

Búsqueda de úlcera de Buruli en el Urabá chocoano y antioqueño, Colombia 2006

Search of Buruli ulcer in Choco and Antioquia, Uraba Colombia, 2006.

NORA CARDONA-CASTRO¹, JUAN CARLOS RESTREPO-VÉLEZ², JUAN CAMILO BELTRÁN-ALZATE³,
ANGELA ZULUAGA DE CADENA², RUBÉN DARÍO MANRIQUE-H.⁴

Forma de citar: Cardona-Castro N, Restrepo-Vélez JC, Beltrán-Alzate JC, Zuluaga A, Manrique-Hernández RD.

Búsqueda de úlcera de Buruli en el Urabá chocoano y antioqueño, Colombia 2006. Rev CES Med 2009;23(1) Supl. Dermatología: s27-s35

RESUMEN

Introducción: en Colombia no se ha reportado ningún caso de úlcera de Buruli (UB), aún teniendo regiones con características similares a zonas endémicas. En nuestro medio, la proximidad geográfica y las condiciones ambientales similares con los países de Sur y Centro América donde se han reportado casos, motivan a buscar activamente pacientes sospechosos de UB, y aplicar técnicas de laboratorio moleculares específicas para brindar un adecuado diagnóstico.

Objetivo: buscar casos de úlcera de Buruli (UB) en Urabá chocoano y antioqueño, (Colombia) durante el año 2006.

Materiales y métodos: se estudiaron casos provenientes de las áreas de estudio, para establecer la causa etiológica de las lesiones utilizando métodos de diagnóstico clínico, microbiológico, histopatológico y molecular.

Resultados: en cinco pacientes (6 %) no se pudo establecer la causa etiológica de la úlcera (leishmaniosis, micosis, úlceras venosas o arteriales, cáncer). El examen clínico de estos pacientes no fue concluyente de UB, sin embargo debido a la falta de documentación de casos en Colombia, se pro-

¹ Md. MSc Enfermedades Infecciosas. Grupo Instituto Colombiano de Medicina Tropical – Universidad CES e-mail: ncardona@ces.edu.co

² Dermatólogo, Universidad CES. Grupo de Dermatología Universidad CES

³ Bacteriólogo. Grupo Instituto Colombiano de Medicina Tropical – Universidad CES

⁴ Magíster en Epidemiología. Grupo de Investigación en Epidemiología y Bioestadística. Universidad CES.

Recibido: marzo 24 de 2009. Revisado en mayo de 2009. Aceptado en junio de 2009.

cesó biopsia de la lesión para detectar ADN de *Mycobacterium ulcerans* por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Todas las pruebas de PCR fueron negativas para ADN de *Mycobacterium ulcerans*.

Conclusiones: debido a indicadores epidemiológicos que señalan a Colombia con condiciones geográficas y ambientales similares a las que se presentan en regiones endémicas, como Perú, Guyana Francesa, México, Surinam, es necesario continuar con su búsqueda.

PALABRAS CLAVE

Úlcera de Buruli

Mycobacterium ulcerans

PCR

Colombia

ABSTRACT

Introduction: in Colombia there are no reported cases of Buruli ulcer (BU), however the geographic and environmental characteristics are similar to endemic regions, and the proximity to other countries in South and Central America where there are reported cases, makes it an important issue to search for them, using molecular techniques specific for BU diagnostic. Objectives: to search for Buruli ulcer (BU) at the Urabá region of Chocó and Antioquia in Colombia, during 2006. Materials and methods: patients with skin ulcer from the study region were tested to establish the etiologic cause of the lesions, using clinical, microbiological, pathological and molecular methods. Results: Five patients were tested for BU using PCR test, since other etiologic causes of the ulcer (leishmaniosis, mycosis, venous or arterial ulcer, others) were not determined. Clinical examination of the patients was not conclusive of BU; but due to the lack of documented cases in Colombia, biopsies were taken from patients for detection of *M. ulcerans* by PCR. All the sam-

ples tested negative for DNA of *Mycobacterium ulcerans*. Conclusions: due to the epidemiological indicators that show that Colombia has the geographic and environmental conditions similar to endemic regions, as Perú, French Guyana, México and Surinam it is necessary to continue with the search.

KEYWORDS

Buruli Ulcer

Mycobacterium ulcerans

PCR

Colombia

INTRODUCCIÓN

La úlcera de Buruli (UB), causada por *Mycobacterium ulcerans*, es la tercera enfermedad mas común en humanos inmunocompetentes producida por micobacterias después de tuberculosis y lepra (1). La UB es clasificada como úlcera tropical (UT), compromete piel y tejido celular subcutáneo, con nódulos, pápulas, placas o edema, que evolucionan a una úlcera indolora y a menudo lleva a secuelas invalidantes. Esta enfermedad afecta frecuentemente a jóvenes menores de 16 años, aunque se tienen reportes de casos en todos los grupos etáreos; las lesiones de la enfermedad son mas frecuentes en las extremidades (2,3). No hay datos disponibles sobre predilección de género o raza, pues la UB se ha reportado igual en todos los géneros y grupos raciales. Tampoco se ha notado un aumento en personas inmunocomprometidas como pacientes con HIV a pesar de la alta tasa de HIV presente en zonas endémicas para esta enfermedad (4,5).

La UB fue documentada por primera vez en Australia en 1947 y recibió su nombre en el distrito de Buruli en Uganda, luego de que allí se aislaran casos de niños que presentaban la enfermedad

(6). En algunas regiones de África la enfermedad afecta hasta al 22 % de la población (7). Existen focos endémicos en África, América (México, Surinam, Perú, Bolivia, Guyana Francesa), Australia y Asia. En 1997, la UB fue reconocida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como un problema emergente de salud pública. Su prevalencia ha incrementado durante los últimos años particularmente en el oeste de África (8).

M. ulcerans se encuentra en el ambiente, se ha detectado en agua, insectos y plantas acuáticas (9-11). Existen varias teorías acerca del modo de transmisión, reportes clínicos evidencian un trauma cutáneo previo o una abrasión de la piel antes del desarrollo de la UB, o la participación de un insecto vector (10-13). Estudios epidemiológicos sugieren que la proximidad a las fuentes de agua dulce como lagos o ríos, aguas de poco movimiento o estancadas predisponen a la enfermedad, pero el contacto específico con el agua que podría llevar a la transmisión de la bacteria, hasta el momento no ha sido comprobado (10-14).

M. ulcerans es una bacteria ácido alcohol resistente (BAAR) potencialmente patógena para animales y humanos, por lo que se considera oportunista. A diferencia de las otras micobacterias se caracteriza por ser extracelular; en las lesiones que produce hay ausencia de células inflamatorias y hay una necrosis extensa de los tejidos en el sitio de la infección (15,16). El período de incubación varía de dos semanas a tres años con un promedio de dos a tres meses (17). Posterior a la inoculación en la piel, *M. ulcerans* prolifera y elabora la toxina micolactona que causa necrosis de la dermis, tejido celular subcutáneo y fascia. Factores del hospedero no bien definidos aún y variaciones en el agente etiológico, juegan un papel determinante en el tipo de cambios patológicos (18). *M. ulcerans*, a diferencia de otras micobacterias, produce un área circunscrita de necrosis de coagulación, asociada tanto en la dermis profunda como en el tejido adiposo de los tejidos infectados, que primariamente contienen bacilos extracelulares formando un gran número de micro colonias, tanto en el centro de

la lesión como en asociación con el tejido adiposo. El número de los bacilos puede ser muy importante en la fase pre-ulcerativa, con pocos o ningún bacilo intracelular presente en fases posteriores de la enfermedad (15,16). Muy rara vez hay una penetración por debajo de la fascia y afección del músculo. Para algunos autores la necrosis de la grasa subcutánea y del colágeno dérmico, acompañados por una mínima inflamación y BAAR, son considerados los hallazgos mas importantes para el diagnóstico histopatológico de UB (15,16).

El papel exacto de la respuesta inmune en la UB no es claro todavía. La respuesta negativa a las pruebas cutáneas es la evidencia de una respuesta inmune celular débil. El curso indolente, la ausencia de adenopatías regionales y las características de las lesiones, sugieren una respuesta mediada por las células T deficiente o ausente. La muerte celular se produce por apoptosis, fenómeno que se da en ausencia de respuesta inflamatoria. Un gran número de bacterias extracelulares y una respuesta inflamatoria pobre, sugieren que la bacteria es mal fagocitada o escapa de la fagocitosis antes de comenzar a ser destruida, procesada y presentada a los linfocitos T. El IFN gama, el principal activador de macrófagos, juega un papel muy importante en las infecciones por micobacterias. Su ausencia en la UB parece estar relacionada con la pobre respuesta de los pacientes a la quimioterapia antimicrobiana convencional (15,19).

El tratamiento de los pacientes con UB es quirúrgico; no hay tratamientos tópicos u orales que hayan mostrado una eficacia importante, sin embargo la rifampicina y la estreptomycin son los antibióticos de elección (1). Las lesiones nodulares y papulares pueden resecarse y hacer un cierre primario, otras lesiones requieren una resección mayor y los injertos de piel pueden necesitarse. Se usan antibióticos profilácticos antes y después de la cirugía. La fisioterapia se requiere para evitar deformidades por contracción especialmente en lesiones que cruzan o comprometen la piel sobre articulaciones (17).

Debido al desconocimiento de la UB en Colombia, el diagnóstico clínico no se realiza en las zonas endémicas de úlcera tropical (UT). La mayoría de los casos de UT en Colombia son debidos a infección por *Leishmania sp*, sin embargo, en un número de casos el agente infeccioso que los causa se queda sin determinar; esto puede ser debido a que *M. ulcerans* no se puede aislar en cultivos de pacientes con lesiones crónicas, y a que no existen en nuestro medio pruebas moleculares disponibles para apoyar dicho diagnóstico.

En Colombia no se ha reportado ningún caso de UB, pero hay regiones con gran cantidad de población alrededor de zonas pantanosas, húmedas, selváticas y con actividades económicas fluviales; características que comparte con zonas endémicas de esta infección. Además, la proximidad con los países de Sur y Centro América donde se han reportado casos, y las condiciones geográficas y ambientales similares, motivan a buscar activamente pacientes sospechosos de UB, y a aplicar técnicas de laboratorio moleculares específicas para brindar un adecuado diagnóstico en nuestro medio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Detección de pacientes: Se desarrolló un estudio descriptivo exploratorio, con búsqueda activa de pacientes y seguimiento de reportes que incluyó trabajo de campo. Se estudió la población circunscrita a las zonas de los servicios de salud del municipio y veredas de Unguía (Chocó) y Apartadó (Antioquia) los cuales pertenecen a las áreas de atención del Hospital de Unguía, del Hospital Regional de Apartadó y del Instituto Colombiano de Medicina Tropical-CES.

Se realizó una campaña de sensibilización al personal del área de la salud del municipio de Unguía y a los dermatólogos e infectólogos que atienden la consulta especializada del ICMT-CES. Se incluyeron pacientes voluntarios que fir-

maron un consentimiento informado, de todas las edades, géneros y condiciones sociales, que consultaron por lesiones tipo no ulcerosa, ulcerosa, inactiva y mixta y que no correspondieron a enfermedades conocidas. Se excluyeron los pacientes que por sus características clínicas, presentaron lesiones sugestivas de úlceras vasculares, de origen arterial o venoso o mixto.

Consideraciones éticas: Se hizo un registro fotográfico de las lesiones, previa firma del consentimiento informado y previo a la toma de la muestra, a todos los pacientes que cumplieron los criterios de inclusión mencionados. Los dermatólogos e infectólogos continuaron con el estudio de los cinco pacientes cuya causa etiológica no fue posible determinar, los cuales fueron estudiados para UB.

Ziehl Neelsen (ZN): Se realizó un extendido de muestra directa de la lesión y se hizo coloración de ZN siguiendo el protocolo descrito (20).

Extracción de ADN: Se utilizó el método de Boom modificado (21). Brevemente, la biopsia fue sometida a 50 μ l de proteinasa K (20mg/ml), e incubada toda la noche a 60°C en una incubadora con agitación continua y se prosiguió con el protocolo ya descrito (21).

PCR: Se realizó una PCR anidada para detección de ADN específico de *M. ulcerans* en biopsias de la úlcera almacenadas en etanol al 70 %. Se utilizaron los iniciadores específicos descritos previamente (22). El volumen de reacción fue de 20ul, el cual contenía 18ul de master mix (10mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCL, 2.5 Mm MgCl₂, 200ul de cada dinucleótido), 1U de AmpliTaq Gold DNA polymerase (Promega, USA) y 1ul del ADN extraído de la muestra diluido 1:10. La PCR se corrió en un termociclador MJ Research, con el siguiente protocolo: 94°C 10 min; 40 ciclos cada uno consistente en desnaturalización a 94°C por 10 seg, alineamiento a 58°C por 10 seg, extensión a 72°C por 30 seg, y un paso final de extensión a 72°C por 15 min. Los productos de amplificación fueron visualizados por una electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % con bromuro de etidio (1ug/ml) (22).

RESULTADOS

El diagnóstico etiológico de úlcera de piel, fue comprobado en 82 pacientes procedentes de regiones que por sus características geográficas se pueden considerar como adecuadas para que se presente la UB (Urabá antioqueño y chocoano). Estos pacientes tuvieron diagnósticos como leishmaniosis (n=36), úlceras piógenas (n=33), esporotricosis (n=12), cáncer espinocelular (n=1). A los cinco pacientes que no tuvieron un diagnóstico etiológico de la úlcera, se les realizó PCR para buscar *M. Ulcerans*, los cuales se describen a continuación.

Descripción de casos

Caso 1

Paciente masculino de 30 años, agricultor, con lesión ulcerativa en tobillo derecho de mas o menos dos años de evolución y con antecedente de picadura de un insecto como factor desencadenante inicial. Inició como una pápula que posteriormente se ulceró y en el momento de toma de la biopsia muestra zonas de cicatrización parcial.

Además, este paciente presentó lesión similar en miembro inferior izquierdo que cicatrizó, dejando una epidermis atrófica y con pérdida importante de volumen a nivel dérmico (Foto 1).



Foto 1

Caso 2

Paciente de sexo femenino de 59 años de edad, ama de casa, con dos lesiones. Una ubicada en dorso de pie derecho y corresponde a una úlcera verrucosa de bordes definidos, cruenta y poco dolorosa. Sopechosa de carcinoma escamocelular o úlcera de marjolin, diagnóstico que fue descartado por histopatología (Foto 2).

La segunda lesión ubicada en planta izquierda, es una lesión ulcerativa, con abundante hiperqueratosis e impotencia para la marcha.

Caso 3

Paciente de sexo masculino, 22 años. Con lesiones ulcerativas de 5 años de evolución en miembro inferior izquierdo, con antecedente de traumatismo. (Foto 3).

Caso 4

Paciente de 19 años, sexo masculino con lesión ulcerativa en miembro inferior derecho, de 3 años de evolución y antecedente de picadura de insecto. (Foto 4).

Caso 5

Paciente masculino de 33 años, agricultor, con lesión ulcerativa en miembro inferior derecho de dos años de evolución y con antecedente de trauma como causa inicial. (Foto 5).



Foto 2



Foto 3



Foto 4



Foto 5

Pruebas diagnósticas

Ziehl Neelsen: todas las muestras de los pacientes fueron negativas para bacilos ácido alcohol resistentes.

PCR: todas las amplificaciones de ADN fueron negativas para *M. ulcerans*.

Diagnóstico clínico

En los 5 pacientes presentados como casos, el diagnóstico clínico era poco claro, debido a que no mostraban los típicos hallazgos de enfermedad vascular de tipo venoso, arterial o mixto que son las principales causas de úlceras en miembros inferiores. No había lesiones o compromiso en otros órganos que hicieran pensar en otras posibilidades diagnósticas como úlceras vas-

culíticas. Además los exámenes realizados para comprobar causas infecciosas, de las cuales la mas importante era la leishmaniosis no fueron positivas.

DISCUSIÓN

El polimorfismo de las lesiones producidas por *M. ulcerans* hace difícil que se sospeche el diagnóstico clínico. En zonas no endémicas o en regiones donde no se ha reportado el primer caso, como en Colombia, hacen que la detección de esta enfermedad sea poco probable. Sumado a este factor, los pacientes utilizan métodos terapéuticos propios y la presentación clínica puede

variar por maceración, pigmentación y cambios en la lesión. Adicional a estos factores, la dificultad de aislar el agente causal de las lesiones crónicas, impide que el diagnóstico se pueda confirmar, siendo estos factores los principales obstáculos para detectar la enfermedad en nuestro país.

Aún en áreas endémicas es frecuente que la UB se diagnostique tardíamente, cuando el tratamiento resulte muy difícil y frustrante, ya que los cultivos directos de las muestras clínicas de pacientes con lesiones crónicas son poco exitosos debido a la baja probabilidad de encontrar la bacteria en estas lesiones. Se realizarían importantes avances en el diagnóstico de la infección, si los métodos moleculares se pudieran aplicar en áreas endémicas de la infección o si existieran pruebas rápidas de diagnóstico aplicables en el campo y la detección temprana de las infecciones permitiría orientar rápidamente las intervenciones terapéuticas.

La confirmación diagnóstica de la UB es complicada por la ausencia de una prueba altamente sensible y específica (1). Un diagnóstico de UB requiere al menos dos de los siguientes hallazgos: clínica sospechosa mas detección de *M. ulcerans* por coloraciones de Ziehl-Neelsen, cultivo positivo de frotis o tejido confirmado por pruebas bioquímicas o PCR IS2404, estudios histológicos compatibles y PCR IS2404 de tejido o frotis (18). La sensibilidad del cultivo es de 40 % y la del frotis al microscopio es relativamente baja, pero la histología y los diferentes PCR dirigidos contra las diferentes regiones del *M. ulcerans* IS2404 y genes del 16S rRNA proporcionan una sensibilidad diagnóstica mayor del 90 % (18). La PCR puede servir por su alta sensibilidad diagnóstica como una buena herramienta en los casos probables y en la confirmación post quirúrgica, y previene además falsos diagnósticos e inadecuados tratamientos en pacientes que residen en áreas endémicas (23). Las pruebas de detección de anticuerpos IgM e IgG contra proteínas específicas de *M. ulcerans* son útiles para la

detección de IgM por ser más específicas que la detección de IgG. Demostrando así que hay una respuesta significativa de los anticuerpos IgM en pacientes enfermos con respecto a los sanos con una sensibilidad de 84,8 % y una especificidad del 95,5 %, pudiendo ser esta una prueba diagnóstica rápida y confiable para el diagnóstico de la UB; sin embargo estas pruebas serológicas no están disponibles para el uso clínico (12,15).

Este reporte es un inicio de la búsqueda de la UB en nuestro medio. Para la implementación de un protocolo de diagnóstico en pacientes con etiología desconocida de UT, es importante usar rutinariamente coloración de Ziehl-Neelsen, cultivo, estudio histopatológico y los métodos moleculares, así como el examen clínico enfocado a la UB, lo que podrá mejorar la detección de dichos casos.

En Colombia no se ha reportado ningún caso de UB hasta ahora, pero hay regiones con población alrededor de zonas pantanosas, húmedas, selváticas y con actividades económicas fluviales, características que comparte con zonas endémicas de esta infección. Además comparte características geográficas, ambientales y de situación de salud pública con los países de Sur y Centro América donde se han reportado casos de la enfermedad (12). En un estudio previo (24) se recolectaron datos y muestras (directo, cultivo y biopsia) de 130 pacientes de la zona de Urabá. De estos, 84 pacientes (64,6 %) fueron diagnosticados como leishmaniosis, 26 pacientes (20 %) úlceras piógenas, 3 pacientes (2,3 %) con miasis y un paciente con micetoma, y en 16 pacientes (12,3 %) que presentaban lesiones ulcerosas no fue posible establecer un diagnóstico etiológico, en estos casos hubiera sido útil la realización de una PCR para detección de ADN de *M. ulcerans* (25).

Estos hallazgos previos apoyan la premisa de que existen en nuestro país pacientes con úlceras que se quedan sin diagnóstico etiológico, no reciben el adecuado tratamiento y padecen las

consecuencias de la enfermedad al no ser tratada tempranamente, lo cual motiva a buscar casos de pacientes con UB, para que en un futuro se les pueda brindar un adecuado diagnóstico y tratamiento.

Declaración de conflicto de intereses:

Los autores de este artículo declaran que no hay conflictos de interés que pudieran influenciar los resultados de este trabajo.

REFERENCIAS

1. Asiedu K, Scherpbier R, Raviglione M. World Health Organization. Buruli ulcer- *Mycobacterium ulcerans* infections.. Geneva: The Organization; 2000
2. Muelder KM. Wounds that will not heal. Int J Dermatol 1992;31:25-6
3. Barker DIP. Epidemiology of *Mycobacterium ulcerans* infection. Trans R Soc Trop Med Hyg 1973;83:410-3
4. Ameh EA, Dogo PM, Ahmed A, Maitana HY, Esangbedo AE, Nmadu PT. *Mycobacterium ulcerans* skin infection in a patient with HIV infection: is this incidental? Trop Doct 1997;27:59
5. Debacker M, Aguilar J, Steunou C, Zinsou C. *Mycobacterium ulcerans* disease : role of age and gender in incidence and morbidity. Tropical Medicine and International Health 2004;9:1297-1304
6. Maccallum P, Tolhurst JC, Buckle G, Sissons HA. A new mycobacterial infection in man. Journal of Pathologic Bacteriology 1948;60:93-122
7. Yamousoukro. (cote d'Ivoire): Inter Press Service;1998 Jul 31. World Health Organization targets untreatable ulcer: report from the first international conference on Buruli ulcer control and research.
8. Tsukamura M, Mikoshiba H. A new mycobacterium which caused skin infection. Microbiol Immunol. 1982;26:951-55
9. Aiga H, Amano T, Cairncross S, Domako JA, Nanas OK, Coleman S. Assessing water-related risk factors for Buruli ulcer. A case-control study in Ghana. Am J Trop Med Hyg 2004;71(4) 387-92
10. Ross BC, Johnson PD, Oppedisano F, Marino I, Sievers A, Stinear T, *et al.* Detection of *Mycobacterium ulcerans* in environmental samples during outbreak of ulcerative disease. Appl Environ Microbiol 1997;63:4135-8
11. Silva MT, Portaels F, Pedrosa J. Aquatic Insects and *Mycobacterium ulcerans*: an association relevant to Buruli Ulcer Control? PLoS Medicine, 2007(4):229-231.
12. Horsburgh CR Jr, Meyers WM. Buruli ulcer. Pathology of emerging infections. Washington: American Society for Microbiology Press;1997.p.119-26
13. Marston BJ, Diallo MO, Horsburgh CR Jr, Diomande I, Saki MZ, Kanga JM, *et al.* Emergence of Buruli ulcer disease in Daloa region of Cote d'Ivoire. Am J Trop Med Hyg 1995;52:219-24
14. Barker DIP. The distribution of Buruli disease in Uganda. Trans S Soc Trop Med Hyg 1972;66:867-74
15. Guarner J, Bartlett J, Whitney S, Raghunathan PL . Histopathologic features of *Mycobacterium ulcerans* infection. Emerging Infectious Diseases 2003;9:651-6
16. Hayman J. Out of Africa: observations on the histopathology of *Mycobacterium ulcerans* infection. J Clin Pathol 1993;46:5-9

17. Hayman J. Clinical features of *Mycobacterium ulcerans* infection. Australian Journal of Dermatology 1985;26:67-73
18. Portaels F. Variability in the 3' end of the 16S rRNA sequence of *Mycobacterium ulcerans* is related to geographic origin of isolates. J. Clin. Microb. 1996; 34:962-965.
19. Pimsler M, Sponsler TA, Meyers WM. Immunosuppressive properties of soluble toxin from *Mycobacterium ulcerans*. J Infec Dis 1988;157:577-80
20. Leão SC, Martin A, Mejía GI, Palomino JC, Robledo J, Tellez MA, Portaels F. Practical handbook for the phenotypic and genotypic identification of mycobacteria. 2004.
21. Boom CJA, Sol MMM, Salimans CL, Jansen PME, Wertheim-Vandillen J, Van der Noordaa J. Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids. *Journal of Clinical Microbiology*, Mar 1990, p 495-503.
22. Massollier L, Raymond R, Saint Andre JP, Kouakou H, Legras P, Manceau AL, Mahanza C, Carbonnelle B. Aquatic Insects as a Vector for *Mycobacterium ulcerans*. Applied and environmental Microbiology 2002; 68:4623-28
23. Siegmund V, Adjei O, Racz P, Berberich C, Klutse E, Vloten van F, Kruppa T, Fleischer B, Bretzel G. Dry-Reagent-Based PCR as a Novel Tool for Laboratory Confirmation of Clinical Diagnosed *Mycobacterium ulcerans*-Associated Disease in Areas in the tropics where *M. ulcerans* is endemic. J. Clin. Microbiol 2005; 43: 271-276.
24. Tamayo L. Etiología infecciosa de la úlcera cutánea no genital en Apartado. Instituto Colombiano de Medicina Tropical (06/1998 a 06/1999)" (Tesis de Grado, Biblioteca Universidad Pontificia Bolivariana, UPB).
25. Silva MT, Portaels F, Pedrosa J. Pathogenetic mechanisms of the intracellular parasite *Mycobacterium ulcerans* leading to Buruli ulcer. Lancet Infect Dis. 2009 Nov;9(11):699-710.

