

LA IMPRONTA COMO MÉTODO NO INVASIVO DE TOMA DE MUESTRA PARA EL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE LA LEISHMANIOSIS CUTÁNEA EN POBLACIÓN MILITAR DE COLOMBIA*

CLAUDIA PATRICIA MÉNDEZ BEJARANO¹, JULIE JANETH PÉREZ RICO²,
OMAIRA RODRÍGUEZ ANGARITA³, DANIEL AUGUSTO VELANDIA RODRÍGUEZ⁴,
YANIRA ANDREA ROMERO BARBOSA⁵, MARÍA TERESA ALVARADO FLECHAS⁶,
TANIA MABEL VALBUENA PINZÓN⁷

¹ (Coronel), Bacterióloga, MSc en Ciencias Biológicas.

² (Capitán), Bacterióloga, candidato a maestría en Ciencias Básicas Biomédicas y Especialista en Docencia Universitaria.

³ (SMSM), Bacterióloga, MSc en Parasitología.

⁴ (OPS), Químico, MSc en Microbiología.

⁵ (OPS) Bacterióloga, Especialista en Auditoría y Garantía de la Calidad en Salud.

⁶ (SMSM), Bacterióloga, candidato a maestría en Salud Pública.

⁷ (SMSM), Bacterióloga, candidato a maestría en Salud Pública y Especialista en Epidemiología.

Grupo de Investigación en enfermedades tropicales del Ejército Nacional. (GINETEJ)

*Artículo derivado del proyecto de Investigación Caracterización de las cepas de *Leishmania* spp circulantes en el territorio nacional en población militar. Financiado por el Comando de Educación y Doctrina del Ejército Nacional CEDOC. Dirección de Sanidad Ejército

Correspondencia: Omaira Rodríguez Angarita
Omaran64@hotmail.com

Recibido: 1 de septiembre de 2017 Aceptado: 26 de junio de 2018

Resumen

Teniendo en cuenta que los métodos tradicionales de toma de muestra y diagnóstico para la leishmaniosis cutánea presentan limitaciones, como el frotis directo, cuya sensibilidad depende de la pericia del profesional, el aspirado de lesión que puede ser usado para detección de parásitos en lámina, su ADN o para cultivos es demorado y exigente, y la biopsia de la lesión que es invasiva y dolorosa se comparó con el método de impronta en papel filtro de la lesión ulcerativa contra el método tradicional de aspirado mediante la técnica de PCR convencional utilizando como blanco una región del ADN del kinetoplasto del parásito. En el presente trabajo, la PCR obtuvo una sensibilidad para impronta del 90,07% comparado con el aspirado, el 86,3%, que, además, por ser un método de toma de muestra no invasivo, con pocas exigencias para el transporte, se puede tomar directamente en el área de operaciones a muy bajo costo, resulta ser beneficioso para ser usado en los pacientes con leishmaniosis cutánea del Ejército Nacional de Colombia, que se encuentran en las diferentes áreas de operaciones.

Palabras clave: leishmaniosis cutánea; impronta; papel de filtro; PCR

THE IMPRINT AS A NON-INVASIVE METHOD OF SAMPLING FOR THE MOLECULAR DIAGNOSIS OF CUTANEOUS LEISHMANIASIS IN COLOMBIA'S MILITARY POPULATION

Abstract

Taking into account that the traditional methods of sampling and diagnosis for cutaneous leishmaniasis, have limitations, such as direct smear, whose sensitivity depends on the professional's expertise, the lesion aspiration that can be used to detect parasites in the lamina, DNA or cultures takes a long time and is demanding, and the biopsy of the lesion that is invasive and painful were compared with the imprinting method on the filter paper of the ulcerative lesion against the traditional method of aspiration by means of the conventional PCR technique using as a target a DNA region of the parasite kinetoplast. In this present work, PCR obtained an imprinting sensitivity of 90.07% compared to the aspirate of 86.3%, which, besides being a non-invasive sampling method, with few transport requirements, it can be taken directly in the area of operations at a very low cost, which turns out to be beneficial to be used in patients with cutaneous leishmaniasis of the National Army of Colombia, who are in different operations areas.

Keywords: cutaneous leishmaniasis; imprint; filter paper; PCR.

IN PRINT COMO MÉTODO NÃO INVASIVO DE COLETA DE AMOSTRA PARA O DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA EM POPULAÇÃO MILITAR DA COLÔMBIA

Resumo

Considerando que os métodos tradicionais de coleta de amostra e diagnóstico para a leishmaniose cutânea apresentam limitações, como exame direto de esfregaços, cuja sensibilidade depende da perícia do profissional, o raspado de lesão que pode ser usado para a detecção de parasitas em lâmina, seu DNA ou para culturas é demorado e exigente, e a biopsia da lesão que é invasiva e dolorosa, comparou-se com o método *in print* em papel filtro da lesão ulcerativa contra o método tradicional de aspirado mediante a técnica de PCR convencional utilizando como alvo uma região do DNA do cinetoplasto do parasita. No presente trabalho, a PCR obteve uma sensibilidade para *in print* de 90,07% comparado com o aspirado, 86,3%, que, além disso, por ser um método de coleta de amostra não invasivo, com poucas exigências para o transporte, pode ser coletado diretamente na área de operações a muito baixo custo, resulta ser benéfico para ser usado nos pacientes com leishmaniose cutânea do Exército Nacional da Colômbia, que se encontram nas diferentes áreas de operações.

Palavras-chave: leishmaniose cutânea; *in print*; papel de filtro; PCR.

Introducción

Las leishmaniosis son un grupo de enfermedades transmitidas al ser humano por la picadura de flebótomos hembras infectadas con el protozoo *Leishmania*. El tipo y la gravedad de las lesiones, las especies de *Leishmania* implicadas y la respuesta al tratamiento son muy variables (1-2). Aproximadamente, el 95% de leishmaniosis cutánea ocurre en las Américas, y Colombia está entre los seis países que más casos nuevos de leishmaniosis cutánea (LC) reporta al año a nivel mundial (1).

El diagnóstico tradicional de LC sigue teniendo el frotis directo, como método estándar de oro, cuyo resultado depende de la experticia del profesional que toma y lee las muestras, aspecto que incide notoriamente en la sensibilidad de este método. Además, hay que tener en cuenta que se deben tomar tres frotis por tres láminas portaobjetos, utilizando una hoja de bisturí raspando de los bordes y el centro de la lesión. También es usado el aspirado que puede ser usado para detección de parásitos en lámina, su ADN o para cultivos, que, como lo señalan algunos autores, es altamente específico, poco sensible y de largo proceso, que requiere tanto personal como infraestructura especializada para tal fin (3-5).

La LC es una de las enfermedades que más disminuye el pie de fuerza de los hombres que conforman el Ejército Nacional de Colombia a consecuencia de su exposición por las operaciones de los uniformados en zonas endémicas, lo cual contribuye al aumento anual de la incidencia de la enfermedad. Por eso, se hace necesario explorar otros métodos para la toma de muestra fáciles, sensibles, no invasivos y que, además, el transporte de muestras desde los sitios de las operaciones militares.

En la literatura, es referenciado el uso de la impronta como método para la toma de muestra (figura 1). Consiste en la impresión de la lesión con sus microlíquidos en papel de filtro para el análisis molecular respectivo. Es un método no invasivo, con parámetros de validación, especificidad y sensibilidad, reportados para PCR del 100% (6). También es un método facilitador del diagnóstico molecular de la LC (7), que evita la necesidad de una cadena de frío para conservar las muestras. Es económico, requiere pequeños volúmenes de muestra y se necesitan conocimientos técnicos mínimos (8).



Figura 1. Protocolo adaptado de Boggild et al. 2010 (15) por el LRI DISAN para la toma de impronta de lesión de *Leishmania*. A. Limpieza y desinfección. B. Eliminación de la costra. C. Toma de la impronta. D. Secado al aire libre para su almacenamiento.

Fuente: Fotografía de los autores.

El uso del papel de filtro como método para la toma de muestra y posterior análisis molecular es potencialmente útil para el medio militar teniendo en cuenta los constantes desplazamientos del personal a zonas de alto riesgo, alejadas de los laboratorios con tecnología actualizada para el diagnóstico oportuno de LC.

Su utilización inició en el siglo pasado con las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos (9). Con el tiempo, se han venido utilizando en múltiples aspectos científicos con buenos resultados a través de la experiencia.

Generalmente la sangre es la muestra más común para recoger con papel de filtro, pero también se han hecho estudios con suero para detectar anticuerpos HAV con una sensibilidad y especificidad del 100% en comparación con el suero líquido (10).

También realizaron estudios con plasma y leche materna en comparación con el plasma líquido para el VIH por PCR cuantitativa, encontrando que el papel de filtro es un medio viable para la recogida de almacenamiento y envío de estas muestras y posterior seguimiento, así como una alternativa económica para controlar la carga viral, y que se ajusta a la escasa tecnología que existe en países en desarrollo (11).

El uso de papel de filtro fue evaluado con sangre y plasma midiendo la estabilidad del ARN del VIH con lo cual se concluye que a temperatura ambiente el ARN del virus fue estable durante más de un año (12).

Se han utilizado muestras de médula ósea, esputo, saliva, heces, etc. Casi cualquier muestra clínica puede ser almacenada en papel de filtro para el análisis posterior, y aunque la sangre total es la más conveniente y la más utilizada con papel de filtro, se está prestando cada vez más atención al diagnóstico de enfermedades infecciosas y desatendidas en lugares remotos utilizando microfluidos basados en la utilización del papel de filtro, lo que hace vislumbrar un futuro prometedor (13).

Sin embargo, se hace necesario una estandarización o consenso sobre la terminología y metodología para avanzar en el campo del diagnóstico a través del papel de filtro (14).

Materiales y métodos

Se tomaron 272 pacientes de las diferentes regiones del país acantonados en el centro de leishmaniosis de Bonza, el Batallón de Sanidad y el Fuerte de Tolemaida, entre otros, que tenían frotis positivo, y se seleccionaron bajo los siguientes criterios de inclusión: lesiones características de LC con mínimo 1, máximo 3 meses de evolución, que no estén localizadas en cara o genitales y sin tratamiento en los dos últimos meses.

Se tomaron las muestras de impronta de acuerdo con lo establecido por Boggild (2010), quien explica que después de eliminar la costra con una gasa húmeda con un papel filtro grado PCR se ejerce presión suave sobre la

base de la úlcera hasta evidenciar el exudado de la lesión a través del papel filtro, se deja secar y se envía al laboratorio (figura1).

Las muestras de aspirado fueron tomadas según el método estandarizado en el Laboratorio de Referencia e Investigación de Enfermedades Tropicales (LRI) de la Dirección de Sanidad Ejército (DISAN), seguido de la toma de impronta, en la misma lesión y bajo las mismas condiciones. Se limpia la lesión, se introduce 3 mm aguja de la jeringa (con aguja 30G × 8 mm o de 21G × 38/40 mm) con firmeza de forma tangencial, de modo que solo atravesase la dermis dentro de la lesión, se aspira suavemente con el émbolo de la jeringa y con la presión negativa se hacen movimientos circulares, junto con pequeños movimientos de entrada y salida del émbolo, sin soltar la aspiración, y el material obtenido es enviado al laboratorio.

La extracción de ADN se llevó a cabo a partir de 5-10 minicírculos de la impronta y 200 uL de aspirado mediante kit de extracción ISOLATE II Genomic DNA Kit (Bioline, London, UK) y se cuantificó el ADN genómico mediante fluorometría, para verificar la viabilidad de la muestra. La amplificación del blanco molecular (120 pb de la región conservada de los minicírculos del cinetoplasto) se realizó utilizando los iniciadores OL1F (5' GGG GAG GGG CGT TCT GCG AA-3') y OL2R (5' CCG CCC CTA TTT TAC ACC AAC CCC-3') (16-17), que anillan en los orígenes de replicación de las dos hebras de los minicírculos bajo las siguientes condiciones: 0,055 U/μL de Taq polimerasa Hot-start (Bioline UK), 5X de Buffer Taq polimerasa Hot-start (Bioline UK), 25 mM de MgCl₂ (Bioline UK), 10 mM de dNTPS (SIGMA EU), 10 uM de iniciadores (IDT EU) y 5 uL de ADN sin diluir, para un volumen total de 20 μL. El perfil térmico consistió en una denaturación inicial: 94 °C por 4 min, seguido de 30 ciclos de denaturación a 94 °C por 30 s. Anillamiento a 55 °C por 30 s extensión a 72 °C por 30 s y una extensión final: 72 °C por 10 min. Técnica previamente estandarizada en el LRI-DISAN basada en la tesis de grado de Jojoa (18). Y el producto de la amplificación se visualizó mediante una electroforesis en gel de agarosa del 3,0% (figura 2). los resultados estadísticos fueron analizados haciendo uso del programa estadístico SPSS versión 19.

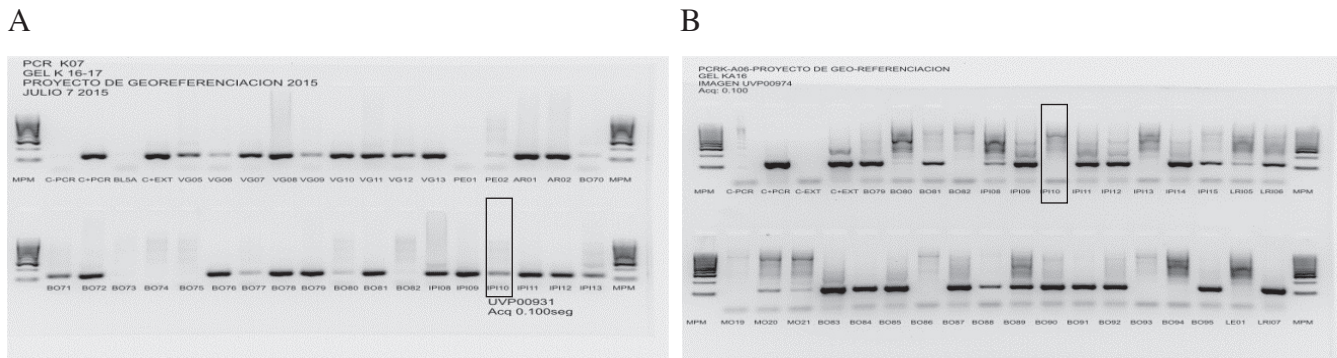


Figura 2. Imágenes de geles de agarosa al 3% que evidencia amplificación del blanco molecular CR-impronta (A) y aspirado (B). Los rectángulos corresponden a muestras de impronta y aspirado de un mismo paciente, en los que se evidencia que, mientras el aspirado arrojó un resultado negativo, la impronta permitió detectar ADN del parásito.

Fuente: Imágenes LRI-DISAN.

Resultados

El 90,07% (245/272) de las improntas arrojaron resultados positivos para la detección de ADN de parásitos de *Leishmania*; el 9,5% (26/272) de las muestras dieron resultados negativos. Y el 0,36% (1/272) de las improntas arrojaron un resultado no concluyente. Por su parte, el 86,3% (235/272) de los aspirados dieron positivo, y el 12,86% (35/272) dieron negativo para la detección del ADN del parásito y un 0,74% (2/272) resultado no concluyente (figura 3). La sensibilidad de la toma de muestra por impronta y el aspirado presentó valores del 90,07 y del 86,3%, respectivamente.

Discusión

La expansión de las operaciones militares en Colombia a zonas entre las que predominan las selvas tropicales donde se encuentran focos de transmisión aumenta los factores de riesgo de adquirir LC, lo que incrementa la incidencia de la enfermedad en esta población.

Así es que entre 2005 y 2010 ocurrieron más de 45 000 casos de LC en los soldados, como refiere la Organización Mundial de la Salud (OMS) (19). Y entre 2011 y 2015 se evidencia un incremento muy discreto pero constante según los datos obtenidos de bases de datos del Ejército.

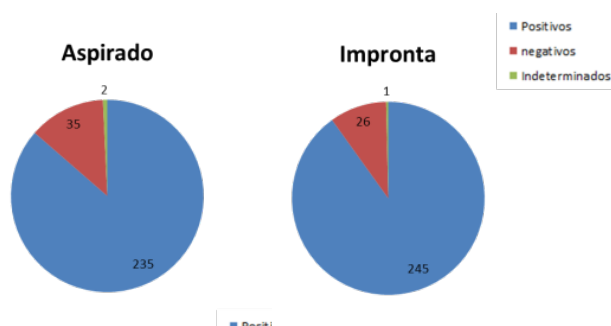


Figura 3. Comparación de resultados de la reacción en cadena de la polimerasa según el tipo de toma de muestra. La impronta versus aspirado la amplificación del kDNA a partir de muestras de impronta presentó mejores resultados al determinar el 90,07% de las muestras como positivas.

Fuente: Elaboración propia.

Los datos del Instituto Nacional de Salud en Colombia indican que durante la década de 1990 se notificaban en promedio 6500 casos nuevos de leishmaniosis cada año, cifra que aumentó a un poco menos de 20 000 casos notificados en 2005. Durante los años siguientes el promedio de casos fue de 14 400, de los cuales el 98% correspondieron a la forma cutánea. En la última década, la mayor parte de los casos notificados al Sistema de Salud Pública (Sivigila) corresponden al régimen de excepción con un aporte oscilado entre el 50 y el 55% de los casos totales de país (24).

Por consiguiente, se hace necesario establecer métodos para toma de muestra o diagnósticos rápidos, simples, oportunos, eficientes y económicos, con una sensibilidad igual o mayor de los ya conocidos.

El LRI-DISAN pudo comprobar mediante los resultados de sensibilidad de la PCR con dos tomas de muestra diferente, impronta y aspirado, las ventajas del método de impronta descritas por Boggild et al. (6, 15) que promete ser un método de fácil uso para toma de muestra en zonas apartadas, selváticas o endémicas, que finalmente se traduce en un diagnóstico rápido para un tratamiento eficaz y oportuno. De esta manera, se confirma lo referido por otros estudios de recoger y conservar en papel de filtro las muestras de LC para diagnóstico, afirmando que este método es conveniente para ser usado en condiciones de campo en países en desarrollo (20).

En 2014, Fadime y colaboradores realizaron estudios comparativos de la sensibilidad de los diferentes métodos de muestreo para diagnosticar LC mediante PCR convencional, que mostraron resultados para el frotis, el aspirado y la impronta del 60,6, el 49 y el 54,8%, respectivamente (21). En otros estudios, se han reportado sensibilidades para el cultivo del 62,8% y frotis del 74,4% (22), y con impronta para las úlceras infectadas secundariamente, la sensibilidad y especificidad fue del 100% (6).

Comparando estos valores con los obtenidos en el presente estudio, el 90,07% fueron positivos para impronta y el 86,3 % para aspirado, lo que muestra una mayor sensibilidad de la impronta con respecto al aspirado, que, aunque no es una diferencia muy marcada, el resultado sí concuerda con lo descrito en la literatura científica (21). Por lo que vale la pena optimizar el método probando una técnica de extracción más eficiente y un método de almacenamiento de los microcírculos de impronta que permitan aumentar la sensibilidad del método. No fue posible establecer la especificidad en este estudio porque se partió de la certeza de que el 100% de los pacientes participantes tenían un frotis positivo.

Las muestras negativas no fueron procesadas por ningún otro método, debido a que este estudio no influyó en el manejo o tratamiento de los pacientes, quienes debían cumplir con el criterio de inclusión de tener resultado positivo por frotis directo, y su resultado solo fue utilizado para los cálculos de sensibilidad respectivos.

Otra ventaja prometedora es en los casos en que las lesiones de LC pueden ser confundidas con otra clase de lesión dermatológica, en que se hace necesario realizar diagnósticos diferenciales, casos en que la impronta puede ser una toma de muestra, no invasiva, que se utilice con varios métodos diagnósticos y así se facilite la resolución favorable de la enfermedad.

El método de toma de muestra por impronta resultó ser efectivo para el diagnóstico de LC y es beneficioso para el Ejército Nacional, porque permite la toma de muestra en cualquier sitio de la geografía colombiana donde se encuentre el afectado y su conservación no exige mayores cuidados para su posterior procesamiento. Lo anterior influye directamente en los gastos de traslado e incapacidad del personal, oportunidad en el diagnóstico y pérdida del pie de fuerza, relacionados con el manejo actual de los pacientes, aclarando que esto no influye con la calidad y con el excelente Programa de Leishmaniasis con que se cuenta en el Ejército. Por tanto, la toma de muestra por impronta es una oportunidad de mejora en el diagnóstico, debido a que puede ser tomada por cualquier personal de salud sin un vasto conocimiento científico, posibilita el diagnóstico de leishmaniasis de forma oportuna para el suministro del tratamiento inmediato y de esta forma evitar posteriores complicaciones de la enfermedad. Por ende, amerita el ensayo del protocolo en tiempo real desde las diferentes zonas de operaciones del país.

Agradecimientos

Al Comando de Educación y Doctrina del Ejército Nacional (CEDOC) por su invaluable apoyo económico, y creer en nosotros como grupo de investigación y en cada uno de nuestros proyectos.

A la Dirección de Sanidad Ejército (DISAN) por permitirnos desarrollar los proyectos y fortalecer cada vez más el Laboratorio de Referencia e Investigación.

A nuestro comandante del Ejército por respaldar nuestros proyectos, siempre con “Fe en la Causa”.

Referencias

1. World Health Organization. Leishmaniasis. [internet] 2018 [citado 2019 marz 16]. Disponible en: www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/
2. Training in Tropical Diseases. Standards for cutaneous leishmaniasis clinical trials published. [internet] 2013 [citado 2016 marz 7]. Disponible en: https://www.who.int/tdr/news/2013/leishmaniasis_clinical_trials/en/
3. Reithinger R, Dujardin J-C. Molecular diagnosis of leishmaniasis: current status and future applications. *J Clin Microbiol.* 2007;45(1):21-25. DOI: 10.1128/JCM.02029-06
4. Magill AJ. Cutaneous leishmaniasis in the returning traveler. *Infect Dis Clin North Am.* 2005;19(1):241-266. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.idc.2004.11.005>
5. Boggild AK, Miranda-Verastegui C, Espinosa D, et al. Evaluation of a microculture method for isolation of Leishma-

- nia parasites from cutaneous lesions of patients in Peru. *J Clin Microbiol.* 2007;45(11):3680-3684. DOI: 10.1128/JCM.01286-07
6. Boggild AK, Ramos AP, Valencia BM, et al. Diagnostic performance of filter paper lesion impression PCR for secondarily infected ulcers and nonulcerative lesions caused by cutaneous leishmaniasis. *J Clin Microbiol.* 2011;49(3):1097-1100. DOI: 10.1128/JCM.02457-10
 7. Faber WR, Oskam L, van Gool T, et al. Value of diagnostic techniques for cutaneous leishmaniasis. *J Am Acad Dermatol.* 2003;49(1):70-74. <https://doi.org/10.1067/mjd.2003.492>
 8. Craine N, Parry J, O'toole J, et al. Improving bloodborne viral diagnosis; clinical audit of the uptake of dried blood spot testing offered by a substance misuse service. *J Viral Hepat.* 2009;16(3):219-222. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2893.2008.01061.x>
 9. Wheat PF. History and development of antimicrobial susceptibility testing methodology. *J Antimicrob Chemother.* 2001;48(1):1-4. https://doi.org/10.1093/jac/48.suppl_1.1
 10. Desbois D, Roque-Afonso AM, Lebraud P, et al. Use of dried serum spots for serological and molecular detection of hepatitis A virus. *J Clin Microbiol.* 2009;47(5):1536-1542.
 11. Ayele W, Schuurman R, Messele T, et al. Use of dried spots of whole blood, plasma, and mother's milk collected on filter paper for measurement of human immunodeficiency virus type 1 burden. *J Clin Microbiol.* 2007;45(3):891-896. DOI: 10.1128/JCM.01919-06
 12. Bensoussan E, Nasereddin A, Jonas F, et al. Comparison of PCR assays for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *J Clin Microbiol.* 2006;44(4):1435-1439. DOI: 10.1128/JCM.44.4.1435-1439.2006
 13. Boggild AK, Miranda-Verastegui C, Espinosa D, et al. Evaluation of a microculture method for isolation of Leishmania parasites from cutaneous lesions of patients in Peru. *J Clin Microbiol.* 2007;45(11):3680-3684. DOI: 10.1128/JCM.01286-07
 14. Boggild AK, Valencia BM, Espinosa D, et al. Detection and species identification of Leishmania DNA from filter paper lesion impressions for patients with American cutaneous leishmaniasis. *Clin Infect Dis T.* 2010;50(1):e1-e6. <https://doi.org/10.1086/648730>
 15. Boggild AK, Valencia BM, Espinosa D, et al. Detection and species identification of Leishmania DNA from filter paper lesion impressions for patients with American cutaneous leishmaniasis. *Clin Infect Dis T.* 2010;50(1):e1-e6. <https://doi.org/10.1086/648730>
 16. Brambilla D, Jennings C, Aldrovandi G, et al. Multicenter evaluation of use of dried blood and plasma spot specimens in quantitative assays for human immunodeficiency virus RNA: measurement, precision, and RNA stability. *J Clin Microbiol.* 2003;41(5):1888-1893. DOI: 10.1128/JCM.41.5.1888-1893.2003
 17. Craine N, Parry J, O'toole J, et al. Improving bloodborne viral diagnosis: clinical audit of the uptake of dried blood spot testing offered by a substance misuse service. *J Viral Hepat.* 2009;16(3):219-222. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2893.2008.01061.x>
 18. Desbois D, Roque-Afonso AM, et al. Use of dried serum spots for serological and molecular detection of hepatitis A virus. *J Clin Microbiol.* 2009;47(5):1536-1542. DOI: 10.1128/JCM.02191-08
 19. Eroglu F, Uzun S, Koltas IS. Comparison of clinical samples and methods in chronic cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 2014;91(5):895-900. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.13-0582>
 20. Magill AJ. Cutaneous leishmaniasis in the returning traveler. *Infect Dis Clin North Am.* 2005;19(1):241-266.
 21. Marques MJ, Volpini AC, Genaro O, et al. Simple form of clinical sample preservation and Leishmania DNA extraction from human lesions for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis via polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg.* 2001;65(6):902-906. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2001.65.902>
 22. Marques MJ, Volpini AC, Genaro O, et al. Simple form of clinical sample preservation and Leishmania DNA extraction from human lesions for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis via polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg.* 2001;65(6):902-906. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2001.65.902>
 23. Martinez AW, Phillips ST, Whitesides GM, et al. Diagnostics for the developing world: microfluidic paper-based analytical devices. *Anal Chem.* 2010;82(1):3-10. DOI: 10.1021/ac9013989
 24. Michalsky EM, Fortes-Dias CL, Pimenta PF, et al. Assessment of PCR in the detection of Leishmania spp. in experimentally infected individual phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2002;44(5):255-259. <http://dx.doi.org/10.1590/S0036-46652002000500004>
 25. Organización Mundial de la Salud. Control de las leishmaniasis. [internet] 2010 [citado 2019 marz 16]. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/82766/WHO%20TRS%20949%20spa.pdf;jsessionid=2DFC3BCACCB07457113F047233F3244E?sequence=1>
 26. Wheat PF. History and development of antimicrobial susceptibility testing methodology. *J Antimicrob Chemother.* 2001;48(1):1-4. https://doi.org/10.1093/jac/48.suppl_1.1
 27. Reithinger R, Dujardin J-C. Molecular diagnosis of leishmaniasis: current status and future applications. *J Clin Microbiol.* 2007;45(1):21-25. DOI: 10.1128/JCM.02029-06
 28. Smit PW, Elliott I, Peeling RW, et al. An overview of the clinical use of filter paper in the diagnosis of tropical diseases. *Am J Trop Med Hyg.* 2014;90(2):195-210.
 29. Training in Tropical Diseases. Standards for cutaneous leishmaniasis clinical trials published. [internet] 2013 [citado 2016 marz 7]. Disponible en: https://www.who.int/tdr/news/2013/leishmaniasis_clinical_trials/en/
 30. World Health Organization. Leishmaniasis. [internet] 2018 [citado 2019 marz 16]. Disponible en: www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/