

Utilidad de un nuevo ELISA para el diagnóstico de la Leishmaniasis cutánea en Guatemala

Nidia R. Rizzo,
Byron A. Arana,
Adelaine Chan¹,
Flora Arana,
Lisa Hochberg¹ y
Jeffrey Ryan¹

Resumen

Un estudio prospectivo para determinar la utilidad de un nuevo ELISA para el diagnóstico de la leishmaniasis cutánea, al compararlo con los métodos convencionales de frote y cultivo, fue realizado en Petén, Guatemala. Cuatro frotos y dos cultivos del borde de la lesión y muestras de sangre con y sin EDTA fueron tomadas de todos los pacientes. De los 98 participantes, 46 mujeres y 52 varones, la media de edad fue de 30 años y la del número de lesiones de 2. El diagnóstico parasitológico fue confirmado en 53 (54%) sujetos que tuvieron un resultado positivo en frote y/o cultivo. Solamente 28 (28.5%) fueron positivos para ambos métodos. Con el ELISA, utilizando suero o plasma del paciente y un antígeno de *L. mexicana*, la prueba identificó a 94 (96%) y 87 (89%) de los casos, respectivamente. Al utilizar un antígeno de *L. braziliensis*, con suero o plasma, se obtuvo un resultado positivo en 93 (95%) y 84 (86%) de los casos respectivamente. El tiempo de evolución o el tamaño de la lesión al momento en que el paciente se presentó a la clínica, no estuvo correlacionada con un resultado positivo en ninguno de los métodos evaluados. Los resultados indican que este nuevo ELISA es una alternativa diagnóstica adecuada, que no está limitada por una baja parasitemia debida a la cronicidad de las lesiones o a los inconvenientes de contaminación o mantenimiento de cultivos

Introducción

La leishmaniasis es una zoonosis, que ocurre cuando una mosca flebotomina se alimenta de un hospedero y durante este proceso lo infecta con parásitos de *Leishmania* spp. Clínicamente, la leishmaniasis puede presentarse en la forma visceral, mucocutánea y cutánea. La leishmaniasis cutánea (LC), es la forma más común y más frecuente de la enfermedad en todo el mundo y también en Guatemala. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que cada año ocurren más de 1.5 millones de nuevos casos (1). En el continente americano, la LC está presente desde Argentina hasta el norte de Tejas, EUA.

¹ Departamento de Entomología, División de Enfermedades Transmisibles e Inmunología, Instituto Walter Reed, Wa, USA

Los niveles de infección en los diferentes países pueden variar desde casos esporádicos, donde el impacto en la salud pública es mínimo, hasta regiones hiperendémicas, donde la mayoría de los individuos contraen la enfermedad antes de cumplir los 12 años de edad. La LC es una enfermedad muy temida, sobre todo en Latinoamérica, debido a la posibilidad de su diseminación a las mucosas. Esta condición es crónica, destruye el tejido que invade y es extremadamente difícil de tratar.

El agente causante de la LC fue reportado por primera vez en Brasil en 1909, mientras que en Guatemala no fue sino hasta cincuenta años más tarde que se hizo una breve descripción de la epidemiología de la leishmaniasis (2). Desde entonces se han reportado un gran número de casos y se han realizado varios estudios sobre la epidemiología y ecología de la enfermedad en las áreas endémicas del país. *Leishmania (Viania) braziliensis* y *L. mexicana* son los parásitos causantes de la enfermedad en la región de El Petén, Guatemala (3). Estos dos parásitos causan lesiones cutáneas, como puede observarse en las Gráficas 1 y 2, que pueden curar espontáneamente o que requieren y responden al tratamiento con antimoniales (4).

Los estudios realizados hasta el momento en Guatemala aún no terminan de identificar todos los elementos involucrados en el ciclo de transmisión de la enfermedad. Existen datos que indican que los perros pueden desempeñar un papel importante en la transmisión (5), sin embargo, no se sabe con seguridad qué especies de flebótomos transmiten la enfermedad, o cuál es el reservorio para las dos especies de parásitos que circulan en Guatemala. Tradicionalmente el diagnóstico de la LC se realiza demostrando la presencia de parásitos de *Leishmania* en frotis o cultivos de tejido tomado del borde de la lesión. Para la identificación de la especie del parásito se deben cultivar grandes cantidades de parásitos utilizando procedimientos engorrosos, caros y que requieren de mucho tiempo. Por otro lado se han hecho esfuerzos en el campo de la genética buscando “primers” para la detección de *Leishmania*; sin embargo éste es un proceso relativamente caro para ser implementado por los servicios de salud pública de los países en desarrollo. Por esta razón, a nivel mundial, existe la necesidad urgente de poder contar con pruebas diagnósticas prácticas, altamente sensibles y específicas.

Gráfica 1
Lesión típica de
leishmaniasis cutánea



Gráfica 2
“Oreja del Chiclero” nombre común con
el cual se conoce este tipo de lesiones
que afectan pabellón auricular, el cual
puede en casos extremos perderse
totalmente.



Utilizando pruebas serológicas, se puede escoger la respuesta específica a un anticuerpo de un paciente y utilizarla como indicador de infección o de exposición al parásito. Esto es especialmente cierto para el caso de la leishmaniasis visceral (LV) o *Kala Azar*, donde se han reportado pruebas altamente sensibles (6, 7) como el “*dipstick rK39*”, el cual ha venido a resolver el problema de diagnóstico para la LV; sin embargo, esta prueba no ha demostrado ser un sistema eficiente para el diagnóstico de LC. Los intentos realizados para el desarrollo de pruebas serológicas para el diagnóstico de la LC no han dado muy buenos resultados hasta el momento (8, 9). En todos los casos se ha utilizado antígenos de cultivo de promastigotes (10-12) o de proteínas recombinantes (13); sin embargo, cuando se prepara un antígeno crudo a partir de lisados de células, éste carece de algunos productos metabólicos importantes que los parásitos vierten, secretan y excretan, los cuales juegan un papel importante en el diagnóstico (14, 15). Un componente de estos antígenos, un factor excretado, se identificó como una sustancia similar a un carbohidrato cargado negativamente, el cual ha demostrado tener una gran afinidad por anticuerpos del suero de conejos infectados con promastigotes de *Leishmania* spp. (16, 17).

Hasta el momento ningún otro antígeno ha demostrado tener posibilidades para ser utilizado en el desarrollo de pruebas inmunodiagnósticas para la LC. Recientemente, el desarrollo de una nueva formulación para medios de cultivo sin proteína y sin suero (XOM), condujo a obtener un antígeno soluble de *Leishmania donovani* el cual sirvió de base para el desarrollo de una prueba muy sensible y específica, para el diagnóstico de pacientes con LV (18). Utilizando este ELISA con algunas modificaciones que lo hacen más sensible para detectar IgGs específicas en los sueros de pacientes con LC, Ryan logró identificar correctamente 92.3% de un grupo de 143 pacientes con LC en el Brasil (19).

A fin de determinar la utilidad de esta nueva prueba para el diagnóstico de LC, se realizó un estudio prospectivo en Guatemala comparando este nuevo ELISA con los procedimientos convencionales de frotis y cultivos, que son los métodos de diagnóstico rutinariamente utilizados por el Programa de Leishmaniasis del Centro de Estudios en Salud del Instituto de Investigaciones de la Universidad del Valle de Guatemala.

Materiales y Métodos

- Población de estudio

El estudio se realizó en el Centro de Salud de Poptún, Petén, Guatemala. A todos los adultos que se presentaron a la clínica de leishmaniasis, con lesiones sospechosas de ser LC se les preguntó si deseaban participar en el estudio. Aquellos que voluntariamente aceptaron participar se les pidió que leyeran y firmaran el formulario de consentimiento voluntario de participación. A cada paciente se le asignó un número de identificación único, con el fin de proteger su identidad. Este número se utilizó para identificar las muestras que se le tomaron y la historia clínica de cada uno. Un médico experimentado en el diagnóstico y tratamiento de la LC tomó las muestras de los pacientes.

- Toma de muestra

A cada paciente se le tomó una muestra de sangre venosa en dos tubos *vacutainer* de 5ml, con y sin anticoagulante (EDTA). Las muestras fueron centrifugadas y el suero y plasma separados, trasvasados a tubos cónicos de 3ml, y almacenados a -20°C para su análisis en el laboratorio. Las muestras convencionales incluyeron la toma de cuatro frotis para el diagnóstico directo y dos aspirados para cultivo del parásito. Todas las muestras fueron tomadas del borde de la lesión siguiendo métodos ya descritos (20).

- Antígeno y preparación de la placa de ELISA

Se inocularon promastigotes en 200ml de un medio sin proteína, obteniendo una densidad final de 1×10^8 células/ml. Los parásitos se incubaron a 26°C por 72 h en botellas de 2L. Al finalizar el período de incubación, se centrifugó el medio a 9,000 xg por 30 min y se estimó la concentración relativa de la proteína del antígeno soluble (exo-antígeno) midiendo la densidad óptica a 280nm (21). Se utilizaron placas de microtítulo de poliestireno de 96-pozos (Immulon IV, laboratorios de Dynatech, Chantilly, VA), las cuales se sensibilizaron cubriéndolas con 0.1 ml de la solución del exo-antígeno de *L. braziliensis* (MERTU1350, cepa de Guatemala) y *L. mexicana* (UNAM-FD, México) (5µg de proteína por pozo). Las placas se bloquearon con 0.5% de caseína (Sigma Chemical Co, St Louis, MO) en PBS por una hora a temperatura ambiente.

- ELISA para la captura de anticuerpos de *Leishmania*

Para la detección de IgG específica para *Leishmania spp*, se utilizó un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima estándar (ELISA). Conviene resaltar que este ELISA está diseñado para detectar únicamente anticuerpos IgG en el hospedero. La muestra de cada paciente se diluyó en un *buffer* de bloqueo de caseína hervida al 0.5% y posteriormente se colocó en duplicado en las

placa ya sensibilizadas. Después de un período de incubación de dos horas, la placa se lavó cuatro veces con PBS- Tween y se incubó nuevamente por 30 min con una solución conteniendo anticuerpos policlonales del conjugado-HRP anti humano IgG (Kikegaard& Perry Laboratorios, Gaithersburg, MD). Posteriormente, la placa se lavó cuatro veces y se agregó el sustrato (TMB, K&PL). Se monitoreó la densidad óptica de las muestras a 650nm hasta que el control positivo alcanzara un valor de 0.85. En ese momento la reacción se paró con ácido fosfórico 0.1N y se leyó la placa a 450nm. Las muestras de los participantes del estudio se compararon contra un grupos de muestras conocidas, controles negativos (n=12) y controles positivos (n=3), que fueron corridas en cada placa. El punto de corte se obtuvo utilizando la media y la desviación estándar del grupo de controles negativos (3x desviación estándar + media) (22).

Resultados

- Características de los participantes y sus lesiones

Un total de 98 pacientes atendidos en la clínica de Leishmaniasis del Centro de Salud en Poptún, aceptaron voluntariamente participar en el estudio. De los 98 participantes 46 fueron mujeres y 52 varones. La edad media de los participantes fue de 30 años (18-66). El número de lesiones varió de 1 a 7 por paciente, con una media de 2.4. Basándose en lo reportado por el paciente, el tiempo de evolución de las lesiones varió de 1 a 1643 días, con una media de 137 días.

- Diagnóstico convencional

Solamente los pacientes con frotos y/o cultivos en los cuales se pudo demostrar la presencia de parásitos de *Leishmania spp* fueron considerados como verdaderos positivos (VP), mientras que aquellos en los cuales no se demostró la presencia de parásitos, pero que por clínica y experiencia del médico tratante se diagnosticaron como LC, se clasificaron como presuntos positivos (PP).

De los 98 participantes, 53 (54%) dieron un resultado positivo en frote y/o cultivo, mientras solamente 28 (28.5%) fueron positivos para ambos métodos. Al separar por métodos, 40 (40.8%) fueron positivos en frotos y 41 (41.8%) en cultivos. En total, en el estudio se incluyeron 53 (54%) verdaderos positivos y 45 (46%) presuntos positivos.

ELISA

En general, indistintamente del antígeno o del material utilizado en la prueba, el ELISA identificó como positivo a 97 (98.9%) de los 98 casos. Utilizando suero del paciente y antígeno de *L. mexicana* para sensibilizar las placas, la prueba identificó, 94 (96%) de los casos; mientras que utilizando plasma con el mismo antígeno, la prueba identificó como positivo a sólo 87 (89%) de los casos. Cuando se utilizó el suero con antígeno preparado de *L. braziliensis*, la prueba identificó correctamente 93 (95%) casos y utilizando plasma y el mismo antígeno de *L. braziliensis*, solamente se logró identificar 84 (86%) de los casos. Ambos antígenos demostraron poder identificar los VP y PP de manera muy similar, y mostraron ser mejor que las láminas y/o cultivos para diagnosticar LC. Todos los pacientes con un diagnóstico parasitológico confirmado a través de los métodos convencionales, tuvieron un resultado positivo en una o más de las pruebas de ELISA.

Las Tablas 1 y 2 resumen los resultados de las densidades ópticas y los análisis de estadística descriptiva obtenidos utilizando antígenos de *L. mexicana* o *L. braziliensis* con muestras de suero o plasma. Combinando el resultado de los métodos convencionales con el resultado de las pruebas serológicas, 97 (98.9%) de los 98 participantes en el estudio, tuvieron un resultado positivo en una o más de los métodos diagnósticos. El tiempo de evolución y el tamaño de la lesión al momento en que el paciente se presentó a la clínica, no estuvieron correlacionados con un resultado positivo en ninguno de los métodos evaluados.

TABLA 1

Resultados de la prueba de ELISA utilizando un antígeno en *L. mexicana* en muestras de suero y plasma de pacientes con leishmaniasis cutánea.

en donde:
 DO = Densidad Óptica
 IC = Intervalo de Confianza
 PP = Presunto Positivo; paciente con diagnóstico clínico de leishmaniasis.
 VP = Verdadero Positivo; pacientes con diagnóstico parasitológico de leishmaniasis confirmado.

	Antígeno de <i>L. mexicana</i>			
	Suero		Plasma	
	VP	PP	VP	PP
Número de muestras	53	45	53	45
DO Mínima	0.336	0.259	0.181	0.145
DO Mediana	1.120	0.998	0.804	0.759
DO Máxima	2.482	3.050	1.750	3.238
Media	1.163	1.193	0.858	0.999
Desviación Std.	0.535	0.699	0.409	0.690
IC al 95% (Inferior)	1.014	0.985	0.744	0.794
IC al 95% (Superior)	1.312	1.401	0.972	1.204
Sensibilidad	97%		88%	

TABLA 2

Resultados de la prueba de ELISA utilizando un antígeno en *L. braziliensis* en muestras de suero y plasma de pacientes con leishmaniasis cutánea.

	Antígeno de <i>L. braziliensis</i>			
	Suero		Plasma	
	VP	PP	VP	PP
Número de muestras	53	45	53	45
DO Mínima	0.377	0.232	0.361	0.229
DO Mediana	1.312	1.137	1.181	1.064
DO Máxima	3.147	3.339	2.860	2.864
Media	1.345	1.351	1.234	1.224
Desviación Std	0.657	0.747	0.540	0.699
IC al 95% (Inferior)	1.167	1.129	1.083	1.016
IC al 95% (Superior)	1.533	1.572	1.384	1.431
Sensibilidad	96%		85%	

en donde:

- DO = Densidad Óptica
 IC = Intervalo de Confianza
 PP = Presunto Positivo; paciente con diagnóstico clínico de leishmaniasis.
 VP = Verdadero Positivo; pacientes con diagnóstico parasitológico de leishmaniasis confirmado.

Discusión

El objetivo del presente estudio fue determinar la utilidad de un nuevo ELISA para el diagnóstico de la LC, y comparar su sensibilidad con los métodos tradicionales de frotis y cultivos de lesiones. Los resultados obtenidos muestran que utilizando suero y antígenos de *L. braziliensis* o *L. mexicana*, la prueba identificó al 95% y 96% de los casos, respectivamente. Esta tasa de positividad fue más alta y estadísticamente diferente ($p < 0.05$) a la reportada en el pasado utilizando los mismo métodos convencionales (20) que fueron del 70% y del 54% respectivamente. Para el análisis de los resultados se definieron dos grupos de análisis: a) pacientes con diagnóstico parasitológico confirmado por los métodos tradicionales, y b) pacientes con solamente un diagnóstico clínico. La presunción de que estas lesiones realmente correspondían a una infección por *Leishmania spp* se basó en la historia proporcionada por los pacientes, las características clínicas de la lesión, la experiencia del investigador de más de 15 años trabajando con leishmaniasis en el área de estudio y la respuesta terapéutica a los antimoniales observada en los pacientes. La sensibilidad del diagnóstico clínico, basados en los elementos anteriormente mencionados, ha sido probada en múltiples sitios, lo cual ha derivado en propuestas de algoritmos diagnósticos que puedan ser empleados en el campo por los trabajadores de salud, para el diagnóstico

de la LC (23-25). La certeza de que los sujetos con un diagnóstico presuntivo, realmente estaban infectados con parásitos de *Leishmania spp* se ve apoyada por los resultados de ELISA (Tablas 1 y 2) en los cuales se observa que no existen diferencias en las densidades ópticas obtenidas entre los VP y los PP, pero sí cuando se comparan estos dos grupos con los negativos.

De la comparación entre los VP con los PP, se puede concluir lo siguiente: a) el diagnóstico clínico es altamente sensible, b) los métodos convencionales de diagnóstico son poco sensibles, y c) el nuevo ELISA es una alternativa diagnóstica adecuada que no está limitada por una baja parasitemia debida a la cronicidad de las lesiones o a los inconvenientes de realizar y mantener cultivos. En cuanto al tipo de muestra, los hallazgos indican que con los antígenos utilizados, el uso de suero para la detección de anticuerpos tiene una leve ventaja al compararla con el uso de plasma (98% vs 95%).

Queda por determinar el comportamiento de la prueba de ELISA en aquellos sujetos con infecciones sub-clínicas o con lesiones no activas, en los cuales cabría la posibilidad de obtener un resultado positivo ya que el sistema inmune se habría activado al momento en el que el individuo se expuso al parásito. Debido a que no se conoce la dinámica de la respuesta inmune, es imposible predecir lo que determinado nivel de IgG detectado por este medio significa, y consecuentemente, lo único que podría asegurarse en estos casos, es que el individuo estuvo expuesto al parásito. Si este fuera el caso, el valor verdadero de la prueba sería en estudios epidemiológicos, donde se necesite documentar la exposición al parásito, como en el caso de movimiento de tropas y personal militar, para personas de áreas no endémicas que visitan las áreas endémicas por razones de trabajo, o ecoturismo. En cualquiera de los escenarios, lo interesante de este ELISA es que se tiene un antígeno nuevo, que ha logrado superar los problemas técnicos que han presentado otros antígenos en el pasado, permitiendo una alta sensibilidad para la detección de anticuerpos en pacientes con leishmaniasis cutánea.

Agradecimientos

Los autores deseamos agradecer a la TS Estela Flores y al Dr. Edgar Méndez por el apoyo logístico para la evaluación de los pacientes en el Centro de Salud de Poptún. Este estudio fue financiado parcialmente con fondos del Programa de Investigación de Enfermedades de la Guerra del Golfo, del Departamento de Defensa de los Estados Unidos de Norte América Proyecto No PE-0601105D8Z. Las opiniones expresadas por los autores no pretenden ser las de la Universidad del Valle de Guatemala ni del Ejército o del Departamento de Defensa de los Estados Unidos.

Bibliografía

1. Berman, J.D. *Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years* Clin. Infect. Dis. 24: 684 – 703, 1997
2. De León, R. *Breve Comunicación sobre el área potencial de Kala Azar guatemalense y secuencia de estudio epidemiológico* Rev. Col. Med. Guat. 10: 79-82, 1959
3. Navin, T.R et al. *Cutaneous leishmaniasis in Guatemala: isoenzyme characterization of isolates from humans* Am. J. Trop. Med. Hyg. 38: 50 – 1, 1988
4. Herwaldt, B.L. et al. *The natural history of cutaneous leishmaniasis in Guatemala* J. Infect. Dis.165: 518 – 27, 1992
5. Ryan, P.R. et al. *The domestic dog, a potential reservoir for Leishmania in the Peten region of Guatemala* Vet Parasitol.115: 1 – 7, 2003
6. Senaldi, G. et al. *Serological diagnosis of visceral leishmaniasis by a dot-enzyme immunoassay for the detection of Leishmania donovani-related circulating antigen* J. Immunol. Methods.193: 9 – 15, 1996
7. Bagchi, A.K. et al. *The latex agglutination test: standardization and comparison with direct agglutination and dot-ELISA in the diagnosis of visceral leishmaniasis in India* Ann. Trop. Med. Parasitol. 92: 159 – 63, 1998
8. Anthony, R.L. et al. *Micro enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the serodiagnosis of New World leishmaniasis* Am. J. Trop. Med. Hyg. 29: 190 – 4, 1980
9. Garcia, M.R et al. *Localized cutaneous leishmaniasis (chiclero's ulcer) in Mexico: sensitivity and specificity of ELISA for IgG antibodies to Leishmania mexicana mexicana* Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 84: 356 – 8, 1990
10. Choudhary, A. et al. *An indirect fluorescent antibody (IFA) test for the serodiagnosis of kala azar* J. Comm. Dis. 24: 32 – 36, 1992
11. Badaro, R. et al. *Evaluation of the micro enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA) for antibodies in American visceral leishmaniasis: antigens selection for detection of infection-specific responses* Am. J. Trop. Med. Hyg. 35: 72 – 78, 1986
12. Choudhary, A. et al. *Enzyme linked immunoabsorbent assay in the diagnosis of kala azar in Bhadohi (Varanasi), India* Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 84: 363 – 6, 1990
13. Reed, S.G. et al. *An improved diagnostic procedure for visceral leishmaniasis* Am. J. Trop. Med. Hyg. 43: 632 – 9, 1990
14. Schnur, L.F. et al. *Leishmanial serotypes as distinguished by the gel diffusion of factors excreted in vitro and in vivo* Isrl. J. Med. Sci. 8: 932 – 42, 1972
15. Sergeiev, V.P. & Shikuna, E.V. *Soluble antigen in Leishmania tropica major* Med. Parasitol. 38: 208 – 12, 1969
16. El-On, J. et al. *Leishmania donovani: Physicochemical, immunological, and biological characterization of excreted factor from promastigotes* Exper. Parasitol. 47: 254 – 69, 1979
17. Bray, R.S. & Lainson, R. *The immunology and serology of leishmaniasis. iv. Results of Ouchterlony double diffusion tests* Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 60: 605 – 09, 1966
18. Martin, S.K. et al. *A diagnostic ELISA for visceral leishmaniasis, based on antigen from media conditioned by Leishmania donovani promastigotes* Ann. Trop. Med. Parasitol. 92: 571-7, 1998



Nidia Rizzo

nrrz@cdc.gov

Licenciatura en Biología en la Universidad del Valle de Guatemala

Laboratorio de Leishmaniasis e Inmunología
Centro de Estudios en Salud, Instituto de Investigaciones, UVG



Byron Arana

Baaz@cdc.gov

Doctorado (Ph.D.) en Medicina Tropical de la Universidad de Liverpool, Inglaterra

Co-Director Centro de Estudios en Salud, Instituto de Investigaciones, UVG



Flora Arana

feaz@cdc.gov

Doctorado (Ph.D.) en Bioquímica por la Universidad de Granada, España.

Laboratorio de Enfermedades Infecciosas, Centro de Estudios en Salud, Instituto de Investigaciones, UVG

19. Ryan, J.R. et al. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Based on Soluble Promastigote Antigen Detects Immunoglobulin M (IgM) and IgG Antibodies in Sera from Cases of Visceral and Cutaneous Leishmaniasis* J. Clin. Microbiol. 30: 1037 – 43, 2002
20. Navin, T.R. et al. *Cutaneous leishmaniasis in Guatemala: Comparison of diagnostic methods* Am. J. Trop. Med. Hyg. 42: 36 – 42, 1990
21. Peterson, G.L. *Determination of total protein* Methods Enzymol. 91: 95-119, 1983
22. Kurstak, E. *Progress in enzyme immunoassays: production of reagents, experimental design and interpretation* Bull. Wld. Hlth. Org. 63: 793 – 811, 1985
23. Weigle, K.A. et al. *A clinical prediction rule for American cutaneous leishmaniasis in Colombia* Int. J. Epidemiol. 22: 548 – 58, 1993
24. Kubba, R.Y. et al. *Clinical diagnosis of cutaneous leishmaniasis (oriental sore)* J. Am. Acad. Dermatol. 16: 1183 – 89, 1987
25. Faber, W.R. et al. *Value of diagnostic techniques for cutaneous leishmaniasis* J. Am. Acad. Dermatol. 49: 70 – 4, 2003