

**MÉTODOS DIAGNÓSTICOS PARASITOLÓGICOS, INMUNOLÓGICOS, HISTOPATOLÓGICOS Y MOLECULARES DE LEISHMANIASIS CUTÁNEA.****PARASITOLOGIC, IMMUNOLOGIC, HISTOPATHOLOGIC AND MOLECULAR DIAGNOSIS OF CUTANEOUS LEISHMANIASIS.****Ríos Yuil, José Manuel\* ; Yuil de Ríos, Emma<sup>†</sup>**

\*Médico Residente de Dermatología del Complejo Hospitalario Dr. Arnulfo Arias Madrid, Caja de Seguro Social. Ciudad de Panamá, República de Panamá.

<sup>†</sup> Especialista en Dermatología de la Policlínica San Fernando Norte y de la Caja de Seguro Social.

Ex-presidenta de la Asociación Panameña de Dermatología.

Delegada de Panamá ante el Colegio Iberoamericano de Dermatología. Ciudad de Panamá, República de Panamá.

**Recibido: 17 de enero de 2011**

**Aceptado: 11 de noviembre de 2011**

Ríos JM, Yuil de Ríos E. Métodos diagnósticos parasitológicos, inmunológicos, histopatológicos y moleculares de Leishmaniasis cutánea. Rev méd cient. 2010;23(2):45-60.

**RESUMEN**

El tratamiento de la leishmaniasis es difícil y suele asociarse a efectos adversos por lo que es importante la confirmación diagnóstica pre-tratamiento. Los principales datos diagnósticos son clínicos y epidemiológicos; sin embargo, para el diagnóstico definitivo se requieren pruebas adicionales. Las principales pruebas diagnósticas son las parasitológicas, inmunológicas, histopatológicas/inmunopatológicas y moleculares. La mayoría de los métodos parasitológicos permiten aislar el parásito viable; sin embargo, son técnicamente complicados y tienen baja sensibilidad. Los métodos inmunológicos son empleados con frecuencia; pero su utilidad es limitada en áreas endémicas. Las técnicas histopatológicas/inmunopatológicas nos permiten observar el parásito y estudiar el infiltrado inflamatorio; sin embargo, las técnicas histopatológicas tienen baja sensibilidad. Los métodos moleculares son los más sensibles y específicos y permiten identificar especies y cepas; sin embargo, su complejidad y costos limitan su aplicación rutinaria en laboratorios clínicos. En el futuro, las técnicas moleculares se convertirán en el nuevo estándar de oro diagnóstico.

**PALABRAS CLAVES:** Leishmaniasis cutánea, pruebas diagnósticas, técnicas de cultivo, leishmanina, biopsia, ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima, inmunohistoquímica, técnicas de diagnóstico molecular, reacción en cadena de la polimerasa.

**ABSTRACT**

It is important to have a diagnostic confirmation of leishmaniasis before starting any medication because treating this disease is difficult and is usually related with adverse effects. The main diagnostic data comes from the clinical exam and the epidemiology. However, the definite diagnosis requires additional tests. The main diagnostic tests are parasitological, immunological, histopathological/immunopathological and molecular techniques. Most parasitological methods allow the isolation of viable parasites; however, they are technically complicated and have low sensitivities. The immunological methods are frequently used, but their utility is limited in endemic areas. The histopathological/immunopathological techniques allow the observation of the parasite and the inflammatory infiltrate; but the histopathological techniques have low sensitivities. Molecular methods are the most sensitive and specific and allow the identification of species and strains; however, their complexity and related costs limit their routine application in clinical laboratories. In the future, molecular methods will be the new diagnostic gold standard.

**KEYWORDS:** Cutaneous leishmaniasis, diagnostic tests, culture techniques, leishmanin, biopsy, enzyme-linked immunosorbent assay, immunohistochemistry, molecular diagnostic techniques, polymerase chainreaction.

Métodos diagnósticos parasitológicos, inmunológicos, histopatológicos y moleculares de Leishmaniasis cutánea by Jose Manuel Rios Yuil, Emma Yuil de Ríos is licensed under a [Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0 Unported License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/).

Permissions beyond the scope of this license may be available at [www.revistamedicocientifica.org](http://www.revistamedicocientifica.org).



## INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis es endémica en más de 60 países en América Central, América del Sur, India, el Oriente Medio, el Norte de África y el Sur de Europa.<sup>1</sup> Se estima que aproximadamente 12 millones de personas se encuentran infectadas por parásitos del género *Leishmania* y cada año se reportan alrededor de 2 millones de nuevos infectados. Aproximadamente 350 millones de personas viven en zonas de riesgo.<sup>2</sup>

Existen 3 formas clínicas principales de leishmaniasis con compromiso cutáneo: la leishmaniasis cutánea localizada (LCL), la leishmaniasis cutánea difusa (LCD) y la leishmaniasis mucocutánea (LMC). La LCL se manifiesta como una o múltiples pápulas que aumentan de tamaño y que típicamente se ulceran. Las lesiones se localizan principalmente en las extremidades inferiores y demoran entre 3 y 18 meses para curar en más del 90 % de los casos.<sup>1</sup> Las principales especies causales de LCL son miembros de los complejos *L. mexicana*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. tropica*, *L. aethiopica* y *L. major*.<sup>3</sup> En la LCD ocurre diseminación de lesiones nodulares cargadas de parásitos en toda la piel. La LCD es causada más frecuentemente por especies del complejo de la *L. mexicana* y por *L. aethiopica*.<sup>1</sup> La LMC se caracteriza por inflamación granulomatosa de la mucosa de la nariz, cavidad oral y faringe, que lleva a destrucción del tabique nasal y del paladar. Las lesiones mucosas pueden aparecer simultáneamente con un cuadro de LC; sin embargo, lo más frecuente es que aparezcan después. Las especies más frecuentemente asociadas con la LMC son la *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis*, y *L. amazonensis*.<sup>1</sup>

El tratamiento de la leishmaniasis es difícil y, con frecuencia, se asocia a importantes efectos adversos. Es por esto que es fundamental confirmar el diagnóstico de la enfermedad antes de iniciar la terapia. Las características clínicas mencionadas con anterioridad y la epidemiología son importantes para el diagnóstico de la enfermedad. El nexo epidemiológico se utiliza principalmente para hacer el diagnóstico en regiones donde la enfermedad no es endémica. El ejemplo más típico es el de aquellas personas que viajan a países tropicales y luego desarrollan una lesión clínicamente sugestiva. En regiones endémicas, el nexo epidemiológico no es tan útil para el diagnóstico debido a que toda la población se encuentra en riesgo. El diagnóstico clínico tampoco es definitivo. De hecho, la leishmaniasis se puede confundir con múltiples enfermedades como: esporotricosis, tuberculosis cutánea, úlceras traumáticas, úlceras venosas, úlceras falcémicas, blastomicosis, sarcoidosis, carcinoma escamoso, carcinoma basocelular, linfoma cutáneo de células B, pioderma gangrenoso, entre otras. Como los criterios clínicos y epidemiológicos sólo nos permiten hacer un diagnóstico probable de la enfermedad, es indispensable la utilización de pruebas de laboratorio para lograr un diagnóstico definitivo.<sup>4</sup> Por esta razón, el objetivo de esta revisión es describir los principales métodos parasitológicos, inmunológicos, histopatológicos y moleculares para el diagnóstico de Leishmaniasis cutánea.

## DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO

El diagnóstico parasitológico se hace mediante frotis, cultivo, inoculación de animales o xenodiagnóstico.<sup>5</sup>

## 1) Frotis:

El frotis nos permite la observación directa del parásito. Puede hacerse de varias formas: la impresión o preparación por impronta, la realización de una pequeña incisión para la obtención de material, el raspado de la superficie cutánea con un bisturí o mediante la aspiración con aguja fina.<sup>6</sup> Este material es observado en el microscopio luego de que es coloreado con la tinción de Giemsa o con alguna de las tinciones de tipo Romanowsky. Para hacer un buen examen directo, un microscopista entrenado debe evaluar, por lo menos, dos frotis por 1 hora. A pesar de esto, puede haber falsos negativos.<sup>7</sup> Entre las ventajas del uso del frotis se pueden mencionar: bajo costo, relativa facilidad para la realización, rapidez en la obtención del resultado y no requerir un laboratorio con equipo sofisticado.<sup>5</sup>

La sensibilidad de esta prueba aumenta del 40 al 80 % dependiendo de sí se toma una muestra o cuatro muestras de la lesión para el examen microscópico. Tradicionalmente, el frotis para el estudio por leishmaniasis se ha tomado del borde indurado de la úlcera; sin embargo, también se han utilizado muestras tomadas del fondo de la úlcera. Un estudio reveló que cuando se toma la muestra del borde de la úlcera se obtiene una sensibilidad del 78,3 %; sin embargo, cuando la muestra es tomada del fondo de la úlcera, la sensibilidad aumenta a un 90,4 %. Es por esto que, entre las recomendaciones para la realización de un buen examen directo, se incluyen la toma de muestras tanto del borde como del fondo de la úlcera. Otras recomendaciones son: lograr una buena hemostasia en el sitio en el que se toma la

muestra para evitar contaminación con eritrocitos o hemoglobina y el examen cuidadoso de toda la placa en busca de amastigotes. En los pacientes con enfermedad crónica, se recomienda complementar el frotis con un cultivo del aspirado con aguja fina.<sup>5</sup>

## 2) Cultivo:

El cultivo del material proveniente de las lesiones cutáneas nos permite la visualización directa del parásito y aumentar la cantidad de parásitos vivos disponibles para la realización de pruebas adicionales. El cultivo del aspirado con aguja fina de la úlcera es un método sencillo y no traumático para lograr un diagnóstico definitivo con una sensibilidad de 67,5 %.<sup>5</sup> Otras fuentes estiman que su sensibilidad se encuentra entre 28,6 y 89 %.<sup>8</sup> Entre las ventajas del cultivo podemos mencionar: el ser económico, accesible y permitirnos aislar organismos para hacer pruebas de susceptibilidad a medicamentos, especiación y genotipificación.<sup>9</sup> Sin embargo, también tiene desventajas como: requerir equipo especial, consumir mucho tiempo, ser vulnerable a contaminación cuando se realiza en el campo y tener baja sensibilidad.<sup>5</sup>

El cultivo tradicional se hace en un sistema de cultivo bifásico constituido por agar sangre cubierto por un medio líquido. Este medio líquido debe ser muestreado periódicamente durante el período de incubación para buscar promastigotes móviles.<sup>9,10</sup> Entre las desventajas propias del sistema de cultivo tradicional se pueden mencionar: un período de incubación de entre 15 y 30 días y el requerimiento de gran cantidad de amastigotes en el inóculo debido al elevado volumen de medio líquido utilizado.<sup>9</sup>

El microcultivo y el minicultivo son alternativas metodológicas al cultivo tradicional. En el microcultivo, se utilizan tubos capilares de 70 µL con un medio líquido de una sola fase suplementado con cantidades variables de suero fetal bovino. El microcultivo tiene la ventaja de ser menos costoso, más fácil de usar y más sensible inclusive cuando la carga parasitaria es baja.<sup>9,10</sup> En un estudio, la sensibilidad del microcultivo fue de 71,7 %; mientras que la sensibilidad del medio de cultivo tradicional, en medio de Novy-MacNeal-Nicolle (NNN) modificado fue de 54,7 %.<sup>9</sup> Se considera que la mayor sensibilidad del microcultivo se debe a las condiciones microaerófilas y a la mayor concentración de CO<sub>2</sub> que se genera en este sistema. Estas condiciones son ideales para la transformación del amastigote en promastigote.<sup>9,10</sup> Otra ventaja del microcultivo es la reducción en el tiempo de incubación. El período de incubación con el microcultivo fue de 3 días (2-10 días), mientras que con el cultivo tradicional fue de 5 días (3-14 días).<sup>9</sup> Sin embargo, en el microcultivo se tiene, como limitación importante, la dificultad para extraer los organismos cultivados debido a los dos extremos sellados de los tubos capilares.<sup>9,10</sup>

Para tratar de solucionar el inconveniente de accesibilidad del microcultivo, surgió la idea del minicultivo. El minicultivo consiste en la utilización de un medio líquido monofásico en un tubo Eppendorf de 1,5 mL. Al igual que los tubos capilares, los tubos Eppendorf son baratos, tienen un volumen bajo y favorecen la generación de microaerofilia sin un efecto de dilución significativo. Además, al igual que en el cultivo tradicional, favorecen el fácil acceso a los parásitos para el posterior análisis de

susceptibilidad a medicamentos, especiación y genotipificación.<sup>10</sup> En un estudio, la sensibilidad del minicultivo fue del 76,3 %. Esta sensibilidad fue levemente inferior al 84,7 % que se obtuvo con el microcultivo y superior al 59,3 % que se obtuvo con el cultivo tradicional. El tiempo promedio de incubación en el minicultivo fue de 3 días (1-12 días). Este valor es igual a los 3 días del microcultivo y menor a los 5 días del cultivo tradicional. Por estas razones, se podría afirmar que el minicultivo fue ideado como una forma de capturar los aspectos positivos del cultivo tradicional y del microcultivo.<sup>10</sup>

### 3) Inoculación de animales:

Las infecciones en animales experimentales son utilizadas para aumentar la probabilidad de aislar el parásito con respecto a los medios de cultivo axénicos. Los hámsteres y los ratones BALB/c son los animales de laboratorio más comúnmente utilizados para el aislamiento de *Leishmania*. Los hámsteres son los más utilizados para aislar parásitos del género *Leishmania* debido a que son susceptibles a prácticamente todas las especies. Por el contrario, los ratones comunes tienden a mostrar varios grados de susceptibilidad frente a las distintas especies de *Leishmania* y son particularmente resistentes a la *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Por esto, si se van a utilizar ratones para las inoculaciones, se prefieren ratones BALB/c o ratones que tengan una delección en el gen del interferón gamma.<sup>11</sup>

### 4) Xenodiagnóstico:

Esta metodología también permite aislar los parásitos que causan la leishmaniasis. Se utilizan flebotominos no infectados y se les permite picar al ser humano o al animal infectado. De esta

manera, si el mamífero estuviera infectado, los insectos ingerirían los amastigotes y se daría el desarrollo del parásito en su tubo digestivo. Posteriormente, al extraer el tubo digestivo del insecto, se puede observar el parásito al microscopio.<sup>12</sup> Esta metodología no es de uso frecuente en el laboratorio clínico convencional por la gran dificultad que representa el establecer y mantener colonias de flebotominos.

## DIAGNÓSTICO INMUNOLÓGICO

### 1) Prueba de Montenegro:

La prueba de Montenegro o leishmanina es una indicadora de la respuesta inmune celular del paciente frente a la infección por *Leishmania*. Consiste en la inyección intradérmica de 0.1 mL de una suspensión que contiene de 3 a 4,5 millones de promastigotes muertos. En la prueba de Montenegro ocurre una reacción de hipersensibilidad retardada o tipo IV que es muy similar a la reacción inflamatoria granulomatosa que se observa en las lesiones producidas por *Leishmania*.<sup>13</sup> Todos los pacientes con LCL y LMC tienen una prueba de Montenegro positiva; mientras que es negativa en los pacientes con LCD.<sup>13, 14</sup> Ocurren falsos positivos en aproximadamente el 1 % de la población sana. Entre las desventajas de la prueba se pueden mencionar: la falta de leishmaninas disponibles comercialmente y la reactividad cruzada entre casi todas las especies y cepas de *Leishmania*.<sup>15</sup>

### 2) Serología:

Los métodos serológicos son sensibles y se aplican como pruebas diagnósticas indirectas en muchas enfermedades infecciosas. Se utilizan con mayor frecuencia para diagnosticar

leishmaniasis visceral debido a que en la LCL y LMC los títulos de anticuerpos suelen ser bajos.<sup>16</sup> Los métodos serológicos pueden alcanzar una sensibilidad de alrededor del 95 %; sin embargo, con ellos pueden ocurrir reacciones cruzadas. Estas reacciones ocurren principalmente en pacientes con enfermedad de Chagas, paracoccidioidomicosis u otras micosis profundas. Por esta razón, los resultados obtenidos mediante métodos serológicos idealmente deben ser confirmados a través de la utilización de métodos de diagnóstico parasitológico o molecular.<sup>17</sup> Las principales técnicas serológicas utilizadas para el diagnóstico de la infección por *Leishmania* son: prueba de aglutinación directa (DAT), prueba de aglutinación rápida para tamizaje (FAST), prueba de anticuerpos fluorescentes o inmunofluorescencia indirecta (IIFA), inmunoensayo ligado a enzima (ELISA) y ELISA en punto (dot-ELISA).<sup>15-18</sup>

La sensibilidad de las pruebas serológicas varía según la preparación antigénica utilizada. Siempre es mayor cuando se utiliza el antígeno homólogo.<sup>17</sup> En estudios realizados en el Norte y el Noreste de Brazil con muestras con leishmaniasis tegumentaria americana, se reportaron sensibilidades de 27,7 % para la inmunofluorescencia indirecta y de 66,9 % para el ELISA; las sensibilidades fueron de 56,7 % para la IIFA y de 93,3 % para el ELISA en los pacientes con leishmaniasis mucocutánea. En un estudio realizado en Turquía con muestras de leishmaniasis cutánea del Viejo Mundo se obtuvo una sensibilidad de 88 % mediante ELISA. La DAT utilizando promastigotes liofilizados, una prueba que se puede realizar en laboratorios menos

sofisticados, tuvo una sensibilidad del 90,5 % y una especificidad del 91,8 % cuando se usaron anticuerpos específicos de *L. aethiopica*. La sensibilidad era de menos del 20 % cuando se utilizaron antígenos no homólogos.<sup>4</sup>

### 3) Inmunocromatografía:

La prueba de inmunocromatografía rápida en tira se utiliza para detectar anticuerpos circulantes contra determinantes antigénicos de diferentes especies de *Leishmania*. Como esta prueba detecta anticuerpos, es mejor para el diagnóstico de leishmaniasis visceral debido a que la respuesta de anticuerpos suele ser débil en los pacientes con leishmaniasis cutánea; sin embargo, es positiva en casi una tercera parte de estos últimos. La prueba detecta anticuerpos contra el antígeno recombinante k39 (rk39), que es el producto de un gen clonado de *L. chagasi* que está conservado entre las especies viscerotrópicas de *Leishmania* (*L. donovani*, *L. infantum*, *L. chagasi*). Es por esto que esta prueba también es útil para el diagnóstico de leishmaniasis post-kala azar, una forma de leishmaniasis cutánea que aparece un tiempo después de la resolución de un cuadro de leishmaniasis visceral. La prueba tiene una sensibilidad del 67 % al 100 % y una especificidad del 93 % al 100 % para el diagnóstico de leishmaniasis visceral; sin embargo, puede ocurrir reacción cruzada con malaria, tuberculosis diseminada, entre otras.<sup>19</sup>

### 4) Inmunoblotting:

Este método ha demostrado ser muy sensible por lo que se utiliza para el diagnóstico diferencial de leishmaniasis. Permite la identificación y exclusión de las proteínas

responsables de reacciones cruzadas. También se trata de una prueba muy específica. Otra ventaja es la posibilidad de detectar casos asintomáticos cuando las otras pruebas serológicas no pueden establecer resultados confiables o cuando sus resultados son negativos.<sup>17, 20</sup> Se ha reportado que no existe correlación entre los títulos de anticuerpos por radioinmunoensayo, ELISA o IIFA y la intensidad de la reacción o el número de bandas que aparecen en el inmunoblotting. En un estudio realizado con el suero de pacientes con leishmaniasis cutánea en el que se usó un extracto soluble de *Leishmania panamensis* como antígeno, se encontró que este suero reconocía las fracciones de 120 kDa (76,7 %), 123 y 129 kDa (69,7 %), 138 kDa (61,6 %), 141 kDa (53,4 %) y 78 kDa (44,1 %). Ninguna banda fue positiva en todos los pacientes del estudio.<sup>20</sup> En el caso particular de la LCL esta metodología no debe considerarse de primera elección, esto como se mencionó, debido a una respuesta inmune humoral muy variable.

## DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO E INMUNOPATOLÓGICO

### 1) Histopatología:

La histopatología de la leishmaniasis cutánea se caracteriza por una reacción inflamatoria granulomatosa con linfocitos, células plasmáticas y macrófagos. Los amastigotes de *Leishmania* se aprecian en el citoplasma de los macrófagos como organismos redondeados u ovals, con un núcleo redondo, un cinetoplasto y rodeados por un halo claro.<sup>21-24</sup> En las lesiones predominan los linfocitos T de memoria. La proporción de linfocitos T con receptores CD4 y con receptores CD8 es variable; sin embargo, esta suele oscilar entre 0,8 a 1,8.<sup>22,23</sup>

En los pacientes con lesiones activas de leishmaniasis cutánea se suelen observar dos patrones histológicos: inflamación crónica no específica y reacción granulomatosa. La inflamación crónica no específica se caracteriza por un infiltrado difuso de linfocitos, células plasmáticas, macrófagos, granulocitos y restos celulares. La reacción granulomatosa contiene los mismos hallazgos histopatológicos antes mencionados pero asociados a la presencia de células epitelioides y a la formación de granulomas frecuentemente con células gigantes. También se han observado casos con vasculitis, neuritis y necrosis. En las lesiones cicatrizales generalmente se observa fibrosis dérmica e infiltrados perivascuales.<sup>25</sup>

En los ratones BALB/c, una cepa de ratones susceptible a la infección por *Leishmania*, inoculados en la dermis de la oreja con amastigotes de *L. major* se observan cambios histológicos similares a los observados en la piel del ser humano. En estas lesiones se observa un infiltrado inflamatorio crónico en el que destacan los macrófagos con citoplasma vacuolado que contienen gran cantidad de amastigotes.<sup>26</sup> Lo mismo ocurre cuando esta cepa de ratones es inoculada con amastigotes de *L. braziliensis*. En un estudio en el que inocularon ratones BALB/c con amastigotes de *L. braziliensis*, cinco semanas después de la infección se observó en la dermis un infiltrado inflamatorio compuesto por polimorfonucleares, numerosos macrófagos fuertemente parasitados y células espumosas. También se observaron cambios vasculares y necrosis tisular a medida que se instauraba la úlcera. Nueve semanas después de la infección, se empezó a observar un depósito inicial de

colágeno, indicando el inicio del proceso de cicatrización. En ese momento, el infiltrado inflamatorio consistía principalmente de macrófagos, células epitelioides y escasas células espumosas, linfocitos y parásitos.<sup>27</sup>

A pesar que la histología es muy buena para la descripción del infiltrado inflamatorio relacionado con la LCL, no es tan buena para la observación directa del parásito. Esto ocurre inclusive cuando se utilizan tinciones especiales distintas a la hematoxilina y eosina (H&E) que ayudan a visualizar mejor el amastigote. Entre estas tinciones destacan la de Giemsa y la de Leishman.<sup>18</sup> El estudio histopatológico suele ser el método con la menor sensibilidad diagnóstica para LCL. En la mayoría de los casos esta sensibilidad oscila entre el 45% y el 65%.<sup>5, 18</sup> Existen condiciones que dificultan el diagnóstico de LCL mediante el examen microscópico de secciones de bloques de parafina. Entre estas condiciones se pueden mencionar: los estadios tardíos de la afección cutánea cuando predominan los granulomas y los histiocitos llenos de parásitos gradualmente desaparecen, las situaciones en las que hay varias infecciones oportunistas en la misma lesión o la misma célula, en las áreas necróticas y también cuando los amastigotes se encuentran libres en el tejido conectivo.<sup>28</sup>

## 2) Inmunohistoquímica:

Las técnicas de inmunohistoquímica son un grupo de metodologías que consisten en la demostración de la presencia de un determinado antígeno en un tejido mediante la utilización de anticuerpos específicos contra dicho antígeno. La presencia del antígeno sólo podrá ser visible

gracias a la utilización de un segundo anticuerpo dirigido contra el primero que esté conjugado con una molécula capaz de absorber y emitir luz o de generar una coloración. Los métodos de inmunohistoquímica incluyen la técnica de inmunoperoxidasa y la técnica de inmunofluorescencia.<sup>29</sup>

#### a) Inmunoperoxidasa:

En la técnica de inmunoperoxidasa, los anticuerpos usados para la identificación del antígeno buscado están marcados con una enzima que transforma un sustrato incoloro en una sustancia coloreada que le permite al observador la detección visual del antígeno parasitario.<sup>29</sup>

La inmunoperoxidasa ha sido utilizada en el diagnóstico de leishmaniasis cutánea y ha demostrado ser una herramienta útil y sensible para el diagnóstico anatomopatológico de la leishmaniasis mediante la detección de amastigotes en el tejido.<sup>30</sup> La sensibilidad de la inmunoperoxidasa es mayor que la del estudio histológico convencional con H&E.<sup>4,18,25,30</sup> Un estudio reveló que la sensibilidad de la inmunoperoxidasa fue de 80 %, mientras que la sensibilidad del estudio histológico con H&E fue de 53 %.<sup>30</sup> En otros se ha reportado la sensibilidad de la inmunoperoxidasa como del 58,6 % o del 64,5 %.<sup>4</sup> Un estudio realizado en perros reportó que la sensibilidad de la inmunoperoxidasa para la detección de amastigotes en lesiones cutáneas era del 62,07 %.<sup>18</sup> Esta elevada sensibilidad coloca a la inmunoperoxidasa en un punto intermedio entre los métodos de

visualización directa y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de *Leishmania*.<sup>30</sup>

La mayor sensibilidad de la inmunoperoxidasa podría ser explicada por la capacidad que tiene para teñir también a los amastigotes degenerados que no cumplen con todos los criterios morfológicos para ser identificados mediante técnicas convencionales. Otra posible explicación para esta mayor sensibilidad radica en su capacidad para brindar un mayor contraste para el observador que las tinciones convencionales. En la inmunoperoxidasa los amastigotes generalmente se tiñen de color marrón oscuro y el fondo se tiñe de azul pálido.<sup>30</sup>

La inmunoperoxidasa es utilizada principalmente en aquellos casos en los que el patólogo tiene dificultad para hacer el diagnóstico con las tinciones histológicas convencionales. En estos casos, la inmunoperoxidasa es útil para confirmar el diagnóstico de leishmaniasis o para descartar otros diagnósticos infecciosos potenciales. Entre los microorganismos que se pueden confundir con *Leishmania* en las tinciones de H&E pero que pueden ser diferenciados por inmunohistoquímica se pueden mencionar: *Trypanosoma cruzi*, *Histoplasma capsulatum*, *Penicillium marneffeii* y *Toxoplasma gondii*. La inmunoperoxidasa también nos permite hacer el diagnóstico cuando nos encontramos frente a presentaciones histológicas inusuales de leishmaniasis o cuando los parásitos se encuentran libres en

el tejido conectivo o dentro de las células endoteliales o epiteliales.<sup>28</sup>

En un estudio realizado con pacientes con leishmaniasis tegumentaria americana, se encontraron cuatro patrones diferentes de tinción mediante inmunoperoxidasa: patrón de amastigotes, patrón celular, patrón vascular y patrón neural. El patrón celular consiste en una reacción positiva detectada en el citoplasma de células mononucleares fagocíticas o de célula gigantes. El patrón vascular consiste en la detección de una reacción positiva en la pared de un vaso y el patrón neural consiste en la detección de una reacción en los nervios cutáneos. El diagnóstico de leishmaniasis usualmente se hace cuando se encuentran los amastigotes en el tejido. En ese estudio se demostró que si se consideran los otros tres patrones de inmunoperoxidasa para el diagnóstico de leishmaniasis cutánea en pacientes con enfermedad activa, se podría elevar la sensibilidad de la prueba desde un 58,5 % (patrón de amastigotes) hasta un 92,5 % (incluyendo todos los patrones). La inmunoperoxidasa también permitió la demostración de persistencia antigénica en algunas cicatrices de lesiones cutáneas antiguas. Esto podría ser evidencia de inmunoprotección o por el contrario podría ser el inicio del proceso de desarrollo de lesiones tardías como las observadas en la LMC.<sup>25</sup>

#### b) Inmunofluorescencia:

La inmunofluorescencia directa también ha sido utilizada para el diagnóstico de LCL

en biopsias de piel. Entre las principales diferencias de esta prueba y la de inmunoperoxidasa destacan: la inmunofluorescencia directa utiliza cortes por congelación del tejido en lugar de cortes de bloques de parafina, el anticuerpo utilizado para la detección (segundo anticuerpo) está marcado con un fluorocromo que generalmente es la fluoresceína y se necesita un microscopio de fluorescencia para la visualización de la prueba.<sup>25</sup> En un estudio la sensibilidad para la detección de amastigotes fue de 41,4 %.<sup>25</sup> La sensibilidad para la detección de antígenos de *Leishmania* suele ser mayor, alcanzando un 88,5 %.<sup>4</sup>

#### DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Los métodos moleculares se están utilizando cada vez más en el diagnóstico y en los estudios epidemiológicos de la leishmaniasis. Las pruebas ideales deben poder realizarse e interpretarse rápidamente, deben ser sensibles, específicas y capaces de determinar las cargas parasitarias tanto en hospederos como en vectores. Múltiples técnicas moleculares han sido utilizadas tales como: el análisis de la longitud de los fragmentos de restricción del producto amplificado mediante PCR (RFLP), el análisis de la secuencia de genes con múltiples copias y de las regiones espaciadoras intergénicas, el estudio de las huellas digitales del ADN y del ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD), entre otras. La electroforesis de enzimas de múltiples locus (MLEE) es una técnica de caracterización adicional. Algunas de estas técnicas, como la MLEE y el RAPD, requieren el aislamiento y cultivo del parásito por lo que su utilidad en situaciones clínicas, en las que se requiere un diagnóstico rápido, es cuestionable.<sup>31</sup>

## 1) Electroforesis de enzimas de múltiples locus:

La MLEE permite la identificación de las diferentes especies y cepas de *Leishmania*. Para esto se debe hacer un cultivo axénico con el fin de obtener un gran número de parásitos y posteriormente analizar catorce isoenzimas diferentes mediante electroforesis.<sup>15</sup> La MLEE se basa en la variación de la movilidad electroforética de las enzimas en las diferentes especies de *Leishmania*.<sup>15,31</sup> En base al análisis del perfil de isoenzimas obtenido, se puede determinar la cepa y especie de *Leishmania*.<sup>15</sup> Este método resulta ser muy demandante técnicamente y consumir mucho tiempo, a veces pudiendo requerir hasta dos meses.<sup>15,32</sup>

## 2) Reacción en cadena de la polimerasa:

La PCR no es una técnica, sino un método que es utilizado por varias técnicas distintas. Las principales variantes del PCR que son utilizadas para el diagnóstico y estudio de la leishmaniasis son la PCR convencional y el PCR en tiempo real (RT-PCR).<sup>33</sup>

### a) PCR convencional:

La PCR ha sido utilizada para detectar *Leishmania* spp. en diferentes tipos de muestras clínicas utilizando blancos diferentes como las secuencias nucleares repetitivas o los minicírculos que contienen ADN del cinetoplasto (kADN). Entre las secuencias nucleares repetitivas se encuentran el ARN ribosomal (rARN), los genes miniexón y el ADN nuclear repetitivo.<sup>33-34</sup> A pesar que la sensibilidad de la prueba varía según el blanco utilizado, múltiples investigaciones han demostrado que la PCR es la prueba más sensible y

específica para el diagnóstico de leishmaniasis.<sup>33</sup>

Entre las secuencias que pertenecen al grupo de las múltiples copias, la secuencia del gen de la subunidad pequeña del rARN (SSU rARN) o 18S rARN es la más estudiada. Cada parásito contiene alrededor de 160 copias de este gen. En un estudio de Marruecos, en el que se analizaron 26 biopsias de pacientes con úlceras cutáneas sugestivas de leishmaniasis mediante PCR utilizando cebadores para el ARN de la subunidad pequeña ribosomal, se encontró que el PCR obtuvo una sensibilidad del 84,6 % y una especificidad del 100 % para el diagnóstico de leishmaniasis cutánea. Estos valores fueron superiores a los obtenidos mediante frotis (69,2 %) y mediante cultivo in vitro (69,2 %).<sup>34</sup>

En un estudio realizado en el Norte de Argentina, en el que se utilizaron los cebadores 13A y 13B para amplificar una secuencia específica 120 pares de bases de kADN que es común a todas las especies de *Leishmania*, se obtuvo una sensibilidad y una especificidad del 100 % para el diagnóstico de leishmaniasis cutánea.<sup>35</sup>

En un estudio realizado en un área endémica de *Leishmania (Viannia) braziliensis* en Brazil, se utilizó el PCR de la secuencia específica 120 pares de bases del kADN para hacer el diagnóstico de leishmaniasis cutánea y se le comparó con el cultivo. La kADN-PCR fue positiva en el 89,3 % de los casos, el cultivo en el 78,2 % de los casos y al combinar ambas técnicas se

obtuvo una positividad del 97,1 %.<sup>36</sup> Otro estudio realizado en Brazil en un centro de referencia para el diagnóstico de leishmaniasis tegumentaria americana, reveló que el kADN-PCR tenía una sensibilidad del 92,3 %, una especificidad del 93,3 % y un valor predictivo positivo del 99,2 % para el diagnóstico de esta enfermedad.<sup>37</sup>

Un estudio realizado en la Clínica de Referencia de Medicina Tropical del Instituto Conmemorativo Gorgas de la Ciudad de Panamá, en el que se analizaron muestras de pacientes con sospecha clínica de leishmaniasis tegumentaria americana con un PCR que amplificaba específicamente la secuencia completa de 750 pares de bases del minicírculo de las especies de *Leishmania Viannia*, reveló que esta prueba fue positiva en el 71,8 % de los casos. Este valor fue superior al 60,3 % obtenido con las pruebas parasitológicas convencionales.<sup>38</sup>

Por estas razones, se afirma que el PCR del kADN del minicírculo es la prueba más sensible para el diagnóstico de rutina de leishmaniasis cutánea.<sup>35-38</sup> Esto se hace aún más evidente en los pacientes con LMC, en los que la sensibilidad de los otros métodos diagnósticos disminuye. Por esta razón, el kADN-PCR es el método de elección para el diagnóstico de LMC.<sup>35,37</sup> Sin embargo, el PCR no es una herramienta perfecta, porque en algunos estudios no ha podido detectar la totalidad de los casos que han sido positivos por cultivo.<sup>37</sup>

b) PCR en tiempo real:

El RT-PCR es considerado una tecnología emergente para la detección, la caracterización genética y la cuantificación de parásitos protozoarios, entre otros. Los principales protozoarios estudiados con esta tecnología son *Cryptosporidium parvum*, *Leishmania infantum* y *Plasmodium falciparum*. En el caso de *Leishmania*, el ADN blanco que se suele utilizar es el de la ADN polimerasa de *Leishmania infantum*, que es un gen que sólo tiene una copia en cada parásito. Esta prueba detectó todos los casos de leishmaniasis cutánea que se detectaron con el PCR convencional; sin embargo tiene la ventaja de permitir una cuantificación más exacta de la carga parasitaria. Esta ventaja es importante principalmente en los pacientes con leishmaniasis visceral, en los que la cuantificación de la carga parasitaria es importante para el seguimiento de la respuesta terapéutica. Sin embargo, utilizando un ensayo semi-cuantitativo con PCR convencional, se puede estimar la carga parasitaria con menos precisión pero hasta un nivel suficiente que permita orientar el tratamiento de estos pacientes. Otras metodologías han utilizado el RT-PCR del kADN o del gen SSU rARN.<sup>33</sup>

La elección de los diferentes blancos del PCR a utilizar debe ser guiada por el motivo por el que solicitamos la prueba. Los ensayos de PCR basados en la amplificación de kADN son los más sensibles para el diagnóstico de leishmaniasis cutánea o visceral; sin embargo, sólo identifican los parásitos hasta el nivel de género o sub-género. Por el contrario, los PCR dirigidos a amplificar

regiones intergénicas en el ADN nuclear, son mejores para la identificación rápida y confiable de la especie de *Leishmania*. Por otro lado, a pesar que el RT-PCR va a convertirse en la técnica de referencia en el futuro, debido a que es más rápido y menos vulnerable a la contaminación que el PCR convencional, todavía no puede ser aplicado para el diagnóstico de rutina porque su costo es hasta tres veces mayor que el del PCR convencional. En la actualidad, su utilización es más factible en los laboratorios de referencia o de investigación.<sup>33</sup>

### 3) Análisis de la longitud de los fragmentos de restricción del producto amplificado:

El RFLP realizado luego de la PCR ha sido utilizado para el diagnóstico clínico de leishmaniasis cutánea debido a que se puede realizar con ADN obtenido directamente del tejido lesional.<sup>33,38-39</sup> Además de facilitar el diagnóstico rápido, permite la identificación de la especie del parásito presente en la lesión. La amplificación por PCR del gen de la cisteíno-proteinasa B (Cpb) con posterior digestión por la *TaqI*, nos permite obtener un patrón de digestión que nos permite diferenciar entre *L. braziliensis*, que tiene un patrón propio, y un grupo formado por *L. panamensis*, *L. guyanensis* o *L. peruviana* que tienen un patrón común. Para discriminar entre estas tres últimas especies, se puede utilizar una PCR-RFLP con el gen HSP70.<sup>39</sup>

### 4) Estudio del ADN polimórfico amplificado al azar:

El RAPD ha sido utilizado para reconstruir filogenias, identificar especies, subespecies y linajes de *Leishmania* tanto con las cepas del Viejo Mundo como con las del Nuevo Mundo. Se

trata de un método molecular relativamente simple que requiere poca cantidad de ADN y que permite la distinción directa de las especies de *Leishmania* mediante la observación directa de las bandas en un gel de agarosa. Sin embargo, la arbitrariedad y el pequeño tamaño de los cebadores utilizados limita su especificidad y restringe su uso a parásitos aislados, lo que ha dificultado su utilización en el diagnóstico de muestras clínicas.<sup>39</sup>

### 5) Análisis de disociación de alta resolución (HRM):

El HRM es una técnica de análisis molecular automatizada que mide la tasa de disociación del ADN de doble cadena provocada por el aumento progresivo de la temperatura. Esta disociación es monitoreada mediante la incorporación a la PCR de una tinción fluorescente que se intercala de manera homogénea en el ADN y que sólo fluoresce cuando está unida al ADN de doble cadena. El cambio en la fluorescencia mide la disociación del ADN inducida térmicamente.<sup>31,40</sup> El patrón de disociación es característico de cada producto de ADN particular. Esto se debe a diferencias en la longitud de la secuencia, el contenido de guanina y citosina, la complementariedad y la termodinámica del vecino más cercano.<sup>31</sup> Esta técnica tiene la capacidad de detectar polimorfismos de un solo nucleótido por lo que se ha utilizado para la identificación de las especies de *Leishmania*. Esta técnica se puede realizar con ADN extraído directamente de la piel u otros tejidos sin necesidad de cultivo y aislamiento. Además, como no requiere procesamiento post-PCR, es más simple, más económica, menos vulnerable a la contaminación y más rápida que las técnicas para la identificación de especies de *Leishmania*

basadas en PCR convencional.<sup>31,40</sup> Esta prueba puede brindar resultados en menos de 2,5 horas.<sup>31</sup>

6) OligoC-TesT para *Leishmania* y Ensayo basado en la secuencia de ácidos nucleicos (NASBA) con oligocromatografía:

El OligoC-TesT utiliza el PCR para amplificar el ADN del paciente *in vitro* bajo cambios cíclicos de temperatura; mientras que el NASBA-oligocromatografía utiliza el NASBA para amplificar el ARN bajo condiciones isotérmicas. Ambas técnicas pueden detectar de manera similar la infección por *Leishmania*. Para esto, se amplifica primero una secuencia corta del 18S rADN en la PCR o del 18S rARN en la NASBA y luego se realiza una rápida y sencilla detección de los productos amplificados en un formato de cromatografía en tira. Ambas pruebas tienen una alta sensibilidad y especificidad; sin embargo, debido a sus requerimientos técnicos, todavía no están disponibles para el diagnóstico clínico rutinario.<sup>41</sup>

## CONCLUSIÓN

Existen numerosos métodos para el diagnóstico de leishmaniasis cutánea. En la actualidad, los métodos de diagnóstico parasitológico son el estándar de oro para el diagnóstico de la enfermedad; sin embargo, en un futuro no muy lejano van a ser desplazados por los métodos de diagnóstico molecular. Esto se debe a que estos últimos tienen numerosas ventajas tales como: alta sensibilidad y especificidad, rapidez y capacidad para distinguir entre diferentes especies y cepas de *Leishmania*.

## REFERENCIAS

1. Piscopo TV, Mallia AC. Leishmaniasis. Postgrad Méd J. 2006;82:649-57.
2. von Stebut E. Cutaneous Leishmania infection: progress in pathogenesis research and experimental therapy. Exp Dermatol. 2007 Apr;16(4):340-6.
3. Awasthi A, Mathur RK, Saha B. Immune response to Leishmania infection. Indian J Med Res. 2004 Jun;119(6):238-58.
4. Goto H, Lauletta Lindoso JA. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. Expert Rev Anti Infect Ther. 2010;8(4):419-33.
5. Ramírez JR, Agudelo S, Muskus C, Alzate JF, Berberich C, Barker D, Velez ID. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis in Colombia: the sampling site within lesions influences the sensitivity of parasitologic diagnosis. J Clin Microbiol. 2000 Oct;38(10):3768-73.
6. ul Bari A, ber Rahman S. Correlation of clinical, histopathological, and microbiological findings in 60 cases of cutaneous leishmaniasis. Indian J Dermatol Venereol Leprol. 2006;72:28-32.
7. Alvar J, Aparicio P, Aseffa A, Den Boer M, Cañavate C, Dedet JP, Gradoni L, Ter Horst R, López-Vélez R, Moreno J. The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. Clin Microbiol Rev. 2008 Apr;21(2):334-59.
8. Luz ZM, Silva AR, Silva Fde O, Caligiorne RB, Oliveira E, Rabello A. Lesion aspirate culture for the diagnosis and isolation of Leishmania spp. from patients with cutaneous leishmaniasis. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009 Feb;104(1):62-6.
9. Boggild AK, Miranda-Verastegui C, Espinosa D, Arevalo J, Adai V, Tulliano G, Llanos-Cuentas A, Low DE. Evaluation of a microculture method for isolation of Leishmania parasites from cutaneous lesions of patients in Peru. J Clin Microbiol. 2007 Nov;45(11):3680-4.
10. Boggild AK, Miranda-Verastegui C, Espinosa D, Arevalo J, Martinez-Medina D, Llanos-Cuentas A, Low DE. Optimization of microculture and evaluation of miniculture for the isolation of Leishmania parasites from cutaneous lesions in

- Peru. *Am J Trop Med Hyg.* 2008 Dec;79(6):847-52.
11. Oliveira MA, Pires Ada S, de Bastos RP, Lima GM, Pinto SA, Pereira LI, Pereira AJ, Abrahamsohn Ide A, Dorta ML, Ribeiro-Dias F. *Leishmania* spp. parasite isolation through inoculation of patient biopsy macerates in interferon gamma knockout mice. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2010 Apr;52(2):83-8.
12. Hernández D, Rojas E, Scorza JV, Jorquera A. Infectividad del perro (*Canis familiaris*) para *Lutzomyia youngi* en Trujillo, Venezuela. *Biomédica* 2006; 26 Supl 1: 242-8.
13. Nogueira MF, Sotto MN, Cucé LC. American tegumentary leishmaniasis: Langerhans cells in Montenegro skin test. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2008 Sep-Oct;50(5):283-6.
14. Silveira FT, Lainson R, Corbett CE. Further observations on clinical, histopathological, and immunological features of borderline disseminated cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2005 Aug;100(5):525-34.
15. Ready PD. Leishmaniasis emergence in Europe. *Euro Surveill.* 2010 Mar 11;15(10):19505.
16. Silvestre R, Santarém N, Teixeira L, Cunha J, Schallig H, Cordeiro-da-Silva A. Evaluation of *Leishmania* species reactivity in human serologic diagnosis of leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 2009 Aug;81(2):202-8.
17. Szargiki R, Castro EA, Luz E, Kowalthuk W, Machado AM, Thomaz-Soccol V. Comparison of serological and parasitological methods for cutaneous leishmaniasis diagnosis in the state of Paraná, Brazil. *Braz J Infect Dis.* 2009 Feb;13(1):47-52.
18. Xavier SC, de Andrade HM, Monte SJ, Chiarelli IM, Lima WG, Michalick MS, Tafuri WL, Tafuri WL. Comparison of paraffin-embedded skin biopsies from different anatomical regions as sampling methods for detection of *Leishmania* infection in dogs using histological, immunohistochemical and PCR methods. *BMC Vet Res.* 2006 Jun 8;2:17.
19. Sharma NL, Mahajan VK, Negi AK, Verma GK. The rK39 immunochromatic dipstick testing: A study for K39 seroprevalence in dogs and human leishmaniasis patients for possible animal reservoir of cutaneous and visceral leishmaniasis in endemic focus of Satluj river valley of Himachal Pradesh (India). *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 2009;75:52-5.
20. Isaza DM, Restrepo M, Mosca W. Immunoblot analysis of *Leishmania panamensis* antigens in sera of patients with American cutaneous leishmaniasis. *J Clin Microbiol.* 1997 Dec;35(12):3043-7.
21. Machado P, Kanitakis J, Almeida R, Chalon A, Araújo C, Carvalho EM. Evidence of in situ cytotoxicity in American cutaneous leishmaniasis. *Eur J Dermatol.* 2002 Sep-Oct;12(5):449-51.
22. Mendes-Aguiar Cde O, Gomes-Silva A, Nunes E Jr, Pereira-Carvalho R, Nogueira RS, Oliveira-Neto Mde P, Bertho AL, Da-Cruz AM. The skin homing receptor cutaneous leucocyte-associated antigen (CLA) is up-regulated by leishmania antigens in T lymphocytes during active cutaneous leishmaniasis. *Clin Exp Immunol.* 2009 Sep;157(3):377-84.
23. Amaral V, Pirmez C, Gonçalves A, Ferreira V, Grimaldi G Jr. Cell populations in lesions of cutaneous leishmaniasis of *Leishmania (L.) amazonensis*-infected rhesus macaques, *Macaca mulatta*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2000 Mar-Apr;95(2):209-16.
24. Brachelente C, Müller N, Doherr MG, Sattler U, Welle M. Cutaneous Leishmaniasis in naturally infected dogs is associated with a T helper-2-biased immune response. *Vet Pathol.* 2005 Mar;42(2):166-75.
25. Schubach A, Cuzzi-Maya T, Oliveira AV, Sartori A, de Oliveira-Neto MP, Mattos MS, Araújo ML, Souja WL, Haddad F, Perez Mde A, Pacheco RS, Momen H, Coutinho SG, de Almeida Marzochi MC, Marzochi KB, da Costa SC. Leishmanial antigens in the diagnosis of active lesions and ancient scars of American tegumentary

- Leishmaniasis patients. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2001 Oct;96(7):987-96.
26. Cangussú SD, Souza CC, Campos CF, Vieira LQ, Afonso LC, Arantes RM. Histopathology of Leishmania major infection: revisiting L. major histopathology in the ear dermis infection model. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009 Sep;104(6):918-22.
27. de Moura TR, Novais FO, Oliveira F, Clarêncio J, Noronha A, Barral A. Toward a novel experimental model of infection to study american cutaneous leishmaniasis caused by Leishmania braziliensis. Infect Immun. 2005 Sep;73(9):5827-34.
28. Hofman V, Brousset P, Mougneau E, Marty P, Lamant L, Antoine JC, Glaichenhaus N, Hofman P. Immunostaining of visceral leishmaniasis caused by Leishmania infantum using monoclonal antibody (19-11) to the Leishmania homologue of receptors for activated c-kinase. Am J Clin Pathol. 2003 Oct;120(4): 567-74.
29. Idikio HA. Immunohistochemistry in diagnostic surgical pathology: contributions of protein life-cycle, use of evidence-based methods and data normalization on interpretation of immunohistochemical stains. Int J Clin Exp Pathol. 2009 Nov 25;3(2):169-76.
30. Quintella LP, Cuzzi T, Madeira Mde F, Okamoto T, Schubach Ade O. Immunoperoxidase technique using an anti-Leishmania (L.) chagasi hyperimmune serum in the diagnosis of culture-confirmed American tegumentary leishmaniasis. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2009 Mar-Apr;51(2):83-6.
31. Talmi-Frank D, Nasereddin A, Schnur LF, Schönian G, Töz SO, Jaffe CL, Baneth G. Detection and identification of old world Leishmania by high resolution melt Analysis. PLoS Negl Trop Dis. 2010 Jan 12;4(1):e581.
32. Zhang WW, Miranda-Verastegui C, Arevalo J, Ndao M, Ward B, Llanos-Cuentas A, Matlashewski G. Development of a genetic assay to distinguish between Leishmania viannia species on the basis of isoenzyme differences. Clin Infect Dis. 2006 Mar 15;42(6):801-9.
33. Antinori S, Calattini S, Piolini R, Longhi E, Bestetti G, Cascio A, Parravicini C, Corbellino M. Is real-time polymerase chain reaction (PCR) more useful than a conventional PCR for the clinical management of leishmaniasis? Am J Trop Med Hyg. 2009 Jul;81(1):46-51.
34. Lemrani M, Hamdi S, Laamrani A, Hassar M. PCR detection of Leishmania in skin biopsies. J Infect Dev Ctries. 2009 Sep 15;3(2):115-22.
35. Barrio A, Mora MC, Ramos F, Moreno S, Samson R, Basombrío MA. Use of kDNA-based polymerase chain reaction as a sensitive and differentially diagnostic method of American Tegumentary Leishmaniasis in disease-endemic areas of northern Argentina. Am J Trop Med Hyg. 2007 Oct;77(4):636-9.
36. Ampuero J, Rios AP, Carranza-Tamayo CO, Romero GA. Genus-specific kinetoplast-DNA PCR and parasite culture for the diagnosis of localized cutaneous leishmaniasis: applications for clinical trials under field conditions in Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009 Nov;104(7): 992-7.
37. Fagundes A, Schubach A, Paula CC, Bogio A, Antonio Lde F, Schiavoni PB, Monteiro Vde S, Madeira Mde F, Quintella LP, Valete-Rosalino CM, Vasconcellos Ede C, Azeredo-Coutinho RB, Pacheco RS, Marzochi MC, Marzochi KB. Evaluation of polymerase chain reaction in the routine diagnosis for tegumentary leishmaniasis in a referral centre. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2010 Feb;105(1):109-12.
38. Miranda A, Carrasco R, Paz H, Pascale JM, Samudio F, Saldaña A, Santamaria G, Mendoza Y, Calzada JE. Molecular epidemiology of American tegumentary leishmaniasis in Panama. Am J Trop Med Hyg. 2009 Oct;81(4):565-71.
39. Montalvo AM, Monzote L, Fraga J, Montano I, Muskus C, Marín M, de Doncker S, Vélez ID, Dujardin JC. PCR-RFLP y RAPD para la tipificación

- de *Leishmania neotropicalis*. *Biomédica*. 2008 Dec;28(4):597-606.
40. Nasereddin A, Jaffe CL. Rapid diagnosis of old world leishmaniasis by high-resolution melting analysis of the 7SL RNA gene. *J Clin Microbiol*. 2010 Jun;48(6):2240-2.
41. Saad AA, Ahmed NG, Osman OS, Al-Basheer AA, Hamad A, Deborggraeve S, Büscher P, Schoone GJ, Schallig HD, Laurent T, Haleem A, Osman OF, Eltom AM, Elbashir MI, El-Safi S. Diagnostic accuracy of the *Leishmania* OligoC-Test and NASBA-oligochromatography for diagnosis of leishmaniasis in Sudan. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010 Aug 3;4(8):e776.