

Utilidad de la prueba diagnóstica de amplificación isotérmica de DNA mediante recombinasa y polimerasa (RPA) en términos de sus atributos diagnósticos y costo-efectividad en comparación con la prueba estándar de diagnóstico para leishmaniasis cutánea: examen directo (frotis o extendido) en el proceso de diagnóstico de LC en diferentes municipios de Colombia durante el periodo comprendido entre 2017 y 2019.

LUZ ESTELLA MESA BEDOYA

**Tesis Presentada Para Obtener El Título de
Doctora en Epidemiología y Bioestadística**

**Escuela de Graduados
Epidemiología y Bioestadística
Línea de Epidemiología Aplicada
Universidad CES
Medellín
Julio 2020**

Utilidad de la prueba diagnóstica de amplificación isotérmica de DNA mediante recombinasa y polimerasa (RPA) en términos de sus atributos diagnósticos y costo-efectividad en comparación con la prueba estándar de diagnóstico para leishmaniasis cutánea: examen directo (frotis o extendido) en el proceso de diagnóstico de LC en diferentes municipios de Colombia durante el periodo comprendido entre 2017 y 2019.

Luz Estella Mesa Bedoya

Tutora

Dra. Sara M. Robledo

Asesores

**Dr. Carlos Muskus
Dr. Rubén Darío Manrique
Dra. Angela María Segura
Dra. Piedad Matilde Agudelo**

**Escuela de Graduados
Universidad CES
Epidemiología y Bioestadística
Línea de Epidemiología Aplicada
Medellín**

Julio 2020

CONTENIDO

RESUMEN	8
ABSTRACT	10
1. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	12
1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	12
1.2. JUSTIFICACIÓN	16
1.3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	17
2. MARCO TEÓRICO	18
2.1. CARACTERÍSTICAS DE LA LEISHMANIASIS CUTÁNEA Y MUCOSA	18
Leishmaniasis cutánea localizada	18
Leishmaniasis cutánea difusa (LCD)	19
Leishmaniasis cutánea diseminada (LD)	19
Leishmaniasis mucosa (LM)	20
2.2. DISTRIBUCIÓN EPIDEMIOLÓGICA DE LA LEISHMANIASIS CUTÁNEA Y MUCOSA	20
2.3. DIAGNÓSTICO DE LA LEISHMANIASIS CUTÁNEA Y MUCOSA	21
Examen directo (frotis o extendido)	22
Cultivo del parásito	22
Biopsia de piel para estudios histopatológicos	23
Reacción en cadena de la ADN polimerasa (PCR)	23
2.4. ALTERNATIVAS PARA MEJORAR EL DIAGNOSTICO	24
2.5. MÁS ALLÁ DE LA EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO DIAGNÓSTICO.	27
3. HIPOTESIS	29
3.1. EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO DIAGNÓSTICO	29
3.2. EVALUACIÓN DE COSTO EFECTIVIDAD	29
4. OBJETIVOS	30
4.1. OBJETIVO GENERAL	30
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
5. METODOLOGÍA	31
5.1. ENFOQUE METODOLÓGICO	31
5.2. TIPO DE ESTUDIO	31
5.3. POBLACIÓN DE ESTUDIO	31
5.4. DISEÑO MUESTRAL	33
5.5. DESCRIPCIÓN DE LAS VARIABLES	33

5.6. TÉCNICAS DE RECOLECCIÓN DE LA INFORMACIÓN	33
Fuentes de información	33
Obtención del consentimiento informado de los pacientes para el estudio	34
Toma de muestra para examen directo	36
Toma de muestra para PCR convencional y para RPA	35
Realización de la prueba RPA	38
Realización de la prueba PCR convencional	40
Funciones de cada uno de los actores que participan en el estudio	40
5.7. LIMITACIONES DEL ESTUDIO	42
5.8. CONTROL DE ERRORES Y SESGOS	43
5.9. TÉCNICAS DE PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE LOS DATOS	45
Técnicas de procesamiento	45
Análisis estadístico	45
6. CONSIDERACIONES ETICAS – PROTECCIÓN A LOS PACIENTES	51
7. RESULTADOS	52
7.1. DESCRIPCIÓN SOCIODEMOGRÁFICA Y CLÍNICA DE LOS PACIENTES	52
7.2. RESULTADOS DE LA RPA, PCR CONVENCIONAL Y EXAMEN DIRECTO	55
7.3. ANÁLISIS DEL RENDIMIENTO DIAGNÓSTICO DE LA RPA	56
7.4. EXPLORACIÓN DE FACTORES ASOCIADOS A LA PRESENCIA DE LC	66
7.5. SUPERVIVENCIA GLOBAL ENTRE LAS PRUEBAS DIAGNÓSTICAS RPA Y EXAMEN DIRECTO EN EL CENTRO DE EVALUACIÓN	70
7.6. APROXIMACIÓN AL ANÁLISIS DE COSTO EFECTIVIDAD	75
8. DISCUSIÓN	77
9. CONCLUSIONES	81
10. PERSPECTIVAS	83
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84
ANEXOS	87

LISTA DE TABLAS

Tabla	Nombre de la tabla	Página
Tabla 1	Características basales de los participantes en el estudio	53
Tabla 2	Rendimiento diagnóstico de la prueba de amplificación isotérmica de DNA mediante recombinasa y polimerasa (RPA) frente a la técnica convencional de diagnóstico examen directo (frotis o extendido)	57
Tabla 3	Áreas bajo la curva ROC de la RPA (tiempo de evolución de la lesión ≤ 90 días)	61
Tabla 4	Áreas bajo la curva ROC de la RPA (tiempo de evolución de la lesión ≥ 91 días)	62
Tabla 5	Porcentaje de acuerdo simple: Resultados examen directo en Centro de Evaluación y Centro de Referencia	63
Tabla 6	Porcentaje de acuerdo simple: Resultados examen directo en Centro de Evaluación y Centro de Referencia si el tiempo de evolución de la lesión es ≤ 90 días	63
Tabla 7	Porcentaje de acuerdo simple: Resultados examen directo (positivo/negativo) según Centro de Evaluación y Centro de Referencia si el tiempo de evolución de la lesión es ≥ 91 días	64
Tabla 8	Porcentaje de acuerdo simple: Resultados RPA en Centro de Evaluación y Centro de Referencia	65
Tabla 9	Porcentaje de acuerdo simple: Resultados RPA en Centro de Evaluación y Centro de Referencia si el tiempo de evolución de la lesión es ≤ 90 días	65
Tabla 10	Porcentaje de acuerdo simple: Resultados RPA en Centro de Evaluación y Centro de Referencia si el tiempo de evolución de la lesión es ≥ 91 días	66
Tabla 11	Prueba de independencia de las variables consideradas plausibles biológicamente	67
Tabla 12	Modelo de regresión Logística, Y = resultado “Verdadero Positivo” con la prueba diagnóstica RPA.	68
Tabla 13	Modelos de regresión Logística, Y = resultado “Verdadero Negativo” con la prueba diagnóstica RPA.	69
Tabla 14	Relación de costos Prueba diagnóstica RPA y examen directo	75

LISTA DE FIGURAS

Figura	Nombre de la figura	Página
Figura 1	Esquema de una sonda típica TwistAmp® nfo	25
Figura 2	Esquema de las disposiciones de los primer de amplificación y la sonda TwistAmp® nfo	26
Figura 3	Procedimiento diagnóstico de LC en el estudio	36
Figura 4	Revelado mediante el dispositivo PCRD kit	40
Figura 5	Diagrama del diseño del estudio	42
Figura 6	Diagrama de venn mostrando la distribución de los resultados positivos de las pruebas diagnósticas en los centros de evaluación	55
Figura 7	Diagrama de venn mostrando la distribución de los resultados positivos de las pruebas diagnósticas en el centro de referencia	56
Figura 8	RPA en el Centro de Evaluación vs examen directo en el Centro de Evaluación	59
Figura 9	RPA en el Centro de Referencia vs examen directo en el Centro de Referencia	59
Figura 10	PCR convencional en el Centro de Referencia vs examen directo en el Centro de Referencia	60
Figura 11	Curva ROC: poder de discriminación de la prueba diagnóstica RPA en el Centro de Evaluación (Modelo de Regresión Logística, Y = resultado “Verdadero Positivo”)	70
Figura 12	Función de Supervivencia - RPA (Centro de Evaluación). Pérdida de sensibilidad (La probabilidad de un FN).	71
Figura 13	Función de Supervivencia - RPA (Centro de Evaluación). Pérdida de Especificidad (La probabilidad de un FP).	72
Figura 14	Función de Supervivencia - RPA (Centro de Evaluación). Pérdida de Sensibilidad (La probabilidad de un FN). Según el tipo de lesión	73
Figura 15	Función de Supervivencia - RPA (Centro de Evaluación). Pérdida de Especificidad (La probabilidad de un FP). Según el tipo de lesión	74

LISTA DE ANEXOS

Anexo	Nombre del anexo	Página
Anexo 1	Tabla de variables	88
Anexo 2	Formato de recolección de la información	91
Anexo 3	Autorización para el uso de las muestras biológicas con fines de investigación	96

RESUMEN

Antecedentes

En leishmaniasis, el diagnóstico preciso es esencial debido a la alta toxicidad de los medicamentos para la enfermedad. Sin embargo, el diagnóstico de leishmaniasis cutánea (LC) se ve obstaculizado por la ausencia de un estándar de oro. Las tecnologías de diagnóstico molecular, en particular la prueba de amplificación isotérmica de DNA mediante recombinasa y polimerasa (RPA), es una metodología relativamente nueva y una alternativa muy versátil a la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) toda vez que permite el desarrollo de pruebas diagnósticas rápidas y portátiles para la amplificación y detección de DNA del parásito. La RPA es una tecnología ideal para usar en campo y en puntos de atención con recursos limitados, y particularmente para sitios donde la rapidez del diagnóstico es esencial. La RPA es fácil de transportar, fácil de usar y altamente sensible en la detección de leishmania, que es especialmente relevante en las lesiones cutáneas crónicas con menor carga parasitaria. La RPA es tan específica como la PCR, con la ventaja adicional que es muchísimo más rápida y económica. Este estudio permitió determinar las diferentes medidas de rendimiento diagnóstico (sensibilidad, especificidad, valores predictivos), el grado de concordancia inter-observador para la prueba diagnóstica RPA y su efectividad diagnóstica a través de un análisis de costo- efectividad en pacientes con sospecha clínica de LC.

Métodos

Se incluyeron muestras de ciento veintiocho pacientes con sospecha de CL atendidos en 10 municipios de los departamentos de Antioquia, Boyacá, Sucre, Caldas, Tolima y Chocó, previa obtención de la autorización para el uso de las muestras clínicas con fines diagnósticos. Las muestras se procesaron para análisis por examen directo – frotis o extendido, PCR convencional y RPA.

Resultados

La nueva prueba diagnóstica RPA realizada en el Centro de evaluación, demostró ser más sensible 90,4% (95% CI 81,9 – 95,7) que el tradicional examen directo (42 – 67%), con un 14% de fallos en la detección de LC (falsos positivos), datos sin ajustar por estándar de referencia imperfecto; y una sensibilidad ajustada por estándar de referencia imperfecto del 100%. Con respecto a la especificidad, la RPA fue más específica 72,7% (95% CI 57,2 – 85,0), con un 20% de casos de LC que no fueron detectados (falsos negativos), sin ajustar por estándar de referencia imperfecto; y una especificidad ajustada por estándar de referencia imperfecto del 100%.

La aproximación al análisis de costo-efectividad evidenció que cada unidad adicional (1%) de sensibilidad en el diagnóstico de la LC, de la prueba diagnóstica RPA cuesta \$ 2,500.0 pesos más que el tradicional examen directo y cada unidad adicional (1%) de especificidad cuesta \$ 2,500.0 pesos más que el tradicional examen directo.

Conclusiones:

La sensibilidad de la RPA evaluada en campo fue mayor a la sensibilidad de la RPA evaluada en el Centro de Referencia. Dada la mayor sensibilidad y las ventajas adicionales de la RPA como son la eliminación del componente subjetivo asociado al examen directo, la versatilidad de la tecnología y su facilidad de transportar y utilizar en campo y en puntos de atención con recursos limitados, se justifica implementar la RPA en los sitios de atención de pacientes con sospecha clínica de LC, donde la rapidez del diagnóstico es esencial para el acceso a un tratamiento oportuno.

La aproximación al análisis de costo-efectividad demostró que la RPA es más económica que el examen directo en términos de ganancia adicional en sensibilidad y especificidad, lo que representa una ventaja adicional para la implementación de la RPA en campo.

Palabras Claves:

Amplificación isotérmica mediante recombinasa y polimerasa (RPA); evaluación de pruebas diagnósticas; leishmaniasis cutánea; examen directo; PCR convencional.

ABSTRACT

Background

In leishmaniasis, accurate diagnosis is essential due to the high toxicity of the drugs for the disease. Nevertheless, diagnosis of cutaneous leishmaniasis (LC) is hampered by the absence of a gold standard. Molecular diagnostic technologies, in particular the isothermal DNA amplification test using Recombinase Polymerase Amplification (RPA), represents the advance and isothermal replacement of Polymerase chain reaction (PCR); is a relatively new methodology for amplifying DNA and a very versatile alternative to conventional PCR for the development of rapid and portable diagnostic tests for nucleic acid detection. RPA is an ideal technology for use in the field and at points of care with minimal resources, and particularly for sites where rapid diagnosis is essential. RPA is easy to transport, easy to use and highly sensitive in the detection of leishmania, which is especially relevant in chronic skin lesions with less parasitic load. RPA is as specific as PCR, with the additional advantage that it is much faster and cheaper. This study allowed to determine the different measures of diagnostic performance (sensitivity, specificity, predictive values), the degree of inter-observer concordance for diagnostic tests (RPA and direct examination - smear or extended) and the effectiveness of diagnostic tests through a cost-effectiveness analysis in patients with clinical suspicion of LC.

Methods

Samples of one hundred and twenty-eight patients with suspected CL attended in 10 municipalities of the departments of Antioquia, Boyacá, Sucre, Caldas, Tolima and Chocó were included, after obtaining authorization for the use of clinical samples for diagnostic purposes. Samples were processed for analysis by direct examination - smear, conventional PCR and RPA.

Results

The new RPA diagnostic test performed at the Evaluation Center, proved to be more sensitive 90.4% (95% CI 81.9 - 95.7) than the traditional Direct Exam (42 - 67%), with 14% failures in the detection of LC (false positives), data not adjusted by imperfect reference standard; and a sensitivity adjusted by imperfect reference standard of 100%. Regarding specificity, RPA was more specific 72.7% (95% CI 57.2 - 85.0), with 20% of LC cases that were not detected (false negatives), without adjusting by the imperfect reference standard; and a specificity of 100% adjusted by the imperfect reference standard.

The RPA evaluated in the field showed greater sensitivity 90.4% (95% CI 81.9 - 95.7) than the RPA evaluated in the Reference Center 72.9% (95% CI 62.2 - 82.0) but

lower specificity 72.7% (95% CI 57.2 - 85.0) and 83.3% (95% CI 68.6 - 93.0) respectively.

The approach to the cost-effectiveness analysis showed that each additional unit (1%) of Sensitivity in the diagnosis of LC, through the diagnostic test RPA costs \$ 2,500.0 pesos more than the traditional "Direct exam", and each additional unit (1%) of Specificity costs \$ 2,500.0 pesos more than the traditional "Direct exam"

Conclusions

The sensitivity of the RPA evaluated in the field was greater than the sensitivity of the RPA evaluated in the Reference Center. Given the increased sensitivity and additional advantages of RPA such as the elimination of the subjective component associated with direct examination, the versatility of the technology and its ease of transport and use in the field and in points of care with limited resources, it is justified to implement the RPA in the care sites of patients with clinical suspicion of LC, where rapid diagnosis is essential for access to timely treatment.

An approach to the cost-effectiveness analysis demonstrated that RPA is cheaper than direct examination in terms of the increase in sensitivity and specificity, which represents an additional advantage for implementing RPA in the field.

Keys words

Recombinase Polymerase Amplification (RPA); Cutaneous Leishmaniasis (CL); Diagnostic accuracy study.

1. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La leishmaniasis cutánea (LC) es una enfermedad reemergente en el mundo, que hace parte del grupo de las enfermedades tropicales desatendidas. En los últimos años, la incidencia de esta enfermedad se ha incrementado significativamente a nivel mundial, con la aparición de nuevas áreas endémicas (1). La Organización Mundial de la Salud (OMS), considera la enfermedad como reemergente y sin control, con una alta carga de enfermedad por los años de vida perdidos asociados a discapacidad por las complicaciones ante la falta de un tratamiento oportuno que puede llevar a mutilaciones o desfiguración o por los efectos secundarios producidos por la toxicidad de los medicamentos disponibles que pueden ser graves y letales (2).

En Colombia la situación es preocupante debido al incremento de casos de LC que se ha registrado en los últimos años, y el cambio en el patrón epidemiológico dado por la aparición de nuevos focos, el proceso creciente de domiciliación y urbanización del ciclo de transmisión. Sin embargo, los datos oficiales no reflejan la realidad de la afección humana debido a varios factores limitantes: 1) numerosos casos no son diagnosticados o no se declaran, 2) la mayoría de los datos oficiales se obtienen exclusivamente a partir de la detección pasiva de los casos, 3) el número de personas infectadas asintomáticas, es mucho mayor que el número de casos que manifiestan la enfermedad y, finalmente, 4) la leishmaniasis es de declaración obligatoria en sólo 40 de los 99 países endémicos (recientemente se incluyó a Australia). Estos aspectos hacen que la leishmaniasis junto con la malaria, esquistosomiasis, filariasis, tripanosomiasis y tuberculosis, sean consideradas por la OMS como las seis enfermedades tropicales de mayor importancia en términos de investigación para nuevos métodos de prevención, diagnóstico y tratamiento (1).

La investigación más reciente disponible sobre incidencia global de LC estimó el verdadero impacto de la leishmaniasis a nivel regional y global (2). En dicha investigación se encontró que aproximadamente 1/3 de los casos de LC a nivel global ocurren en las regiones de las Américas, Cuenca del Mediterráneo y Occidente de Asia y que los 10 países con el mayor número de casos de LC son en orden Afganistán, Algeria, Colombia, Brasil, Irán, Siria, Etiopía, Norte de Sudán, Costa Rica y Perú que juntos representan el 70 - 75% de los casos incidentes de LC estimados a nivel global (3).

Según esta investigación también se con los 17.420 casos de LC por año reportados durante el período de 2005-2009 se estimó la incidencia anual de LC entre 48.800 - 80.100 casos; para la región de las Américas se reportaron 66.941 casos de LC por año (países con 5 años de datos) y se estimó la incidencia de LC en 187.200 - 307.800 casos por año. Este ejercicio es importante porque tiene en cuenta el subregistro que existe en casi todos los países donde la leishmaniasis es endémica

y de notificación obligatoria y permite a los gobiernos planear estrategias más apropiadas para el control de la enfermedad.

En Colombia la LC es endémica. Las poblaciones principalmente afectadas son aquellas que habitan en áreas rurales y semiurbanas donde la pobreza y las dificultades para acceder a los servicios de salud son el principal problema. La oferta de diagnóstico oportuno para iniciar el tratamiento es la medida más importante en términos del mejoramiento de la calidad de vida de los pacientes que se sienten estigmatizados por las secuelas de la enfermedad (cicatrices y/o mutilaciones en diferentes partes de su cuerpo) y en el control de la leishmaniasis; además de ser la actividad prioritaria que el sistema de salud debe garantizar para la atención y control de esta enfermedad.

Por lo tanto, el diagnóstico no solo debe ser oportuno sino acertado, con reducida posibilidad de resultados falsos positivos, que llevan a los pacientes a recibir un tratamiento para la LC sin necesitarlo, lo que representa tanto una carga para el sistema nacional de salud como un riesgo para la vida de los pacientes, debido a la alta toxicidad de las drogas usadas para el tratamiento de la LC, como también a la disminución de los resultados falsos negativos que llevan a que los pacientes que teniendo LC no puedan acceder al tratamiento de forma oportuna, lo que implica un deterioro de sus condiciones de salud, además de, un incremento igualmente en la carga del sistema de salud, por complicaciones posteriores asociadas a una LC no tratada.

Sin embargo, los métodos de diagnóstico actualmente disponibles como son el examen directo (frotis o extendido), cultivo, biopsia, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que permiten determinar la presencia o no del parásito en la muestra obtenida del paciente, presentan graves inconvenientes como son:

- La sensibilidad del examen directo está estrechamente relacionada con el tejido de donde proviene la muestra, al igual que con la técnica utilizada para la toma y procesamiento de esta; también depende del tiempo de evolución de la lesión y del uso de tratamientos previos por parte de los pacientes, en definitiva es una técnica muy dependiente del operador (4). De esta forma, la sensibilidad del frotis o extendido de material obtenido del borde activo de la lesión es de 90.4% en comparación con la del frotis o extendido del material obtenido de la base de la úlcera que es del 78.3%, la variación en la concentración de parásitos en diferentes tipos de muestras explica el amplio rango de positividad de la microscopía directa que se reporta a través de la literatura publicada; la sensibilidad de la detección por PCR convencional es del 80.8% cuando el material es obtenido de la base de la úlcera vs 57.7% cuando el material es obtenido del borde de la lesión (1,5).
- El frotis o extendido, que es el método de diagnóstico parasitológico por excelencia (gold standard) utilizado en los centros de salud de las regiones más apartadas de las cabeceras municipales y donde la LC es endémica, tiene grandes limitaciones debido a su alto componente subjetivo que implica

un buen entrenamiento del personal a cargo de la toma de la muestra, proceso de coloración y capacitación del personal para realizar la lectura de las placas en busca de los amastigotes. Todas estas limitaciones tienen una repercusión importante para el paciente porque le impiden el acceso oportuno al tratamiento debido a las imprecisiones en el diagnóstico y además impiden orientar las estrategias para el control y disminución de la morbilidad de cada una de las formas de leishmaniasis (1).

- Las diferentes técnicas de PCR (múltiple; anidada; en tiempo real; transcripción inversa, y otras), aunque son técnicas diagnósticas flexibles, con alta sensibilidad y especificidad, requieren termocicladores, experiencia considerable, alto grado de entrenamiento por parte del personal y espacios adecuados con especificaciones técnicas especiales dentro de los laboratorios de diagnóstico de rutina. Esta infraestructura y pericia técnica, que requieren tanto el diagnóstico molecular como el cultivo, está restringiendo su uso a los laboratorios de referencia.

Si bien la PCR ha sido durante mucho tiempo la tecnología dominante para la amplificación de ácidos nucleicos, todas estas limitaciones prácticas han llevado a desarrollar una variedad de métodos de amplificación isotérmica con una alta sensibilidad como alternativas a la PCR (6).

Los diversos métodos de amplificación isotérmica incluyen:

- Amplificación por desplazamiento de la cadena o hebra de ADN (SDA).
- Amplificación mediada por transcripción (TMA).
- Amplificación isotérmica Mediada por bucles u horquillas (LAMP)
- Amplificación por círculo rodante (RCA)
- Amplificación dependiente de helicasa (HDA)
- Amplificación mediante recombinasa y polimerasa (RPA)

La SDA es una técnica basada en la capacidad de una ADN polimerasa modificada para desplazar una hebra monocatenaria resultante de un corte en una región específica del ADN, y a partir de esta hebra desplazada, iniciar la replicación o amplificación de ese ADN diana. Por su parte, la TMA utiliza un aparato TECAN que puede hacer hasta 16 mezclas o pooles de muestras individuales. Las técnicas de amplificación isotérmica SDA y TMA tienen como limitación su incorporación a equipos de alto rendimiento con plataformas cerradas que no admiten reactivos de uso general, lo que limita su uso en laboratorios clínicos de hospitales de primer y segundo nivel que no cuentan con los recursos financieros ni con los volúmenes de muestras que justifiquen la inversión en plataformas de alto rendimiento (7).

La técnica LAMP usa cuatro a seis juegos de cebadores para amplificar la secuencia diana por desplazamiento de la cadena con la ayuda de la enzima ADN polimerasa Bst, la cual actúa con una temperatura constante de 60 a 65 °C. Se ha demostrado que el uso de seis cebadores aumenta la velocidad de la amplificación y la

especificidad de la prueba LAMP. El principal inconveniente de la técnica LAMP es que el diseño del cebador o primer es complicado, lo que impide su adopción generalizada en el desarrollo de ensayos y para detectar sus productos necesita un equipo RT-PCR, cebadores marcados con fluorescencia o un detector de turbidez (7).

La amplificación isotérmica dependiente de helicasa (tHDA) como plataforma molecular es muy simple pues solo requiere un único juego de cebadores para amplificar una secuencia de ADN genómico; emplea el mismo mecanismo de reacción que la PCR convencional, excepto que la doble hélice de ADN es separada por una enzima helicasa en lugar de la *Taq* polimerasa que se activa al calor, por lo tanto no requiere de un termociclador durante la amplificación; la enzima helicasa resiste un rango de temperatura y por lo tanto se adapta mejor a las condiciones de campo (7).

La amplificación de ADN mediante RPA funciona a una temperatura baja y constante entre 37- 42°C con una pequeña preparación de la muestra, y es capaz de amplificar un número tan bajo como 1-10 copias de ADN en menos de 20 min, sin la necesidad de un paso inicial de desnaturalización o el uso de múltiples cebadores. Es una técnica muy simple con una alta sensibilidad y selectividad. Permite la combinación de múltiples cebadores en el mismo tubo de reacción y es muy rápida. La RPA adaptada a las tiras de flujo lateral en el diagnóstico de LC, tiene el potencial para la implementación de la prueba en áreas endémicas con recursos muy limitados (8).

En general los métodos de amplificación isotérmica usan una infraestructura y técnica menos complicada y en algunos casos menos costosa que la que se usa en la PCR convencional. Cada una de ellas funciona a rangos de temperatura particular, con juegos de cebadores específicos y tiempos de amplificación diferentes. Igualmente, varían en el límite de detección, es decir, en el número mínimo de copias de ADN detectadas.

Las características de la RPA en comparación con la PCR convencional son:

1. En la PCR convencional se emplean ciclos a diferentes temperaturas, mientras que en la RPA se necesita solo una reacción a temperatura constante para el proceso completo de amplificación del ADN.
2. En la RPA no se requiere de equipos costosos mientras que en la PCR convencional se requiere un termociclador.
3. Las condiciones de reacción en la RPA son más simples y efectivas en condiciones de laboratorio sin sacrificar su rendimiento.
4. La RPA produce fragmentos más largos de ADN que los producidos por la técnica de PCR convencional

5. La RPA es más eficiente en la amplificación y tiene una producción más alta de ADN que la PCR convencional debido a su equilibrada e ininterrumpida actividad enzimática (6).

1.2. JUSTIFICACIÓN

La LC es endémica en casi todo el territorio colombiano; se estima que aproximadamente 10 millones de persona se encuentran en riesgo de contraer la enfermedad. Las poblaciones principalmente afectadas son aquellas que habitan en áreas rurales y semiurbanas donde la pobreza y las dificultades para acceder a los servicios de salud son el principal problema.

La oferta de diagnóstico oportuno para iniciar el tratamiento es la medida más importante en términos del mejoramiento de la calidad de vida de los pacientes que se sienten estigmatizados por las secuelas de la enfermedad (cicatrices o mutilaciones) y en el control de la leishmaniasis, además de ser la actividad prioritaria que el sistema de salud debe garantizar para la atención y control de esta enfermedad.

La oportunidad en el diagnóstico se ve seriamente comprometida por las dificultades de acceso a los servicios de salud en zonas del territorio nacional donde la LC es endémica y donde la población no cuenta con un centro de salud cercano. Por otro lado, las condiciones de infraestructura de los laboratorios de diagnóstico disponibles en los centros de salud en las zonas endémicas son muy precarias, con pocos recursos, espacios reducidos y el personal de laboratorio muy poco entrenado para realizar un diagnóstico de LC acertado usando la técnica del examen directo (frotis o extendido) que consiste en la visualización del parásito en la muestra obtenida de la lesión usando un microscopio convencional, una técnica con un gran componente de dependencia del operador y de su experiencia, lo cual lo constituye en un estándar de referencia imperfecto. Adicionalmente, la constante rotación del personal en los servicios de salud pública dificulta que las secretarías de salud en los municipios y departamentos puedan garantizar la capacitación y entrenamiento del personal en la técnica de la toma, coloración de la muestra y lectura de esta, variables que determinan la sensibilidad de la técnica en el sitio de atención. Todas estas variables, en conjunto, favorecen que los pacientes con LC no accedan a tiempo a un tratamiento que evitaría complicaciones por una LC no tratada.

Dados los antecedentes enunciados, la prueba diagnóstica de amplificación isotérmica RPA brinda la posibilidad de detectar pocos parásitos de forma más efectiva, empleando menos recursos técnicos que los que emplea el diagnóstico a través de la PCR convencional, que es un método más sensible que el examen directo para el diagnóstico de LC. De esta manera, la RPA puede simplificar el diagnóstico molecular, una metodología que a la fecha ha sido poco viable en los

laboratorios de primer y segundo nivel por sus requerimientos en cuanto a recursos técnicos, espacios locativos y entrenamiento del personal.

La implementación de una técnica molecular de alta precisión en el diagnóstico, como la RPA, representa una gran ventaja para los pacientes, ya que tendrán un diagnóstico acertado, el cual permitirá tomar mejores decisiones a nivel clínico y a su vez, impactará positivamente la salud pública, pues se reducen los resultados falsos positivos que posteriormente acceden a tratamiento para LC sin necesitarlo, representando una carga económica para el sistema nacional de salud y poniendo en riesgo sus vidas, debido a un tratamiento que es altamente tóxico; y la reducción de falsos negativos que no accederían al tratamiento de forma oportuna, lo que implica un deterioro de sus condiciones de salud, además de, un incremento igualmente en la carga económica para el sistema de salud, por complicaciones posteriores asociadas a una LC no tratada.

Aunque la expansión del diagnóstico molecular se ha visto obstaculizada por la combinación de los altos costos y la escasez de mano de obra capacitada, muchos laboratorios podrían estar potencialmente interesados en la aplicación de esta técnica de diagnóstico molecular si la barrera de entrada se baja a un nivel accesible y la prueba diagnóstica resulta fácil de realizar.

1.3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es el rendimiento diagnóstico de la prueba de amplificación isotérmica de DNA mediante recombinasa y polimerasa (RPA) en términos de sus atributos y costo-efectividad en comparación con la prueba estándar (examen directo: frotis o extendido) en los pacientes con sospecha clínica de LC?

2. MARCO TEÓRICO

Las leishmaniasis son zoonosis que pueden afectar la piel, las mucosas o las vísceras, resultado del parasitismo del protozoo flagelado del género *Leishmania* en los macrófagos, introducido al organismo por la picadura de un insecto flebótomo. La infección al hombre se puede dar a partir de parásitos provenientes de un reservorio animal (ciclo zoonótico), o a partir de parásitos que el vector ha tomado de otro hospedero humano (ciclo antroponótico). Los vectores de la leishmaniasis en Colombia corresponden al género *Lutzomyia* popularmente conocidos como “capotillo”, “arenilla”, “pringador”. De este género se han descrito 133 especies en Colombia. La distribución geográfica de este género va desde el nivel del mar hasta los 3500 msnm, sin embargo el ciclo de transmisión no se mantiene en altitudes superiores a los 1750 msnm (4,9).

Las diferentes manifestaciones clínicas de la LC dependen de la especie de *Leishmania* infectante y de la respuesta inmune desencadenada por el hospedero, y pueden variar desde formas benignas y autolimitadas como la LC localizada, hasta las formas más severas como la LC difusa o diseminada y la leishmaniasis mucosa (LM).

2.1. CARACTERÍSTICAS DE LA LEISHMANIASIS CUTÁNEA Y MUCOSA

Leishmaniasis cutánea localizada

Se distribuye desde el sur de los Estados Unidos hasta el norte de Argentina. Canadá, Chile, Uruguay y la mayoría de las islas caribeñas se encuentran libres de transmisión. La enfermedad inicia en el lugar de la picadura luego de un período de incubación que dura entre dos semanas y dos meses, con la aparición de un nódulo pequeño, indoloro, de base indurada y que aumenta progresivamente de tamaño, puede presentarse como una lesión única o múltiples lesiones cutáneas. El nódulo puede aumentar de tamaño y adquirir la forma de placa o como consecuencia de la necrosis en el centro de la reacción granulomatosa, inducida por la respuesta inmune, convertirse en úlcera (4,5,10).

La úlcera típica es redondeada, de bordes elevados, eritematosos, acordonados, con centro granulomatoso limpio y base infiltrada. Regularmente son indoloras, de crecimiento lento; cuando hay sobreinfección bacteriana se tornan dolorosas, de fondo sucio, secreción purulenta, recubiertas por costra de aspecto melisérico, eritema periférico y signos inflamatorios locales. Se pueden presentar como lesiones únicas o múltiples y ocasionalmente como lesiones erisipeloides (10).

La enfermedad puede tornarse crónica luego de 12 semanas sin cierre de la úlcera o con la transformación de la misma en una placa verrugosa de bordes elevados recubiertos con escamas y/o costras que coinciden con los bordes de la cicatriz de la lesión inicial (10).

Algunas veces, dependiendo del hospedero y de la especie de *Leishmania*, la forma cutánea puede manifestarse en forma difusa o diseminada.

Leishmaniasis cutánea difusa (LCD)

La LCD está asociada generalmente con estados de inmunosupresión, ya sea por efecto directo del parásito o por una condición inmunológica que impide que el hospedero responda en forma adecuada ante la infección. En algunos pacientes la infección con *Leishmania*, principalmente *L. amazonensis* induce una inhibición de la respuesta de inmunidad celular específica contra el parásito, lo que facilita su reproducción y diseminación. La LCD se caracteriza por la presencia de abundantes lesiones en todo el cuerpo (el número de úlceras es mayor de 10) sobre todo cara y extremidades. Las lesiones son de tipo nodular principalmente, aunque algunas veces pueden ser placas con descamación epidérmica; las lesiones son indoloras, contienen gran número de amastigotes dentro de macrófagos vacuolados, con poco o ningún infiltrado linfocitario. La epidermis que recubre los nódulos no se ulcera y aparece con prolongaciones extendidas. En algunos pacientes se encuentran grandes nódulos infiltrados que asemejan a la lepra lepromatosa; estos pacientes tienen una fuerte inhibición de la inmunidad celular específica contra *Leishmania*; en otros la inhibición es menor y aunque hay diseminación de los parásitos e intradermorreacción de Montenegro negativa, algunas lesiones son de tipo placa. La respuesta al tratamiento con antimoniales es pobre, presentándose frecuentes recaídas (4,5,10). La LCD ha sido reportada en Brasil, Venezuela, México, República Dominicana y Colombia.

Leishmaniasis cutánea diseminada (LD)

La LD es una forma clínica en la cual la inmunidad del hospedero frente al protozoo es de fundamental importancia en el desenlace de esta zoonosis. La singularidad de este tipo de leishmaniasis con múltiples formas de presentación y cantidad de lesiones a nivel de piel nos plantea innumerables diagnósticos diferenciales, tales como vasculitis, herpes simple diseminado con componente necrótico, herpes zóster diseminado, histoplasmosis diseminada subaguda en inmunocomprometidos y pioderma gangrenoso a focos múltiples, entre otros, por lo que se debe tener siempre en cuenta la epidemiología del paciente, así como su perfil inmunológico (11). Su curso es crónico y tiene pobre respuesta a la terapéutica. Se ha constatado una deficiente inmunidad celular específica contra los antígenos de *Leishmania*. Se diferencia de la forma difusa, anérgica o leproide de Convit y Kerdel Vegas por tener notable similitud con la lepra lepromatosa en sus casos más intensos (leishmaniasis lepromatoide). Al igual que la forma diseminada, tiende a invadir piel y persistir a pesar del tratamiento (11). En cuanto a la histopatología, en la LD existe un denso infiltrado inflamatorio constituido por macrófagos vacuolados con múltiples parásitos en su interior que se visualizan con técnica de Gallego, y en ocasiones con HE (11).

Leishmaniasis mucosa (LM)

La LM se presenta cuando algunas especies de *Leishmania* del subgénero *Viannia* se disemina por vía linfática y sanguínea desde una lesión cutánea e invade las mucosas de la región naso-orofaríngea. Esta forma clínica de la enfermedad, llamada “espundia” en Brasil, debe diferenciarse de la lesión mucosa que ocurre por contigüidad de una lesión cutánea en nariz, labios o mejillas y que la puede causar cualquier especie de *Leishmania*. La invasión del parásito a la mucosa se observa inicialmente como hiperemia con congestión nasal, que evoluciona a la formación de nódulos semejantes a granos de arroz que confluyen, posteriormente aparece una úlcera y luego se perfora el tabique; el daño continúa con invasión y destrucción de tejidos contiguos, como el paladar blando y duro, labios, faringe, laringe y tráquea. La evolución de las lesiones en mucosas es crónica, y pueden persistir durante años; tienen pobre respuesta al tratamiento con antimoniales pentavalentes por lo que las recaídas son frecuentes. Las lesiones mucosas se caracterizan por un infiltrado de abundantes linfocitos y plasmocitos, pero pocos histiocitos y parásitos. Se hace evidente la destrucción de estructuras cartilaginosas (10).

2.2. DISTRIBUCIÓN EPIDEMIOLÓGICA DE LA LEISHMANIASIS CUTÁNEA Y MUCOSA

La OMS estima que 1 de cada 7 personas en todo el mundo vive en áreas endémicas de leishmaniasis. Las leishmaniasis se encuentran distribuidas en Norte y Sudamérica, Europa, África y Asia y son endémicas en las regiones tropicales y subtropicales de 99 países (recientemente se incluyó a Australia) y cuatro territorios en 5 continentes; su distribución geográfica está limitada por la distribución de los flebotomíneos vectores, su tendencia a ingerir sangre de los animales y el hombre y por su capacidad de soportar el desarrollo interno de las especies de *Leishmania*. Sin embargo, los datos oficiales subestiman la realidad de la afección humana debido a varios factores: a) la distribución de las zonas de transmisión en áreas endémicas es con frecuencia discontinua; b) numerosos casos no son diagnosticados o no se declaran; c) la mayoría de los datos oficiales se obtienen exclusivamente a partir de la detección pasiva de los casos; d) el número de personas infectadas, pero asintomáticas, es mucho mayor que el número de casos manifiestos de LV y, por último, la leishmaniasis es de notificación obligatoria en tan sólo 40 de los 99 países endémicos. En América se han informado casos desde el norte de Argentina al sur de Texas, con la excepción de Chile y Uruguay (9). El estudio de Alvar y col (2012), estima que aproximadamente entre 0,7- 1,2 millones de casos de LC ocurren cada año a nivel mundial (1,3).

En Colombia, durante la década de 1990 se notificaron en promedio 6.500 casos nuevos de leishmaniasis; en la década del 2000 se notificaron en promedio 14.000 casos, lo cual evidenció un incremento inusitado de los casos durante los últimos años. Durante los años 2011 y 2012 el sistema de vigilancia en salud pública-SIVIGILA del Instituto Nacional de Salud reportó 8.188 y 9.546 casos confirmados

de leishmaniasis respectivamente, de los cuales la LC representó el 98% del total de los casos reportados (9,12); Alvar y col (2012) calcularon que en Colombia durante el período 2005- 2009 se reportaron 17.420 casos de LC por año y la incidencia fue estimada aproximadamente en 48.800- 80.100 casos de LC por año (3). Durante el año 2018 se notificaron un total de 7.132 casos, para las tres formas clínicas (LC, LM y LV), el 98.3% de los casos correspondió a la forma cutánea, con una disminución del 18% de los casos con respecto al año anterior y el 1.4% a la forma mucosa (13).

Para el 2018, los casos notificados de LC han estado dentro del umbral histórico esperado del acumulado en cada una de las semanas epidemiológicas del canal endémico; sin embargo, se presentó un aumento de casos en los departamentos de Nariño, Guajira, Guainía, Norte de Santander, Risaralda y Vichada, con respecto al año anterior (13). La incidencia nacional de leishmaniasis en 2018 fue de 58,8 casos por 100 000 habitantes en riesgo para LC, cifra dentro de la meta nacional de 90 casos por 100 000 habitantes. Guaviare es la entidad territorial con la incidencia más alta del país con 332,7 casos por 100 000 habitantes, seguida de Nariño y Risaralda. Al analizar por población general sin incluir a los militares se observa, que Guaviare, Risaralda y Santander presentaron tasas de incidencia superior a 90 casos por 100 000 habitantes (13).

Los cambios climáticos durante 2018 pudieron afectar la aparición de casos de LC, donde se presentó un fenómeno climático de niña débil, con precipitaciones en gran parte del territorio nacional. Posterior a la temporada de lluvia se aumenta la densidad del vector y las condiciones favorables para el desarrollo del ciclo del vector (*Lutzomyia* sp.); la temperatura, la cobertura vegetal, influyen en la abundancia del vector y la dinámica poblacional de los flebotomíneos (13).

2.3. DIAGNÓSTICO DE LA LEISHMANIASIS CUTANEA Y MUCOSA

El diagnóstico temprano de la leishmaniasis es de gran importancia ya que permite instaurar el tratamiento específico lo antes posible y con este, controlar la evolución de la enfermedad, aliviar los signos y síntomas y mejorar la calidad de vida de los pacientes quienes están expuestos a ser estigmatizados socialmente por las cicatrices y secuelas físicas que deja la LC y la LM y que son difíciles de olvidar para quien ha sufrido la enfermedad (4,10).

El correcto diligenciamiento de la historia clínica ofrece datos clínicos y epidemiológicos que permiten suponer la presencia de la enfermedad, pero es necesario el diagnóstico de laboratorio para verificar la sospecha clínica de leishmaniasis. Recientemente se han descrito y utilizado metodologías moleculares dirigidas a la detección de ADN del parásito las cuales aplicadas adecuadamente han tenido sensibilidades altas frente a las técnicas parasitológicas estándar, aumentando los niveles de confianza en cuanto al diagnóstico convencional, además de brindar mayor confianza para la administración del tratamiento (10).

El diagnóstico de la enfermedad debe ser parasitológico, es decir, debe estar basado en la determinación de la presencia del parásito por cualquiera de estos procedimientos:

Examen directo (frotis o extendido)

Este examen consiste en obtener tejido del borde activo de la lesión o del centro de la úlcera o lesión que se extiende sobre una lámina portaobjetos y que luego es sometido a tinción con colorante de Giemsa o Whright. Se recomienda en primera instancia por ser un procedimiento fácil, económico y rápido de realizar; con una buena técnica de toma, procesamiento y lectura de la muestra, la sensibilidad del examen directo podría llegar hasta el 90% o más. Si la muestra se obtiene del centro de la úlcera la sensibilidad del examen microscópico podría estar alrededor del 90.4%, pero si se toma del borde activo de la lesión esta podría bajar al 78.3% (14). Sin embargo, otro estudio reportó una sensibilidad para el examen directo tomando la muestra del borde activo de la lesión del 88% (15).

Para los casos de lesiones en piel, es importante seleccionar una lesión que tenga el menor tiempo de evolución y que no presente una infección sobre agregada. Si la lesión es ulcerada puede raspar tejido del fondo de la úlcera luego que ha retirado la costra, en caso de que esté presente. Si se trata de una lesión en mucosa, se debe procurar obtener un raspado de la lesión o un fragmento del tejido de esta. En los casos de una LV, la muestra se debe tomar por medio de un aspirado de medula ósea (habitualmente cresta ilíaca postero-superior o esternón) preferiblemente, pero se puede tomar de bazo o hígado (10).

El examen directo o frotis será positivo cuando se observe la presencia de amastigotes de *Leishmania* intra o extracelularmente. En caso de ser negativo, se recomienda repetir el examen directo de un sitio diferente, de la misma lesión o de otra. Si clínica y epidemiológicamente persiste la sospecha de leishmaniasis y el examen directo no muestra el parásito, se debe tomar biopsia para estudio anatomopatológico (10).

Cultivo del parásito

Consiste en el aislamiento del parásito a partir de material aspirado de las lesiones o triturado de biopsia de piel, cultivados en medios de cultivo específicos o en animales de laboratorio. Bajo condiciones asépticas se deposita la muestra en el medio de cultivo bifásico conocido como NNN y se incuba a 26°C. Se revisa cada semana al microscopio invertido en busca de promastigotes de *Leishmania*. En caso de no observar el parásito se continúa incubando a 26°C y se examina de nuevo semanalmente durante un mes, al cabo del cual, si persiste negativo, se descarta.

El crecimiento del parásito en los medios de cultivo apropiados brinda buenos resultados en el diagnóstico, con una sensibilidad cercana al 70% (10); otros autores han reportado sensibilidades del 67.5% (14) y del 62.8% (16) para el examen

parasitológico del cultivo, sin embargo, la contaminación de los cultivos obtenidos de biopsias es un problema frecuente para el crecimiento del parásito, debido a sobre infección bacteriana de la lesión y a la flora normal de la piel como lo demuestra un estudio donde los falsos negativos fueron elevados a pesar de no reportarse una contaminación importante de los cultivos (15).

El cultivo se utiliza también para identificar la especie del parásito que está ocasionando la lesión y como fuente de antígeno para pruebas inmunológicas.

Biopsia de piel para estudios histopatológicos

Una vez obtenida la biopsia de cualquier órgano o tejido, se fija en formol y se incluye en parafina para luego hacer cortes muy delgados del tejido (4µm) que se adhieren en láminas portaobjetos. El tejido se desparafina en xilol y se hidrata en soluciones decrecientes de alcohol. Para el estudio histopatológico los cortes se colorean con Hematoxilina de Harris-Eosina o con inmunoperoxidasa; se dejan secar a temperatura ambiente y se revisan al microscopio en busca de los amastigotes y el tipo de reacción inflamatoria. En la coloración con inmunoperoxidasa los amastigotes se observan más fácilmente al microscopio de luz por el contraste de la coloración, ya que los amastigotes toman un color marrón. El método de peroxidasa tiene mayor sensibilidad que la biopsia coloreada con Hematoxilina-Eosina, pero menor que el examen directo y el cultivo (10).

La biopsia para el estudio histopatológico de la enfermedad sólo confirma el diagnóstico cuando el patólogo informa la presencia de amastigotes. Sin embargo, su sensibilidad es menor que la del examen directo, probablemente por la distorsión que sufren los parásitos durante el proceso de fijación y tinción. Se ha reportado una sensibilidad hasta del 64.3% (14), y frecuentemente se informa reacción inflamatoria de tipo granulomatosa compatible con *Leishmania*. Aun así, es una técnica de gran ayuda para el diagnóstico diferencial de las lesiones cutáneas diferentes a leishmaniasis.

Reacción en cadena de la ADN polimerasa (PCR)

Permite la detección del ADN de los parásitos en material de lesiones de pacientes, de animales posibles reservorios, así como en los flebotomíneos vectores. El material de partida para la PCR puede ser un raspado de la lesión, un pequeño fragmento de la biopsia preservado en alcohol puro hasta su procesamiento, el aspirado de la lesión o también sangre total. Es una técnica útil en términos de especificidad y sensibilidad. La especificidad puede llegar a ser del 100% si se usan los cebadores ("primer") apropiados, es decir, altamente específicos para el material genético de *Leishmania*, con respecto a la sensibilidad algunos autores han reportado que la sensibilidad también varía dependiendo del lugar de donde se tome la muestra, es decir, para muestras tomadas del fondo de la úlcera la sensibilidad es aproximadamente del 80.8% mientras que, si la muestra se toma del borde activo de la lesión la sensibilidad baja hasta el 57.7% (14).

La técnica consiste en amplificar el ADN del parásito mediante el uso de diferentes secuencias de oligonucleótidos que funcionan como cebadores para la extensión de las nuevas cadenas de ADN que se amplifican; dependiendo de las secuencias utilizadas varía también la sensibilidad de la PCR. Un estudio adelantado en Israel demostró que la PCR usando el ADN del kinetoplasto (kDNA) tenía la mayor sensibilidad, 98.7% de todos los ensayos que se corrieron, seguido por la PCR usando el ADN de la secuencia ITS1, 91.0% mientras que la PCR usando secuencias del mini-exón tuvo 53.8% de sensibilidad (16).

Para cualquiera de estas PCR se debe extraer el ADN de la muestra obtenida del paciente por cualquier método de extracción disponible, ya sea fenol-cloroformo y etanol o cualquier otro método. El ADN extraído se incorpora en una mezcla que contiene las secuencias específicas de oligonucleótidos que actúan como cebadores, los desoxinucleósidos trifosfato (dNTP), cloruro de magnesio y la enzima *Taq* ADN polimerasa. La mezcla de reacción se somete a determinados ciclos de desnaturalización, amplificación y extensión en un termociclador. Las condiciones de amplificación dependen del gen que se quiere amplificar. Luego de la amplificación, el producto de la amplificación (ADN amplificado) se visualiza en un gel de agarosa al 1% con la ayuda de un colorante que tiñe los ácidos nucleicos que puede ser bromuro de etidio o *Syber safe Green*, un colorante más seguro que el Bromuro de Etidio ya que no es mutagénico (10).

Existen variaciones del ensayo como la PCR en tiempo real, que emplea un fluorocromo para visualizar la reacción. Esta variación hace a la PCR más sensible. Actualmente se están desarrollando otros métodos basados en PCR que consisten en la amplificación isotérmica del ADN y la detección puede hacerse visualmente adicionando el fluorocromo *Sybr-green*, el cual se torna verde en presencia de productos amplificados y permanece naranja en su ausencia (10).

Con la prueba PCR se puede distinguir además la especie del parásito, utilizando una técnica conocida como PCR-RFLP que consiste en el análisis de la longitud de los fragmentos de restricción del producto amplificado cuando se somete a digestión con diferentes enzimas de restricción (10).

2.4. ALTERNATIVAS PARA MEJORAR EL DIAGNOSTICO

La RPA es un método desarrollado en el año 2006 por Piepenburg et al. En la reacción RPA, la enzima recombinasa forma un complejo de nucleoproteína con cebadores oligonucleotídicos y explora secuencias homólogas en una plantilla de ADN dando como resultado la amplificación del ADN de doble cadena sin la necesidad de fusión térmica o química de este; esta tecnología fue desarrollado usando proteínas involucradas en la síntesis, recombinación y reparación del ADN celular. Es un método novedoso para la amplificación de ácidos nucleicos que consiste en un oligonucleótido con:

- Una etiqueta o marcaje 5'- antigénica
- Un análogo interno de nucleótido abásico (un residuo de tetrahidrofurano o THF, a veces denominado "dSpacer") que reemplaza a un nucleótido.
- Un grupo bloqueador de la extensión de polimerasa (como un fosfato, un espaciador C3 o un nucleótido di-desoxinucleótido) en el extremo 3'

Las sondas TwistAmp® nfo se usan en una configuración en la que el cebador de amplificación opuesto se marca en su extremo 5' con otra etiqueta antigénica (diferente a la de la sonda). El tercer oligonucleótido presente en la reacción (equidireccional con la sonda) es un cebador convencional (17).

Nota: el residuo THF reemplaza una base que estaría presente en la secuencia objetivo y no es una inserción adicional.

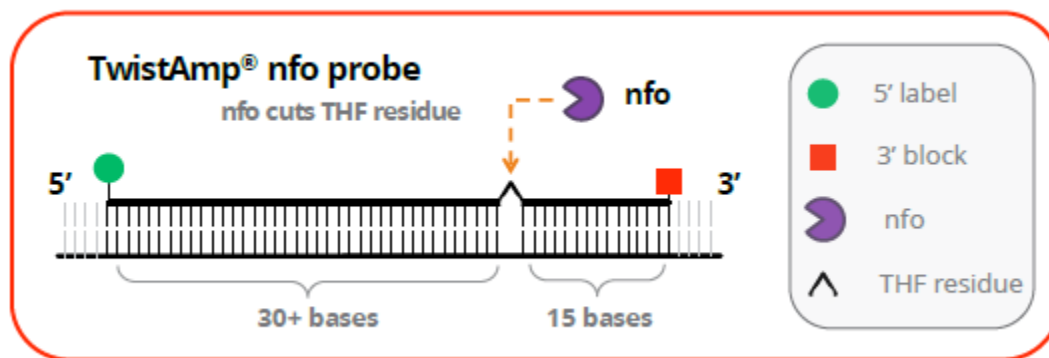


Figura 1. Esquema de una sonda típica typical TwistAmp® nfo. El residuo básico de THF es escindido por nfo solo cuando la sonda está unida. El grupo 3 'OH generado en el proceso es un objetivo para la extensión de la polimerasa y permite que la etiqueta 5' se integre en los productos de amplificación. Fuente: <https://www.twistdx.co.uk/>

En la práctica, no importa en qué dirección se usan las etiquetas, es decir, qué etiqueta está en la sonda y cuál está en el cebador. Sin embargo, para facilitar el desarrollo posterior de la prueba, puede resultar útil colocar la etiqueta del anticuerpo conjugado en la sonda (Biotina para PCRD). De esta manera, los usuarios que proceden a usar una tira de dos líneas para la multiplexación, pueden cambiar en qué línea de la tira detectan ordenando un nuevo cebador etiquetado en lugar de pedir una nueva sonda (17).

La reacción de amplificación TwistAmp® promovida por los dos oligonucleótidos cebadores generará targets para el "annealing" de la sonda TwistAmp® nfo. En el contexto resultante de doble cadena, el residuo de THF presenta un sustrato para la enzima nfo (también conocida como Endonucleasa IV) presente en el kit TwistAmp® nfo. La nfo escindirá la sonda en la posición THF y, por lo tanto, generará un nuevo grupo 3'-hidroxilo (desbloqueando efectivamente la sonda) que puede actuar como un sitio de primer para la extensión de polimerasa, transformando así la sonda en un cebador. El amplicón producido por la sonda procesada y el cebador de amplificación opuesto marcado con 5' se unirán eficazmente a los dos residuos antigénicos en una molécula de ADN (ver Figura 2).

Este dúplex se puede detectar en formatos de ensayo tipo sándwich (típicamente post-amplificación, es decir, detección de punto final), utilizando consumibles como los que se enumeran a continuación:

Milenia Hybridetect-1 o U-Star units para detectar biotin + FITC/FAM y PCRD para detectar DIG + biotin and/or FITC/FAM + biotin

Las tiras de flujo lateral para la detección de ácidos nucleicos (incluido el Milenia Hybridetect-1) generalmente están diseñadas para utilizar productos (por ejemplo, productos de PCR y sondas marcadas con antígeno) como sustrato y, por lo tanto, requieren procedimientos de procesamiento de muestras exhaustivos. En contraste, el mecanismo de reacción TwistAmp® nfo genera la molécula reportera doblemente marcada simultáneamente con la reacción de amplificación y solo requiere un procesamiento mínimo posterior a la amplificación (17).

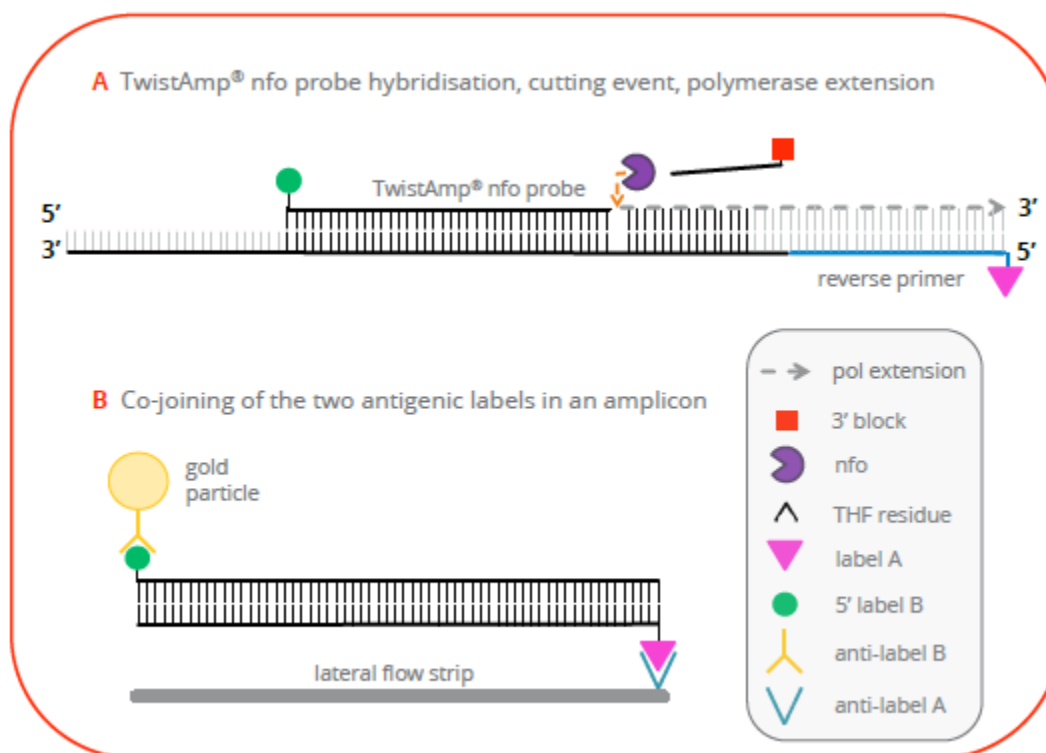


Figura 2. Esquema de las disposiciones de los primer de amplificación y la sonda TwistAmp® nfo. (A) La sonda procesada y el primer opuesto generarán productos de amplificación bicatenarios que se unen a los dos marcadores antigénicos. (B) Este producto puede capturarse posteriormente usando una de las etiquetas (por ejemplo, usando la línea de prueba de anti-biotina en una tira de flujo lateral), y visualizarse usando la otra (por ejemplo, por interacción con anticuerpos marcados con oro). Fuente: <https://www.twistdx.co.uk/>

La reacción de nucleasa nfo y la generación resultante del amplicón doblemente marcado están restringidos a casos en los que la sonda puede reconocer su secuencia objetivo, elegida para estar dentro del producto de amplificación original. Por lo tanto, el corte de la sonda es indicativo del evento de amplificación en sí mismo y puede usarse para monitorear el éxito de la reacción TwistAmp® (17).

2.5. MÁS ALLÁ DE LA EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO DIAGNÓSTICO

Generalmente los estudios de validez de pruebas diagnósticas se diseñan con dos objetivos:

1. Determinar la precisión diagnóstica de la prueba que se evalúa. Este objetivo supone la comparación de las clasificaciones resultantes de dos procesos independientes de medición. El primero, la prueba de referencia (Gold-standard) que se asume clasifica de forma correcta a los individuos de acuerdo con la presencia o no de una condición clínica de interés. El segundo proceso lo constituye la prueba diagnóstica que se somete a evaluación. El resultado de esta comparación se puede expresar a través de diversos índices como son: sensibilidad, especificidad o combinaciones tales como cocientes de probabilidad, o los valores predictivos. La mayoría de los estudios de precisión de pruebas diagnósticas en la literatura evalúan este aspecto de la validez diagnóstica aunque muy pocos se adhieren a un diseño óptimo (libre de sesgos o al menos con un buen control de estos) (18).

2. Evaluar el impacto que tendría el uso de una u otra prueba diagnóstica sobre el manejo clínico, las decisiones terapéuticas y, en último término, sobre los resultados de salud de los pacientes. Los estudios que incluyen este objetivo, no son muy numerosos en la literatura, además son de diseño complejo y en ocasiones se desarrollan como ensayos clínicos aleatorizados (18).

El personal de la salud, en el ejercicio diario de su profesión debe tomar decisiones sobre cómo asignar recursos para atender las necesidades en salud de sus pacientes. Es necesario conocer el balance entre la efectividad de las intervenciones disponibles, efectos adversos y sus costos, para tomar este tipo de decisiones. En muchas ocasiones es necesario llevar a cabo un análisis cuantitativo de los costos y de los beneficios entre las diferentes alternativas existentes para abordar un mismo problema clínico.

El análisis económico de intervenciones en salud es una herramienta que permite hacer estas comparaciones en forma estructurada y que puede ser utilizada como criterio para priorizar servicios y asignar recursos. Hay cuatro técnicas básicas (equiparables a diseños) para llevar a cabo análisis económico de intervenciones en salud: el análisis de identificación o de minimización de costos, el análisis de costo-efectividad, el análisis de costo-utilidad y el análisis de costo-beneficio.

Análisis de identificación o minimización de costos

Este tipo de análisis calcula los costos relacionados con una enfermedad o con los servicios médicos utilizados para su tratamiento. Por medio de este tipo de análisis se puede conocer la carga económica de una enfermedad o la de su tratamiento y sirve también para comparar diferentes alternativas en cuanto a costo, siempre y

cuando los beneficios de estas alternativas en términos de salud sean iguales. Por ejemplo: La toma de decisiones en un hospital universitario en relación con la compra de medicamentos utiliza con frecuencia el análisis de minimización de costos, la diferencia de precio no es suficiente para tomar la decisión, en este caso debe tenerse certeza de que el beneficio es el mismo con las diferentes opciones de medicamentos, es decir, debe haberse demostrado intercambiabilidad de los medicamentos (bio-equivalencia y bio-disponibilidad iguales) (19,20).

Análisis de costo-utilidad

Este análisis es una forma particular de análisis de costo-efectividad pero en la que los desenlaces de una intervención se miden en QALY ganados, medida que incorpora tanto la duración como la calidad de los años de vida adicionales obtenidos de una intervención médica (19,20).

Análisis de costo-beneficio

Este análisis valora los beneficios en salud en unidades monetarias y los compara con los costos de la intervención. De manera que los resultados obtenidos de esta técnica se interpretan como el costo neto (costo-beneficio) de una intervención. El inconveniente de este análisis radica en que el valor de un individuo para la sociedad se basa en su productividad o ingresos futuros, esto significa que se pueden subvalorar los beneficios para ciertos grupos poblacionales como podrían ser: niños, ancianos y en ocasiones las mujeres (19,20).

Análisis de costo-efectividad

Este análisis compara los costos de diferentes métodos para obtener la misma efectividad. Parte de la premisa de que los beneficios de salud son el objetivo que se desea maximizar, y quien toma las decisiones está sujeto a las limitaciones de los recursos de salud. Este análisis mide tanto el costo neto (gastos menos ahorro) de una intervención en salud como los beneficios producidos por ella. Se comparan los costos incrementales con los resultados incrementales, expresados en unidades físicas o naturales (mediciones clínicas convencionales, como la reducción de la presión arterial, días de discapacidad evitados, vidas salvadas o años de vida ganados) (19,20).

Los resultados de un análisis de costo-efectividad se presentan como una razón, costo por unidad. Esta razón solo se puede interpretar comparándola con la razón de otra intervención, de una alternativa al tratamiento de interés o incluso con la opción de no hacer ninguna intervención (19,20). Este análisis se amplía en la sección de procesamiento y análisis de los datos.

3. HIPOTESIS

3.1. EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO DIAGNÓSTICO

Hipótesis nula:

No existen diferencias en el rendimiento diagnóstico entre la prueba de amplificación isotérmica de DNA mediante recombinasa y polimerasa (RPA) y el examen directo (frotis o extendido) en el diagnóstico de la LC.

Hipótesis alterna:

La prueba de amplificación isotérmica de DNA mediante recombinasa y polimerasa (RPA) tiene un rendimiento diagnóstico al menos tan bueno como el del examen directo (frotis o extendido) en el diagnóstico de la LC.

3.2. EVALUACIÓN DE COSTO-EFECTIVIDAD

Entendiendo la efectividad como un aumento de la sensibilidad y la especificidad de la prueba de amplificación isotérmica de DNA mediante recombinasa y polimerasa (RPA) con respecto al Examen directo (frotis o extendido) en el diagnóstico de la LC.

Hipótesis nula:

No existen diferencias en la sensibilidad y especificidad entre la prueba de amplificación isotérmica de DNA mediante recombinasa y polimerasa (RPA) y el examen directo (frotis o extendido) en términos de la razón de costo-efectividad incremental.

Hipótesis alterna:

La prueba de amplificación isotérmica de DNA mediante recombinasa y polimerasa (RPA) tiene una sensibilidad y especificidad al menos tan buenas como la del examen directo (frotis o extendido) en términos de la razón de costo-efectividad incremental.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar la utilidad de la prueba RPA en términos de sus atributos diagnósticos y costo-efectividad, durante el proceso de diagnóstico de LC en los diferentes municipios de Colombia durante el periodo comprendido entre 2017 y 2019.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Describir sociodemográfica y clínicamente los pacientes con sospecha de LC, pertenecientes a las poblaciones atendidas en los diferentes municipios de los departamentos de Antioquia, Chocó, Caldas, Tolima, Boyacá y Sucre.
- Establecer el rendimiento diagnóstico de la prueba RPA frente al examen directo
- Evaluar la concordancia inter-observador de la prueba RPA y el examen directo
- Realizar una aproximación al análisis de costo-efectividad de la prueba RPA y el examen directo.

5. METODOLOGÍA

5.1. ENFOQUE METODOLÓGICO

El presente estudio corresponde a un enfoque cuantitativo fundamentado en el método hipotético-deductivo dado que se establece una pregunta inicial de investigación de la cual se derivan hipótesis que se someten a prueba utilizando un diseño de investigación apropiado para evaluar una prueba diagnóstica. Y de esta manera establecer finalmente si los resultados corroboran o no las hipótesis (21).

5.2. TIPO DE ESTUDIO

Ante la disponibilidad de una nueva prueba diagnóstica se debe proceder al estudio de su validez antes de introducirla en la práctica clínica, el diseño más adecuado para este propósito se corresponde con un estudio observacional - descriptivo, de corte transversal para la evaluación de las diferentes medidas de rendimiento diagnóstico (sensibilidad, especificidad, valores predictivos) y el grado de concordancia inter-observador para las pruebas diagnósticas RPA y el examen directo -frotis o extendido-); en este tipo de diseño se realiza, de forma ciega e independiente, la prueba a evaluar y la prueba de referencia a una serie consecutiva y representativa de pacientes con sospecha de LC, las cuales deben ser interpretadas en ausencia de toda información clínica adicional que no estará disponible cuando la prueba se utilice en la práctica clínica (18).

5.3. POBLACIÓN DE ESTUDIO

Estuvo conformada por los pacientes con sospecha clínica de LC atendidos en los municipios de Apartadó y Anorí en el departamento de Antioquia, Pauna, San Pablo de Barbur, Quipama y Otanche en el departamento de Boyacá, Ovejas en el departamento de Sucre, La Victoria, en el departamento de Caldas, Róvira y Falan en el departamento de Tolima y Capurganá en el departamento de Chocó, durante el período comprendido entre enero del 2017 y noviembre del 2019.

Este estudio comprendió dos unidades de análisis:

1. Los pacientes de donde se tomaron las variables sociodemográficas y clínicas.
2. Las muestras que se tomaron a cada uno de los pacientes de las cuáles se obtuvieron los datos con los que se determinaron los atributos diagnósticos de la prueba en evaluación.

Criterios de selección de los pacientes y de las muestras clínicas

Los criterios de Inclusión de los pacientes fueron:

- Hombres y mujeres de cualquier edad que presentaron lesiones en piel sospechosas de LC (úlceras, placas, nódulos).
- Que aceptaron participar del estudio y firmaron el formato de uso de muestras clínicas con fines diagnósticos.
- Que no recibieron tratamiento farmacológico para leishmaniasis en los 3 meses previos al diagnóstico. Por tratamiento farmacológico se entiende la administración de medicamentos con actividad específica contra el parásito y el manejo de cualquier infección concomitante.

Los criterios de exclusión de las muestras clínicas fueron:

- Muestras clínicas insuficientes para los análisis por examen directo tanto en el centro de referencia como en el de evaluación, y para los métodos moleculares (RPA y PCR convencional) en el centro de evaluación y en el centro de referencia.
- Muestras que se dañaron durante el procesamiento en laboratorio, es decir, sobre las que se realizó un mal procedimiento como sería la fijación y tinción en lámina portaobjetos lo que ocasionaría una distorsión de los parásitos.
- Muestras que solo tuvieron una prueba diagnóstica (RPA o examen directo)

5.4. DISEÑO MUESTRAL – TAMAÑO DE LA MUESTRA

Asumiendo que una sensibilidad y especificidad adecuadas para la RPA sería aquella igual o superior a un 90%. Y que tanto la sensibilidad como la especificidad para la prueba diagnóstica de referencia examen directo se encuentran alrededor de un 70% aproximadamente (en condiciones de campo).

Con un intervalo de confianza del 95% y un poder estadístico del 80% el tamaño de la muestra que se calculó fue de 62 pacientes por grupo: Enfermos y No enfermos, para un total de 124 participantes en el estudio. Estos cálculos se obtuvieron mediante el programa Epidat versión 4.1

Sensibilidad esperada

Prueba 1(Examen directo): 70%

Prueba 2 (RPA): 90%

Especificidad esperada

Prueba 1 (Examen directo): 70%

Prueba 2 (RPA): 90%

Nivel de confianza: 95%

Poder estadístico 80%

Potencia (%)	Tamaño de la muestra		
	Enfermos	No Enfermos	Total
80	62	62	124

5.5. DESCRIPCIÓN DE LAS VARIABLES

Se propusieron las siguientes categorías de clasificación de las variables para una mejor comprensión de estas (Anexo 1. Tabla de variables).

a. Variables de identificación y sociodemográficas

Las variables que hacen parte de este grupo solo se consideraron una vez a lo largo del estudio y su principal función fue permitir la identificación de los participantes y la caracterización de la población de estudio.

b. Variables relacionadas con la infección actual

Este grupo de variables solo se consideró en el momento del diagnóstico de leishmaniasis de los pacientes del estudio, permitió hacer una caracterización de la infección actual y de los antecedentes de LC al ingreso de los participantes al estudio.

c. Variables relacionadas con el análisis de costo-efectividad

Costos directos: costo por paciente de la prueba RPA, costo por paciente del examen directo, costos de los exámenes de apoyo diagnóstico (cultivo, IFI, PCR-RFLP), costo de un falso negativo (progresión de la LC a LM).

5.6. TÉCNICAS DE RECOLECCIÓN DE LA INFORMACIÓN

a. Fuentes de información

En este estudio se utilizó una fuente primaria de información ya que ésta se tomó directamente de los pacientes y de los resultados diagnósticos de sus muestras

clínicas y una fuente secundaria debido a que se usó la historia clínica de los pacientes para obtener algunos datos que eventualmente fueron necesarios.

Instrumento y proceso de recolección de la información

Se diseñó un instrumento específico, en el cual se consignó la información necesaria requerida para este estudio e información clave que permitió identificar al paciente a través de un código y así mantener la confidencialidad de sus datos. Los datos se obtuvieron directamente de los pacientes a través del diligenciamiento de un formato específico proporcionado por el estudio al personal de laboratorio (bacteriólogas) de las instituciones de salud de los diversos municipios de los departamentos de Antioquia, Chocó, Caldas, Tolima, Boyacá y Sucre. En este formato se registraron los respectivos resultados de los análisis de laboratorio efectuados a cada una de las muestras clínicas, otros datos se obtuvieron de la historia clínica propia del paciente en la institución; también se registró en este formato información del bacteriólogo(a) que realizó las pruebas diagnósticas en el centro de evaluación y en el centro de referencia, como: tiempo de experiencia en la toma de muestras clínicas y en la lectura de placas para el diagnóstico de LC, nombre de la persona que realizó la prueba diagnóstica en el centro de evaluación y en el centro de referencia.

Este formato contenía la información necesaria requerida para dar cuenta de los objetivos de la investigación. Los profesionales encargados de recopilar la información recibieron un entrenamiento (en las sedes de las instituciones de salud de los respectivos municipios de los departamentos de Antioquia, Chocó, Caldas, Tolima, Boyacá y Sucre) sobre el correcto diligenciamiento del instrumento de recolección por parte de la investigadora principal Luz Estella Mesa y por parte de la estudiante de microbiología Jessica Tabares Ocampo, quien realizó su tesis de grado sobre el desarrollo de una prueba rápida (RPA) para el diagnóstico de la leishmaniasis en campo y por la Microbióloga Tatiana Pineda de la U de A. Esta capacitación también incluyó el entrenamiento en biología molecular, para la realización de la prueba RPA bajo las condiciones locativas disponibles en los centros de salud de los diferentes municipios (Ver Anexo 2. Formato de recolección de la información).

b. Obtención del Consentimiento Informado de los pacientes para el estudio

La LC es una enfermedad de notificación obligatoria al sistema nacional de vigilancia en salud pública, por lo tanto, el diagnóstico de la enfermedad no hace excepción de personas. Es requisito indispensable tener un diagnóstico positivo para leishmaniasis antes de poder acceder al tratamiento, que es distribuido exclusivamente de forma gratuita por el ministerio de la protección social a los pacientes con diagnóstico positivo.

Siendo este un estudio descriptivo que no involucró ningún procedimiento diferente a la toma de muestras tradicional para diagnóstico de LC mediante el examen

parasitológico directo, se utilizó un formato de autorización de uso de muestras biológicas con fines de investigación, el cual fue firmado por el paciente o su acudiente en el caso que fuera un menor de edad.

Después de obtener esta autorización se procedió a la toma de las muestras como se explicó en la descripción de los procedimientos que se realizaron a los pacientes. A los pacientes que consultaron por presentar lesiones en piel se les explicó que se estaba evaluando una nueva prueba diagnóstica para LC diferente al tradicional examen directo parasitológico que incluido en la norma de atención de los pacientes con LC. Se les explicó que se esperaba que esta nueva prueba diagnóstica fuera mucho mejor que el examen directo para diagnosticar la LC y que al decidir participar en este estudio tendrían la oportunidad de ser diagnosticados con dos pruebas de laboratorio diferentes y así estarían más seguros de su diagnóstico una vez fueran notificados por su médico tratante. Se les dijo que, si deseaban participar, se les tomarían muestras adicionales de la lesión en piel para ser analizadas con otros métodos más específicos y así tener un mejor diagnóstico de su enfermedad. Finalmente, si estaban de acuerdo, se les pidió que firmaran el formato de autorización para el uso de las muestras clínicas con fines diagnósticos. Después se procedió a la verificación de los criterios de inclusión y exclusión de los pacientes, y una vez verificados se realizó la toma de las muestras clínicas.

Estos procesos anteriormente descritos, fueron realizados por el personal de laboratorio clínico (bacteriólogo(a)) previamente entrenadas por personal del estudio (investigador principal y/o estudiante de microbiología de la U de A y/o microbiólogo U de A). Una vez obtenido el Consentimiento Informado, se procedió a la toma de las muestras de tejido del borde activo de la lesión para el examen directo y PCR.

Las dos pruebas diagnósticas, RPA y examen directo se realizaron simultáneamente con las muestras de las lesiones de cada uno de los pacientes; en el caso del centro de referencia PECET se realizó adicionalmente la PCR convencional de forma simultánea sobre cada una de las muestras (Figura 3).

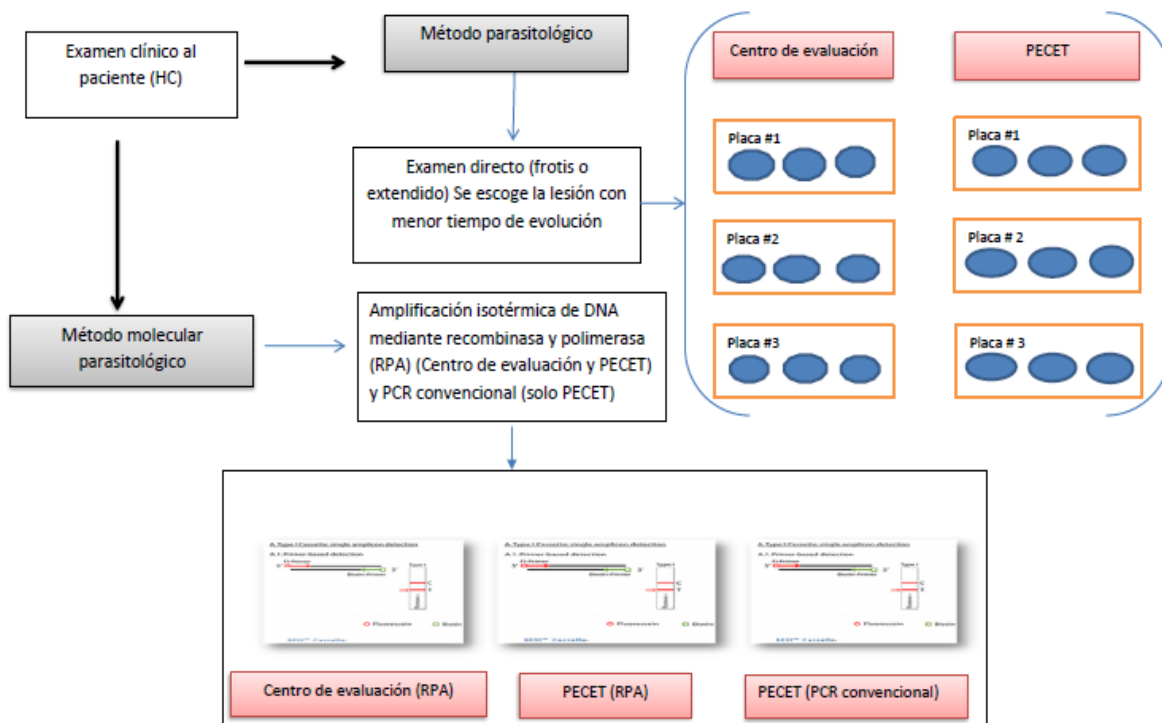


Figura 3. Procedimiento diagnóstico de LC en el estudio

c. Toma de muestra para examen directo

Para el examen directo se tomaron muestras para seis (6) placas, de las cuales tres (3) fueron analizadas en el centro de evaluación y las otras tres (3) placas fueron remitidas al centro de referencia PECET quién hizo el respectivo diagnóstico de la muestra en cuestión como se observa en la figura 3.

El paciente no requirió preparación previa. La muestra se pudo tomar tanto del borde activo como del fondo de la úlcera. En caso de que el paciente presentara varias lesiones, se seleccionó la de menor tiempo de evolución y que tuviera los bordes más indurados. Si la úlcera presentaba costra y se deseaba tomar una muestra del fondo, se debía debridar antes de proceder al raspado.

El Bacteriólogo(a) o Microbiólogo(a) responsable del laboratorio clínico en los diferentes municipios de los departamentos de Antioquia, Chocó, Caldas, Tolima, Boyacá y Sucre, previamente entrenado(a) por personal del estudio (investigador principal y/o estudiante de microbiología de la U de A y/o Microbiólogo U de A), realizaron las siguientes actividades:

- Rotuló las placas utilizando lápiz vidriograf con el Código W asignado al paciente y fecha.

- Con las manos enguantadas hizo limpieza de los bordes de la lesión utilizando gasa y alcohol antiséptico.
- Realizó hemostasia del lugar escogido para la toma de la muestra, esto se logró haciendo pinza con los dedos índice y pulgar.
- Realizó una pequeña incisión con la hoja de bisturí de aproximadamente 3 mm de larga por 2-3 mm de profundidad en la parte central del borde activo, que es paralelo al borde de la úlcera.
- Limpió, con gasa seca, la sangre que pudiera salir al realizar la incisión.
- Con la punta del bisturí, realizó un raspado en el sitio de la incisión para obtener tejido.
- Extendió el material obtenido sobre la lámina, esparciéndolo con la misma hoja del bisturí suavemente para evitar destrucción de los amastigotes. Realizó 3 extendidos por placa.
- Dejó secar las láminas a temperatura ambiente.
- Trasladó las muestras, en un recipiente cerrado, hasta el área técnica en el laboratorio de Inmunología.
- Coloreó las placas con Giemsa.
- Observó al microscopio de luz con un aumento de 100X, en busca de los amastigotes que pueden encontrarse intra o extracelulares.
- Registró el resultado de la prueba en el cuaderno de Atención a pacientes y en la Historia Clínica.
- Una vez leídas las placas, éstas fueron almacenadas en cajas de colección para posterior control interno y externo de lectura de placas.

El reporte de resultados fue realizado por el bacteriólogo(a) o microbiólogo(a) (previamente capacitado por personal de la investigación, para dar cuenta de los datos durante toda la ejecución del estudio). En este documento final no se reportan los nombres del personal de laboratorio que realizó las diferentes pruebas diagnósticas tanto en los centros de evaluación como en el centro de referencia, así como tampoco se reporta el tiempo de experiencia de cada uno de ellos en la toma de las muestras clínicas y en la lectura de las placas; estos datos están disponibles en los formatos de recolección de la información y en la base de datos del estudio.

Los resultados del examen directo se reportaron de la siguiente manera:

Resultado Diagnóstico Positivo: Se observaron formas amastigotas de *Leishmania* spp

Resultado Diagnóstico Negativo: No se observaron formas amastigotas de *Leishmania* spp (de acuerdo con el POE directo para *Leishmania* spp. Laboratorio PECET) (10).

d. Toma de muestra para PCR convencional y para la RPA

Se tomaron tres (3) muestras para PCR del mismo modo y del mismo sitio de donde se tomó la muestra para el examen directo, esto es, borde activo de la lesión o fondo de la úlcera.

- Para la RPA a ser realizada en el centro de evaluación local, la muestra se depositó en un buffer de lisis empleando proteinasa K y se incubó a 56°C por 1 hora, mezclando la muestra al menos dos veces con agitación manual. Luego la muestra se dejó en reposo y se tomó 1 o 2 µl del sobrenadante para la PCR isotérmica.
- Para la RPA y la PCR convencional a ser procesadas en el centro de referencia (PECET). Las dos muestras se depositaron en un buffer de transporte y conservación llamado NET (NaCl, EDTA, Tris) y se almacenaron congeladas a 20°C hasta su procesamiento. Este método de transporte y preservación de las muestras garantizó la calidad de estas y la validez de sus resultados.

Para la obtención del ADN, se centrifugaron las muestras a 13.000 rpm en una microcentrífuga por 2 o 3 minutos, se descartó el buffer NET y la muestra que iba a ser procesada para RPA se re-suspendió en el buffer de lisis a base de proteinasa K y la extracción se realizó de manera igual a como se hizo la extracción en el centro de evaluación local. La muestra que iba a ser procesada por PCR convencional, se le extrajo el ADN utilizando un kit comercial y siguiendo en adelante las indicaciones del fabricante del kit empleado.

Además, se purificó ADN de parásitos de *Leishmania* cultivados en el Laboratorio para emplear como control en las reacciones de amplificación. Este ADN se purificó de aproximadamente 1×10^8 promastigotes de *Leishmania braziliensis* y/o *panamensis* cultivados en medio de Schneider + 10% de suero fetal bovino (SFB) y empleó el mismo kit comercial empleado para extraer el ADN de las muestras clínicas.

e. Realización de la prueba RPA

La reacción se llevó a cabo inicialmente en un volumen final de 47.5 µl, conteniendo los reactivos presentes en un kit comercial (TwistAmp™ nfo) que contenía todos los componentes para la prueba RPA, exceptuando el ADN y los cebadores. Para la preparación de la mezcla de la reacción (single-plex) se usó un tubo de 1.5 ml, al cual se le adicionaron 2.1 µl del cebador sentido y anti-sentido, 0.6 µl de la sonda TwistAmp® nfo; 29.5 µl del buffer de rehidratación y finalmente 13.2 µl de ADN (molde) y agua.

- Se agregó la mezcla de la reacción preparada, a la reacción TwistAmp® nfo. (Se pipeteó para mezclar).
- Se Agregó 2.5 µl de acetato de magnesio 280mM (MgOAc) (suministrado) y se mezcló bien para comenzar la reacción.
 - Nota: Las reacciones RPA comenzaron tan pronto como se agregó MgOAc.
- Se Incubó a 40 °C durante 20 minutos. Para amplificar genes presentes en bajo número de copias, se retiró la tira de reacción después de 4 minutos, se agitó y giró brevemente, y se colocó nuevamente en el dispositivo de calentamiento.
- Después de 20 minutos, para el análisis a través de tirillas de flujo lateral, se diluyeron los productos de reacción según se especificó en las tirillas de flujo lateral que se eligieron.
 - Nota: Si los tubos se abrían después de la amplificación, existía un gran riesgo de contaminación de las superficies de trabajo con amplicones. Se aseguró de tomar las medidas apropiadas para minimizar este riesgo.

La reacción de control positivo se preparó de manera similar a las muestras problemas, excepto en el ADN molde que se usó 1 µl del ADN control y 8 µl de un mix de cebadores específicos para una región del genoma que no corresponde a ningún gen. La temperatura sugerida de amplificación en este caso fue 39°C, pero se podía emplear 40°C.

Las reacciones de amplificación por RPA se revelaron a través de un inmunoensayo de flujo lateral de ácido nucleico, llamado PCRD, que pudo usarse como una alternativa al uso de la electroforesis en gel de ADN con agarosa. Si bien tomó solo 10 minutos detectar la amplificación exitosa de las secuencias de ADN objetivo, PCRD fue la mejor opción para los laboratorios ocupados que deseaban resultados rápidos. Una vez se terminó la reacción de amplificación se mezclaron 70 µL de buffer de extracción PCRD y 5 µL de la reacción de amplificación; posteriormente se agregaron sobre la almohadilla para depositar la muestra de los dispositivos de revelado comercial PCRD (Abingdon Health®) y se esperó hasta 10 minutos para hacer la lectura.

La presencia de dos líneas de color en la zona de revelado fue considerada como positiva y la presencia de una única línea en la región del control, fue considerada negativa (Figura 4). Si en la tirilla no se observaba señal en la línea correspondiente al control, la prueba se calificaba como indeterminada y se repetía.



Figura 4. Revelado mediante el dispositivo PCRD kit

f. Realización de la prueba PCR convencional

El ADN obtenido en el Laboratorio PECET se amplificó por un protocolo previamente establecido en el Laboratorio el cual amplificó la región N-terminal del gen HSP70 de *Leishmania*. Para el revelado de la reacción se tomó 8-10 μ l del producto amplificado, se mezcló con 2 μ l de buffer de carga conteniendo el colorante envizion y se corrió en geles de agarosa (seakem) al 2% en buffer TAE 1X (Tris- 40 mM de ácido acético, y 1 mM de EDTA) a 90 voltios constante durante 1 hora. Se cargaron, además 2 μ l del marcador de peso molecular en escala 100 pb. El gel se visualizó bajo luz ultravioleta empleando el sistema Chemidoc (Bio-Rad) y el programa Quantity one versión 4,6.

g. Funciones de cada uno de los actores que participaron en el estudio

Investigador principal:

- Validó el entrenamiento del personal de laboratorio de las instituciones donde se evaluó la prueba RPA y sobre la forma correcta de hacer el diagnóstico de LC a través del examen directo (protocolo de toma de muestras, coloración y visualización de los amastigotes).
- Entrenó al personal de laboratorio de las instituciones sobre la forma correcta de hacer el diagnóstico de LC a través del examen directo.
- Acordó con el personal de atención médica la información que se debía diligenciar en la historia clínica y que sería relevante para el desarrollo del estudio.
- Verificó y recogió la información del laboratorio y del personal médico en cada una de las instituciones donde se evaluó la prueba diagnóstica.
- Visitó las instituciones para verificar que se estaba cumpliendo los protocolos establecidos para la toma de muestras y diagnóstico de LC.
- Verificó el envío de las muestras biológicas que correspondían al PECET como centro de referencia para diagnóstico de LC y de las que fueron evaluadas en las diferentes instituciones, para ser almacenadas en el PECET como soporte de los resultados del estudio.

- Consolidó y procesó la información de los distintos centros de evaluación de las pruebas diagnósticas.

Microbiólogos/Bacteriólogos de los centros de evaluación de la prueba diagnóstica:

- Tomaron y procesaron las muestras biológicas bajo los estándares de calidad previamente acordados con el investigador principal del estudio.
- Remitieron oportunamente las muestras biológicas al centro de referencia (PECET) tanto las que fueron evaluadas en dicha institución como las que corresponden al PECET.
- Entregaron la información médica y de laboratorio oportuna y correctamente diligenciada.

Microbiólogo del centro de referencia (PECET)

- Procesó las muestras enviadas por los distintos centros de evaluación y suministró los resultados diagnósticos oportunamente al investigador principal.
- Almacenó correctamente las muestras enviadas por los diferentes centros de evaluación para que sirvieran de soporte de los resultados de la investigación.
- Suministró todo el apoyo científico y logístico que se necesitó para el correcto desarrollo de la investigación.

La figura 5 resume el proceso seguido en el estudio.

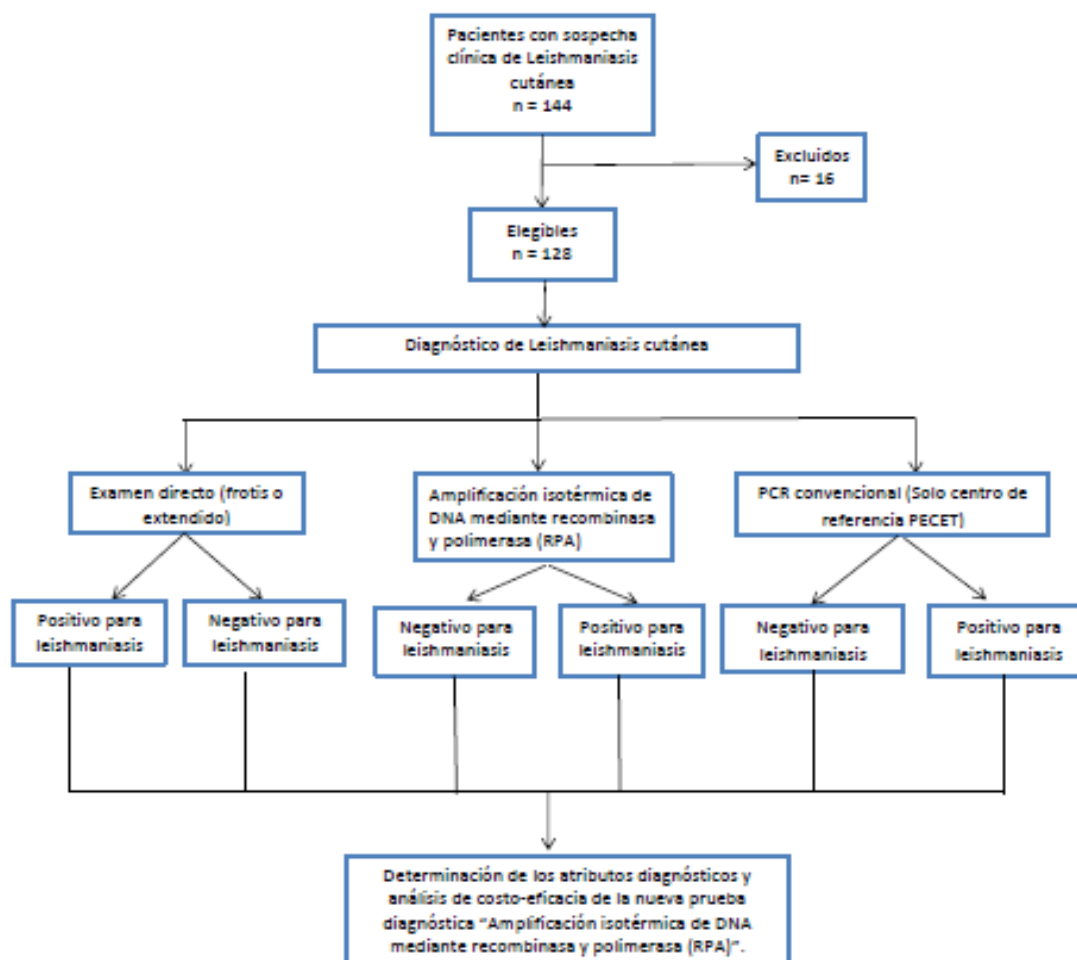


Figura 5. Diagrama del diseño del estudio.

5.7. LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Desde la perspectiva del trabajo de campo, aunque se había contemplado inicialmente como proceso del diagnóstico para LC, tres placas (lámina portaobjetos) para el examen directo tanto en los centros de evaluación como en el centro de referencia, no se pudo garantizar en los diferentes sitios geográficos del estudio, la lectura de estas tres placas con sus tres respectivos resultados; solo se obtuvo un reporte general de positividad o negatividad del examen directo, que pudo corresponder a la lectura de una, dos o las tres placas de cada paciente.

Otra limitación importante del estudio fue la relacionada con el enmascaramiento en la interpretación de las pruebas diagnósticas que se evaluaron en los centros de salud de los diferentes municipios del territorio nacional; por lo tanto, es razonable pensar que la interpretación del examen directo (dado su alto componente implícito

de subjetividad), pudo verse influenciada por el conocimiento del resultado previo de la prueba diagnóstica RPA en los centros de salud de los diferentes municipios; esto quiere decir, que no se descarta la posibilidad de una sobreestimación del rendimiento diagnóstico de la RPA. Sin embargo, se reconoce las dificultades técnicas y de disponibilidad de personal de laboratorio que se presentan en estos lugares apartados del territorio nacional, donde la prevalencia de LC es importante.

No se pudo garantizar la interpretación del examen directo sin conocimiento previo de la información clínica o demográfica disponible del paciente (que pudiera haber sido de utilidad en la interpretación de los resultados, aunque no necesariamente).

5.8. CONTROL DE ERRORES Y SESGOS

Se usó la herramienta QUADAS como guía para implementar criterios de valoración y control de sesgos y así incrementar la calidad metodológica en el estudio de evaluación de la prueba RPA (22,23).

Los sesgos que se buscaron controlar son los siguientes:

- a. Sesgo de composición del espectro de pacientes: Se procuró representar el espectro completo de la enfermedad en la muestra seleccionada para que fuera representativa de los pacientes que recibieron la prueba diagnóstica evaluada (RPA) en la práctica clínica. Los sujetos se reclutaron uno por uno en el estudio, en la medida que consultaban por lesiones en piel sospechosas de LC (úlceras, placas, nódulos) en los servicios de salud de los diversos municipios incluidos en la investigación, una vez se verificó el cumplimiento de los criterios de inclusión de los pacientes y se obtuvo el consentimiento informado, estos pacientes se ingresaban en el estudio.
- b. Sesgo de progresión de la enfermedad: Al ser este un estudio transversal en el que ambas pruebas (evaluada y de referencia) se realizaron simultáneamente, el período transcurrido entre la aplicación de la prueba diagnóstica RPA y el examen directo, fue lo suficientemente corto como para que fuera razonable asumir que el problema en estudio (LC) no evolucionó en ese período, por lo tanto, no hubo ningún efecto en la estimación del rendimiento diagnóstico de la prueba a evaluar.
- c. Sesgo de verificación diagnóstica parcial o sesgo de referencia: Para controlar este sesgo, se verificó el diagnóstico de LC usando la prueba de referencia (examen directo) en toda la muestra del estudio. La aplicación de la prueba de referencia fue independiente del resultado de la prueba a evaluar (RPA), así se evitó sobreestimar la sensibilidad e infraestimar la especificidad.
- d. Sesgo de incorporación: Se evitó ya que la prueba diagnóstica de referencia (examen directo) y la prueba a evaluar (RPA) eran independientes entre sí,

es decir, la prueba de referencia no incluyó, total o parcialmente, los resultados de la prueba evaluada. El resultado de la prueba evaluada no formó parte de los criterios de definición del diagnóstico final, evitándose así sobreestimar la sensibilidad y especificidad.

- e. Sesgo de revisión de la prueba a evaluar: Este sesgo no se pudo evitar ya que la prueba a evaluar (RPA) no se pudo interpretar sin conocer los resultados de la prueba de referencia (examen directo). No se pudo garantizar que, en los laboratorios diagnósticos de las diferentes regiones geográficas incluidas en el estudio, se pudiera disponer de personal diferente que realizara e interpretara la RPA independientemente del examen directo. No se pudo enmascarar la interpretación de las dos pruebas diagnósticas para evitar una sobrestimación del rendimiento diagnóstico; pero, considero que teniendo la prueba a evaluar un menor componente subjetivo que la prueba de referencia, la probabilidad de ocurrencia de este sesgo se redujo considerablemente.
- f. Sesgo de revisión de la prueba de referencia: El proceso de evaluación en el centro de referencia tuvo un cegamiento natural, las pruebas diagnósticas a la misma muestra se corrieron simultáneamente y bajo un proceso de codificación, esto permitió no incurrir en este sesgo.
- g. Sesgo de revisión clínica: La persona que realizó e interpretó las pruebas diagnósticas, evitó emplear como norma general, la información clínica o demográfica que pudiera estar disponible cuando se aplicó la prueba diagnóstica; debido a que la prueba de referencia (examen directo) no es totalmente objetiva, se hizo énfasis en evitar este sesgo para no tener una sobrestimación del rendimiento diagnóstico.
- h. Sesgo por variabilidad en la interpretación de resultados: Este sesgo se controló haciendo doble lectura del diagnóstico a cada una de las muestras a través del PECET como centro de referencia y el lugar de evaluación de la prueba diagnóstica, así se pudo evitar infraestimar la sensibilidad y la especificidad.
- i. Sesgo de la prueba de referencia imperfecta: Como prueba de referencia se utilizó el examen directo (frotis o extendido) con sus inconvenientes de baja sensibilidad en campo debido a su dependencia del operador, este sesgo se controló a través del modelo de pruebas imperfectas, la condición de enfermedad en los pacientes se verificó a través de la evaluación de las características clínicas de los pacientes.

5.9. TÉCNICAS DE PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE LOS DATOS

a. Técnicas de procesamiento

Definición de la población de estudio que se incluyó en el análisis

Se incluyeron en el análisis todas las muestras que se evaluaron a través de los métodos diagnósticos directo, RPA y PCR convencional.

Base de datos en Excel

Los datos se registraron por medio del formato diseñado para la recolección de la información de los pacientes, en los diferentes centros de salud donde se evaluó la prueba diagnóstica, fueron consignados en una base de datos creada en Excel, para posteriormente ser importados desde la herramienta de análisis estadístico STATA versión 14, desde la cual se prepararon los datos y/o variables para los diferentes análisis estadísticos.

Codificación de las variables

Las variables dicotómicas fueron codificadas como 0 y 1, donde 0 hizo referencia a la ausencia del evento o característica de interés y 1 a la presencia de este.

Las variables politómicas fueron codificadas a partir de 1 hasta el número de nominaciones que tuviera la variable.

En algunas ocasiones fue necesario categorizar y recodificar algunas variables, para optimizar los análisis estadísticos.

En los diferentes tipos de análisis estadístico (univariado, bivariado y multivariado), los resultados se tabularon y se presentaron por medio de tablas, gráficos.

b. Análisis estadístico

Análisis basal de los pacientes

Se realizó el análisis de las características basales, donde se compararon características sociodemográficas (sexo, edad, raza, ocupación), características relacionadas con la infección (antecedentes de leishmaniasis, tiempo de evolución de la lesión, tipo de lesión, lugar donde adquirió la infección) de los participantes.

La descripción basal se realizó a través del cálculo de las principales medidas de frecuencia como fueron proporciones y medidas descriptivas como media, mediana, desviación estándar, rango intercuartil. Los resultados se presentaron en tablas.

El análisis estadístico se realizó con la utilización del programa informático STATA versión 14 de licencia personal.

Análisis del rendimiento diagnóstico

Los resultados se presentaron en una tabla de contingencia 2x2. Se calcularon:

- a. Sensibilidad y Especificidad
- b. VPP; VPN (sus cálculos dependen de la prevalencia)
- c. Cocientes de probabilidades (CP) o razón de verosimilitudes (likelihood ratio)

$$CP(+)=\frac{S}{(1-E)} \text{ o LR+}$$

$$CP(-)=\frac{1-S}{(E)} \text{ o LR-}$$

Los CP no varían con la prevalencia.

Para todos los cálculos se reportaron sus respectivos intervalos de confianza al 95%

Corrección de la sensibilidad y especificidad por Estándar de Referencia imperfecto

Dado que se usó un estándar de referencia imperfecto como si fuera un Gold Standard para evaluar el rendimiento diagnóstico de la prueba RPA, la precisión diagnóstica del nuevo test pudo ser tanto subestimada como sobreestimada., produciendo un sesgo de tipo “sesgo de estándar de referencia imperfecto” (24). Para enfrentar este sesgo se procedió a corregir los valores de sensibilidad y especificidad de la prueba diagnóstica RPA, a través del método de Corrección de un único Test diagnóstico (RPA) vs un Gold Standard imperfecto (Examen directo) en una única población:

Suponiendo que se conocen dos parámetros, podemos encontrar (maximum likelihood) estimaciones ML (*MLEs*) de los tres parámetros restantes (24); para este propósito, se consideró el siguiente caso:

1. La sensibilidad (70%) y la especificidad (70%) del estándar de referencia imperfecto (examen directo) son conocidas, entonces, la *MLEs* de la sensibilidad y especificidad de la RPA será:

$$Se(T) = \frac{Sp(R)(a + b) - b}{NSp(R) - (b + d)} ; \quad Sp(T) = \frac{Se(R)(c + d) - c}{NSE(R) - (a + c)}$$

Imperfect Reference Standard (R), New Diagnostic Test (T) and Total population(N)

Área bajo la Curva ROC

Se evaluó la capacidad de discriminación de la prueba diagnóstica RPA, comparando el área bajo la curva de la prueba diagnóstica según tiempo de evolución de la lesión.

Evaluación de la concordancia inter-observador (índice Kappa de Cohen)

Se usaron tablas de 2x2 donde se clasificaron los hallazgos de cada uno de los dos centros: centro de referencia y centro de evaluación; se calculó la proporción total de concordancia observada y la proporción de concordancia esperada por azar (a partir de los valores marginales de la tabla de contingencia), También se analizó la concordancia por la variable tiempo de evolución de la lesión “≤ 90 días y ≥ 91 días”.

Análisis de supervivencia

Se estableció una curva de supervivencia considerando como variable tiempo, el tiempo de evolución de la lesión (días) y como falla, la pérdida de sensibilidad de la prueba diagnóstica RPA en el Centro de evaluación, es decir, obtener un falso negativo (FN) (Censura es el resultado positivo = 1); también se evaluó la curva según el tipo de lesión (úlceras y otros tipos) y se compararon las dos curvas de supervivencia a través del Test de log-rank y Wilcoxon.

Se estableció otra curva de supervivencia considerando como variable tiempo, el tiempo de evolución de la lesión (días) y como falla, la pérdida de especificidad de la prueba diagnóstica RPA en el Centro de Evaluación, es decir, obtener un falso positivo (FP) (Censura es el resultado positivo = 1); también se evaluó la curva según el tipo de lesión (úlceras y otros tipos) y se compararon las dos curvas de supervivencia a través del Test de log-rank y Wilcoxon.

Las hipótesis que se contrastaron fueron las siguientes:

Comparación de las curvas de Supervivencia

Pérdida de sensibilidad de la RPA en el Centro de Evaluación según tipo de lesión (úlceras y otros tipos).

H₀: La curva de supervivencia “pérdida de sensibilidad de la RPA para las lesiones tipo úlcera” vs “pérdida de sensibilidad de la RPA para las lesiones de otros tipos” presentan *igual supervivencia global*, es decir, no hay diferencias persistentes.

H₁: La curva de supervivencia “pérdida de sensibilidad de la RPA para las lesiones tipo úlcera” vs “pérdida de sensibilidad de la RPA para las lesiones de otros tipos” presentan diferente supervivencia global, es decir, existen diferencias persistentes.

Las Pruebas estadísticas de contraste de hipótesis que se usaron fueron el test de log-rank y el test de Wilcoxon.

Exploración de factores asociados a la presencia de leishmaniasis según el diagnóstico obtenido por la RPA

Se identificaron las variables clínicas y demográficas asociadas a la presencia de la leishmaniasis (que se tomaron como variables independientes) por medio de tablas de contingencia usando la prueba Chi-cuadrado de independencia; además se calcularon medidas de asociación como fueron las tasas de incidencia y sus respectivos intervalos de confianza (95%).

Se utilizó un modelo de regresión logística (RLog) binaria para explicar las variaciones en los resultados diagnósticos de la RPA según variables clínicas explicativas como antecedentes de leishmaniasis, tiempo de evolución de la lesión, tipo de lesión, tiempo de experiencia en toma y lectura de muestras clínicas para diagnóstico de LC (significación estadística $p < 0.05$ e intervalos de confianza al 95%).

Aproximación al análisis de costo-efectividad

Existen diferentes formas de efectuar un análisis económico: costo-beneficio, costo-utilidad, costo-efectividad. En este estudio se realizó una aproximación a un análisis de costo-efectividad, ya que el objetivo fue evaluar cuál de las dos estrategias diagnósticas (RPA o examen parasitológico directo) resultó ser más costo-efectiva. De cada técnica evaluada se obtuvo el costo y la efectividad netos (expresados en su sensibilidad y su especificidad). La efectividad se entendió como un aumento de la sensibilidad y la especificidad de la prueba RPA con respecto al examen directo.

Para efectuar el análisis de costo-efectividad se compararon las técnicas diagnósticas en función de su costo. Se analizó la costo-efectividad incremental entre las dos técnicas incluidas en el estudio con el fin de evidenciar en alguna de las técnicas (25):

1. Dominancia fuerte: técnica con menor costo y mayor efectividad; o con menor efectividad y menor costo.
2. Dominancia débil: técnica con mayor efectividad, pero igual costo; igual efectividad y mayor costo; menor efectividad e igual costo; menor costo e igual efectividad.

3. Dominancia extendida: técnica con mayor costo y mayor efectividad, pero menor tasa de costo efectividad incremental.

Categorías de los costos más relevantes para el estudio que fueron considerados:
Costos directos: Se corresponden con los costos unitarios de las pruebas diagnósticas (RPA y examen directo) empleadas durante el tiempo de duración del estudio.

Costos relacionados con las pruebas de apoyo al diagnóstico tradicional : se incluyeron los costos del Cultivo y PCR convencional utilizadas cuando el resultado del examen directo fue negativo y los datos clínicos del paciente fueron muy sugestivos de LC; y los costos secundarios a las posibles complicaciones de las pruebas diagnósticas como fue el costo de un “falso negativo” (costo por día de hospitalización de un paciente con LM, costo de una cirugía estética de reconstrucción, por ejemplo).

Los costos se expresaron en pesos colombianos; la fuente de información de los costos de las pruebas diagnósticas y costos relacionados fueron algunas fuentes locales pertenecientes a centros de costos de prestadores privados o públicos (costo unitario de las pruebas diagnósticas) como el PECET de la U de A.

No se midieron costos indirectos como pérdidas de días de trabajo por hospitalización del paciente, gastos o pérdidas económicos de la familia por atención del paciente, no se aplicó tasa de descuento a los costos, ni a los efectos.

Parámetros evaluados para la efectividad de las pruebas diagnóstica de LC:

Para este análisis el indicador de efectividad elegido que sirvió de base comparativa en el análisis de costo-efectividad se expresó en términos de: la diferencia en la sensibilidad y la diferencia en la especificidad.

Con estos elementos técnicos (efectividad diagnóstica) y económicos (costos directos de las pruebas diagnósticas y de apoyo al diagnóstico), se realizó una aproximación a la evaluación económica de la prueba diagnóstica mediante un modelo de costo efectividad.

De esta manera, se estableció una relación o razón en la que el numerador tuvo en cuenta los costos directos de las pruebas diagnósticas y los costos relacionados con las pruebas de apoyo diagnóstico; mientras que el denominador se refirió a la efectividad de las pruebas diagnósticas expresada en términos de la diferencia entre la sensibilidad y especificidad.

La relación entre las dos pruebas diagnósticas se estableció utilizando el análisis costo-efectividad incremental (ACEI) o razón marginal o incremental.

El ACEI o Razón marginal se obtuvo dividiendo el incremento de los costos de las 2 alternativas de diagnóstico por el de los efectos en términos de sensibilidad y

especificidad, de las mismas 2 opciones de diagnóstico, y fueron expresados como costo de una opción diagnóstica por unidad de efectividad adicional con respecto a la otra alternativa diagnóstica. Permitirá saber si la RPA resulta razonable o no en términos de costos.

$$\text{Razón marginal} = \frac{(\text{Costos RPA} - \text{Costos examen directo})}{(\text{Sensibilidad RPA} - \text{Sensibilidad examen directo})}$$

$$\text{Razón marginal} = \frac{(\text{Costos RPA} - \text{Costos examen directo})}{(\text{Especificidad RPA} - \text{Especificidad examen directo})}$$

6. CONSIDERACIONES ETICAS - PROTECCIÓN A LOS PACIENTES

Siendo este un estudio descriptivo que no involucró ningún procedimiento diferente a la toma de muestras tradicional para diagnóstico de LC mediante el examen parasitológico directo, la investigación se clasifica como investigación *sin riesgo*.

Para la autorización de uso de muestras biológicas con fines de investigación, se diseñó un formato el cual fue firmado por el paciente o su acudiente en el caso que fuera un menor de edad.

Todos los pacientes incluidos en el estudio firmaron la autorización para el uso de las muestras biológicas con fines de investigación, después de leer el documento y expresar y resolver sus inquietudes, se enfatizó en la voluntariedad de su autorización, la posibilidad de no permitir que sus muestras fueran utilizadas con fines de investigación a parte del diagnóstico de LC sin que esto les ocasionara represalias o les impidiera acceder al diagnóstico estándar y tratamiento, así como en la confidencialidad de los datos, la cual se les garantizaría a través del instrumento diseñado para la recolección de los mismos, instrumento en el cual se consignaría la información necesaria requerida para alcanzar los objetivos de este estudio e información clave que permitiría identificar al paciente a través de un código y no a través de su nombre y apellidos. El protocolo se sometió a aprobación por el Comité Institucional de Ética de la Universidad CES y por el comité de bioética para investigación en humanos de la Sede de Investigación Universitaria (CBEIH-SIU) de la Universidad de Antioquia. El estudio se rigió por la guía normalizada de buenas prácticas clínicas (TDR/WHO) y los lineamientos de la resolución 8430 de 1993, emanada del Ministerio de la Protección Social, por la cual se establecieron las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud en Colombia.

Los beneficios directos de este estudio para todos los sujetos de investigación incluyeron, un diagnóstico completo parasitológico, acceso a los profesionales médicos quienes completaron la historia clínica, realizaron el examen físico y dermatológico y lo más importante, la oportunidad en el diagnóstico que les permitió acceder al tratamiento de forma inmediata. El paciente recibió el tratamiento de la forma convencional, es decir, basado en el resultado del examen directo en campo, que es la prueba diagnóstica por excelencia que se utiliza en los centros de salud y con la cual se asigna el tratamiento respectivo. Este estudio no implicó ningún riesgo adicional al propio de la toma de muestra para cualquier proceso diagnóstico en LC (dolor en el lugar de la toma de la muestra clínica).

Los procedimientos de recolección de datos para la investigación fueron efectuados por personas calificadas y competentes desde el punto de vista científico. En todo momento de la investigación se tomaron las medidas necesarias para respetar la confidencialidad del paciente (Ver Anexo 3. Autorización para el uso de las muestras biológicas con fines de investigación).

7. RESULTADOS

7.1. DESCRIPCIÓN SOCIODEMOGRÁFICA Y CLÍNICA DE LOS PACIENTES CON SOSPECHA DE LEISHMANIASIS CUTÁNEA ATENDIDOS EN LOS DIFERENTES CENTROS DE SALUD DE SUS RESPECTIVOS MUNICIPIOS

Características basales de los pacientes en el estudio

Este estudio incluyó 128 pacientes con sospecha clínica de LC, los cuales fueron reclutados en los departamentos de Antioquia (52,34%), Boyacá (22,67%), Tolima (12,5%), Sucre (10,16%), Chocó (1,56%) y Caldas (0,78%). De los 128 casos sugestivos de LC, 44 (34,38%) fueron mujeres y 84 (65,63%) fueron hombres. Los pacientes se encontraban en un rango de edad comprendido entre 3 y 89 años; el promedio de edad en las mujeres fue de $29,02 \pm 18,54$ (SD) y en los hombres fue $36,76 \pm 23,02$ (SD). El 90,91% de las mujeres y el 90,36% de los hombres no tenían antecedentes de LC al momento de ingresar en el estudio; un alto porcentaje de mujeres (90%) y hombres (86,08%) tenía igual o menos de 90 días de evolución de las lesiones; el 90,70% de las mujeres y el 86,59% de los hombres tenían lesiones del tipo úlcera (Tabla 1).

El Urabá Antioqueño, representó el sitio geográfico del territorio nacional, donde más reportaron los pacientes que habían adquirido la infección (35,25%), seguido por el Occidente de Boyacá (16,39%) y La provincia de Ibagué en el departamento del Tolima (7,38%) (Tabla 1).

Tabla 1. Características basales de los participantes en el estudio.

	Femenino	Masculino
Sexo		
frecuencia (%)	44 (34,38)	84 (65,63)
Edad		
media (desviación estándar)	29,02 (18,54)	36,76 (23,02)
mediana (rango intercuartílico)	27,5 (13 - 47,5)	33,5 (20 - 53)
Raza		
% blanca	18,18	10,98
% indígena	11,36	6,10
% mestiza	65,91	74,39
% negra	4,55	8,54
Antecedentes de LC		
si (%)	9,09	9,64
no (%)	90,91	90,36
Tiempo de evolución de la lesión (%)		
≤ 90 días	90,00	86,08
91-180 días	7,50	6,33
≥ 181 días	2,50	7,59
Tipo de Lesión (%)		
úlceras	90,70	86,59
placa	4,65	8,54
nódulo	4,65	2,44
úlceras/placa	0,00	1,22
placa/nódulo	0,00	1,22
Ocupación (%)		
ama de casa	50,00	1,25
agricultor	0,00	37,50
estudiante	30,00	17,5
oficios varios	12,50	30
ninguna	5,00	6,25
pensionado(a)	0,00	3,75
minero(a)	2,50	2,50
militar	0,00	1,25

Lugar donde adquirió la infección	Porcentaje pacientes (%)
Urabá, Antioquia	35,25
Occidente, Boyacá	16,39
La provincia de Ibagué, Tolima	7,38
Norte, Chocó	6,56
Montes de María, Sucre	5,74
Norte, Tolima	4,10
Magdalena Medio, Boyacá	3,28
Noreste, Antioquia	2,46
Occidente, Antioquia	2,46
Oriente, Antioquia	2,46
Norte, Cauca	1,64
Bajo Cauca, Antioquia	0,82
Magdalena Medio, Antioquia	0,82
Magdalena Medio, Caldas	0,82
Margarita, Bolívar	0,82
Medio Baudó, Chocó	0,82
Noroeste, Chocó	0,82
Norte, Antioquia	0,82
Norte, Boyacá	0,82
Norte, Guaviare	0,82
Oriente, Tolima	0,82
Provincia de Gualivá, Cundinamarca	0,82
Provincia de Sumapaz, Cundinamarca	0,82
Subregión de la Sabana, Sucre	0,82
Suroeste, Antioquia	0,82
Venezuela	0,82
Sitio del estudio	
Apartadó, Antioquia	43,75
Otanche, Boyacá	10,16
Ovejas, Sucre	10,16
Anorí, Antioquia	8,59
Rovira, Tolima	8,59
San Pablo de Borbur, Boyacá	6,25
Falán, Tolima	3,91
Pauna, Boyacá	3,13
Quipama, Boyacá	3,13
Capurganá, Chocó	1,56
Victoria, Caldas	0,78

7.2. RESULTADOS DE LA PRUEBA DIAGNÓSTICA RPA, PCR CONVENCIONAL Y EXAMEN DIRECTO EN LOS CENTROS DE EVALUACIÓN Y EN EL CENTRO DE REFERENCIA

Para la prueba diagnóstica RPA realizada en los centros de evaluación, se observó un 68.75% (88 de 128) de casos positivos de LC y un 31.25% (40 de 128) de casos negativos de LC. Adicionalmente, la misma prueba diagnóstica (RPA) realizada en el centro de referencia evidenció un 54.69% (70 de 128) de casos positivos de LC y un 45.31% (58 de 128) de casos negativos de LC. La PCR convencional realizada en el centro de referencia arrojó un 58.59% (75 de 128) de casos positivos de LC y un 41.41% (53 de 128) de casos negativos de LC; finalmente la positividad para el Examen directo realizado en los centros de evaluación fue de un 65.35% (83 de 127) y un 34.65% (44 de 127) de casos negativos de LC; mientras que la positividad para el Examen directo en el centro de referencia fue de 66.93% (85 de 127) y un 33.07% (42 de 127) de casos negativos para LC. Se omitió un (1) valor perdido (missing value) de los cálculos y análisis estadísticos para los resultados de la prueba diagnóstica Examen directo.

Ocho pacientes fueron positivos para el examen directo microscópico, 12 pacientes fueron positivos para la RPA, y 75 pacientes fueron positivos por los dos métodos diagnósticos (Figura 6).

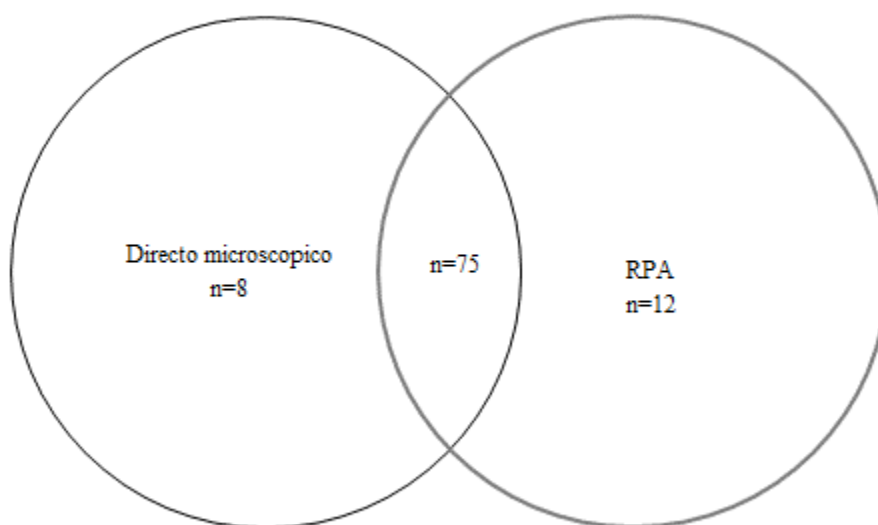


Figura 6. Diagrama de venn para la distribución de los resultados positivos de las pruebas diagnósticas en los centros de evaluación.

El análisis de positividad para el examen directo, la PCR convencional y la RPA en pacientes con sospecha de LC, mostró que 8, 6 y 6 pacientes respectivamente fueron positivos para cada uno de los métodos diagnósticos respectivamente, y 52 pacientes fueron positivos para los tres métodos (Figura 7).

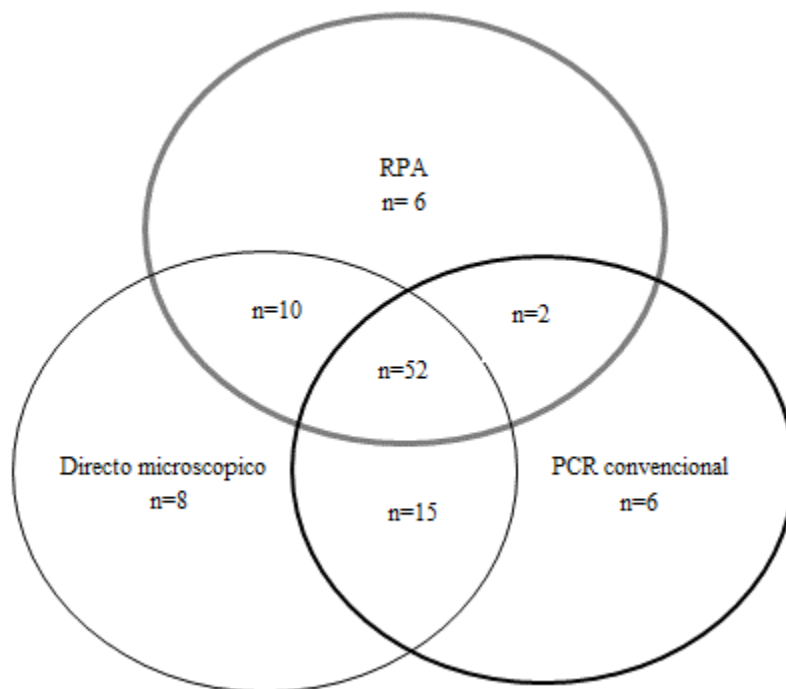


Figura 7. Diagrama de venn mostrando la distribución de los resultados positivos de las pruebas diagnósticas en el centro de referencia.

7.3. ANÁLISIS DEL RENDIMIENTO DIAGNÓSTICO DE LA PRUEBA DE AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA DE ADN MEDIANTE RECOMBINASA Y POLIMERASA (RPA) FRENTE A LA TÉCNICA CONVENCIONAL DE DIAGNÓSTICO: EXAMEN DIRECTO (FROTIS O EXTENDIDO)

Se calcularon las diferentes medidas de rendimiento diagnóstico para la prueba RPA evaluada frente al examen directo (Tabla 2).

Los valores de sensibilidad y especificidad para la RPA frente al examen directo, ambos realizados en los centros de evaluación fueron 90,4% (95% CI 81,9 – 95,7) y 72,7% (95% CI 57,2 – 85,0) respectivamente; 72,9% (95% CI 62,2 – 82,0) y 83,3% (95% CI 68,6 – 93,0) para la RPA y el examen directo ambos realizados en el centro de referencia; 72,0 (95% CI 60,4 – 81,8) y 69,8 (95% CI 55,7 – 81,7) para la RPA y la PCR convencional realizadas en el centro de referencia

respectivamente. Las demás medidas de rendimiento diagnóstico se pueden ver en la tabla 2.

Tabla 2. Rendimiento diagnóstico de la prueba “RPA” frente a la técnica convencional “Examen directo” (frotis o extendido).

Test		No. muestras		% muestras		Sensibilidad % (IC 95%)	Especificidad % (IC 95%)	VPP % (IC 95%)	VPN % (IC 95%)	LR+ (IC 95%)	LR- (IC 95%)	Prevalencia	Índice de Youden	Área ROC (IC 95%)
		Total Enfermos	Total Sanos	Total Enfermos	Total Sanos									
Centro de Evaluación														
RPA ¹	datos sin ajustar	83	44	65,4	34,6	90,4 (81,9 - 95,7)	72,7 (57,2 - 85,0)	86,2 (77,1 - 92,7)	80,0 (64,4 - 90,9)	3,31 (2,03 - 5,40)	0,13 (0,07 - 0,26)	65,35 (56,68 - 74,02)	0,63 (0,48 - 0,78)	0,82 (0,74 - 0,89)
	datos ajustados†					100,0 (99,40 - 100,0*)	100,0 (98,86 - 100,0*)	100,0 (99,40 - 100,0*)	100,0 (98,86 - 100,0*)	· (0,0 - 0,98)	65,35 (56,68 - 74,02)	1,0 (1,0 - 1,0)	100,0 (99,61 - 100,0*)	
Centro de Referencia														
RPA ²	datos sin ajustar	85	42	66,9	33,1	72,9 (62,2 - 82,0)	83,3 (68,6 - 93,0)	89,9 (80,2 - 95,8)	60,3 (46,6 - 73,0)	4,38 (2,20 - 8,71)	0,32 (0,22 - 0,47)	66,9 (58,0 - 75,0)	0,56 (0,42 - 0,71)	0,78 (0,71 - 0,86)
	datos ajustados†					88,24 (80,80 - 95,67)	100,0 (98,81 - 100,0*)	100,0 (99,33 - 100,0*)	80,77 (69,10 - 92,44)	· (0,07 - 0,21)	66,9 (58,0 - 75,0)	0,88 (0,81 - 0,95)	92,13 (87,05 - 97,20)	
RPA ³	datos sin ajustar	75	53	58,6	41,4	72,0 (60,4 - 81,8)	69,8 (55,7 - 81,7)	77,1 (65,6 - 86,3)	63,8 (50,1 - 76,0)	2,38 (1,55 - 3,68)	0,4 (0,27 - 0,60)	58,6 (49,6 - 67,2)	0,42 (0,26 - 0,58)	0,71 (0,63 - 0,79)
PCR Convencional ⁴	datos sin ajustar	85	42	66,9	33,1	78,8 (68,6 - 86,9)	81,0 (65,9 - 91,4)	89,3 (80,1 - 95,3)	65,4 (50,9 - 78,0)	4,14 (2,20 - 7,79)	0,26 (0,17 - 0,40)	66,9 (58,0 - 75,0)	0,60 (0,45 - 0,74)	0,80 (0,72 - 0,87)
	datos ajustados†					95,29 (90,20 - 100,0*)	100 (98,81 - 100,0*)	100 (99,38 - 100,0*)	91,30 (82,07 - 100,0*)	· (0,02 - 0,12)	66,9 (58,0 - 75,0)	0,95 (0,91 - 1,0*)	96,85 (93,42 - 100,0*)	
Todo		49	26	65,3	34,7									
									Índice Kappa (± EE) Valor p					
Concordancia para la RPA entre el Centro de Evaluación y el Centro de Referencia									0,547 (0,085) 0,000					
Concordancia para el Examen directo entre el Centro de Evaluación y el Centro de Referencia									0,859 (0,089) 0,000					

* One-sided, 97,5% intervalo de confianza

† datos ajustados por prueba de referencia imperfecta; ± Error estándar

RPA = Amplificación isotérmica de DNA mediante recombinasa y polimerasa; PCR = Reacción en cadena de la polimerasa

VPP = Valor predictivo positivo; VPN = Valor predictivo negativo; LR = likelihood ratio; ± Error estándar

¹ RPA en el Centro de Evaluación vs Examen directo en el Centro de Evaluación

² RPA en el Centro de Referencia vs Examen directo en el Centro de Referencia

³ RPA en el Centro de Referencia vs PCR convencional en el Centro de Referencia

⁴ PCR Convencional en el Centro de Referencia vs Examen directo en el Centro de Referencia

Corrección de la sensibilidad y especificidad por Estándar de Referencia imperfecto

Dado que la precisión diagnóstica de la RPA pudo ser tanto subestimada como sobreestimada a causa del “sesgo de estándar de referencia imperfecto”, que se produce cuando en la evaluación de una prueba diagnóstica, se usa como referencia una prueba imperfecta como es el examen directo, frotis o extendido (muy dependiente del operador), se procedió a realizar la corrección de los parámetros de sensibilidad y especificidad de la RPA y de la PCR convencional mediante el Método de Corrección de un único Test diagnóstico vs un Gold Standard imperfecto en una única población. El procedimiento de corrección se muestra en las Figuras 8, 9 y 10.

Partiendo de un valor de sensibilidad del 70% y una especificidad del 70% para el estándar de referencia imperfecto (examen directo), valores establecidos por consenso entre expertos y soportados por la literatura publicada, entonces, las estimaciones de máxima verosimilitud (*MLEs*) de la sensibilidad y especificidad de la RPA serán:

$$Se(T) = \frac{Sp(R)(a + b) - b}{NSp(R) - (b + d)} ; \quad Sp(T) = \frac{Se(R)(c + d) - c}{NSe(R) - (a + c)}$$

Imperfect Reference Standard (R), New Diagnostic Test (T) and Total population(N)

Como se puede apreciar los valores corregidos por estándar de referencia imperfecto, para la sensibilidad y la especificidad, superan el 100%, lo que significa que el valor real de la sensibilidad y la especificidad de la RPA realizada en los centros de evaluación de los diferentes municipios, es de un 100% y lo mismo aplica para el valor de la especificidad 100%. Sin embargo, es importante tener en cuenta qué dado el elevado componente de interpretación subjetiva del examen directo, una posible falta de enmascaramiento en la interpretación del examen directo, con previo conocimiento del resultado de la RPA; sobrestimaría el índice de rendimiento global en un 30% (Relative Diagnostic Odds Ratio (RDOR) 1.3; 95% CI, 1.0 – 1.9) (26) (Figura 8).

Tabla 2x2		Gold Standard (R)			
		Positivo	Negativo		
Test (T)	Positivo	75	12		
	Negativo	8	32		
		83	44	127	
		Corregido		Sin Corregir	
Sen(Ref)=	70,0%	Sen(T)	108,9%	Sen(T)=	90,4%
Esp(Ref)=	70,0%	Esp(T)	339,0%	Esp(T)=	72,7%
Prevalencia	65,4%				

Figura 8. RPA en el centro de evaluación vs examen directo en el centro de evaluación

El valor corregido por estándar de referencia imperfecto, para la especificidad de la RPA, supera el 100%, lo que significa que el valor real de la especificidad para la RPA evaluada en el centro de referencia es de un 100% (Figura 9).

Tabla 2x2		Gold Standard (R)			
		Positivo	Negativo		
Test (T)	Positivo	62	7		
	Negativo	23	35		
		85	42	127	
		Corregido		Sin Corregir	
Sen(Ref)=	70,0%	Sen(T)	88,1%	Sen(T)=	72,9%
Esp(Ref)=	70,0%	Esp(T)	451,3%	Esp(T)=	83,3%
Prevalencia	66,9%				

Figura 9. RPA en el centro de referencia vs examen directo en el centro de referencia

El valor corregido por estándar de referencia imperfecto, para la especificidad de la PCR convencional evaluada en el centro de referencia supera el 100%, por lo tanto, su valor real es de una especificidad de 100% (Figura 10).

Tabla 2x2		Gold Standard (R)			
		Positivo	Negativo		
Test (T)	Positivo	67	8		
	Negativo	18	34		
		85	42	127	
		Corregido		Sin Corregir	
Sen(Ref)=	70,0%	Sen(T)	94,9%	Sen(T)=	78,8%
Esp(Ref)=	70,0%	Esp(T)	471,8%	Esp(T)=	81,0%
Prevalencia	66,9%				

Figura 10. PCR convencional en el centro de referencia vs examen directo en el centro de referencia

Área bajo la Curva ROC

La capacidad de la nueva prueba diagnóstica RPA de discriminar entre resultados positivos y negativos de LC fue de 0,82 (95% CI 0,74 – 0,89) (Tabla 2).

Se calcularon las áreas bajo la curva ROC de la prueba diagnóstica RPA con sus respectivos intervalos de confianza, teniendo en cuenta la variable tiempo de evolución de la lesión: menor o igual a 90 días y mayor o igual a 91 días. También se calculó el valor p para la prueba de homogeneidad de áreas.

Se puede observar cómo se incrementa la capacidad de la nueva prueba diagnóstica “RPA” de discriminar entre resultados positivos y negativos de LC, cuando los datos se ajustan por estándar de referencia imperfecto, tanto para las lesiones con menos de 90 días, como para las lesiones con más de 91 días de evolución (Tabla 3 y 4).

Tabla 3. Áreas bajo la curva ROC de la RPA (tiempo de evolución de la lesión ≤ 90 días)

Tiempo de evolución de la lesión ≤ 90 días

Test	Área ROC (95% CI)	Área ROC (95% CI)†	Chi ² Valor p*
RPA ¹	0,82 (0,73 - 0,90)	1,0 (0,99 - 1,0)	17,49 0,000
RPA ³	0,76 (0,67 - 0,85)	0,88 (0,81 - 0,94)	9,23 0,002
RPA ⁴	0,71 (0,62 - 0,80)	0,93 (0,88 - 0,99)	22,23 0,00
PCR Convencional ⁵	0,81 (0,73 - 0,89)	0,94 (0,89 - 0,99)	11,20 0,00

¹ RPA en el Centro de Evaluación vs Examen directo en el Centro de Evaluación

³ RPA en el Centro de Referencia vs Examen directo en el Centro de Referencia

⁴ RPA en el Centro de Referencia vs PCR convencional en el Centro de Referencia

⁵ PCR Convencional en el Centro de Referencia vs Examen directo en el Centro de Referencia

† Dato ajustado por prueba de referencia imperfecta

* Prueba de homogeneidad de áreas

Tabla 4. Áreas bajo la curva ROC de la RPA (tiempo de evolución de la lesión ≥ 91 días)

Tiempo de evolución de la lesión ≥ 91 días			
Test	Área ROC (95% CI)	Área ROC (95% CI)†	Chi ² Valor p*
RPA ¹	0,71 (0,45 - 0,97)	1,0 (0,96 - 1,0)	4,77 0,028
RPA ³	0,77 (0,53 - 1,00)	1,0 (0,96 - 1,0)	3,50 0,061
RPA ⁴	0,66 (0,41 - 0,92)	0,87 (0,66 - 1,0)	1,63 0,20
PCR Convencional ⁵	0,79 (0,56 - 1,00)	1,0 (0,96 - 1,0)	3,18 0,07

¹ RPA en el Centro de Evaluación vs Examen directo en el Centro de Evaluación

³ RPA en el Centro de Referencia vs Examen directo en el Centro de Referencia

⁴ RPA en el Centro de Referencia vs PCR convencional en el Centro de Referencia

⁵ PCR Convencional en el Centro de Referencia vs Examen directo en el Centro de Referencia

† Dato ajustado por prueba de referencia imperfecta

* Prueba de homogeneidad de áreas

Concordancia inter-observador de la prueba de amplificación isotérmica de DNA mediante recombinasa y polimerasa (RPA) y el Examen Directo (frotis o extendido)

- Evaluación de la concordancia inter-observador (Índice Kappa)

Este Índice Kappa, corresponde al grado de acuerdo inter-observador, una vez corregido el debido al azar; también se calculó la concordancia inter-observador según la variable tiempo de evolución de la lesión.

a. Concordancia entre Centro de Evaluación y Centro de Referencia para el Examen directo

Se obtuvo una concordancia entre los centros de evaluación y el centro de referencia para el Examen directo del 86% (concordancia excelente) aproximadamente (índice kappa= 0,859) (Tabla 5).

Tabla 5. Porcentaje de acuerdo simple: Resultados examen directo en centro de evaluación y centro de referencia

		Centro de Referencia (Examen directo)		Total
		positivo	negativo	
Centro de Evaluación (Examen directo)	positivo	80	3	83
	negativo	5	39	44
Total		85	42	127

El acuerdo observado es $(80 + 39) / 127 = 93,70\%$

Acuerdo observado	Acuerdo esperado	Kappa	EE*	Estadístico Z	Valor p
93,70%	55,20%	0,859	0,089	9,69	0,000

* EE: error estándar

b. La concordancia entre centro de evaluación y centro de referencia para el examen directo, si el tiempo de evolución de la lesión es ≤ 90 días

Se obtuvo una concordancia entre los centros de evaluación y el centro de referencia para el Examen directo si el tiempo de evolución de la lesión es menor o igual a 90 días, del 86% (concordancia excelente) aproximadamente (índice kappa= 0,862) (Tabla 6).

Tabla 6. Porcentaje de acuerdo simple: Resultados examen directo en centro de evaluación y centro de referencia si el tiempo de evolución de la lesión es ≤ 90 días.

		Centro de Referencia (Examen directo)		Total
		positivo	negativo	
Centro de Evaluación (Examen directo)	positivo	70	2	72
	negativo	4	28	32
Total		74	30	104

El acuerdo observado es $(70 + 28) / 104 = 94,23\%$

Acuerdo observado	Acuerdo esperado	Kappa	EE*	Estadístico Z	Valor p
94,23%	58,14%	0,862	0,098	8,8	0,000

* EE: error estándar

- c. La concordancia entre centro de evaluación y centro de referencia para el examen directo, si el tiempo de evolución de la lesión es ≥ 91 días

Se obtuvo una concordancia entre los centros de evaluación y el centro de referencia para el Examen directo si el tiempo de evolución de la lesión es mayor o igual a 91 días, del 71% (concordancia buena o moderada) aproximadamente (índice kappa= 0,708) (Tabla 7).

Tabla 7. Porcentaje de acuerdo simple: Resultados examen directo (positivo/negativo) según Centro de Evaluación y Centro de Referencia si el tiempo de evolución de la lesión es ≥ 91 días.

		Centro de Referencia (Examen directo)		Total
		positivo	negativo	
Centro de Evaluación (Examen directo)	positivo	5	1	6
	negativo	1	7	8
Total		6	8	14

El acuerdo observado es $(5 + 7) / 14 = 0,8571\%$

Acuerdo observado	Acuerdo esperado	Kappa	EE*	Estadístico Z	Valor p
85,71%	51,02%	0,708	0,267	2,65	0,004

* EE: error estándar

- d. La concordancia entre centro de evaluación y centro de referencia para la RPA

Se obtuvo una concordancia entre los centros de evaluación y el centro de referencia para la RPA del 55% (concordancia aceptable) aproximadamente (índice kappa= 0,547) (Tabla 8).

Tabla 8. Porcentaje de acuerdo simple: Resultados RPA en Centro de Evaluación y Centro de Referencia

		Centro de Referencia (RPA)		Total
		positivo	negativo	
Centro de Evaluación (RPA)	positivo	65	23	88
	negativo	5	35	40
Total		70	58	128

El acuerdo observado es $(65 + 35) / 128 = 78,13\%$

Acuerdo observado	Acuerdo esperado	Kappa	EE*	Estadístico Z	Valor p
78,13%	51,76%	0,547	0,085	6,46	0,000

* EE: error estándar

- e. La concordancia entre centro de evaluación y centro de referencia para la RPA, si el tiempo de evolución de la lesión es ≤ 90 días

Se obtuvo una concordancia entre los centros de evaluación y el centro de referencia para la RPA si el tiempo de evolución de la lesión es menor o igual a 90 días, del 47% (concordancia aceptable) aproximadamente (índice kappa= 0,468) (Tabla 9).

Tabla 9. Porcentaje de acuerdo simple: Resultados RPA en Centro de Evaluación y Centro de Referencia si el tiempo de evolución de la lesión es ≤ 90 días.

		Centro de Referencia (RPA)		Total
		positivo	negativo	
Centro de Evaluación (RPA)	positivo	54	21	75
	negativo	5	24	29
Total		59	45	104

El acuerdo observado es $(54 + 24) / 104 = 75,0\%$

Acuerdo observado	Acuerdo esperado	Kappa	EE*	Estadístico Z	Valor p
75,00%	52,98%	0,468	0,093	5,05	0,000

* EE: error estándar

- f. La concordancia entre centro de evaluación y centro de referencia para la RPA, si el tiempo de evolución de la lesión es ≥ 91 días

Se obtuvo una concordancia entre los centros de evaluación y el centro de referencia para la RPA si el tiempo de evolución de la lesión es mayor o igual a 91 días, del 87% (concordancia excelente) aproximadamente (índice kappa= 0,865) (Tabla 10).

Tabla 10. Porcentaje de acuerdo simple: Resultados RPA en Centro de Evaluación y Centro de Referencia si el tiempo de evolución de la lesión es ≥ 91 días.

		Centro de Referencia (RPA)		Total
		positivo	negativo	
Centro de Evaluación (RPA)	positivo	6	1	7
	negativo	0	8	8
Total		6	9	15

El acuerdo observado es $(6 + 8) / 15 = 93,33\%$

Acuerdo observado	Acuerdo esperado	Kappa	EE*	Estadístico Z	Valor p
93,33%	50,67%	0,865	0,256	3,38	0,0004

* EE: error estándar

7.4. EXPLORACIÓN DE FACTORES ASOCIADOS A LA PRESENCIA DE LC SEGÚN EL DIAGNÓSTICO OBTENIDO POR LA PRUEBA RPA

Se calcularon los resultados de la prueba χ^2 de independencia para las variables consideradas plausibles biológicamente, además de las medidas de asociación y sus respectivos intervalos de confianza (95% CI). Las variables cuyos valores de p están resaltados en negrilla, fueron candidatas para ingresar en el modelo, ya que cumplieron el criterio de Hosmer-Lemeshow ($p < 0,25$), las variables “antecedentes de leishmaniasis (valor $p=0,004$)” y “resultado del examen directo en el centro de evaluación (valor $p=0,000$)”, no cumplieron con el criterio de independencia con respecto al resultado de la RPA en el centro de evaluación, se observaron evidencias estadísticamente significativas de algún grado de asociación entre las variables y el resultado de la RPA. (Tabla 11).

Tabla 11. Prueba de independencia de las variables consideradas plausibles biológicamente

Resultado Test RPA en el C. Evaluación	Pearson Chi ²	Valor P	RP ¹	95% CI	
Sexo	0,25	0,616	1,066	0,827	1,374
Antecedentes de leishmaniasis	8,05	0,004	0,456	0,203	1,024
Tipo de lesión	3,89	0,049	1,539	0,885	2,677
Tiempo de evolución de la lesión	3,96	0,047	1,545	0,888	2,689
Sitio del estudio	0,19	0,660	1,063	0,801	1,412
Lugar donde adquirió la infección	0,03	0,856	0,977	0,765	1,249
Raza	0,84	0,361	0,889	0,700	1,128
Ocupación	2,20	0,138	1,220	0,966	1,541
Tiempo experiencia toma de muestras C. Evaluación	3,59	0,058	1,387	0,922	2,088
Tiempo experiencia lectura de placas C. Evaluación	3,59	0,058	1,387	0,922	2,088
Resultado del examen directo C. Evaluación	53,04	0,0000	3,3130	2,035	5,395

¹ RP: Razón de Prevalencias

Los valores P en negrilla, cumplieron con el Criterio de Hosmer-Lemeshow ($p < 0,25$) por lo tanto, son variables candidatas para ingresar en el modelo de regresión.

Modelo de Regresión Logística (RLog) Binaria.

Se realizó el modelo de regresión logística (RLog) binaria vía método “Backward” de selección de variables. Se determinaron 5 modelos de regresión logística, el modelo inicial contenía todas las variables consideradas plausibles biológicamente, a partir de ese modelo inicial, se fueron eliminando una a una las variables menos significativas (con mayor valor p) (Tabla 12).

Para el modelo inicial (Modelo 1), en total, fueron necesarias 4 interacciones para estimarlo. La función de LR Chi² (4) = 5.17; sig. 0.2707 indica que el modelo no se ajusta mejor que un modelo vacío; aproximadamente el 9,34% (Pseudo R² = 0.0934) de la variación de los resultados de la RPA en el Centro de Evaluación puede ser explicada por la variación de las variables independientes del modelo (Tabla 12).

Tabla 12. Modelos de regresión Logística, Y = resultado “Verdadero Positivo” con la prueba diagnóstica RPA.

Resultado de un VP en la prueba RPA (C. Evaluación)	Modelo 1	Modelo 2	Modelo 3	Modelo 4	Modelo 5
Variable	Odds Ratio Valor p (95% CI)	Odds Ratio Valor p (95% CI)	Odds Ratio Valor p (95% CI)	Odds Ratio Valor p (95% CI)	Odds Ratio Valor p (95% CI)
Tipo de lesión	5,321	2,08			
Úlcera	0,200 (0,414 - 68,458)	0,539 (0,201 - 21,484)			
Tiempo de evolución de la lesión	8,086	5,2	4,75	4,75	3,667
<= 90 días	0,048 (1,018 - 64,235)	0,094 (0,755 - 35,810)	0,107 (0,714 - 31,580)	0,107 (0,714 - 31,580)	0,165 (0,585 - 22,965)
Ocupación	2,218				
agricultor	0,384 (0,369 - 13,332)				
Tiempo experiencia toma de muestras C. Evaluación	3,404	3,467	3,167		
> 1 año	0,199 (0,525 - 22,070)	0,127 (0,702 - 17,114)	0,146 (0,669 - 14,979)		
Tiempo experiencia lectura de placas C. Evaluación	1,000	1,000	1,000	3,167 0,146 (0,669 - 14,979)	
> 1 año					
_cons	0,076 0,216 (0,001 - 4,519)	0,277 0,478 (0,008 - 9,608)	0,632 0,696 (0,063 - 6,308)		2 0,423 (0,366 - 10,919)

Donde la variable dependiente es el resultado “Verdadero Positivo” de la prueba diagnóstica RPA en el Centro de Evaluación (0 “Falso Positivo”; 1 “Verdadero Positivo” de la RPA).

La probabilidad de tener un resultado verdadero positivo con la prueba diagnóstica RPA, se incrementa 8,08 veces con respecto a tener un falso positivo en los pacientes con un tiempo de evolución de sus lesiones menor o igual a 90 días, en comparación con los pacientes con un tiempo de evolución de sus lesiones mayor o igual a los 91 días, permaneciendo el resto de las covariables constantes.

Solo a manera de ilustración, se presenta la interpretación de algunas variables del modelo que no fueron significativas estadísticamente:

- Por cada incremento de 1 año en el tiempo de experiencia en la toma de muestras en el centro de evaluación, la probabilidad de tener un resultado verdadero positivo en la prueba diagnóstica RPA, aumenta 3,4 veces con respecto a tener un falso positivo en el personal con > de 1 año de experiencia en comparación con el personal con < de 1 año de experiencia, permaneciendo el resto de las covariables constantes.
- La probabilidad de tener un resultado verdadero positivo en la prueba diagnóstica RPA, se incrementa 5,32 veces con respecto a tener un falso positivo en los pacientes con lesiones tipo úlcera en comparación con los

pacientes con otros tipos de lesiones, permaneciendo el resto de las covariables constantes.

- La probabilidad de tener un resultado verdadero positivo en la prueba diagnóstica RPA, se incrementa 2,21 veces con respecto a tener un falso positivo en los pacientes cuya ocupación es la agricultura, en comparación con los pacientes con otras actividades ocupacionales, manteniendo el resto de las covariables constantes.

Tabla 13. Modelos de regresión Logística, Y = resultado “Verdadero Negativo” con la prueba diagnóstica RPA.

Resultado de un VN en la prueba RPA (C. Evaluación)	Modelo 1	Modelo 2	Modelo 3
Variable	Odds Ratio Valor p (95% CI)	Odds Ratio Valor p (95% CI)	Odds Ratio Valor p (95% CI)
Tipo de lesión	0,312	0,305	0,429
Úlcera	0,386 (0,022 - 4,341)	0,380 (0,022 - 4,308)	0,475 (0,042 - 4,391)
Tiempo de evolución de la lesión	1,407	1,441	
<= 90 días	0,763 (0,153 - 12,916)	0,747 (0,157 - 13,232)	
Ocupación	1,342		
agricultor	0,815 (0,114 - 15,866)		
Tiempo experiencia toma de muestras C. Evaluación	1,000	1,000	1,000
> 1 año			
Tiempo experiencia lectura de placas C. Evaluación	1,000	1,000	1,000
> 1 año			
_cons	4,287 0,209 (0,443 - 41,461)	4,470 0,190 (0,476 - 41,949)	5,000 0,142 (0,584 - 42,797)

Donde la variable dependiente es el resultado “Verdadero Negativo” de la prueba diagnóstica RPA en el Centro de Evaluación (0 “Falso Negativo”; 1 “Verdadero Negativo” de la RPA) (Tabla 13).

En estos modelos se puede ver que la probabilidad de tener un resultado verdadero negativo con respecto a un falso negativo usando la prueba diagnóstica RPA, no

está influenciada por las variables independientes incluidas en los modelos (Tabla 13).

Curva ROC del modelo de regresión logística

La curva ROC muestra el poder de discriminación del modelo de regresión logística para Y= resultado “Verdadero Positivo” con la RPA; la Figura 11 muestra un área bajo la curva de 0,7255; por lo tanto, se puede concluir que las variables incluidas en el modelo de regresión logística binaria discriminan de manera aceptable entre verdaderos positivos (VP) y falsos positivos (FP) de la prueba diagnóstica RPA, su poder de discriminación es el 73 % del máximo posible.

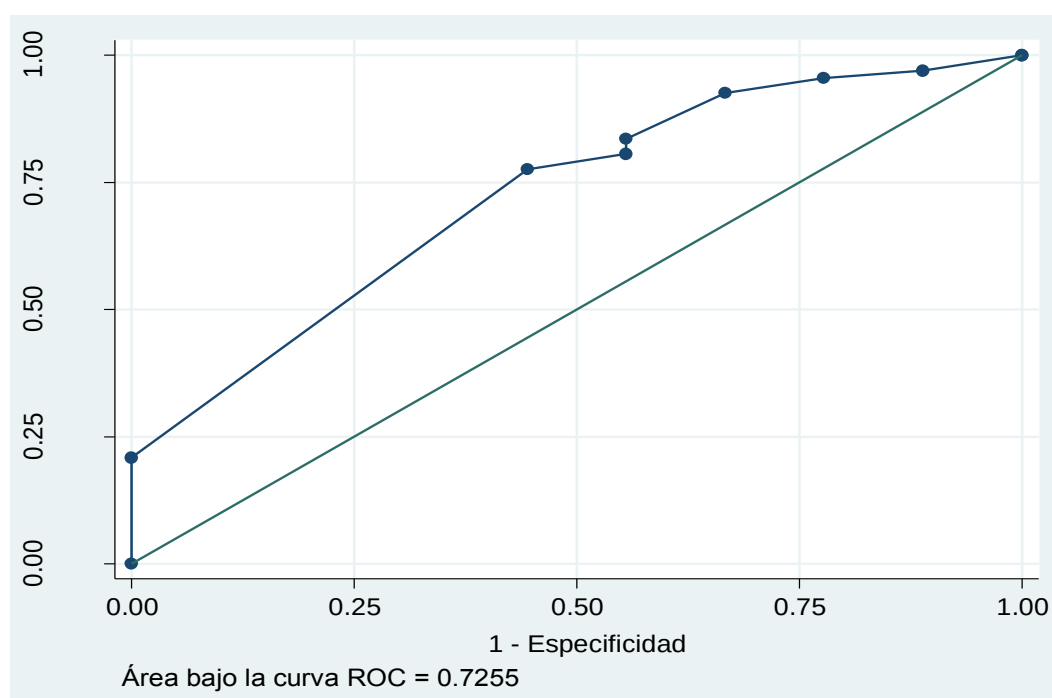


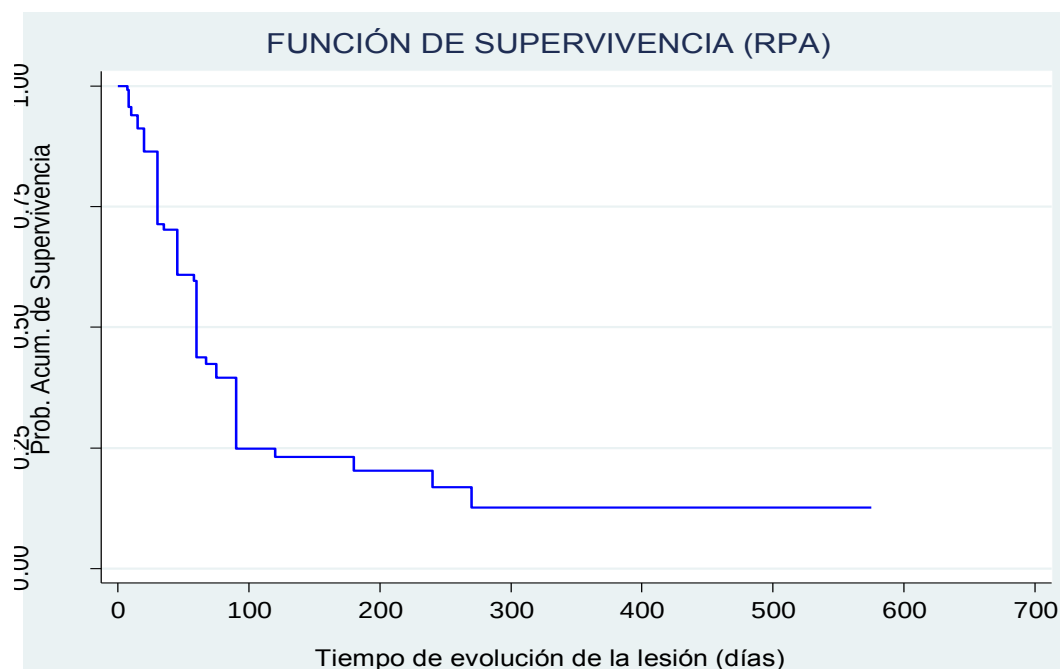
Figura 11. Curva ROC: poder de discriminación de la prueba diagnóstica RPA en el Centro de Evaluación (Modelo de Regresión Logística, Y = resultado “Verdadero Positivo”)

7.5. SUPERVIVENCIA GLOBAL ENTRE LAS PRUEBAS DIAGNÓSTICAS RPA Y EXAMEN DIRECTO EN EL CENTRO DE EVALUACIÓN

Se estableció una curva de supervivencia considerando como variable tiempo, el tiempo de evolución de la lesión (días) y como falla, la pérdida de sensibilidad de la prueba diagnóstica RPA en el Centro de Evaluación, es decir, obtener un falso negativo (FN) (Censura es el resultado positivo = 1) (Figura 12)

Esta curva representa la probabilidad de tener un falso negativo (pérdida de sensibilidad de la RPA) en función de la variable tiempo de evolución de la lesión; en ella se observa como la probabilidad de un FN es más elevada cuanto menos tiempo de evolución tiene la lesión; aproximadamente por debajo de los 90 días de evolución de la lesión, la probabilidad de un FN se va incrementando considerablemente. A partir de los 90 días de evolución de la lesión, la probabilidad de un FN disminuye lentamente, para estabilizarse a partir de los 275 días aproximadamente, es decir, cuando las lesiones se tornan crónicas (Fig. 12).

Figura 12. Función de Supervivencia - RPA (Centro de Evaluación). Pérdida de Sensibilidad (La probabilidad de un FN).

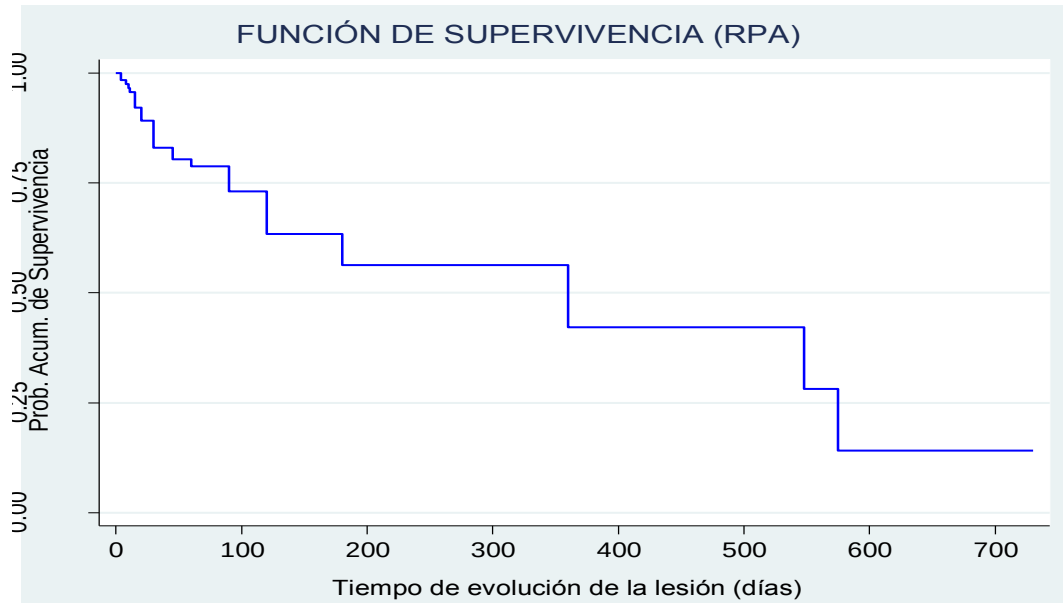


Se estableció otra curva de supervivencia considerando como variable tiempo, el tiempo de evolución de la lesión (días) y como falla, la pérdida de especificidad de la prueba diagnóstica RPA en el Centro de Evaluación, es decir, obtener un falso positivo (FP) (Censura es el resultado positivo = 1) (Figura 13).

Esta curva representa la probabilidad de tener un falso positivo (pérdida de especificidad de la RPA) en función de la variable tiempo de evolución de la lesión; en ella se observa como la probabilidad de un FP es más elevada cuanto menos tiempo de evolución tiene la lesión; aproximadamente por debajo de los 90 días de evolución, la probabilidad de un FP se incrementa de forma acelerada. A diferencia de la curva anterior, en esta gráfica, la probabilidad de un FP para las lesiones con menos de 90 días es mayor que, la probabilidad de un FN para las lesiones con el mismo tiempo de evolución. Esto significa que, para las lesiones en general, la

pérdida de especificidad es mayor que la pérdida de sensibilidad cuando las lesiones tienen menos de 90 días de evolución (Fig. 13).

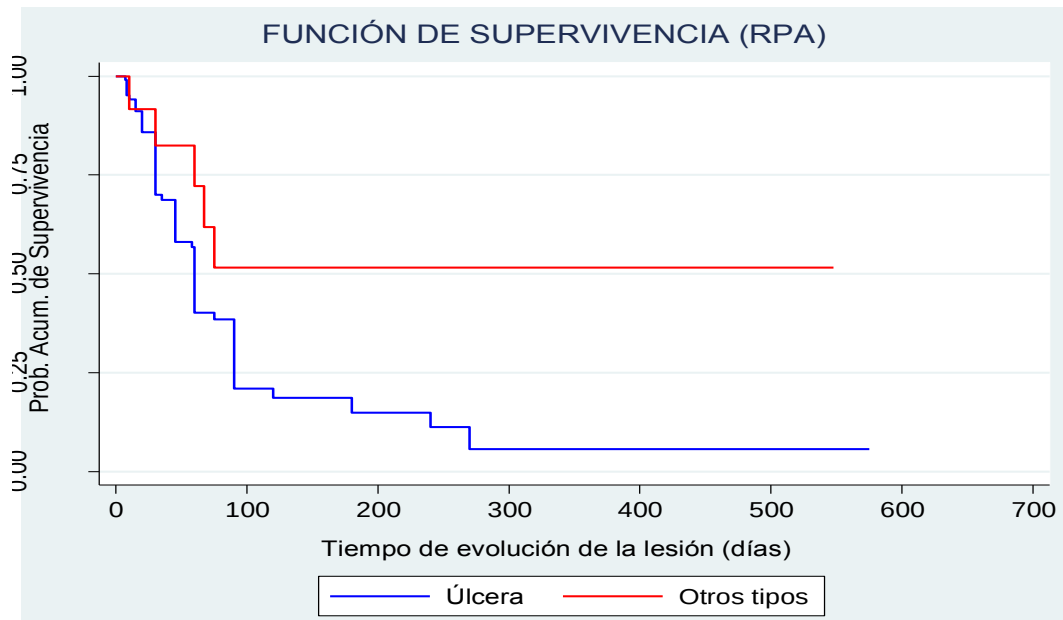
Figura 13. Función de Supervivencia - RPA (Centro de Evaluación). Pérdida de Especificidad (La probabilidad de un FP).



También se evaluó la curva de supervivencia, según el tipo de lesión (úlceras y otros tipos), considerando como falla, la pérdida de sensibilidad de la prueba diagnóstica RPA en el Centro de Evaluación, es decir, obtener un falso negativo (FN) (Censura es el resultado positivo = 1) (Fig. 14)

La gráfica muestra que, cuando las lesiones en general tienen un tiempo de evolución menor a los 90 días, la probabilidad de un FN es más elevada para otros tipos de lesiones diferentes a las úlceras, es decir, la pérdida de sensibilidad de la RPA es mayor para las lesiones de otros tipos diferentes a la úlcera con un tiempo de evolución menor a 90 días. Mientras que, las lesiones tipo úlcera con menos de 90 días de evolución, tienen menos probabilidad de tener un FN que los otros tipos de lesiones, por lo tanto, la pérdida de sensibilidad es menor (Fig. 14).

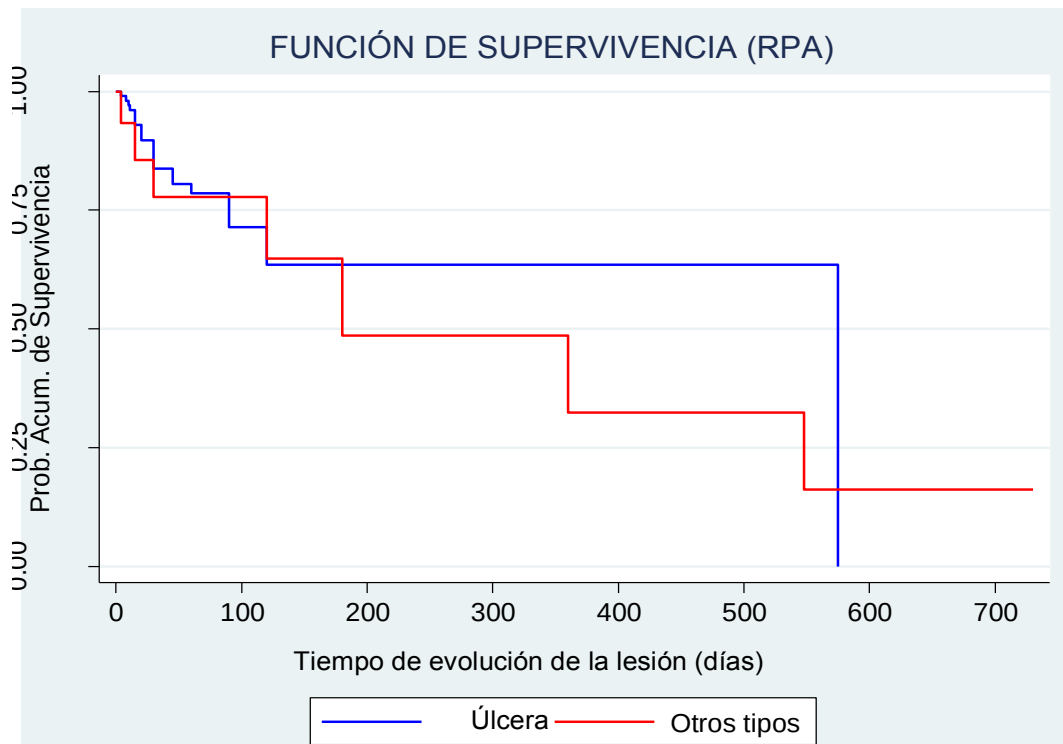
Figura 14. Función de Supervivencia - RPA (Centro de Evaluación). Pérdida de Sensibilidad (La probabilidad de un FN). Según el tipo de lesión.



Curva de supervivencia, según el tipo de lesión (úlceras y otros tipos), considerando como falla, la pérdida de especificidad de la prueba diagnóstica RPA en el Centro de Evaluación, es decir, obtener un falso positivo (FP) (Censura es el resultado positivo = 1) (Fig. 15)

La gráfica muestra que, cuando las lesiones en general tienen un tiempo de evolución menor a los 90 días, la probabilidad de un FP es más elevada para las lesiones tipo úlcera que para los otros tipos de lesiones; es decir, la pérdida de especificidad de la RPA es mayor para las úlceras que para otros tipos de lesiones. Sin embargo, a medida que aumenta el tiempo de evolución de la lesión, la probabilidad de encontrar un FP disminuye para los otros tipos de lesiones, mientras que, para las úlceras esta probabilidad permanece constante (Fig. 15).

Figura 15. Función de Supervivencia - RPA (Centro de Evaluación). Pérdida de Especificidad (La probabilidad de un FP). Según el tipo de lesión.



Finalmente, se compararon las dos curvas de supervivencia a través del Test de log-rank y wilcoxon.

Comparación de las curvas de Supervivencia: Pérdida de sensibilidad de la RPA en el Centro de Evaluación según tipo de lesión (úlceras y otros tipos).

Test de log-rank
 $\chi^2(1) = 17,12$
 $Pr > \chi^2 = 0.0000$

Test de Wilcoxon
 $\chi^2(1) = 10,97$
 $Pr > \chi^2 = 0.0009$

Interpretación: Existen evidencias estadísticamente significativas para decir que los grupos comparados presentan diferente supervivencia global, es decir, existen diferencias persistentes.

Comparación de las curvas de Supervivencia: Pérdida de especificidad de la RPA en el Centro de Evaluación según tipo de lesión (úlceras y otros tipos).

Test de log-rank
 $\chi^2(1) = 10,38$
 $Pr > \chi^2 = 0.0013$

Test de Wilcoxon
 $\chi^2(1) = 8,74$
 $Pr > \chi^2 = 0.0031$

De lo anterior se puede concluir que existen evidencias estadísticamente significativas para decir que los grupos comparados presentan diferente supervivencia global, es decir, existen diferencias persistentes.

7.6. APROXIMACIÓN AL ANÁLISIS DE COSTO-EFECTIVIDAD

En esta aproximación al análisis de costo-efectividad, la efectividad se entenderá como un aumento de la sensibilidad y la especificidad de la prueba RPA con respecto al examen directo. El indicador de efectividad elegido que sirvió de base comparativa en el análisis de costo-efectividad se expresó en términos de: la diferencia en la sensibilidad y la diferencia en la especificidad entre las pruebas diagnósticas RPA y el examen directo.

La aproximación al análisis de costo-efectividad se realizó sin tener en cuenta los costos secundarios asociados a un resultado falso negativo del tradicional Examen directo.

Los costos atribuidos a cada una de las pruebas para el diagnóstico de LC se muestran en la Tabla 14.

Tabla 14. Relación de costos Prueba diagnóstica RPA y examen directo

Costos Directos "RPA"	Costos Directos "Examen Directo"	Costos Relacionados "Examen Directo" (Cultivo + PCR convencional)	Costos Secundarios "Examen Directo" Cirugía de reconstrucción (Falso Negativo)
\$90.000	\$15.000	\$135.000	\$100.000.000

El ACEI o Razón marginal o incremental según la sensibilidad de la RPA fue:

$$\text{Razón marginal} = \frac{(90000 - 15000)}{(100,0 - 70,0)}$$

$$\text{Razón marginal} = 2,500.0$$

El ACEI o Razón marginal o incremental según la especificidad de la RPA fue:

$$\text{Razón marginal} = \frac{(90000 - 15000)}{(100,0 - 70,0)}$$

$$\text{Razón marginal} = 2,500.0$$

Los resultados muestran que:

Cada unidad adicional (1%) de sensibilidad en el diagnóstico de la LC, de la prueba diagnóstica RPA cuesta \$ 2,500.0 pesos más que el Examen directo tradicional.

Cada unidad adicional (1%) de especificidad en el diagnóstico de la LC, de la prueba diagnóstica RPA cuesta \$ 2,500.0 pesos más que el Examen directo tradicional.

8. DISCUSIÓN

La evaluación de un nuevo método diagnóstico en ausencia de un Gold Standard válido o aceptable siempre ha representado un dilema especialmente con respecto a la sensibilidad. Todos los métodos convencionales empleados para el diagnóstico de la LC tienen tasas de positividad desde moderadas hasta bajas. Algunos estudios han reportado una positividad de la microscopía directa del 42% (27); 46,7% (28); 48% (29); 67% (30). Este amplio rango puede explicarse en parte, por la variación en la concentración de parásitos en diferentes tipos de muestras biológicas.

En el diagnóstico de la leishmaniasis, el verdadero problema es encontrar un método altamente sensible para diagnosticar correctamente los casos con solo unos pocos parásitos en el material biológico obtenido. En este estudio, si consideramos la demostración de amastigotes en un frotis teñido (examen directo) como el Gold standard (OMS,1999), la RPA demostró ser más sensible (90,4%) que el tradicional examen directo (42 – 67%), con un 14% de fallos en la detección de LC (falsos positivos), datos sin ajustar por estándar de referencia imperfecto; y una sensibilidad ajustada por estándar de referencia imperfecto del 100%.

Con respecto a la especificidad, la RPA fue más específica (72,7%) que el examen directo, con un 20% de casos de LC que no fueron detectados (falsos negativos), sin ajustar por estándar de referencia imperfecto; y una especificidad ajustada por estándar de referencia imperfecto del 100%.

Los resultados muestran que con la nueva prueba diagnóstica RPA, es 3,31 veces (LR+) más probable que una persona con LC reciba un resultado positivo, que una persona sin LC (o lo que es lo mismo, es 3,31 veces más probable encontrar un verdadero positivo (VP) con la prueba diagnóstica RPA que con el examen directo); pequeña diferencia pero podría ser relevante teniendo en cuenta la toxicidad de los medicamentos disponibles para tratar la LC; y 0.13 veces (LR-) más probable que una persona con LC reciba un resultado negativo que una persona sin LC (o lo que es lo mismo, es 0,13 veces más probable encontrar un falso negativo con la prueba diagnóstica RPA que con el examen directo); se puede decir, que un resultado negativo de la RPA descarta la enfermedad.

El área bajo la curva ROC de la prueba diagnóstica RPA, nos dice que existe una probabilidad de 82% (sin ajustar por estándar de referencia imperfecto) y del 100% (ajustada por estándar de referencia imperfecto) de que, si se eligen al azar a dos individuos, uno con LC y otro sin ella, la RPA los clasifique a ambos correctamente. Por lo tanto, el área bajo la curva ROC de la RPA, tiene una buena capacidad de distinguir o de discriminar entre enfermos y no enfermos.

La concordancia inter-observador para la prueba diagnóstica RPA entre el Centro de evaluación y el Centro de referencia fue aceptable ya que se situó por encima de 0.4 (0,547). Si evaluamos esta concordancia discriminada por el tiempo de evolución de la lesión observamos que para las lesiones con un tiempo menor o

igual a 90 días de evolución, la concordancia entre los dos observadores fue menor (0,468) que la concordancia general y para las lesiones con un tiempo mayor o igual a 91 días de evolución (lesiones crónicas), la concordancia fue excelente (0,865); este último resultado (0,865) sorprende, porque para el diagnóstico de LC, las lesiones se prefieren con un tiempo de evolución menor de 90 días; se podría pensar que esta concordancia elevada para las lesiones con más de 91 días de evolución, se podría atribuir a la falta de enmascaramiento para la interpretación de los resultados de la RPA, muy influenciados por el conocimiento previo de los resultados del examen directo, para el que en definitiva, está más familiarizado el personal de laboratorio en los diferentes centros de evaluación, a pesar del elevado componente subjetivo que tiene implícito esta prueba diagnóstica; esta hipótesis podría estar respaldada por la excelente concordancia observada (concordancia por encima de 0,8) para el examen directo, tanto la general, como la concordancia para las lesiones recientes y para las crónicas.

Esta situación se había previsto en la metodología, dadas las condiciones del estudio, donde el personal de laboratorio tomaba las muestras simultáneamente para el examen directo, la RPA y la PCR convencional para el Centro de evaluación y para el Centro de referencia; luego de la toma de muestras, se procesaban las muestras para el examen directo y se almacenaban las muestras para la RPA y PCR convencional; por esta razón, no se podía asegurar desconocer en todos los casos los resultados previos del examen directo, incrementándose así, la probabilidad de que la interpretación de la RPA introdujera sesgos.

Las variables independientes escogidas por su plausibilidad biológica para explorar los factores asociados a la presencia de LC, solo explicaron aproximadamente el 10% de la variación en los resultados de la RPA en el Centro de evaluación. Se observó que, la probabilidad de tener un resultado verdadero positivo (VP) con la prueba diagnóstica RPA, se incrementó 8,08 veces con respecto a tener un falso positivo (FP) en los pacientes con un tiempo de evolución de sus lesiones menor o igual a 90 días, en comparación con los pacientes con un tiempo de evolución de sus lesiones mayor o igual a los 91 días, permaneciendo el resto de las covariables constantes. Este resultado está en sintonía con el conocimiento existente en diagnóstico de LC, sobre la preferencia de muestras clínicas de lesiones con un tiempo de evolución menor a 90 días (recientes), dado que permiten visualizar mejor los amastigotes a través del tradicional examen directo, y para las pruebas moleculares, garantiza la presencia del parásito en cantidades detectables por las mismas.

La curva ROC del modelo de regresión logística mostró que la RPA tiene un buen poder de discriminación (73%) entre los resultados verdadero positivo (VP) y falsos positivos (FP), en función de las variables independientes incluidas en el modelo. Con relación a la probabilidad de obtener un resultado verdadero negativo (VN), con respecto a tener un falso negativo (FN) con la prueba diagnóstica RPA; se puede afirmar que, el modelo de regresión logística no fue influenciado por las variables independientes incluidas en este.

La función de supervivencia para la RPA en el Centro de Evaluación mostró que, la probabilidad de tener un falso negativo (FN) disminuye considerablemente, a medida que aumenta el tiempo de evolución de la lesión; para las lesiones con un tiempo de evolución ≤ 90 días, la probabilidad de tener un FN oscila entre 0,375 y valores cercanos a 1; para las lesiones más crónicas, con un tiempo de evolución ≥ 91 días, la probabilidad de tener un FN se ubica por debajo de 0,25, estabilizándose a partir de los 280 días aproximadamente. Las lesiones más crónicas tienen menos probabilidad de tener un resultado FN, es decir, de perder sensibilidad con la prueba diagnóstica RPA, principalmente porque es más difícil encontrar parásitos en la lesión, para diagnosticar la LC, este resultado también confirma por qué es importante hacer el diagnóstico de la LC sobre lesiones con menos de 90 días de evolución.

Cuando se discrimina por tipo de lesión, se observa que la probabilidad de tener un resultado FN en lesiones tipo úlcera con ≤ 90 días de evolución, es de aproximadamente 0,375 en comparación con una probabilidad de 0,50 para los otros tipos de lesiones que tienen el mismo tiempo de evolución, la probabilidad de tener un FN se estabiliza para los otros tipos de lesiones a partir de los 91 días de evolución, mientras que para las úlceras la probabilidad de tener un FN, disminuye considerablemente a partir de los 91 días de evolución de la lesión, este resultado corrobora, la preferencia que se tiene por las lesiones tipo úlcera y con menos de 90 días de evolución para el diagnóstico de la LC.

Las lesiones con ≤ 90 días de evolución, tienen una probabilidad de tener un resultado falso positivo (FP) que oscila entre valores cercanos a 1 y 0,80 aproximadamente; por encima de los 91 días de evolución de la lesión, la probabilidad comienza a disminuir considerablemente; posiblemente por la dificultad de diagnosticar la LC en las lesiones crónicas (≥ 91 días), debido al escaso número de parásitos presentes. Cuando se discrimina por tipo de lesión, se observa que, la probabilidad de encontrar un FP para las lesiones tipo úlcera se estabiliza en 0,625 a partir de los 110 días de evolución de la lesión aproximadamente, mientras que, para los otros tipos de lesiones, la probabilidad de encontrar un FP disminuye a medida que aumenta el tiempo de evolución de la lesión, estabilizándose de forma tardía.

Cuando se compararon las curvas de supervivencia de la pérdida de sensibilidad (probabilidad de tener un falso negativo) según el tipo de lesión, a través del test de log-rank y el test de Wilcoxon, se pudo evidenciar que los grupos comparados, presentaban diferencias en la supervivencia global; estas diferencias persistentes en la comparación de las dos curvas diagnósticas, pueden estar relacionadas con la dificultad para diagnosticar la LC en las lesiones crónicas (≥ 91 días) y no con una superioridad para el diagnóstico de estas lesiones crónicas versus las lesiones con ≤ 90 días de evolución.

Otro objetivo no menos importante de la investigación sobre pruebas diagnósticas, va un paso más allá de conocer el rendimiento diagnóstico de la prueba; es importante evaluar el impacto que tendría el uso de la RPA en comparación con el

examen directo sobre los resultados de salud de los pacientes (18); a través de una *aproximación* al análisis de costo-efectividad para la prueba diagnóstica RPA se evidenció que esta es más costo-efectiva que el examen directo en términos de ganancia en sensibilidad y especificidad; aunque se debe tener en cuenta que, para la aproximación a este análisis, no se tuvieron en cuenta los costos relacionados con el examen directo y los costos secundarios a un falso negativo, es decir, una cirugía de reconstrucción por una LC que derivó en una leishmaniasis mucocutánea. También es importante aclarar que el costo de la nueva prueba diagnóstica RPA corresponde a un valor aproximado de investigación, en este no se tienen en cuenta los posibles descuentos de los diferentes proveedores por volumen; y el costo directo del examen directo es difícil de cuantificar, dado que esta prueba diagnóstica es subsidiada por el sistema de salud.

9. CONCLUSIONES

El diseño de estudio escogido (observacional, transversal) para la evaluación de la prueba diagnóstica RPA, garantizó tener un espectro de pacientes representativo de los pacientes que recibirán la prueba diagnóstica en la práctica clínica y evitar un mayor número de sesgos que otros diseños podrían introducir en este tipo de estudios de exactitud de métodos diagnósticos.

La nueva prueba diagnóstica RPA realizada en el centro de evaluación mostró una mayor sensibilidad (90,4%) y especificidad (72,7%) sin ajustar, y una sensibilidad y especificidad del 100% ajustadas por estándar de referencia imperfecto, superando la sensibilidad y especificidad reportadas para el tradicional examen directo, con una probabilidad de 0,13 (0,13 LR-) de tener un resultado falso negativo, o lo que es lo mismo, 0,13 veces más probable encontrar un falso negativo con la prueba diagnóstica RPA que con el examen directo. Esto a su vez demuestra que un resultado negativo de la RPA descarta la LC.

El área bajo la curva ROC del modelo de regresión logística del 73% del máximo posible, permite concluir que las variables independientes incluidas en el modelo discriminan de forma aceptable entre verdaderos positivos y falsos positivos de la prueba diagnóstica RPA.

Frente a la RPA evaluada en el centro de referencia se puede concluir que se justifica realizar la RPA en campo, dado que su sensibilidad fue mayor (90,4%) que la sensibilidad de esta en el Centro de referencia (72,9%), además de las ventajas que ofrece la RPA como la eliminación del componente subjetivo asociado al examen directo, la versatilidad de una tecnología ideal por su facilidad de transportar y utilizar en campo y en puntos de atención con recursos limitados, donde la rapidez del diagnóstico es esencial.

Las posibles fallas en la ausencia de enmascaramiento en la interpretación de las pruebas diagnósticas RPA y examen directo previstas con anticipación desde la metodología (al ser imposible contar con personal de laboratorio diferente para la toma de la muestra e interpretación de los resultados), afectaron los resultados de la concordancia inter-observador específicamente para la RPA, prueba diagnóstica que posiblemente fue interpretada con conocimiento de los resultados previos del examen directo.

La aproximación al análisis de costo-efectividad demostró que la RPA tiene una ventaja adicional y es que es más económica que el examen directo en términos de ganancia adicional en sensibilidad y especificidad, conocer el verdadero impacto de la RPA, requiere de un diseño más complejo como sería una evaluación económica de costo-efectividad.

Los resultados aquí mostrados soportan la implementación de la RPA como prueba para el diagnóstico molecular en cualquier centro de salud u hospital de cualquier

nivel de complejidad, lo que facilitará el diagnóstico permitiendo con ello un tratamiento oportuno para los pacientes con LC.

10. PERSPECTIVAS

Se requiere realizar un estudio de la evaluación económica de costo-efectividad con un diseño más complejo que permita identificar el verdadero impacto que tendría el uso de la RPA sobre los resultados de salud de los pacientes con LC.

REFERENCAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization. Control of the leishmaniasis. Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis. 2010
2. Valverde A, Berrouet MC. Manifestaciones tóxicas cardiovasculares con el uso de antimonias en una paciente con leishmaniasis cutánea. Med UPB. 2019;38(1):78-84.
3. Alvar J, Vélez I, Bern C. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. PLoS ONE. 2012;7(5):e35671.
4. Vega-López F. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis. Curr Opin Infect Dis. 2003;16(2):97-101.
5. Ministerio de la Protección Social, Organización Panamericana de la Salud. Guía de atención integral de leishmaniasis 2010 (Documento Actualizado de Versión final Convenio 256/09). 2010.
6. Chia-Chen C, Chien-Cheng C, Shih-Chung W, Hui-Hsin L, Yang-Hung L, Chii-Wann L. Diagnostic Devices for Isothermal Nucleic Acid Amplification. Sensors. 2012;12(6):8319-37.
7. Kong H, Ranalli T, Lemieux B. New isothermal molecular diagnostics platforms. IVD Technol. 2007;13(3):35-43.
8. Lobato IM, O'Sullivan CK. Recombinase polymerase amplification: Basics, applications and recent advances. Trends Anal Chem. 2018;98:19-35.
9. Instituto Nacional de Salud. Protocolo de Vigilancia en Salud Pública. Leishmaniasis. 2017.
10. Vélez I, Robledo SM. Manual de Procedimientos para el Diagnóstico y Control de la Leishmaniasis en Centro América. Medellín, Colombia: Foxit Reader; 2010.
11. Pizzariello G, Uranga A, Olivares L, Maronna E. Leishmaniasis cutánea diseminada, una forma clínica emergente. Dermatol Argent. 2013;19:44-7.
12. Instituto Nacional de Salud. Vigilancia y Análisis del Riesgo en Salud Pública-Sivigila-Vigilancia Rutinaria. 2018.
13. Agudelo N. Informe de evento Leishmaniasis cutánea, mucosa y visceral, Colombia, 2018. Instituto Nacional de Salud; 2018.
14. Ramírez JR, Agudelo S, Muskus C, Alzate JF, Berberich C, Barker D, et al. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis in Colombia: the sampling site within

- lesions influences the sensitivity of parasitologic diagnosis. *J Clin Microbiol.* 2000;38(10):3768-73.
15. Zerpa O, Borges R, Loyo N, Galindo W, Belisario D, Rodríguez N, et al. Comparación de cinco métodos para el diagnóstico de leishmaniasis cutánea. *Dermatol Venez.* 2002;40(4).
 16. Bensoussan E, Nasereddin A, Jonas F, Schnur LF, Jaffe CL. Comparison of PCR assays for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *J Clin Microbiol.* 2006;44(4):1435-9.
 17. TwistAmp® DNA Amplification Kits Assay Design Manual [Internet]. ©2018 TwistDx™. All rights reserved. TWISTA, TWIRLA, TWISTFLOW, TWISTGLOW and TWISTAMP are trademarks of TwistDx Limited; Disponible en: <https://www.twistdx.co.uk/docs/default-source/RPA-assay-design/twistamp-assay-design-manual-v2-5.pdf?sfvrsn=29>
 18. Zamora J, Abaira V. Análisis de la calidad de los estudios de evaluación de pruebas diagnósticas. *Nefrología.* 2008;28(2):42-5.
 19. Ruíz M A, Morillo Z LE. Epidemiología Clínica. Investigación clínica aplicada. Editorial Medica Panamericana; 2004.
 20. Drummond MF, Sculpher MJ, Torrance GW, O'Brien BJ, Stoddart GL. Methods for the Economic Evaluation of Health Care Programmes. Oxford University Press Inc., New York; 2005.
 21. Hernández Sampieri R, Fernández Collado C, Baptista Lucio P. Metodología de la investigación. Mexico: Editorial Mc Graw Hill; 2010.
 22. Ochoa Sangrador C, González de Dios J, Buñuel Alvarez J. Evaluación de artículos científicos sobre pruebas diagnósticas. *Evid Pediatr.* 2007;3.
 23. González Rodríguez M, Velarde Mayol C. Listas guía de comprobación de estudios sobre pruebas diagnósticas incluidos en las revisiones sistemáticas: declaración QUADAS. 2012;8:Evid Pediatr.
 24. Xiao-Hua Z, Obuchowski NA, McClish DK. Statistical Methods in Diagnostic Medicine. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc; 2011.
 25. Maris Batallés S, Lisandro Villavicencio R, Maris Pezzotto S. Analisis coste-efectividad de distintos métodos de diagnóstico por imagen del tromboembolismo pulmonar agudo. *Rev Esp Salud Pública.* junio de 2009;83(3).
 26. Lijmer J, Mol B, Heisterkamp S, Bonsel G, Prins M, van der Meulen J, et al. Empirical evidence of design-related bias in studies of diagnostic tests [published correction appears in *JAMA* 2000 Apr 19;283(15):1963]. *JAMA.* 1999;282(11):1061-6.

27. Aviles H, Belli A, Armijos R, Monroy F, Harris E. PCR detection and identification of *Leishmania* parasites in clinical specimens in Ecuador: a comparison with classical diagnostic methods. *J Parasitol.* abril de 1999;85(2):181-7.
28. Weigle KA, Labrada LA, Lozano C, Santrich C, Barker DC. PCR-Based Diagnosis of Acute and Chronic Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania (Viannia)*. *J Clin Microbiol.* febrero de 2002;40(2):601-6.
29. Andresen K, Gaafar A, El-Hassan A, Ismail A, Dafalla M, Theander T, et al. Evaluation of the polymerase chain reaction in the diagnosis of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major*: a comparison with direct microscopy of smears and sections from lesions. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* abril de 1996;90(2):133-5.
30. Rodrigues E, Felinto de Brito M, Mendonça M, Werkhäuser R, Coutinho E, Souza W, et al. Evaluation of PCR for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis in an area of endemicity in northeastern Brazil. *J Clin Microbiol.* octubre de 2002;40(10):3572-6.

ANEXOS

Anexo 1. Tabla de variables

Variables de identificación e Información sociodemográfica

No.	Nombre de la variable	Descripción	Naturaleza- Tipo	Posibles valores
1	Código del participante	*Iniciales de los apellidos e inicial del primer nombre. En caso de que el participante tenga un solo apellido se completa el segundo espacio con un guion	Cualitativa- Nominal	__ _*001 al ...124
2	Sitio del estudio	Donde se hizo el ingreso del participante al estudio	Cualitativa- Nominal	1: icmt Apartadó 2: icmt Medellín 3: Pecet 4: H. Remedios 5: H. Puerto Valdivia 6: Otro 99: Sin dato
3	Sexo	Al que la persona responda.	Cualitativa- Nominal	1: Masculino 2: Femenino 99: Sin dato
4	Edad	Edad en años cumplidos al momento de ingreso en el estudio.	Cuantitativa- Razón	
5	Raza	Raza del participante	Cualitativa- Nominal	1: Blanca 2: Negra 3: Mestiza 4: Indígena 5: Otra 99: Sin dato
6	Ocupación	*Hace referencia a empleados que en sus actividades están en riesgo de exposición al vector.	Cualitativa- Nominal	1: Agricultor 2: Aserrador 3: Minero 4: Militar/Policia 5: Ama de casa 6: Estudiante 7: Infante no estudiante 8: Turista 9: Empleado con riesgo* 10: Otro 99: Sin dato

Variables Clínicas (relacionadas con la infección actual)

No.	Nombre de la variable	Descripción	Naturaleza- Tipo	Posibles valores
7	Lugar donde adquirió la infección	Departamento donde el paciente refiere que adquirió la infección (según la lista de planeación).	Cualitativa- Nominal	1- 32
8	Antecedentes de Leishmaniasis	Haber tenido leishmaniasis antes de la actual	Cualitativa- Nominal	1: Sí 2: No
9	Tiempo de evolución de la lesión	Tiempo de aparición de la lesión y es referido por el paciente	Cuantitativa- Razón	Días desde el momento de aparición de la lesión
10	Tipo de lesión		Cualitativa- Nominal	1: Úlcera 2: Placa 3: Nódulo
11	Resultado de la RPA en el centro de evaluación.	Examen de diagnóstico (reportado por el laboratorio del centro de evaluación)	Cualitativa- Nominal	1: Positivo 2: Negativo

No.	Nombre de la variable	Descripción	Naturaleza- Tipo	Posibles valores
12	Persona que realizó la prueba RPA en el centro de evaluación	Nombre de la persona del laboratorio que realizó el examen	Cualitativa- Nominal	
13	Centro de evaluación de la RPA	Nombre del centro de evaluación de la RPA	Cualitativa- Nominal	
14	Resultado del examen directo en el centro de evaluación	Examen de diagnóstico (reportado por el laboratorio del centro de evaluación)	Cualitativa- Nominal	1: Positivo 2: Negativo
15	Persona que realizó el examen directo en el centro de evaluación	Nombre de la persona del laboratorio que realizó el examen	Cualitativa- Nominal	
16	Centro de evaluación del examen directo	Nombre del centro de evaluación del examen directo	Cualitativa- Nominal	
17	Resultado del cultivo en el centro de evaluación (PECET)	Examen de diagnóstico (reportado por el laboratorio del centro de evaluación (PECET))	Cualitativa- Nominal	1: Positivo 2: Negativo
18	Persona que realizó el cultivo en el centro de evaluación (PECET)	Nombre de la persona del laboratorio que realizó el examen	Cualitativa- Nominal	
19	Centro de evaluación del cultivo	Nombre del centro de evaluación del cultivo	Cualitativa- Nominal	
20	Tiempo de experiencia en toma de las muestras clínicas para diagnóstico de LC (Bacteriólogo centro de evaluación)	Tiempo reportado por el bacteriólogo o microbiólogo en el centro de evaluación	Cuantitativa- Razón	Como lo reporte el profesional de salud
21	Tiempo de experiencia en lectura de las placas para examen parasitológico directo (Bacteriólogo centro de evaluación)	Tiempo reportado por el bacteriólogo o microbiólogo en el centro de evaluación	Cuantitativa- Razón	Como lo reporte el profesional de salud
22	Resultado de la RPA en el centro de referencia (PECET)	Examen de diagnóstico (reportado por el laboratorio del centro de referencia (PECET)).	Cualitativa- Nominal	1: Positivo 2: Negativo
23	Persona que realizó la prueba RPA en el centro de referencia (PECET)	Nombre de la persona del laboratorio que realizó el examen	Cualitativa- Nominal	
24	Resultado del examen directo en el centro de referencia (PECET)	Examen de diagnóstico (reportado por el centro de referencia (PECET))	Cualitativa- Nominal	1: Positivo 2: Negativo
25	Persona que realizó el examen directo en el centro de referencia (PECET).	Nombre de la persona que realizó el examen	Cualitativa- Nominal	
26	Resultado de la prueba PCR convencional en el centro de referencia (PECET).	Examen de diagnóstico (reportado por el centro diagnóstico de referencia (PECET))	Cualitativa- Nominal	1: Positivo 2: Negativo
27	Persona que realizó la PCR convencional en el centro de referencia (PECET)	Nombre de la persona que realizó la PCR convencional.	Cualitativa- Nominal	
28	Tiempo de experiencia en lectura de las placas para examen parasitológico directo (Bacteriólogo centro de referencia)	Tiempo reportado por el bacteriólogo o microbiólogo en el centro de evaluación	Cuantitativa- Razón	Como lo reporte el profesional de salud

Variables relacionadas con el análisis de costo-efectividad

No.	Nombre de la variable	Descripción	Naturaleza- Tipo	Posibles valores
29	Costo unitario de la RPA (referido por el centro de referencia)	Costo unitario en pesos colombianos y en dólares de la RPA	Cuantitativa- Razón	Cualquier valor en pesos y dólares
30	Costo unitario del examen directo en el centro de evaluación.	Costo unitario en pesos colombianos y en dólares del examen directo	Cuantitativa- Razón	Cualquier valor en pesos y dólares
31	Costo unitario del examen directo en el centro de referencia.	Costo unitario en pesos colombianos y en dólares del examen directo	Cuantitativa- Razón	Cualquier valor en pesos y dólares
32	Costo unitario de la PCR convencional (PCR-RFLP) en el centro de referencia.	Costo unitario en pesos colombianos y en dólares de la PCR convencional	Cuantitativa- Razón	Cualquier valor en pesos y dólares
33	Costo unitario prueba(s) de apoyo al diagnóstico tradicional (IFI, cultivo, etc.) en el centro de evaluación.	Costo unitario en pesos colombianos y en dólares del cultivo	Cuantitativa- Razón	Cualquier valor en pesos y dólares
34	Costo unitario prueba(s) de apoyo al diagnóstico tradicional (IFI, cultivo, etc.) en el centro de referencia.	Costo unitario en dólares	Cuantitativa- Razón	Cualquier valor en pesos y dólares
35	Costo de un falso negativo	Costo unitario en pesos colombianos y dólares	Cuantitativa- Razón	Cualquier valor en pesos y dólares
36	Costo de un falso positivo.	Costo unitario en pesos colombianos y dólares	Cuantitativa- Razón	Cualquier valor en pesos y dólares

Anexo 2. Formato de Recolección de la información

FORMATO RECOLECCIÓN DE INFORMACIÓN PROYECTO EVALUACIÓN EN CAMPO DE LA PRUEBA DIAGNÓSTICA: AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA DE DNA MEDIANTE RECOMBINASA Y POLIMERASA (RPA) EN EL DIAGNÓSTICO DE LA LEISHMANIASIS CUTÁNEA		
		
CONSULTORIO DEL PECET, ICMT (MEDELLÍN / APARTADO), HOSPITAL DE REMEDIOS, HOSPITAL DE PUERTO VALDIVIA O CUALQUIER OTRO HOSPITAL DE LOS MUNICIPIOS DEL TERRITORIO NACIONAL Y ATENCIÓN EXTRAMURAL		
Código para identificar al paciente: Iniciales de los nombres del paciente:		

Visita (Tamizaje)

EVALUACIONES PREDIAGNÓSTICO DE LEISHMANIASIS CUTÁNEA	
Sitio del estudio:	☐ 1. icmt Apartadó ☐ 2. icmt Medellín ☐ 3. Pecet ☐ 4. H. Remedios ☐ 5. H. Puerto Valdivia ☐ 6. Otro Cuál? _____
Ocupación:	Fecha de nacimiento: / / (Día) (Mes) (Año)
Sexo:	☐ 1. Masculino ☐ 2. Femenino
Raza:	☐ 1. Blanca ☐ 2. Negra ☐ 3. Mestizo ☐ 4. Indígena ☐ 5. Otro: _____
Antecedentes de Leishmaniasis: ☐ 1. Sí ☐ 2. No	
Lugar dónde adquirió la infección: _____	
Tiempo de evolución de la lesión (días):	
Tipo de lesión: ☐ 1. Úlcera ☐ 2. Placa ☐ 3. Nódulo	

INFORMACIÓN BACTERIÓLOGO/MICROBIÓLOGO QUE REALIZA LAS PRUEBAS DIAGNÓSTICAS EN EL CENTRO DE EVALUACIÓN
Cuánto tiempo de experiencia tiene Usted en la toma de muestras clínicas para diagnóstico de leishmaniasis cutánea (LC)? _____ _____

Cuánto tiempo de experiencia tiene Usted en la lectura de las placas para examen parasitológico directo de Leishmaniasis cutánea (LC)?

PRUEBAS DIAGNÓSTICAS DE LABORATORIO PARA LEISHMANIASIS CUTANEA REALIZADAS EN EL CENTRO DE EVALUACIÓN

¿Se realizó la prueba de laboratorio Examen directo (frotis o extendido)? ☐ Sí ☐ No

Explique por qué no se realizó: _____

Resultado: ☐ 1. Positivo ☐ 2. Negativo

Nombre de la persona que realizó la prueba _____

¿Se realizó la prueba de laboratorio RPA? ☐ Sí ☐ No

Explique por qué no se realizó: _____

Resultado: ☐ 1. Positivo ☐ 2. Negativo

Nombre de la persona que realizó la prueba _____

¿Se realizó el cultivo para la muestra clínica? ☐ Sí ☐ No

Explique por qué no se realizó : _____

Resultado: ☐ Positivo ☐ Negativo

Nombre de la persona que realizó la prueba _____

PRUEBAS DIAGNÓSTICAS DE LABORATORIO PARA LEISHMANIASIS CUTÁNEA REALIZADAS EN EL CENTRO DE REFERENCIA (PECET)

¿Se realizó la prueba de laboratorio Examen directo (frotis o extendido)? ☐ Sí ☐ No

Explique por qué no se realizó la prueba _____

Resultado: ☐ 1. Positivo ☐ 2. Negativo

Nombre de la persona que realizó la prueba _____

¿Se realizó la prueba de laboratorio RPA? ☐ Sí ☐ No

Explique por qué no se realizó la prueba _____

Resultado: ☐ 1. Positivo ☐ 2. Negativo

Nombre de la persona que realizó la prueba _____

¿Se realizó la prueba de laboratorio PCR convencional? ☐ Sí ☐ No

Explique por qué no se realizó la prueba

Resultado: ☐ 1. Positivo ☐ 2. Negativo

Nombre de la persona que realizó la prueba

INFORMACIÓN BACTERIÓLOGO/MICROBIÓLOGO QUE REALIZA LAS PRUEBAS DIAGNÓSTICAS EN EL CENTRO DE REFERENCIA (PECET)

Cuánto tiempo de experiencia tiene Usted en la lectura de las placas para examen parasitológico directo de Leishmaniasis cutánea (LC)? _____

COSTOS DE LAS PRUEBAS DIAGNÓSTICAS PARA LEISHMANIASIS CUTÁNEA REALIZADAS EN EL LUGAR DE EVALUACIÓN

Costo en pesos colombianos de la prueba diagnóstica Examen directo (frotis o extendido)

¿Se realizaron **otras** pruebas de laboratorio de apoyo para el diagnóstico diferentes a la prueba RPA y al examen directo parasitológico? ☐ Sí* ☐ No

*Si respondió afirmativamente a la pregunta anterior conteste las siguientes preguntas:

Nombre de la prueba diagnóstica # 1:

Costo en pesos colombianos de la prueba diagnóstica # 1:

Nombre de la prueba diagnóstica # 2:

Costo en pesos colombianos de la prueba diagnóstica # 2:

COSTOS DE LAS PRUEBAS DIAGNÓSTICAS PARA LEISHMANIASIS CUTÁNEA REALIZADAS EN EL CENTRO DE REFERENCIA (PECET)

Costo en pesos Colombianos de la prueba diagnóstica Examen directo (frotis o extendido)

Costo en pesos Colombianos de la prueba diagnóstica RPA _____

Costo en pesos Colombianos de la prueba diagnóstica PCR convencional

¿Se realizaron **otras** pruebas de laboratorio de apoyo para el diagnóstico de LC diferentes a las mencionadas anteriormente? : ☐ Sí* ☐ No

*Si respondió afirmativamente a la pregunta anterior conteste las siguientes preguntas:

Nombre de la prueba diagnóstica # 1:

Costo en pesos Colombianos de la prueba diagnóstica # 1: _____

Nombre de la prueba diagnóstica # 2:

Costo en pesos Colombianos de la prueba diagnóstica # 2: _____

Anexo 3. Autorización para el uso de las muestras biológicas con fines de investigación

	AUTORIZACIÓN PARA EL USO DE LAS MUESTRAS CLINICAS EN EL PROYECTO EVALUACIÓN EN CAMPO DE LA PRUEBA DIAGNÓSTICA: AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA DE DNA MEDIANTE RECOMBINASA Y POLIMERASA (RPA) EN EL DIAGNÓSTICO DE LA LEISHMANIASIS CUTÁNEA	
CONSULTORIO DEL PECET, ICMT (MEDELLIN / APARTADO), HOSPITAL DE REMEDIOS, HOSPITAL DE PUERTO VALDIVIA O CUALQUIER OTRO HOSPITAL DE LOS MUNICIPIOS DEL TERRITORIO NACIONAL Y ATENCIÓN EXTRAMURAL		
Código del paciente:		Versión: 01

POR FAVOR LEA ESTE DOCUMENTO Y REALICE TODAS LAS PREGUNTAS QUE SE LE OCURRAN ANTES DE FIRMARLO.

Yo _____ de

años de edad, identificado(a) con cédula de ciudadanía N.º _____
como paciente/acudiente que consulta para el diagnóstico de leishmaniasis cutánea por presentar sintomatología compatible con esta enfermedad doy mi autorización para que las muestras que me sean tomadas se utilicen en las actividades de investigación que se requieren en el proyecto: ***“Utilidad de la prueba diagnóstica de amplificación isotérmica de DNA mediante recombinasa y polimerasa (RPA) en términos de sus atributos diagnósticos y costo-efectividad en comparación con la prueba estándar de diagnóstico para leishmaniasis cutánea: examen directo (frotis o extendido)”***.

Los investigadores me han explicado claramente que, si los resultados de este estudio son publicados, yo no apareceré identificado por mi nombre.

Firmo de manera libre y sin presiones a los ____ días del mes de _____ del año 20____

SU FIRMA (O HUELLA DIGITAL) INDICA QUE USTED ACEPTA VOLUNTARIAMENTE LOS PROCEDIMIENTOS PARA LA TOMA DE MUESTRA PARA DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIASIS CUTÁNEA, HABIENDO LEIDO (O ESCUCHADO) LA INFORMACION ANTERIOR.

Nombre _____ del _____ Paciente _____ o _____ acudiente:

ID: _____

Firma:

Nombre del encargado consultorio: _____

CC:

Firma: _____