciente (búsqueda activa); el diagnóstico se fundamentará en el examen de la lesión teniendo en cuenta la definición de caso; se indagará sobre el tiempo de enfermedad, zona corporal de presencia de lesiones y sus características, considerando como hecho importante para el diagnóstico la permanencia o procedencia de una zona endémica de Leishmaniasis.

**Criterios de definición de caso clínico-epidemiológico de Leishmaniasis:** Presencia de lesiones típicas e historia epidemiológica compatible.

Procedencia de área endémica

Aparición de lesión sin historia de trauma

Evolución de la lesión de más de dos semanas

Úlcera redonda u ovalada y de bordes levantados

Apariencia con forma de cráter de volcán

Lesiones nodulares y en ocasiones con más de una localización

Adenopatía local o generalizada

### **FROTIS DIRECTO DE LESIÓN**

#### **Materiales**

- Gasa estéril: Se mantiene empaquetada en papel kraf (5 gasas por sobre), a medida que se va utilizando se abre el sobre.

- Guantes

- Hoja de bisturí No. 11 ó 15

- 3 Láminas portaobjetos: Se limpian previamente con alcohol al 95% para retirar los restos de grasa y otro tipo de suciedad. Cada lámina se marca utilizando stickers con el respectivo código asignado al paciente

- Coloración Field: Azul de metileno fosfatado, Solución Buffer, Solución A, Solución B

Los colorantes se almacenan a temperatura ambiente en frascos ámbar que los proteja de la luz excesiva y de la humedad.

**Procedimiento:** El examen directo se realiza haciendo un raspado del borde interno de la úlcera. El procedimiento es el siguiente:

- Se elige la lesión con menor tiempo de evolución y menor infección agregada. De esta se escoge el borde activo de la úlcera.

- Se desinfecta el borde la lesión con alcohol al 70% y agua oxigenada.

- Se presiona con firmeza con los dedos índice y pulgar el borde elegido. Con una hoja de bisturí hacer una pequeña incisión en el lado interno; secar la sangre con gasa y raspar el tejido de los bordes de la incisión.

- Con el material obtenido en la hoja de bisturí, se hace el frotis en una lámina, procurando que éste sea delgado. Una buena muestra es aquella que presenta un aspecto granular con muy poca sangre.
- Se deja secar la lámina al medio ambiente.
- Fijar luego con metanol por tres minutos ó sumergiendo por un segundo la lámina en azul de metileno fosfatado. Al secar, llevar al laboratorio clínico del municipio para su procesamiento.

**Coloración de Field:** Se prepara el colorante mezclando una gota de solución A, una gota de solución B y 3 ml de agua amortiguada. Cuando la placa esté seca, se coloca boca abajo en una caja de petri soportada por dos palillos y se deja correr la mezcla de colorante entre la placa y la caja de petri por 9 minutos. Se retira la placa y se deja secar a temperatura ambiente para hacer la lectura al microscopio óptico con lente de inmersión (100 X).

**Interpretación:** Se considera “positivo” cuando se observa uno o más formas amastigotes características de *leishmanias* (ovaladas o redondeadas, con distinción del núcleo y kinetoplasto) en los extendidos. Se informa como “negativo” cuando no se observan amastigotes después de haber recorrido un mínimo de 100 campos. En este último caso, deben repetirse los directos antes de descartar el diagnóstico de leishmaniasis los frotis o raspados del borde de la lesión se reportan como: “Examen directo tomado del borde de la lesión: positivo o negativo para *Leishmania*” o “se observan (o no se observan) amastigotes de *Leishmania*”.

**Envío de la muestra del Frotis de lesión:** Obligatorio para el establecimiento de salud, donde se toma la muestra, realizar una coloración y enviar otra lámina sin coloración al personal del proyecto para realizar la lectura.

- Fijar con metanol por tres minutos.
- Las láminas, debidamente rotuladas, serán envueltas individualmente, haciendo paquetes con un máximo de 10 láminas porta-objetos.
- Colocar los paquetes en caja de cartón y adicionar las fichas clínico-epidemiológicas respectivas.
- Rotular la cubierta y enviar al laboratorio referencial de la facultad de salud.

## **CULTIVO POR ASPIRADO**

### **Materiales**

- Gasa estéril, Guantes, Mecheros, Alcohol 95%, Cinta de enmascarar
  - 4 Jeringas de tuberculina con aguja No.22
  - PBS estéril con antibiótico PBS+P/E (Penicilina 500 U/ml / Estreptomina 10 mg/ml): Se almacena en viales tapa rosca a temperatura ambiente, protegidos de la luz y de la humedad.
  - 1Tubo de Medio de cultivo líquido: MEM. Se almacena en tubos con tapa de caucho a temperatura ambiente protegidos de la luz y de la humedad.
  - 2 Medios de cultivo sólido: NNN y SNK
- Se almacenan en tubos con tapa de caucho a temperatura ambiente protegidos de la luz y de la humedad.

**Procedimiento:** Este método debe realizarse previa limpieza del sitio de trabajo y con ayuda de dos mecheros (condiciones de asepsia)

- En condiciones de asepsia, introducir 0.1 ml de PBS+P/E en dos agujas de tuberculina
- Limpiar la tapa del medio de cultivo (1 NNN y 1 SNK) con alcohol al 95%
- Marcar los tubos con cinta de enmascarar con el código que se le asigne a cada paciente
- Después de desinfectar la lesión, se introduce con un ángulo de 30° en el borde más activo de la úlcera la aguja de una jeringa de tuberculina que contiene 0.1 ml PBS+P/E; se hacen movimientos rotatorios para macerar con el bisel el tejido, evitando contaminación con sangre, y al observar la aparición del aspirado se retira lentamente la aguja. La excesiva presencia de sangre en las muestras colectadas es perjudicial para el desarrollo del parásito, debido a que la sangre contiene proteínas séricas altamente inhibitorias para el crecimiento de los promastigotes de Leishmania.
- La muestra obtenida se transfiere, manteniendo condiciones de esterilidad ayudados por el mechero, en los tubos con medio de cultivo y luego se adicionan, en iguales condiciones de esterilidad, 0.3 ml de medio líquido MEM y se incuba a temperatura ambiente, protegidos de la luz y la humedad en cajas de icopor o cavas perfectamente tapadas.

Para cada medio de cultivo (1 NNN y 1 SNK) se realiza un aspirado utilizando agujas y jeringas diferentes.

**Interpretación:** Los cultivos se observan por primera vez al cuarto día, tornando una gota de la fase líquida entre lámina y laminilla y observando al microscopio en 40X en busca de promastigotes de Leishmania, o se pueden observar directamente en microscopio de luz invertida. En caso de no observar el parásito se continúa incubando y se examina de nuevo semanalmente durante ocho semanas al cabo de las cuales, si persiste negativo, se descarta. Algunas veces se requieren 2 o 3 pases cada 7-10 días para evitar la oxidación excesiva de la sangre, antes de que se vean los promastigotes.

## **REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)**

### **Materiales**

- Gasa estéril: Se mantiene empaquetada en papel kraf (5 gasas por sobre), a medida que se va utilizando se abre el sobre.
- Guantes
- Hoja de bisturí No. 11 ó 15
- Vial con 0.5 ml de NET SDS 10%

**Procedimiento:** Se escoge el borde activo de la úlcera, si el paciente presenta más de una lesión, se utiliza para el diagnóstico, muestra de la lesión más reciente

- Después de realizar la limpieza de la lesión se hace buena hemostasia, sujetando el área escogida de toma de muestra fuertemente con los dedos índice y pulgar, y con la hoja del bisturí se realiza una pequeña incisión en la parte central del borde activo.
- Se limpia la gota de sangre que puede salir con la incisión con gasa estéril y con la parte cortante del bisturí se toma un fragmento de tejido de los bordes de la incisión tratando de obtener la mayor cantidad.
- El material obtenido se introduce en el vial que contiene NET SDS 10%.

Es importante señalar que la excesiva presencia de sangre en las muestras colectadas es perjudicial para el desarrollo de la técnica, ya que el grupo hemo de la sangre inhibe la reacción en cadena de la polimerasa.



**ANEXO G. CALCULO CRITERIOS DE VALIDEZ POR PUNTO DE CORTE EN LA ESCALA DE CERTEZA DIAGNOSTICA POR EL TSC**

CALCULOS DE SENSIBILIDAD, ESPECIFICIDAD, VALOR PREDICTIVO POSITIVO Y VALOR PREDICTIVO NEGATIVO, POR PUNTO DE CORTE EN ESCALA DE CERTEZA DIAGNOSTICA TSC.

**PUNTO DE CORTE A**

TSC-A*	Estándar Ref		Total
	NEG	POS	
NEG	3	3	6
POS	30	160	190
Total	33	163	196

**TSC-A\*** = Cuando se considera el valor 1 en la escala de certeza diagnóstica del TSC como prueba negativa (NEG), y valores  $\geq 2$  como prueba positiva (POS).

True D defined as gstand $\sim= 0$	[95% Conf. Inter.]		
Sensitivity	Pr( +  D)	98.16%	96.28% 100.04%
Specificity	Pr( -  ~D)	9.09%	5.07% 13.12%
Positive predictive value	Pr( D  +)	84.21%	79.11% 89.32%
Negative predictive value	Pr( ~D  -)	50.00%	43.00% 57.00%
Prevalencia	Pr(D)	83.16%	77.92% 88.40%

**PUNTO DE CORTE B**

TSC-B*	Estándar Ref		Total
	NEG	POS	
NEG	5	8	13
POS	28	155	183
Total	33	163	196

**TSC-B\*** = Cuando se considera valores 1 y 2 en la escala de certeza diagnóstica del TSC como prueba negativa, y valores  $\geq 3$  como prueba positiva.

True D defined as gstand $\sim= 0$		[95% Conf. Inter.]		
Sensitivity	Pr( +  D)	95.09%	92.07%	98.12%
Specificity	Pr( -  $\sim$ D)	15.15%	10.13%	20.17%
Positive predictive value	Pr( D  +)	84.70%	79.66%	89.74%
Negative predictive value	Pr( $\sim$ D  -)	38.46%	31.65%	45.27%
Prevalencia	Pr(D)	83.16%	77.92%	88.40%

### PUNTO DE CORTE C

TSC-C*	Estándar Ref		Total
	NEG	POS	
NEG	10	26	36
POS	23	137	160
Total	33	163	196

**TSC-C\*** = Cuando se considera valores 1, 2 y 3 en la escala de certeza diagnóstica del TSC como prueba negativa, y valores  $\geq 4$  como prueba positiva.

True D defined as gstand $\sim= 0$		[95% Conf. Inter.]		
Sensitivity	Pr( +  D)	84.05%	78.92%	89.18%
Specificity	Pr( -  $\sim$ D)	30.30%	23.87%	36.74%
Positive predictive value	Pr( D  +)	85.63%	80.71%	90.54%
Negative predictive value	Pr( $\sim$ D  -)	27.78%	21.51%	34.05%
Prevalencia	Pr(D)	83.16%	77.92%	88.40%

### PUNTO DE CORTE D

TSC-D*	Estándar Ref		Total
	NEG	POS	
NEG	18	79	97
POS	15	84	99
Total	33	163	196

**TSC-D\*** = Cuando se considera valores  $\leq 4$  en la escala de certeza diagnóstica del TSC como prueba negativa, y valores 5 como prueba positiva.

True D defined as gstand $\approx$ 0		[95% Conf. Inter.]		
Sensitivity	Pr( +  D)	51.53%	44.54%	58.53%
Specificity	Pr( - ~D)	54.55%	47.57%	61.52%
Positive predictive value	Pr( D  +)	84.85%	79.83%	89.87%
Negative predictive value	Pr(~D  -)	18.56%	13.11%	24.00%
Prevalencia	Pr(D)	83.16%	77.92%	88.40%

**ANEXO H. TABLAS 2 x 2 EVALUACION REPRODUCIBILIDAD INTER-EVALUADOR POR PUNTO DE CORTE EN LA ESCALA DE CERTEZA DIAGNOSTICA POR EL TSC**

**PUNTO DE CORTE A**

		Evaluador 2		
		+	-	
Evaluador 1	+	55	2	57
	-	2	0	2
		57	2	59

Kappa = -0.351  
Acuerdo Observado = 93.2%

**PUNTO DE CORTE B**

		Evaluador 2		
		+	-	
Evaluador 1	+	47	5	52
	-	4	3	7
		51	8	59

Kappa = 0.313  
Acuerdo Observado = 84.7%

**PUNTO DE CORTE C**

		Evaluador 2		
		+	-	
Evaluador 1	+	41	8	49
	-	5	5	10
		46	13	59

Kappa = 0.300  
Acuerdo Observado = 77.9%

**PUNTO DE CORTE D**

		Evaluador 2		
		+	-	
Evaluador 1	+	18	9	27
	-	6	26	32
		24	35	59

Kappa = 0.483

Acuerdo Observado = 74.5%

**ANEXO I. INDICES DE ACUERDO PROPORCIONAL  
EN DECISIONES POSITIVAS Y NEGATIVAS ENTRE DOS OBSERVADORES**

		Evaluador 2		
		+	-	
Evaluador 1	+	41	8	49
	-	5	5	10
		46	13	59

Imbalance = Prevalencia de ratings positivos para observadores superior 0.5  
 Evaluador 1 = 0.830  
 Evaluador 2 = 0.779

Simetría = En ambos marginales existe un imbalance en la misma dirección

**PROPORCION OBSERVADA DE ACUERDO POSITIVO (CHARBERLIND'S  $P_{pos}$ )**

$$P_{pos} = \frac{2a}{N + (a - d)}$$

$$P_{pos} = \frac{2 \times 41}{59 + (41 - 5)} = 86.3\%$$

**PROPORCION OBSERVADA DE ACUERDO NEGATIVO ( $P_{neg}$ )**

$$P_{neg} = \frac{2d}{N - (a - d)}$$

$$P_{neg} = \frac{2 \times 5}{59 - (41 - 5)} = 43.5\%$$

## BIBLIOGRAFIA

- <sup>1</sup> World Health Organization. Annex 3: Burden of disease in DALYS by cause, sex and mortality stratum in WHO regions, estimates for 2001. In: The world health report. Geneva: WHO, 2002: 192-7. [consultada Julio 2004] Disponible en internet: [http://www.who.int/whr/2002/whr2002\\_annex3.pdf](http://www.who.int/whr/2002/whr2002_annex3.pdf).
- <sup>2</sup> Instituto Nacional de Salud. Situación Epidemiológica de las enfermedades transmitidas por vectores 2003-2004. SIVIGILA Sem Epidem N° 8, febrero 22-28 de 2004
- <sup>3</sup> Davies, CR., Reithinger, R., Campbell, D., Feliciangeli, D., Borges, R., y Rodriguez, N. The epidemiology and control of leishmaniasis in Andean countries. Cad Saúde Publica, Rio de Janeiro 2000; 16: 925-950
- <sup>4</sup> Instituto Nacional de Salud. Informe de Cierre 2005, Grupo transmisibles. Colombia, 2005
- <sup>5</sup> Instituto Nacional de Salud. Informe de Vigilancia y Control, Colombia, 2004
- <sup>6</sup> Secretaría de Salud de Santander. Diagnóstico de la Situación de Salud en Santander 2004.
- <sup>7</sup> Observatorio de Salud Pública de Santander. Situación de Salud en Santander. Indicadores Básicos 2005.
- <sup>8</sup> TDR/SWG. Report of the Scientific Working Group meeting on leishmaniasis. Geneva, 2 -4 February, 2004.
- <sup>9</sup> Weigle, KA., De Dávalos, M., Heredia, P., Molineros, R., Saravia, NG., D'alessandro, A. Diagnosis of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Colombia: a comparison of seven methods. Am J Trop Med Hyg 1987 36: 489-496
- <sup>10</sup> Ramirez, JR., Agudelo, S., Muskus, C., Alzate, JF., Berberich, C., Barker, D., Velez, ID. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis in Colombia: the sampling site within lesions influences the sensitivity of parasitologic diagnosis. J Clin Microbiol. 2000; 38:3768-73
- <sup>11</sup> Kraemer, HC. Evaluating Medical Tests. SAGE publications. London 1992
- <sup>12</sup> González, LA., Alzate, A., Saravia, N. Evaluación de la inmunoperoxidasa en el diagnóstico diferencial entre esporotricosis y leishmaniasis experimental. Colombia Médica 1991; 22: 130-135
- <sup>13</sup> Weigle, KA., Escobar, M., Arias, AL., Martinez, F., Rojas, C. A clinical prediction rule for American cutaneous leishmaniasis in Colombia. Int J of Epidemiology 1993; 21:548-558

- <sup>14</sup> Youssef, O. Cutaneous Leishmaniasis: A Historical Perspective. *Clinics in Dermatology* 1999; 17: 249-254
- <sup>15</sup> Bonfante, R. Leishmanias y Leishmaniasis tegumentaria en América Latina. *Bol OPS* 1983; 95: 418-426
- <sup>16</sup> Pumarola, A., Rodríguez, A., García, JA., Piedrota, G. *Microbiología y parasitología médica*. 2ª ed. Salvat editores SA.
- <sup>17</sup> Zelazny, AM., Fedorko, DP., Li, L., Neva, FA., Fischer, SH. Evaluation of 7SL RNA gene sequences for the identification of *leishmania* spp. *Am J Trop Med Hyg.* 2005;72:415–20
- <sup>18</sup> Marco, JD., Calvopina, M., Kumazawa, H., Furuya, M., Korenaga, M., Cajal, SP., et al. Species assignation of Leishmania from human and canine American tegumentary leishmaniasis cases by multilocus enzyme electrophoresis in North Argentina. *Am J Trop Med Hyg.* 2005;72:606-11
- <sup>19</sup> Herwaldt, B. Leishmaniasis. *The Lancet.* 1999; 354: 1191 – 1199.
- <sup>20</sup> Altamirano, AJ. Comprometiendo la estructura osteo-facial de las poblaciones humanas del Antiguo Perú por la Leishmaniasis Tegumentaria de forma mucosa. [Doutorado] Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública [Documento electrónico]. 2000 [Consultado Junio 15 de 2006]. Disponible en internet: <[http://portaldeseres.cict.fiocruz.br/transf.php?script=thes\\_chap&id=00010803&lng=pt&nrm=iso](http://portaldeseres.cict.fiocruz.br/transf.php?script=thes_chap&id=00010803&lng=pt&nrm=iso)>.
- <sup>21</sup> Corredor, A., Kreutzer, RD., Tesh, RB., Boshell, J., Palau, MT., Cáceres, E., et al. Distribution and etiology of leishmaniasis in Colombia. *Am J Trop Med Hyg.* 1990; 42: 206-14
- <sup>22</sup> Davies, CR., Llanos-cuentas, A., Sharp, SJ., Canales, J., León, E., Alvarez, E., et al. Cutaneous leishmaniasis in the Peruvian Andes: Factors associated with variability in clinical symptoms, response to treatment, and parasite isolation rate. *Clin Infect Dis.* 1997; 25: 302-10
- <sup>23</sup> Grimaldi, G Jr., Tesh, RB. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. *Clin Microbiol Rev.* 1993; 6: 230-50
- <sup>24</sup> Hernandez, R., Sauerteig, E., Diaz, J. Leishmaniasis Americana de espectro intermedio o verrugoso. Presentación de un caso anatomo-clínico y discusión de la histopatología. [Consultado 30 de Junio de 2006]. Disponible en Internet: <<http://caibco.ucv.ve/caibco/CAIBCO/Vitae/VitaeNueve/CasosClinicos/Dermatologia/ArchivosPdf/Dermatologia.pdf>>
- <sup>25</sup> Da-Cruz, A.M., Bittar, R., Mattos, M., Oliveira-Neto, M.P., Nogueira, R., Pinho-Ribeiro, V., et al. T-cell-mediated immune responses in patients with cutaneous or mucosal leishmaniasis: long-term evaluation after therapy. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2002; 9:251-6.

- <sup>26</sup> Passos, VM., Barreto, SM., Romanha, AJ., Krettli, AU., Volpini, AC., Lima, E., y Costa, MF. American cutaneous leishmaniasis: use of a skin test as a predictor of relapse after treatment. *Bull World Health Organ.* 2000; 78: 968-74.
- <sup>27</sup> Tapia, FJ., Caceres-Dittmar, G., Sanchez, MA. Inadequate epidermal homing leads to tissue damage in human cutaneous leishmaniasis. *Immunol Today.* 1994; 15:160-5
- <sup>28</sup> Curry, AJ., Jardim, A., Olobo, JO., Olafson, RW. Cell-mediated responses of immunized vervet monkeys to defined *Leishmania* T-cell epitopes. *Infect Immun.* 1994;62:1733-41
- <sup>29</sup> Saravia, NG., Valderrama, L., Labrada, M., Holguin, AF., Navas, C., Palma, G., Weigle, KA. The relationship of *Leishmania braziliensis* subspecies and immune response to disease expression in New World leishmaniasis. *J Infect Dis.* 1989; 159:725-35
- <sup>30</sup> Velez, I., Agudelo, S., Robledo, S., Jaramillo, L., Segura, I., Soccol, V., Restrepo, S. Diffuse cutaneous leishmaniasis with mucosal involvement in Colombia, caused by an enzymatic variant of *Leishmania panamensis*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1994;88:199
- <sup>31</sup> Jones, TC., Johnson, WD Jr., Barreto, AC., Lago, E., Badaro, R., Cerf, B., et al. Epidemiology of American cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis braziliensis*. *J Infect Dis.* 1987;156:73-83
- <sup>32</sup> Davies, CR., Kaye, P., Croft, SL., Sundar, S. Leishmaniasis: new approaches to disease control. 2003; *BMJ* 326: 377-82
- <sup>33</sup> Ashford, RW., Desjeux, P., De Raadt, P. Estimation of population at risk of infection and number of cases of leishmaniasis. *Parasitology Today* 1992; 8:104-105.
- <sup>34</sup> Boletín Epidemiológico / OPS. Perfiles de Salud: Perú y Venezuela. 2004; 25:8-15
- <sup>35</sup> Instituto Nacional de Salud. Informe de Cierre 2005, Grupo transmisibles. Colombia, 2005
- <sup>36</sup> Muñoz, G., Davies, C. *Leishmania panamensis* transmission in the domestic environment: the results of a prospective epidemiological survey in Santander, Colombia. *Biomédica*, Volumen 25. En prensa 2006.
- <sup>37</sup> Werner, JK., Barreto, P. Leishmaniasis in Colombia, a review. *Am J Trop Med Hyg* 1980; 198: 751-761
- <sup>38</sup> Weigle, KA., Santrich, C., Martinez, F., Valderrama, L., Saravia, N. Epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Colombia: Environmental and behavioral risk factors for infection, clinical manifestations, and pathogenicity. *J Infect Dis* 1993; 168: 709 – 14
- <sup>39</sup> Feinstein, AR. Clinical Judgment Revisited: The Distraction of Quantitative Models. *Ann Intern Med.* 1994; 120: 799 – 805
- <sup>40</sup> Pita, S., Pertegas, S. Investigación: pruebas diagnósticas. *Cad Aten Primaria* 2003; 10: 120-124.

- <sup>41</sup> Orozco, LC. Pequeña historia de la evaluación de tecnologías diagnósticas. Salud UIS 2004; 36
- <sup>42</sup> Altman, DG., Bland, JM. Statistics Notes: Diagnostic tests 1: sensitivity and specificity. BMJ. 1994; 308: 1552.
- <sup>43</sup> Altman, DG., Bland, JM. Statistics Notes: Diagnostic tests 2: predictive values. BMJ 1994; 309:102.
- <sup>44</sup> Kraemer, HC. Evaluating Medical Tests. SAGE publications. London 1992
- <sup>45</sup> Nierenberg, AA., Feinstein, AR. How to evaluate a diagnostic marker test. JAMA 1988; 259: 1699-1702
- <sup>46</sup> Orozco, LC., Camargo, D. Evaluación de tecnologías diagnosticas y tipos de muestreos Biomedica 1997; 17:321-324
- <sup>47</sup> Kraemer, HC, Thieman, S. How many subjects. SAGE publications. London 1987
- <sup>48</sup> Ramirez, JR., Agudelo, S., Muskus, C., Alzate, JF., Berberich, C., Barker, D., Velez, ID. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis in Colombia: the sampling site within lesions influences the sensitivity of parasitologic diagnosis. J Clin Microbiol 2000; 38:3768-3773
- <sup>49</sup> González, LA., Alzate, A., Saravia, N. Evaluación de la inmunoperoxidasa en el diagnóstico diferencial entre esporotricosis y leishmaniasis experimental. Colombia Médica 1991; 22: 130-135
- <sup>50</sup> Cuba C. Diagnóstico parasitológico de la leishmaniasis tegumentaria americana. Rev Med Exp. 2000; 17: 1-4.
- <sup>51</sup> Zhou, X., Obuchowski, NA., Mcclish, D. Statistical methods in diagnostic medicine. Wiley-interscience N.Y. 2002.
- <sup>52</sup> Obuchowski, NA. Simple size calculations in studies of test accuracy. Stat Methods Med Res 1998; 7: 371-392.
- <sup>53</sup> Zarate, GI. Métodos de inferencia estadística aplicados en la investigación. Ed UIS. Bucaramanga, 1992.
- <sup>54</sup> Pirmez, C., Da Silva, V., Paes, M., Cruz, AM., Gonçalves, C., et al. Use of PCR in diagnosis of human American tegumentary leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. J Clin Microbiol 1999; 37: 1819-23
- <sup>55</sup> Organización Panamericana de la Salud. Boletín Epidemiológico 2002; 23
- <sup>56</sup> Lossing AG, Wright JG, MacLeod R. Diagnostic test studies: Biotechnology assessment. Surgery 1996; 120: 1-6

- <sup>57</sup> Begg CB, McNeil BJ. Assessment of Radiologic tests: Control of bias and other design considerations. *Radiology* 1988; 167: 565-9
- <sup>58</sup> STATA 8.0. STATA Corporation, Inc., College Station, Texas, USA, 2003
- <sup>59</sup> Kraemer, HC., Bloch, DA. Kappa coefficients in epidemiology an appraisal of a reappraisal. *J Clin Epidemiol.* 1988; 41: 959-68
- <sup>60</sup> Gold, EB. Confidentiality and privacy protection in epidemiologic research. In: Coughlin S, Beauchamp TL. *Ethics and Epidemiology*; Oxford University Press, NY 1996. p 130
- <sup>61</sup> Feinstein, AR., Cicchetti, DV. High agreement but low kappa: II. Resolving the paradoxes 1990; 43: 551-8
- <sup>62</sup> Feinstein, AR., Cicchetti, DV. High agreement but low kappa: I. The problems of two paradoxes 1990; 43: 543-59
- <sup>63</sup> Pirmez, C., da Silva, V., Paes-Oliveira, M., da-Cruz, AM., Goncalves-da-Costa, SC., Catanho, M., et al. Use of PCR in Diagnosis of Human American tegumentary leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. *J Clin Microbiol.* 1999; 37: 1819-23
- <sup>64</sup> Isaza, DM., Restrepo, BN., Arboleda, M., Casas, E., Hinostroza, H., y Yurgaqui, T. La leishmaniasis: conocimientos y prácticas en poblaciones de la costa del pacífico de Colombia. *Rev Panam Salud Pública* 1999; 6: 177-183
- <sup>65</sup> Navin, T., Arana, F., De Mérida, B., Arana, B., Castillo, L., Silvers, D. Cutaneous leishmaniasis in Guatemala: comparison of diagnostic methods. *Am J Trop Med Hyg.* 1990; 42: 36-42
- <sup>66</sup> de Oliveira, C., Báfica, A., Oliveira, F., Favali, C., Correa, T., Freitas, LA., et al. Clinical utility of polymerase Chain reaction-based detection of *Leishmania* in the diagnosis of American cutaneous leishmaniasis. *Clin Infect Dis.* 2003; 37: e149-53
- <sup>67</sup> Rodrigues, EH., Felinto de Brito, ME., Mendonca, MG., Werkhauser, RP., Coutinho, EM., Souza, WV., et al. Evaluation of PCR for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis in an area of endemicity in northeastern Brazil. *J Clin Microbiol.* 2002; 40:3572-6
- <sup>68</sup> Restrepo, M., Gómez, ME. La reacción de Inmunofluorescencia Indirecta en el diagnóstico de la leishmaniasis tegumentaria americana. *Biomédica* 1983; 3: 15-21
- <sup>69</sup> Grupo COMBI Área Metropolitana de Bucaramanga. Estrategia de comunicación y movilización social para impactar conductas orientadas a la prevención del dengue, aplicando la metodología COMBI. *Boletín Epidemiológico de Bucaramanga*; 5 Julio de 2005: 12-20
- <sup>70</sup> Kennedy, LA. Community involvement at what cost?—local appraisal of a Pan-European nutrition promotion programme in low-income neighborhoods. *Health Prom Int* 2001; 16: 35-45