

52  
23



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

EVALUACION DE LA REACCION DE MONTENEGRO  
REALIZADA CON LEISHMANINA PRODUCIDA  
CON UNA CEPAS DE LEISHMANIA MEXICANA.

## T E S I S

EXAMEN DE CALIFICACION  
FAC. DE QUIMICA

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A:

MARIA DOLORES GOMEZ TOXQUI



MEXICO, D. F.

1986.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**Jurado Asignado :**

**Presidente: Prof. Abel Gutiérrez Ramos**

**Vocal: Prof. María Angélica Alfonsina Olivo Díaz**

**Secretario: Prof. Ana Esther Agullar Cárdenas**

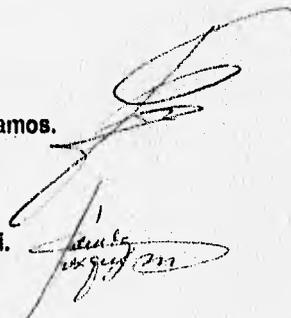
**1er. Suplente: Prof. Malté Astigarraga Zavalota.**

**2do. suplente: Prof. Patricia Berrón Ruíz**

**Este trabajo se desarrolló en el Departamento de Inmunogenética del Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos. (INDRE) de la S.S.A. bajo la dirección de la Dra Clara Gorodezky y la M en C. Angélica Olivo Díaz.**

**Asesor del Tema: Q.F.B. Abel Gutiérrez Ramos.**

**Sustentante: María Dolores Gómez Toxqui.**

Handwritten signatures of the assessor and the student. The signature of Abel Gutiérrez Ramos is written over the text of his name. The signature of María Dolores Gómez Toxqui is written below the text of her name.

De manera muy especial dedicó este trabajo a la memoria del Dr. Ricardo Martínez Marañón como un reconocimiento a su profesionalismo y a su gran calidad humana.

A la Dra. Clara Gorodezky le agradezco todas las enseñanzas, orientación , apoyo humano y profesional que me brindó.

A la M. en C. Angélica Olivo Díaz mi más sincero agradecimiento por toda la ayuda y apoyo que siempre me dió para la realización de este trabajo.

Les doy las gracias por su ayuda, sinceramente y con mucho cariño a mis amigos que forman parte del Departamento de Inmunogenética.

M. en C. Angélica Olivo Díaz.

Biol. Mónica Moreno Galván.

Quim. Carmen Aláez.

Tec. Josefina Vilchis Vega.

Tec. Arturo Hernández Baroja.

Biol. Gabriela de la Rosa.

Biol. Norma Bautista Matías.

Dra. Ana Isabel Burguete García.

Mis más sinceros agradecimiento a los doctores:

Dr. Oscar Hobart del Hospital Regional SSA. de Comalcalco, Tabasco.

Dr. Hector Pérez Pérez. Director del Hospital Regional SSA Comalcalco Tabasco.

Dra. Clementina Magos del INDRE.

Q.I. Margarita Guerrero del Centro de Salud Manuel González Rivera SSA, México, D.F.

Q.F.B. Georgina Carrada del Lab. Regional de Villahermosa, Tabasco.

A todos ellos por proporcionar a los pacientes y testigos que fueron integrados a este estudio. Sin su colaboración hubiese sido imposible la realización de este trabajo.

También quiero agradecer a la Dra. Amalia Monroy de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN por la donación de la cepa de *Leishmania* que se utilizó en este trabajo.

Agradezco a mis padres por todo el apoyo  
y ayuda que siempre me han brindado.

A mis hermanos Miguel Angel y Rocio.

A Tere le doy las gracias por todo el cariño  
y apoyo que siempre me ha dado.

A Polo con todo cariño.

Para mi hija Adriana con todo mi amor.

<b>INDICE</b>	<b>Páginas</b>
I. ABREVIATURAS	8
II. RESUMEN	9
III. INTRODUCCIÓN	11
1.- CARACTERÍSTICAS DE LOS PARÁSITOS	11
2.-CARACTERÍSTICAS DE LAS ENFERMEDADES QUE PRODUCEN LAS LEISHMANIOSIS	20
3.- DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA	25
4.- DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO	27
5.- LA REACCIÓN DE MONTENEGRO	29
IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	34
V. HIPOTESIS	34
VI. OBJETIVOS	35
VII. MÉTODOS	36
1.- PARÁSITOS	36
2.- MEDIO DE CULTIVO	36
3.- OBTENCIÓN DEL ANTÍGENO DE MONTENEGRO	37
4.- PRUEBAS DE ESTERILIDAD	39
5.- PREPARACIÓN DEL COLORANTE DE GIEMSA	39
6.- PRUEBA INTRADÉRMICA	39
6.1.- IMPRONTAS	39
6.2.- CULTIVO DEL PARÁSITO	39
7.- POBLACIÓN ESTUDIADA	41
7.1.- ENFERMOS CONFIRMADOS	41
7.2.- GRUPO TESTIGO DE ÁREA NO ÉNDEMICA SIN	41

ANTECEDENTES DE LEISHMANIOSIS	
7.3 - GRUPO TESTIGO DE ÁREA ENDÉMICA SIN ANTECEDENTES DE LEISHMANIOSIS	49
7.4 - ANÁLISIS ESTADÍSTICO	49
VIII. RESULTADOS	53
1 - PACIENTES CON LEISHMANIOSIS CUTÁNEA	53
2 - PACIENTES CON LEISHMANIOSIS CUTÁNEA CONFIRMADA	56
3 - POBLACIÓN TESTIGO DE ZONA NO ENDÉMICA (D.F.)	56
4 - POBLACIÓN TESTIGO DE LA ZONA ENDÉMICA (COMALCALCO, TABASCO)	58
IX. DISCUSIÓN	65
X. CONCLUSIONES	68
XI. BIBLIOGRAFÍA	70

## I.- ABREVIATURAS

DNA = ÁCIDO DESOXIRIBONUCLEÍCO

LPG = LIPOFOSFOGLICANA

kDNA = DNA DE CINETOPLASTO

LCL = LEISHMANIOSIS CUTÁNEA LOCALIZADA

LCD = LEISHMANIOSIS CUTÁNEA DIFUSA

LV = LEISHMANIOSIS VISCERAL

LMC = LEISHMANIOSIS MUCOCUTÁNEA

CD4+ = GLICOPROTEÍNA DE MEMBRANA DE LA SUBPOBLACIÓN DE LINFOCITOS  
T QUE PRINCIPALMENTE SON COOPERADORES E INDUCTORES

CD8+ = GLICOPROTEÍNA DE MEMBRANA DE LA SUBPOBLACIÓN DE LINFOCITOS  
T QUE PRINCIPALMENTE SON SUPRESORES Y CITITÓXICOS

Th1 = SUBPOBLACIÓN DE LINFOCITOS T CD4+ QUE PRODUCEN INTERLEUCINA-  
2, FACTOR DE NECROSIS TUMORAL E INTERFERÓN-GAMMA

Th2 = SUBPOBLACIÓN DE LINFOCITOS T CD4+ QUE PRODUCEN INTERLEUCINA-  
4, INTERLEUCINA-6 E INTERLEUCINA-10

IL-2 = INTERLEUCINA-2

MHC = COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD

HLA = ANTÍGENO DE LEUCOCITOS HUMANOS

IL-4 = INTERLEUCINA-4

IL-10 = INTERLEUCINA-10

INF- $\gamma$  = INTERFERÓN-GAMMA

TNF = FACTOR DE NECROSIS TUMORAL

IDR = INTRADERMORREACCIÓN DE MONTENEGRO

GPI = GLUCOSA FOSFATO ISOMERASA

GOT = TRANSAMINASA GLUTÁMICA PIRÚVICA

## II.- RESUMEN

Montenegro empleó por primera vez en 1924 la reacción intradérmica IDR para el diagnóstico de la leishmaniosis, utilizando un extracto fenolizado de promastigotes de *Leishmania braziliensis*. La IDR de Montenegro también es altamente específica para el diagnóstico de las formas cutáneas de la leishmaniosis (LC), ya que en los pacientes con enfermedad de Chagas, tuberculosis pulmonar, paludismo, lepra, blastomicosis y diversas dermatosis se obtienen resultados negativos de la IDR mientras que los pacientes con (LC) o con forma mucocutánea son positivos. Sin embargo, no existe un criterio estándar en cuanto al número de parásitos/ml que debe contener la leishmanina ni el diámetro de la induración de la reacción que debe considerarse como positivo. Para la estandarización de la prueba se aplicaron 0.1 ml de leishmanina fenolada que contenía  $5 \times 10^6$  promastigotes/ml de la cepa MHOM/MX/83/UAVY CV de *Leishmania mexicana*. La induración se midió a las 48 hrs. Los sujetos de estudio se agruparon en tres categorías:

1) 29 pacientes con leishmaniosis cutánea (LC) confirmada por la presencia del parásito. 2) 69 sujetos aparentemente sanos, sin antecedentes de residencia en área endémica. 3) 94 testigos del área endémica, sin antecedentes de la enfermedad.

Los dos últimos grupos fueron pareados por edad y sexo con los pacientes. El 92.75 % del grupo 2 presentaron una IDR  $< 5$  mm, por lo que se consideró como positiva una reacción  $> 5$  mm; el 93.1 % de los pacientes montaron una reacción positiva, lo cual concuerda con que todos ellos tenían un diagnóstico de LC localizada, y el 6.9 % restante corresponde a 2 pacientes con LC difusa. En el grupo 3 hubo 38.85 % de positivos y 69.15 % de negativos. El porcentaje elevado de positividad en estos individuos probablemente se debe a una infección subclínica previa.

La diferencia fue altamente significativa ( $p=0.00001$ ) y la sensibilidad de la prueba es del 100 %, si se considera a los pacientes de LCD, como anérgicos. Los

resultados indican que la IDR es una prueba confiable para el rastreo epidemiológico del padecimiento y que la induración mínima para considerar una prueba positiva debe de ser  $> 5$  mm, usando una leishmanina con  $5 \times 10^6$  parásitos/ml.

### III.- INTRODUCCION

Las leishmaniosis son enfermedades causadas por unas 14 especies ó subespecies del género *Leishmania* (1) que se transmiten por insectos llamados flebotomos, generalmente a partir de reservorios animales. De acuerdo a los datos de la OMS (2), las leishmaniosis constituyen una de las seis enfermedades tropicales de mayor importancia en el mundo. Walsh calculó que existían 12 millones de casos en 1985 (3) y se estima que cada año aparecen alrededor de 400,000 casos nuevos. Los expertos de la OMS han concluido que constituyen un verdadero problema de salud pública, no sólo por su magnitud creciente, sino también por sus consecuencias socioeconómicas y psicológicas ya que son enfermedades debilitantes, incapacitantes y en muchos casos mortales. En nuestro país, como no son de notificación obligatoria no se conoce su verdadera frecuencia, pero hay razones para pensar que tanto el número de casos, como las zonas geográficas afectadas, son cada vez mayores (4), de modo que cualquier trabajo que contribuya a aclarar esta situación es importante.

#### 1.- CARACTERISTICAS DE LOS PARÁSITOS

**Taxonomía.** Según la clasificación adoptada por la OMS (5), las leishmanias son protozoarios pertenecientes al phylum Sarcomastigophora, subphylum Mastigophora, clase Zoomastigophora, orden Kinetoplastida, suborden Trypanosomatina, familia Trypanosomatidae, Género *Leishmania*.

Las especies aceptadas en dicha clasificación son:

*L. donovani*, *L. major*, *L. tropica*, *L. aethiopica*, *L. mexicana*, *L. braziliensis* y *L. peruviana*. Las especies *L. donovani*, *L. mexicana* y *L. braziliensis*, se subdividen a su vez, como sigue: la primera en *L. donovani donovani*, la causante del kala-azar en la India; *L. donovani infantum*, en la cuenca del Mediterráneo y *L. donovani chagasi*, que produce el kala-azar en América; *L. mexicana* comprende las siguientes subespecies:

*L. mexicana mexicana*, *L. mexicana amazonensis*, *L. mexicana pifanoi*, *L. mexicana garnhami* y *L. mexicana venezuelensis*; y por último, la *L. braziliensis* se subdivide en *L. braziliensis braziliensis*, *L. braziliensis guyanensis* y *L. braziliensis panamensis* (cuadro 1).

En 1987 Shaw y col. (6) otorgan ya una categoría taxonómica y proponen dos subgéneros para el género *Leishmania*: *Leishmania (Viannia)* para las que tienen un desarrollo peripilario y *Leishmania (Leishmania)* para las que lo tienen suprapilario; en el primer suborden están los miembros del antiguo complejo *braziliensis*, por ejemplo, *Leishmania (Viannia) braziliensis*, antes llamada *L. braziliensis braziliensis*; en el segundo suborden están las demás especies, por ejemplo, *Leishmania (Leishmania) major*, antes *Leishmania major*. Con esta clasificación las subespecies se elevan a nivel de especie, sin embargo, en el segundo Simposium sobre taxonomía y filogenética de *Leishmania*, realizado en 1986 (7), se propuso una clasificación en la que también las subespecies se elevan a nivel de especie. Esta nomenclatura es la que se utilizará de aquí en adelante (cuadro 2).

Originalmente, estos parásitos se clasificaban por las manifestaciones clínicas de la enfermedad y la región geográfica en que se encontraban los pacientes, pero las manifestaciones clínicas dentro de una misma región pueden ser tan variadas que la utilización de estos parámetros son insuficientes (5).

Generalmente las especies y subespecies de *Leishmania* están asociadas con el desarrollo de un cuadro clínico característico, por lo que los esfuerzos para encontrar herramientas taxonómicas adecuadas han tenido, durante muchos años, un papel prominente en las investigaciones sobre los tripanosomátidos. Los estudios se iniciaron empleando los análisis serológicos de los antígenos del parásito, la serotipificación por el factor excretor y la caracterización biológica en cultivo, en los flebotomos y en el hamster (5). Recientemente se han utilizado diferentes técnicas

## CUADRO 1. TAXONOMÍA DE *Leishmania*

REINO	Protozoa	ESPECIES:
PHYLUM	Sarcomastigophora	<i>L. donovani</i>
SUBPHYLUM	Mastigophora	<i>L. major</i>
CILASE	Zoomastigophora	<i>L. tropica</i>
ÓRDEN	Kinetoplastida	<i>L. aethiopica</i>
SUBÓRDEN	Trypanosomatina	<i>L. braziliensis</i>
FAMILIA	Trypanosomatidae	<i>L. peruviana</i>
GÉNERO	<i>Leishmania</i>	<i>L. mexicana</i>
SUBESPECIES:		
<i>L. d. donovani</i>	<i>L. b. braziliensis</i>	<i>L. m. mexicana</i>
<i>L. d. infantum</i>	<i>L. b. guyanensis</i>	<i>L. m. pifanoi</i>
<i>L. d. chagasi</i>	<i>L. b. panamensis</i>	<i>L. m. garnhami</i>
		<i>L. m. venezuelensis</i>

## CUADRO 2. NOMENCLATURA ACTUAL DE LAS LEISHMANIOSIS.

Nomenclatura actual	Nomenclatura previa
<i>Leishmania braziliensis</i>	<i>Leishmania braziliensis braziliensis</i> <i>Leishmania (Viannia) braziliensis.</i>
<i>Leishmania guyanensis</i>	<i>L. b. guyanensis</i> <i>L. (V) guyanensis.</i>
<i>Leishmania panamensis</i>	<i>L. b. panamensis</i> <i>L. (V) panamensis.</i>
<i>Leishmania lainsoni</i>	<i>L. (V) lainsoni.</i>
<i>Leishmania mexicana</i>	<i>Leishmania mexicana mexicana</i> <i>Leishmania (Leishmania) mexicana.</i>
<i>Leishmania amazonensis</i>	<i>L. m. amazonensis</i> <i>L. (L) amazonensis.</i>
<i>Leishmania venezuelensis</i>	<i>L. m. venezuelensis</i> <i>L. (L) venezuelensis</i>
<i>Leishmania chagasi</i>	<i>L. m. chagasi</i> <i>L. (L) chagasi.</i>
<i>Leishmania donovani</i>	<i>Leishmania donovani donovani</i> <i>L. (L) donovani.</i>
<i>Leishmania infantum</i>	<i>L. d. infantum</i> <i>L. (L) infantum.</i>
<i>Leishmania tropica</i>	<i>Leishmania tropica tropica</i> <i>L. (L) tropica.</i>
<i>Leishmania major</i>	<i>L. t. major</i> <i>L. (L) major.</i>
<i>Leishmania aethiopica</i>	<i>L. (L) aethiopica.</i>

para la identificación más precisa, como los anticuerpos monoclonales dirigidos contra determinantes antigénicos específicos, la determinación de isoenzimas y los métodos de biología molecular que identifican secuencias de DNA de cada subespecie, las cuales revelan características intrínsecas del parásito que no se modifican o son enmascaradas por factores del huésped o del ambiente (8,9,10). Algunos de estos métodos han mostrado utilidad para distinguir especies y subespecies, sin embargo, "la Taxonomía Bioquímica todavía no puede ofrecer la base de un sistema completo que sustituya el esquema clásico", como se notará en los ejemplos citados más adelante, en los cuales una especie o subespecie de leishmania ha llegado a producir una enfermedad que normalmente es ocasionada por otra especie.

Los principales métodos para identificar las especies y subespecies de leishmania son:

**A.- La caracterización biológica.** Se demuestra por el desarrollo del parásito a partir de los aislados en los flebotomos y por su virulencia en los roedores (11).

**B.- Caracterización Inmunológica.** Se utiliza la prueba de Noguchi Adler, que consiste en cultivar a los promastigotes en un medio de cultivo en varias cajas que contengan diferentes diluciones de suero hiperinmune de conejo.

En estas condiciones el crecimiento de los parásitos es anormal, pues los promastigotes tienden a aglutinarse. El título de la prueba se considera positiva en aquella dilución en la cual el crecimiento del parásito sea normal. Esta dilución se compara con un cultivo control que no contenga anticuerpos. Las cepas con títulos semejantes se consideran cepas antigénicamente idénticas. Otra técnica es la serotipificación de los aislados por medio del factor excretor (LPG). En este método se toma el sobrenadante del cultivo de *Leishmania* en la fase log, se filtra el sobrenadante y se ajusta el pH a 5.0. Se lleva a ebullición, se centrifuga y el precipitado se descarta y el sobrenadante se liofiliza. El material seco se resuspende a la mitad del volumen

original en agua destilada, se dializa en una membrana especial y se extrae 3 veces con fenol al 90% a 68 °C. Se dializa la fase acuosa contra agua destilada, se cuantifican los carbohidratos por el método de Dubis. Un método muy específico consiste en el empleo de anticuerpos monoclonales especie-específicos en diferentes técnicas como son ELISA, RIA, Inmunofluorescencia para la identificación de antígenos que son propios de cada especie (12, 13, 14).

**C. Caracterización bioquímica.** Se han utilizado varias técnicas para la identificación de las especies de *Leishmania*, entre las cuales se encuentran las siguientes: 1) el análisis de la secuencia del DNA del cinetoplasto (kDNA) (15). 2) La comparación de la densidad de flotación del DNA nuclear (15). 3) El análisis de la velocidad de hibridación DNA-RNA (15, 16). 4) El estudio de los tamaños de los fragmentos de kDNA obtenidos con endonucleasas de restricción (15,16,17). 5) La caracterización por isoenzimas (18). 6) El estudio de la estructura de los carbohidratos de la membrana celular por medio de lectinas (19). 7) El análisis del contenido de ácidos grasos (20). 8) Estudios de radiorespirometría (21).

Las pruebas más utilizadas en la actualidad son las isoenzimas y los anticuerpos monoclonales. La prueba de las isoenzimas consiste en cultivar en medio Senekije los promastigotes los cuales se concentran a una cantidad de  $10^8$  - $10^9$  en 0.5 ml del amortiguador de corrimiento, que contiene 0.728 g de Tris y 0.472 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  en 100 ml de agua desionizada con un pH 8.0. Las muestras se aplican a una membrana de celulosa prehumedecida con el amortiguador de corrimiento y se colocan en la cámara de electroforesis con el voltaje y tiempo apropiados. Después de la electroforesis, las membranas se recortan y se colocan al lado del sustrato hasta que reaccionen. La reacción continúa hasta que las bandas sean de una intensidad apropiada, variando de 2 a 3 minutos con glucosa fosfato isomerasa GPT hasta 20 minutos con transaminasa glutámica piruvica GOT. La membrana se quita y se sumerge en ácido acético al 5%, se lava con agua y se deja que se seque a

temperatura ambiente. Esta se puede fotografiar o puede examinarse en ese momento. Se mide la distancia de migración de la banda control y de las bandas problema las cuales dan un valor proporcional a las del control. A estos valores se les denomina fracción representativa o (valor R.F.). La técnica que emplea a los anticuerpos monoclonales, consiste en inocular ratones BALB/c con un aislado de membrana de promastigotes de cepas de *Leishmania*. Se obtienen las células del bazo del ratón inmunizado ( $1.0$  a  $1.3 \times 10^8$ ) y se fusionan con NS-1 (células de mieloma  $1.2$  a  $1.6 \times 10^7$ ) usando polientilenglicol para dar lugar a la formación del hibridoma. La producción de anticuerpos se evalúa entre los días 14 y 17 de cada mes. Después se selecciona por HAT el hibridoma y se utiliza el método de dilución limitante para obtener la clona específica que produce el anticuerpo de interés y se siembra en medio de cultivo. El sobrenadante contiene los anticuerpos monoclonales.

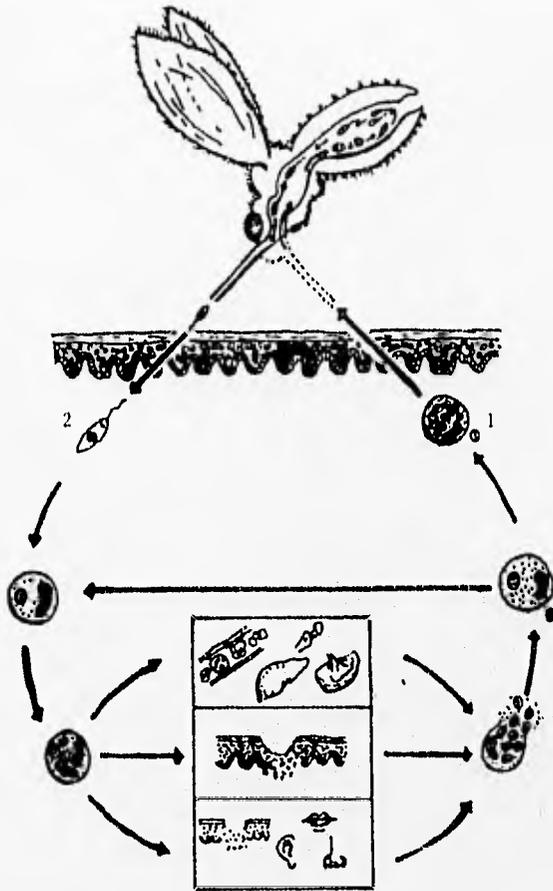
Una vez obtenidos estos anticuerpos se utilizan empleando la técnica de RIA (Radioinmunoensayo) para la tipificación de las leishmanias. Se usan placas de 96 pozos que contienen pegado el antígeno (membrana de promastigotes). Se incuban con el medio de cultivo que contiene el anticuerpo monoclonal por un mínimo de 2 hrs a  $5^{\circ}\text{C}$ . Después se adiciona anti-IgG de ratón (fragmento Fab) purificado por afinidad, marcado con  $^{125}\text{I}$  y se incuba por 1 hora a  $0^{\circ}\text{C}$ . El exceso de anticuerpo se elimina con 5 lavados. Las placas se secan a temperatura ambiente y se mide la radiactividad. Recientemente, las técnicas moleculares son las de mayor preferencia para la identificación de especies, pues conociendo las secuencias específicas de nucleótidos en el DNA que caracterizan a cada una, se puede hibridar el DNA de los parásitos con ellas usando el método del southern blot o se puede amplificar los segmentos de DNA usando iniciadores que flanquean a las secuencias blanco. Estos métodos son los más específicos y sensibles para la identificación de las diferentes especies.

Entre los procedimientos que se propusieron para la clasificación de las leishmanias, se intentó usar a la posición que ocupan los parásitos en el tubo digestivo de los vectores, pero ésta característica no tuvo repercusiones aparentes, hasta que recientemente se sugirió para la creación de dos subgéneros (6). En 1962 Hertig y Johnson (22,23) señalaron que algunas leishmanias patógenas para el hombre pueden desarrollarse en el intestino posterior de los flebotomos. Se creía que todas las leishmanias de maníferos se desarrollaban primero en el intestino medio, antes de migrar hacia las partes bucales.

Los trabajos de Shaw y col. (24) demostraron que las leishmanias que infectan a los reptiles se desarrollan en el intestino posterior (hipopilaria).

Lainson y Shaw (25) dividieron después a las leishmanias que parasitan al hombre en dos grupos, pero sin implicaciones taxonómicas. A uno lo designaron "peripilaria", al que pertenecen las especies que necesariamente se desarrollan primero en el intestino posterior, antes de migrar al intestino anterior del insecto; al otro lo llamaron "súprapilaria", en el que se encuentran las especies que han perdido la capacidad de desarrollarse en el intestino posterior y se reproducen sólo en el intestino medio y anterior. Estas últimas se consideran más avanzadas desde el punto de vista evolutivo.

**Ciclo de vida.** Todas las leishmanias utilizan dos huéspedes para completar su ciclo de vida: uno vertebrado, en el que las leishmanias se encuentran siempre bajo la forma amastigote y en el interior de células de la serie fagocítica-mononuclear, especialmente dentro de los macrófagos de la piel y de las mucosas o bien en las vísceras, dependiendo de la especie. El otro huésped es un invertebrado (flebotomo), que cuando pica succiona las formas amastigotes, las que se desarrollan y se reproducen en diferentes porciones del intestino bajo la forma de promastigotes, siendo éstas también las formas que se encuentran en los cultivos (fig. 1) (26, 27).



- 1.- Amastigote  
2.- Promastigote

Figura 1. Ciclo de vida de *Leishmania*.

**Morfología.** Salvo pequeñas diferencias, todas las leishmanias tienen una morfología y una evolución semejantes: la forma amastigote, como su nombre lo indica, aparentemente carece de aparato flagelar; es de forma redonda u ovoide, mide de 2.5-5.0  $\mu\text{m}$  de longitud en su diámetro mayor, que en microscopía de luz y teñido con alguno de los derivados del Romanowski, solo muestra un núcleo redondo u ovoide y un cinetoplasto generalmente baciliforme. La microscopía electrónica ha mostrado, además de muchas otras características interesantes, que en realidad el aparato flagelar se encuentra reducido al blefaroplasto y a la bolsa del flagelo que no se perciben en la microscopía de luz (28).

El promastigote, que se desarrolla, como se mencionó, en el insecto vector o en cultivo *in vitro*, se caracteriza por ser más grande (15-25  $\mu\text{m}$  de longitud por 1.5-3.5  $\mu\text{m}$  de ancho) y tener una forma alargada con un núcleo central o subcentral y el cinetoplasto situado en el extremo anterior, del cual parece originarse el flagelo. Los promastigotes, a diferencia de los amastigotes, presentan movimientos muy activos en cultivo (fig. 1) (29).

## 2.- CARACTERISTICAS DE LAS ENFERMEDADES QUE PRODUCEN LAS LEISHMANIAS

**1) Características clínicas.** Algunas leishmanias afectan exclusivamente la piel, o la piel y las mucosas; otras, las vísceras. De ahí la primer gran clasificación de estas enfermedades en leishmaniosis cutáneas o mucocutáneas y leishmaniosis visceral, también llamada kala-azar (30).

A su vez, las leishmaniosis del "Nuevo Mundo" que atacan los tegumentos pueden presentar diversas manifestaciones clínicas; algunas producen una lesión local, generalmente una úlcera y suelen llamarse leishmaniosis cutáneas localizadas (LCL), también designadas con diversos nombres vernáculos: úlcera de los chicheros, úlcera de Bauru, pian bois, etc. (30). En otros casos, poco o mucho tiempo después de

una manifestación local, semejante a las anteriores, se desarrolla en la región nasofaríngea una lesión persistente y con frecuencia mutilante; a esta variedad se le llama leishmaniosis mucocutánea o espundia (LMC) (30).

Además de estas formas clínicas de la leishmaniosis cutánea americana, se pueden presentar con menos frecuencia manifestaciones muy variadas en un determinado enfermo: formas vegetantes, verrucosas, en placas, lupoides (más frecuentes en el Medio Oriente), lesiones de propagación aparentemente linfática (como en la esporotricosis), etc. (30).

Otras veces se diseminan prácticamente en toda la superficie de la piel, no en forma de úlceras, sino de nódulos semejantes a los de la lepra lepromatosa. A esta variedad se le llama leishmaniosis cutánea difusa (LCD), lepromatoide o anérgica, porque se piensa que en su establecimiento interviene en forma muy importante en el hospedero una supresión específica de la respuesta inmunológica celular frente a la *Leishmania* (31); sin embargo, conviene insistir que aunque estas leishmanias lleguen a diseminarse en toda la piel y a veces a la mucosa nasal, nunca afectan las vísceras de los enfermos.

Por el contrario, la leishmaniosis visceral, después de un período de incubación de dos a cuatro meses, se caracteriza por un proceso febril que pronto afecta seriamente el estado general del paciente, produciendo una marcada caquexia acompañada de crecimiento del bazo y del hígado, que llegan generalmente a la hipertrofia. A estos síntomas cardinales (fiebre prolongada, hepato y esplenomegalia y consunción), se agregan otros muchos síntomas secundarios, tales como la pigmentación cutánea, epistaxis, diarrea, susceptibilidad a otras infecciones y pancitopenia. La enfermedad casi siempre es mortal si no se establece el tratamiento adecuado.

Aunque en términos generales una especie de leishmania identificada con los criterios modernos de taxonomía bioquímica, suele provocar predominantemente una

forma clínica, existen numerosas excepciones a la regla. Así, los casos de leishmaniosis cutánea difusa en México son causados por *L. mexicana* (32,33). También se aisló *L. amazonensis* de la médula ósea de un enfermo de kala-azar (34) y un hallazgo sorprendente ha sido el aislamiento de una variedad de *L. infantum*, de un enfermo con leishmaniosis cutánea en Europa (35) cuando esta cepa normalmente produce leishmaniosis visceral. El mismo parásito provocó kala-azar en un individuo y manifestaciones cutáneas en otro (36) y en el perro llegan a coexistir dos zimodemas *L. infantum* (37).

**Características Inmunológicas.** Aunque la mayoría de los casos de leishmaniosis informados en México, presentan manifestaciones cutáneas localizadas, también se han descrito formas multinodulares diseminadas (38), en las que se presentan lesiones nodulares no ulcerativas, que se diseminan a muchos sitios de la piel. El estudio histológico de los pacientes con LCD, muestra un dominio de macrófagos vacuolados altamente infectados, en contraste con la LCL, en donde se observan focos epitelioides o un infiltrado linfohistiocítico con pocos o ningún parásito (39). En la LCD existe una inmunosupresión celular específica, ya que las pruebas intradérmicas con antígenos de *Leishmania* son negativas en estos pacientes, mientras que la respuesta celular en contra de otros antígenos permanece intacta (40, 41, 42, 43, 44). Además, la respuesta a la quimioterapia común es baja y frecuentemente reversible en esta forma de la enfermedad (45). La respuesta celular evaluada *in vitro* mediante la prueba de transformación blastoide revele en estos pacientes, la ausencia de respuesta de los linfocitos T contra los antígenos del parásito (44,46).

Se sugiere la activación de una subpoblación de linfocitos T CD4+ cooperadores llamados Th2 que favorecen la síntesis de anticuerpos específicos y que propician la no activación de los macrófagos infectados, por lo que la infección se disemina fácilmente. Por su parte, la respuesta celular protectora que está dada por los linfocitos cooperadores Th1 está muy abatida o ausente (47).

En la LCL hay una buena respuesta inmunológica celular, que se manifiesta contra los antígenos de *Leishmania* tanto *in vivo* como *in vitro* (46, 48, 49, 50). En consecuencia, se desarrolla en forma eficiente la inmunidad adquirida en los pacientes que han evolucionado hacia la cicatrización (51). En general, en la LCL hay una buena respuesta a la quimioterapia (45, 52, 53).

Los estudios inmunohistológicos en pacientes con LCL, muestran que los linfocitos T CD8+ (citotóxicos ó Tcit ) predominan cuando existe un infiltrado mononuclear difuso en la dermis que rodea a la lesión, pero cuando hay formación de granuloma con presencia de células gigantes, se encuentra una mayor cantidad de linfocitos T cooperadores CD4+ (Th) alrededor de éstas células (54). Cuando se comparan los resultados inmunopatológicos de pacientes con LCL y LCD, no se encuentran diferencias en la cantidad de subpoblaciones de linfocitos T CD8+ y CD4+, ni en las células que expresan el receptor para la interleucina 2 (IL-2), pues siempre se halla mayor cantidad de células CD8+ que de CD4+ en las lesiones de ambas formas clínicas. Sin embargo, una diferencia sobresaliente es que las células productoras de IL-2 están disminuidas en un orden de magnitud en los pacientes con LCD y hay ausencia de respuesta celular (55), lo que sugiere que podría estar participando una subpoblación de linfocitos T CD4+, no productores de IL-2, como sucede en el ratón (47, 56).

Los hallazgos en cuanto a la susceptibilidad genética en el humano muestran que el MHC (complejo principal de histocompatibilidad) parece jugar un papel importante en la expresión del padecimiento. En la LCL causada por *L. guyanensis* en Venezuela (57) se describió asociación del HLA-DQ3, así como en la forma mucocutánea en Brasil y una disminución del HLA-DR2 en los pacientes, sugiriendo un gen de protección (58). En México se encontró también un incremento de DQ3, en la LCL causada por *L. mexicana* y un gen de protección ligado al antígeno HLA-DPw4 (59).

Tanto la susceptibilidad como la resistencia genéticamente determinadas ha sido ampliamente estudiada en el ratón, utilizando cepas singénicas y congénicas y se ha encontrado que la resistencia innata a *L. donovani* está determinada por un gen, o un grupo de genes ligados, localizados en el cromosoma 1, denominado I.sh, mientras que la resistencia adquirida está regulada por tres genes: el Rld-1 ligado al H-2, otro al H-11 y otro al Ir-2 (60, 61, 62, 63, 64).

En la leishmaniosis cutánea la distinción entre resistencia innata y adquirida es menos clara, pero se presentan distintos grados de susceptibilidad y/o resistencia a *L. major* en cepas consanguíneas de ratones, dependiendo del fondo genético de cada una de ellas (65, 66). Los ratones de la cepa BALB/c son característicamente incapaces de controlar la infección por *L. major* (66, 67), aún cuando la lesión primaria sea inducida con dosis mínimas de parásitos (67), desarrollando una enfermedad diseminada severa, que es fatal (66, 67, 68). La susceptibilidad a la infección por *L. major* está controlada por los genes Scl-1, Scl-2 y por genes ligados al H-11 (67, 69, 70, 71, 72). La participación de los genes ligados al H-2 parece ser mínima en la infección por *L. major*.

Se han realizado una serie de trabajos sobre la participación del MHC en el ratón (H-2) en las respuestas proliferativas de las células T que a su vez activan a los macrófagos infectados con *L. major*, en cepas de ratones singénicas y congénicas, los cuales han demostrado la existencia de una restricción genética determinada por la región I-A de genes del MHC clase II en la proliferación de blastos parásito-específicos (73), ya que sí el reconocimiento no se lleva a cabo, no hay respuesta proliferativa. Se ha encontrado que los macrófagos de la cepa BALB/c infectados con *L. donovani* presentan una disminución en la producción de IL-1 y en la expresión de antígenos clase I y clase II del MHC sobre la membrana celular. Esto está asociado al fondo genético del ratón y al péptido antigénico que sea presentado a cualquiera de las células Th para que se induzca una respuesta celular. La subpoblación Th1 que

sintetiza interferón-gamma (IFN- $\gamma$ ), IL-2 y factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), que activan al macrófago, inducen una respuesta celular protectora y conducen a la resolución de la lesión; si lo que se activa es una subpoblación Th2 que produce IL-4, IL-10, se induce la síntesis de anticuerpos y además una supresión de la respuesta celular, ocasionando una enfermedad progresiva (47, 56).

### 3.- DISTRIBUCIÓN GEOGRAFICA

En el Viejo Mundo existen tres especies que causan leishmaniosis cutánea: *L. tropica*, *L. major* y *L. aethiopica*, las cuales abarcan vastas regiones del Medio Oriente, la cuenca del Mediterráneo y Africa Oriental y las lesiones que producen son conocidas con diversos nombres tales como, úlcera de Bagdad, úlcera de Biskra, "Botón" de Oriente, etc.

En América, las leishmaniosis cutáneas se han reportado desde Texas, en el norte (74, 75), hasta Argentina, en el sur (76). Todas las manifestaciones cutáneas descritas anteriormente se han encontrado en México, pero con una frecuencia y distribución muy desiguales; la forma más frecuente en el país es la úlcera de los chicleros, la que aparentemente existía desde antes de la conquista, ya que los cronistas narran que durante la colonización de Yucatán observaron indígenas "con las orejas podridas". Sin embargo, fue Seidelin en 1912 quien informó el agente etiológico que causaba esta enfermedad (77). Posteriormente, diversos investigadores nacionales (78) y extranjeros (79) confirmaron la existencia de la enfermedad, estableciendo inicialmente su distribución geográfica, la cual incluye fundamentalmente los Estado de Quintana Roo, Yucatán, Campeche y Chiapas en México; Belice y el territorio del Petén en Guatemala. En estos trabajos y otros posteriores (80), se tenía la idea de que la leishmaniosis cutánea era una enfermedad profesional de los chicleros, que se debía a la permanencia prolongada en la selva en la que se encuentra el árbol del chicozapote, del cual estos trabajadores extraen el

látex con el que se produce el chicle. Naturalmente, otras labores que exigen también un contacto prolongado con la selva, como la explotación de la madera, la construcción de caminos, las labores agrícolas o de caza en la selva, se consideraban también factores de riesgo.

La primera excepción al axioma de que la leishmaniosis cutánea en México es una enfermedad de la selva, ocurrió cuando se comunicó en 1965 que existía leishmaniosis en el Estado de Coahuila, cuya ecología es completamente diferente a la de los sitios selváticos, en donde predomina el clima semiárido (81).

Después se supo que también la había en Tamaulipas, Nuevo León, Coahuila y probablemente Durango (82, 83, 84), por lo cual esta área se llamó "Foco Norte"; también se describió la presencia de la enfermedad en otros Estados de la República como Oaxaca y Yucatán (85, 86).

Los trabajos de Velasco (87) han puesto de manifiesto en el Estado de Tabasco, y particularmente en la región de la Chontalpa, una evolución muy especial de estas enfermedades, probablemente relacionada con los cambios ecológicos que ha ocasionado el desarrollo reciente de la agricultura en estos lugares, con las consecuencias socioeconómicas que ésta evolución ha acarreado. Cuando se popularizó el conocimiento de que esta zona es particularmente favorable para el cultivo del cacao en gran escala, la selva tropical siempre verde y los pastizales que originalmente la cubrían, se substituyeron rápidamente por plantaciones de cacao. Es bien sabido que esta planta, al igual que el café, exige, para su desarrollo y productividad, el crecimiento bajo un dosel de árboles altos lo cual, naturalmente, hace que el suelo esté cubierto por una densa hojarasca que parece muy favorable para la reproducción de los flebotomos. Además, como estos cacaotales son de propiedad privada o ejidal, se encuentran relativamente protegidos de cazadores y otros depredadores, lo que favorece la reproducción de los reservorios potenciales.

Por otro lado, el auge producido por esta explotación intensiva del cacao causó un crecimiento explosivo de la población lo que hizo que los asentamientos humanos llegaran hasta los límites más extremos de los cacaotales, e incluso a veces, los invadieran.

El conjunto de estos factores ha provocado un desarrollo inusitado de la leishmaniosis y ha hecho variar algunos conceptos clásicos sobre la úlcera de los chicleros, tales como su predominancia casi exclusiva en los varones, su distribución por edades, la localización de las lesiones, etc.

En los últimos años, a consecuencia de estas observaciones, las autoridades de salud de Tabasco, han comunicado 381 casos, de los cuales el 98.5 % son leishmaniosis cutánea localizada; 4 casos (1 %) con diseminada y 2 casos (0.5 %) son mucocutánea (88). Esta última variedad de leishmaniosis tegumentaria era, hasta hace poco, totalmente desconocida en México. Sorpresivamente también se encontró en Tequila, Jalisco (89).

La leishmaniosis visceral se ha encontrado en México sólo en la cuenca del Balsas (Figura 2), donde se conocen unos 8 casos, de los cuales sólo hay 3 publicados en detalle (90, 91).

#### **4.- DIAGNOSTICO DE LABORATORIO**

Las leishmaniosis, en todas sus formas, pueden confundirse con otros muchos padecimientos, de modo que los criterios clínicos y epidemiológicos tienen que complementarse con procedimientos de laboratorio, para tener certeza del diagnóstico. En términos generales, estos procedimientos pueden dividirse en dos grandes grupos:

1.- La demostración del parásito en improntas, biopsia, cultivo o inoculación del parásito en animales de experimentación (hamsters o ratones).

Naturalmente estos métodos son los únicos cuyo resultado es indiscutible pero desafortunadamente, con frecuencia los resultados son negativos debido a diversas

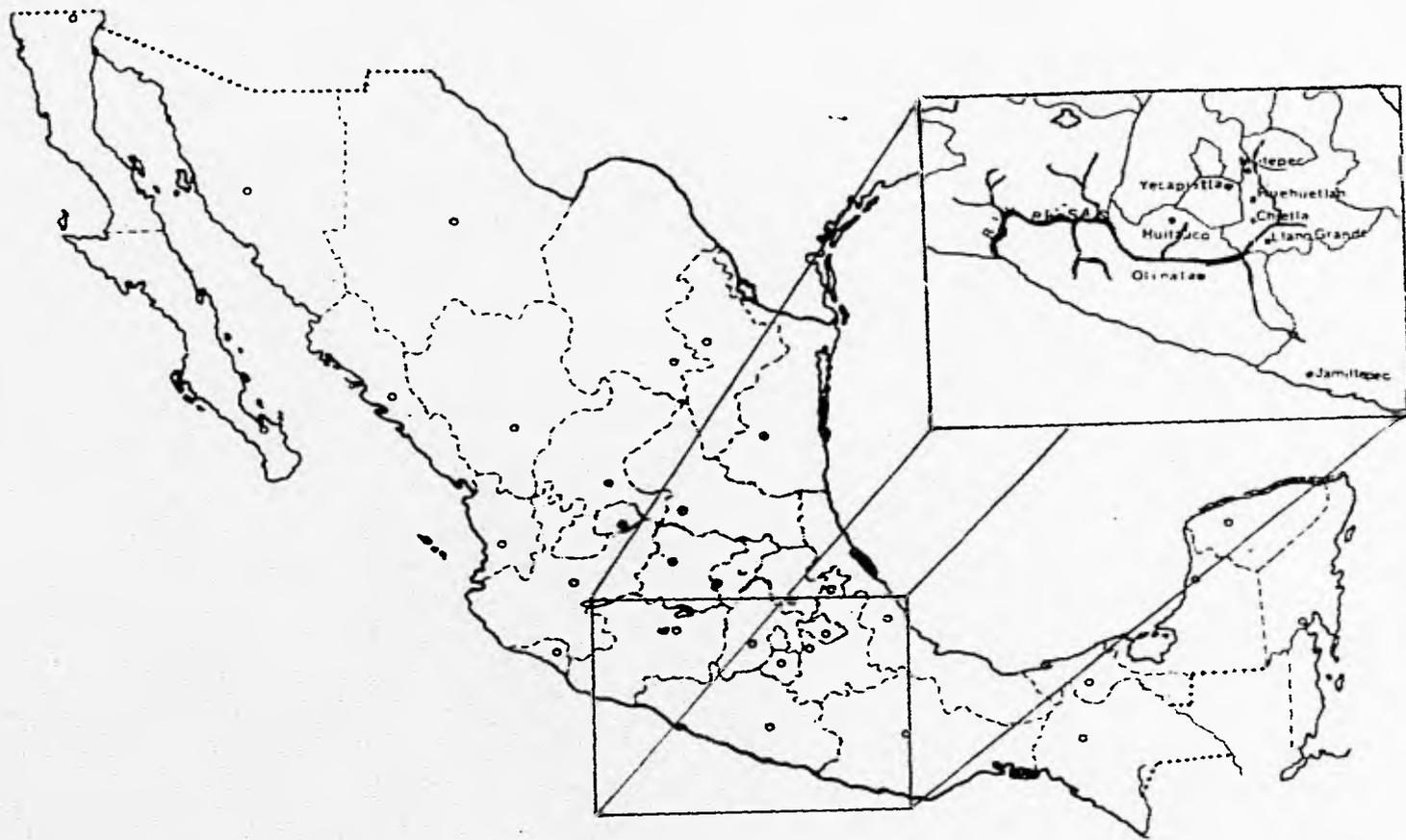


Figura 2. Casos de leishmaniosis visceral. Zona geográfica donde se han encontrado.

circunstancias, como por ejemplo, cuando la enfermedad es antigua y los parásitos son escasos o no existen; cuando hay contaminación bacteriana o fúngica en los cultivos, o cuando las improntas no se toman en forma adecuada.

2.- Los métodos inmunológicos, entre los cuales están, por un lado, las técnicas que identifican la presencia de anticuerpos específicos, es decir los procedimientos serológicos, tales como la inmunofluorescencia indirecta, hemaglutinación pasiva y ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) (92). Por otro lado, están los métodos para identificar la respuesta celular que incluyen a las técnicas *in vitro* que abarcan, entre otras, a la transformación blastoide, activación de macrófagos, medición de citocinas (31) y los métodos *in vivo* constituidos por las pruebas cutáneas. Para la leishmaniosis esta última es la intradermorreacción de Montenegro, la cual es el objeto de este trabajo.

## 5.- LA REACCIÓN DE MONTENEGRO

A pesar del tiempo transcurrido desde su descubrimiento, esta reacción se sigue considerando como un excelente auxiliar en el diagnóstico, por su especificidad, facilidad de elaboración, facilidad de aplicación del reactivo y por lo valioso de sus resultados, no sólo en la clínica, sino también por su contribución a los estudios epidemiológicos de la leishmaniosis.

Wagner (93) y Wagner y Koch (94) fueron los primeros en demostrar que los conejos inyectados con cultivos de leishmanias muertas, se hacían hipersensibles a los extractos de la misma. En 1926, Montenegro (95) introdujo al diagnóstico de la leishmaniosis una reacción que se efectúa mediante la inyección intradérmica de un extracto fenolizado de promastigotes de *L. brazillensis*. Jessner (96) empleó suspensiones de *L. tropica*, en la intradermorreacción, para el diagnóstico de la úlcera de oriente. Buss (97) mostró las ventajas de los antígenos preparados con suspensión de promastigotes y demostró su especificidad, observando concordancia en 30 casos

comprobados. Salles Gomes (98) obtuvo 97.5 % de positividad en 25 casos confirmados por demostración del parásito y obtuvo resultados negativos en pacientes con úlcera tropical, cromomicosis, lepra tuberculoide y psoriasis, que no tenían antecedentes de leishmaniosis, lo que indica que la reacción es altamente específica. El fué también quién propuso que la reacción se llamara REACCIÓN DE MONTENEGRO en homenaje a su descubridor.

El antígeno que se utiliza para esta reacción ha sido objeto de muy diversas modificaciones, diferentes cepas del parásito, mezclas de diferentes cepas, distintas concentraciones de sustancia activa, medidas por el número de promastigotes/ml, por concentración de proteínas, o por ambos; también se han usado diversos procedimientos para matar a los parásitos, como son el ultrasonido, el fenol, el formol o el timerosal (5). En vista de estas discrepancias, la Organización Mundial de la Salud ha determinado que se use una suspensión de 1 millón de promastigotes/ml en fenol-salina al 0.5 % (0.5 ml de fenol fundido más 99.5 ml de solución salina), o en timerosal (1 ml de timerosal en un litro de solución salina) (7).

Sin embargo, en este estudio se utilizaron  $5 \times 10^6$  promastigotes/ml en base a un estudio hecho en Kenya en 1983 (99) y además para lograr la identificación de algunas reacciones que pudieran ser débilmente positivas con una leishmanina que contenga  $1 \times 10^6$  promastigotes/ml. Además con una dosis mayor se pensó que es posible demostrar a sujetos sanos de zona endémica que han tenido contacto con el parásito.

Según Pifano (100), la respuesta cutánea será más intensa conforme se hace más antigua la infección. A partir de la 4a semana ya es positiva en un elevado porcentaje de casos, pero una reacción negativa en los primeros tres meses de la enfermedad coincide muchas veces con la presencia de abundantes parásitos y resistencia al tratamiento con antimoniales. En las localizaciones mucosas, que representan formas tardías de la afección, la intradermorreacción es intensamente

positiva. La única excepción es la LCD, en la que la reacción siempre es negativa, debido a que la respuesta inmunológica celular está francamente abatida (31).

Hay individuos que pueden resultar fuertemente positivos a la intradermorreacción, aún cuando no tengan cicatrices que indiquen que tuvieron el padecimiento, lo cual sugiere que hay infecciones leishmaniásicas en las que no se manifiestan lesiones cutáneas, aunque sí son capaces de inducir inmunidad.

La lectura de la induración de la reacción de Montenegro se ha hecho también, en diferentes formas. Liew (101) propuso que esta intradermorreacción formaba parte de las llamadas reacciones de Jones-Mote, caracterizadas por un infiltrado de basófilos y neutrófilos, cuyo máximo desarrollo en el ratón se alcanza a las 12-15 horas y desaparece en 48 horas.

Esta idea no ha tenido aceptación en la práctica y todos los autores continúan usando el criterio de la OMS (5): "La inyección intradérmica de 0.1 ml de leishmanina en la superficie anterior del antebrazo se examina a las 48-72 horas". En la actualidad, la determinación del diámetro de la infiltración se realiza casi universalmente, según las recomendaciones de Sokal (102), utilizando un bolígrafo que se desplaza centripetamente hacia la induración; en el sitio donde se siente resistencia queda marcado un extremo. Esto se repite en cuatro puntos diametralmente opuestos, ya que de esta manera puede medirse fácilmente el diámetro.

También ha habido discrepancias respecto al diámetro a partir del cual la reacción puede considerarse positiva. Por ejemplo, Navarrete y Biagi (103) consideran positivas las reacciones que presentan una pápula de 10 mm o más de diámetro, pero la mayoría de los autores consideran como límite de la positividad 5-6 mm (99,104, 105, 106).

La mayoría de los investigadores están de acuerdo en que el resultado de la reacción debe medirse por el diámetro de la induración, pero según Rodríguez-Toro

(104), el eritema local también debe valorarse cuidadosamente, pues el diluyente en el que van las leishmanias puede originar reacciones inespecíficas

Además de su aplicación en el diagnóstico clínico de la leishmaniosis, la reacción de Montenegro puede ser de gran utilidad en estudios epidemiológicos, ya que es una prueba altamente específica (103).

Como ya se mencionó, la reacción puede ser positiva en personas que no tienen antecedentes, ni cicatrices de haber padecido la leishmaniosis; esto se interpreta como índice de una infección subclínica y ha servido para determinar el llamado por Pifano "índice alérgico" (100), es decir, el porcentaje de una muestra de la población de estudio en la cual resulta positiva la reacción.

En cuanto a la respuesta local que se observa a las 48 horas de la inyección de la leishmanina en pacientes positivos, se sabe que es causada por linfocitos T específicos que reconocen antígenos de *Leishmania* y liberan citocinas, particularmente interferón- $\gamma$ , que atraen y activan a los macrófagos en el sitio de la reacción (91, 92). La síntesis de las citocinas y la migración de las células que ellas estimulan toma tiempo, por lo que la reacción no se manifiesta hasta 24 o 48 horas después de la aplicación del antígeno. Esta respuesta se conoce como reacción de hipersensibilidad tardía, o hipersensibilidad tipo IV, con la que se puede conocer el estado de la inmunidad celular específica en la que se encuentra el paciente, pues es el resultado de la activación de linfocitos T.

Como ya se ha descrito, la respuesta protectora en la leishmaniosis es fundamentalmente celular, ya que la inmunidad humoral no confiere ninguna protección, por el contrario, cuando hay un título alto de anticuerpos, el pronóstico de la enfermedad no es muy favorable. Los pacientes con LCD presentan altos títulos de anticuerpos contra el parásito, pero no hay respuesta a la intradermorreacción de Montenegro, lo que significa que la respuesta celular de estos individuos está inmunosuprimida específicamente, ya que si hay respuesta cutánea para otros

antígenos, como la candidina y el PPD (31) Además de esto, la respuesta a la quimioterapia en estos pacientes es casi nula (45).

Considerando que la respuesta celular es la más importante en la leishmaniosis, la intradermoreacción de Montenegro puede usarse como una herramienta muy valiosa para analizar la prevalencia de exposición al agente infeccioso en una zona endémica, sin dejar de tomar en cuenta que los pacientes que puedan desarrollar una LCD o la lleguen a desarrollar serán anérgicos.

#### **IV.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Como en México no ha sido estandarizada la prueba de Montenegro (95), es importante llevar a cabo esta evaluación para establecer un valor de corte, a partir del cual una reacción de induración al antígeno pueda considerarse como positiva, y se pueda definir su trascendencia para evaluar la presencia de infección en una zona endémica.

#### **V.- HIPÓTESIS**

Se tiene una herramienta rápida y eficiente para la evaluación epidemiológica de la leishmaniosis, por lo que el contar con una prueba cutánea específica bien estandarizada constituye un método fácil, específico y sensible para la identificación de casos y para el conocimiento de la magnitud del problema en el país.

## VI- OBJETIVOS

- 1.- Evaluar la leishmanina que se produce en el Laboratorio de Biología Celular del Departamento de Inmunogenética.
- 2.- Hacer un análisis de la respuesta celular a la leishmanina valorada *in vivo* en pacientes con leishmaniosis cutánea, sujetos sin antecedentes de leishmaniosis pertenecientes a una zona endémica, comparando los resultados con individuos que jamás estuvieron en una zona endémica.
- 3.- Establecer al tamaño mínimo de la induración para considerar la prueba como positiva.
- 4.- Analizar los resultados para establecer la sensibilidad de la prueba en una zona endémica.
- 5.- Conocer la frecuencia de sujetos sanos que han tenido contacto con el parásito, sin manifestar la enfermedad y que por lo tanto han quedado protegidos en una zona endémica.
- 6.- Conocer la frecuencia de respuesta cutánea positiva en los pacientes con leishmaniosis cutánea de una zona endémica del país.

## VII. MÉTODOS

**1.- PARÁSITOS.-** Los promastigotes con los que se preparó la leishmanina fueron de la cepa MHOM/MX/83/UAVY CV, aislada en el año de 1983 de una úlcera de los chichleros que tenía un hombre de 33 años en Chetumal, Quintana Roo. Esta cepa fue gentilmente donada por la Doctora Amalia Monroy Osiria e identificada como *Leishmania mexicana* en el laboratorio del Doctor Grimaldi, mediante las técnicas de zimodemas y anticuerpos monoclonales. El estudio preliminar de las curvas de desarrollo de esta cepa, mostró que la fase estacionaria (la más rica en antígenos) se alcanza en ella a los 12 días de cultivo.

### 2.- MEDIOS DE CULTIVO.

**Medio de Senekjje.-** La cepa se mantuvo en el laboratorio en medio de Senekjje (107) modificado que contiene en la fase sólida: 2.5 % de extracto de carne (GIBCO), 2 % de bacto-peptona (GIBCO), 3 % de bacto-agar (GIBCO), 0.5 % de NaCl, originalmente tenía sangre desfibrinada de conejo. La experiencia previa nos había mostrado que en la Ciudad de México la sangre de conejo se puede sustituir sin inconveniente, por sangre humana, específicamente paquete de glóbulos rojos, que desechan los bancos de sangre por envejecimiento. El extracto de carne se disuelve en 100 ml de agua destilada, se hierve y se filtra en papel Whatman No 42; se añaden la bacto-peptona, el bacto-agar y el NaCl; se ajusta el pH a 7.2-7.4; se esteriliza 15 min a 15 lb; se agrega 15% del paquete de rojos y se reparten 5 ml en frascos de 50 ml. El medio se deja solidificar con los frascos en posición inclinada. Se lleva a cabo una prueba de esterilidad de 24 horas a 37°C.

**Solución de Locke.-** La fase líquida del medio Senekjje es la solución de Locke (108), que contiene 0.9 % de NaCl, 0.25 % de glucosa, 0.04 % de KCl, 0.02 %

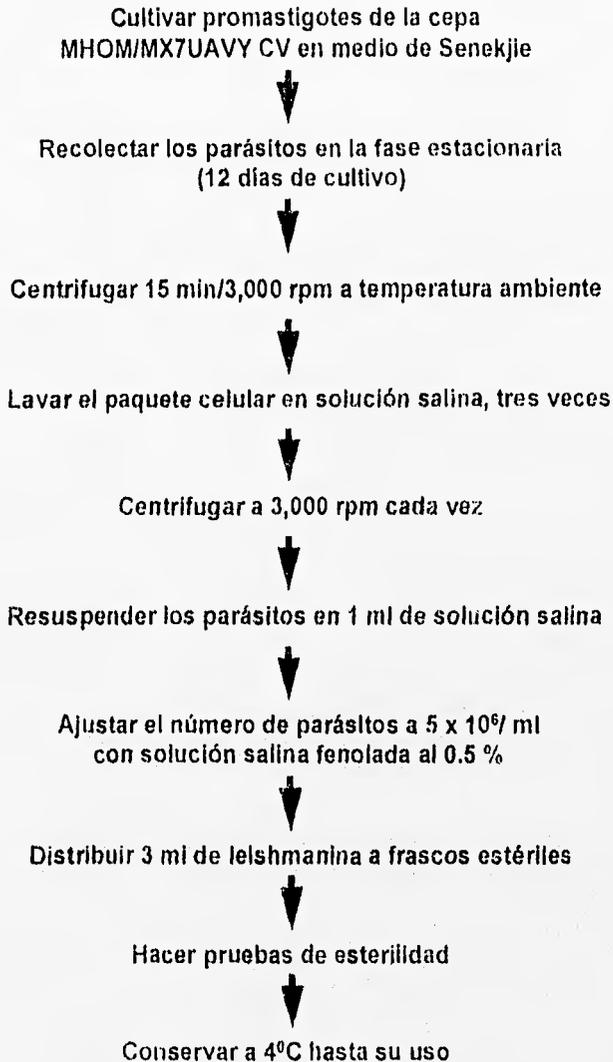
de  $\text{CaCl}_2$  y 0.02 % de  $\text{NaHCO}_3$  por cada 100 ml de agua destilada; esta solución se esteriliza 15 min a 10 lb. A cada frasco se le agregan 4 ml.

Para expandir el cultivo al volumen necesario para preparar la leishmanina, se utilizó medio RPMI 1640 (GIBCO) (109) suplementado con suero fetal de ternera inactivado durante 1 hora a  $56^\circ\text{C}$ , que además de permitir un crecimiento muy rico, está exento de sangre y en consecuencia, no tendrá factores alérgicos que puedan aparecer en el reactivo de Montenegro.

**Preparación del medio RPMI 1640:** A 16.4 g de RPMI en polvo se les adicionan 2 g de bicarbonato de sodio, estos se disuelven en 950 ml de agua destilada y desionizada, se ajusta el pH a 7.0-7.2 y se completa el volumen a 1,000 ml. Se esteriliza con filtro millipore ( $0.22 \mu\text{m}$ ) y se hacen alícuotas de 80 ml en frascos estériles de 100 ml sellados con tapón de hule y retapa metálica. El medio se deja en prueba de esterilidad a  $37^\circ\text{C}$  durante 48 horas.

A los 80 ml de medio se agregan 40 mg de sulfato de estreptomicina, 40,000 U de penicilina G sódica, 4 ml de Hepes 1 M (pH 7.2), 1 ml de glutamina 200 mM y 15 ml de suero fetal de ternera inactivado.

**3.-OBTENCIÓN DEL ANTÍGENO DE MONTENEGRO.** En la figura 3 se resume el método de obtención del antígeno de Montenegro. Las leishmanias de 12 días de cultivo en RPMI, se colectan en tubos de 50 ml y se centrifugan 15 min a 3,000 rpm a temperatura ambiente, se desecha el sobrenadante, el precipitado se resuspende en 40 ml de solución salina. Este paso se repite tres veces, con el objeto de lavar los promastigotes de los residuos del medio, posteriormente se resuspenden en 1 ml de solución salina y se cuentan en el hemocitómetro. El número de parásitos se ajusta a una concentración de  $5 \times 10^6$  promastigotes/ml utilizando solución salina fenolada al 0.5 % (99) y se distribuye en alícuotas de 3 ml a las cuales se les hace prueba de esterilidad.



**Fig. 3- Método de obtención del antígeno de Montenegro (Leishmanina).**

**4.- PRUEBA DE ESTERILIDAD.** Para esta prueba, se incuban los frascos en una estufa a 37°C durante 48 horas. Se toman muestras para tinción de Gram y Giemsa, y para sembrar en gelosa sangre, tioglicolato de sodio, agar soya tripticasa y Sabouraud. Los tres primeros se observan a las 48 horas y el último, a los 5 días. Todos los resultados fueron negativos.

Una vez comprobada la esterilidad, se hace una cuantificación de proteínas por el método de Lowry (110), tomando diferente número de parásitos. Como se observa en la figura 4,  $5 \times 10^6$  promastigotes corresponden a 50  $\mu$ g de proteínas.

**5.-PREPARACIÓN DEL COLORANTE DE GIEMSA.-** Se disuelve 1g de colorante en 66 g de glicerina pura a una temperatura de 60°C agitándola. Se mezcla la solución fría con 66 g de metanol puro exento de acetona y se filtra posteriormente. Esta solución se diluye 1:3 con agua al momento de utilizarla.

**6- PRUEBA INTRADÉRMICA.** A cada uno de los individuos que se tomaron en este estudio se les aplicó 0.1 ml del antígeno de Montenegro en la cara anterior del antebrazo izquierdo, utilizando una jeringa de insulina. El diámetro de la induración se midió a las 48 horas.

**6.1- Improntas.** A los pacientes que presentaban las lesiones producidas por el parásito, se les tomaron 10 improntas para buscar la presencia de amastigotes de *Leishmania* y las células presentes en las lesiones. Para el análisis, se fijaron las improntas con metanol y se tiñeron con colorante de Giemsa.

**6.2- Cultivo del parásito.** De todos los pacientes con leishmaniosis cutánea se tomó muestra de la lesión, con la que se inoculó medio de Senekjie (107), para confirmar por crecimiento en cultivo la presencia del parásito.

## CURVA DE LOWRY

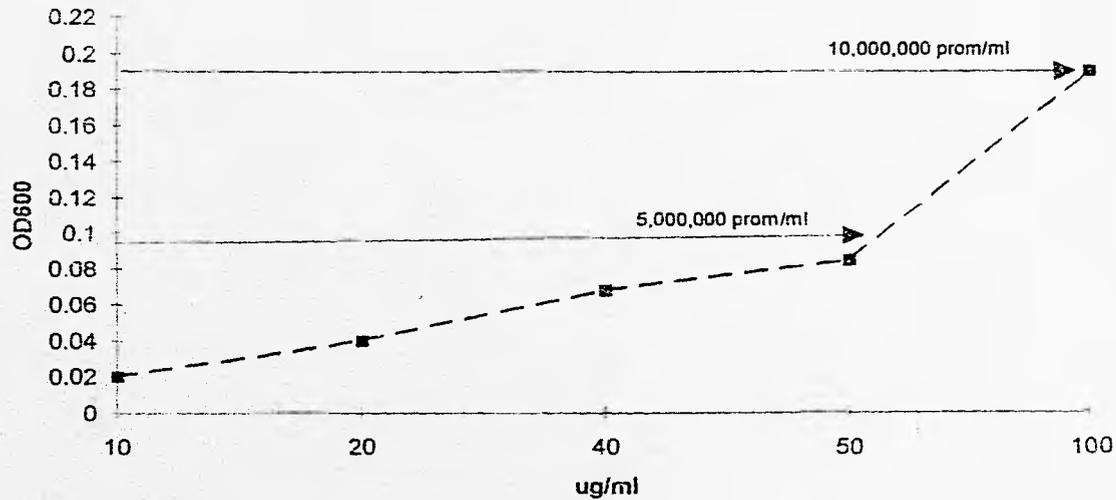


Fig. 4. Concentración de proteínas del Ag de *Leishmania*.

## 7.- POBLACIÓN ESTUDIADA

**7.1.- Enfermos confirmados.** La evaluación fundamental de la leishmanina se realizó aplicándola en 29 enfermos con diagnóstico de leishmaniosis cutánea, 27 con LCI y 2 con LCD procedentes de Comalcalco, Tabasco. La enfermedad se comprobó mediante la demostración del parásito en las improntas tomadas de las lesiones (cuadros 3 y 4).

Este grupo se seleccionó de entre 59 enfermos que asistían a la consulta en el Hospital Regional de Comalcalco cuyo director es el Dr. Hector Pérez. Fueron diagnosticados por el Dr. Oscar Hobart Hernández, a quien se le agradece sinceramente su colaboración lo mismo que al Dr. Pérez. Los expertos del Hospital hicieron el diagnóstico de leishmaniosis cutánea en todos estos pacientes, el cual se trató de confirmar mediante improntas, cultivos y por medio de la intradermorreacción, estudios que se llevaron a cabo en cada paciente.

Como la prueba absoluta de la enfermedad es la demostración del parásito, se buscó la presencia de éste en las improntas y en cultivo de los 59 pacientes iniciales. En 29 pacientes se demostró al parásito en las improntas, mientras que sólo en dos casos de los 29, se logró aislar el parásito. Esto probablemente se debió a razones técnicas como son, una toma de muestra inadecuada o porque se haya contaminado la lesión con bacterias u hongos.

Para los grupos testigos que abarcaron este estudio se elaboró un cuestionario de historia clínica que se incluye (anexo 1).

**7.2- Grupo testigo de área no endémica sin antecedentes de leishmaniosis.** Se tomaron 64 personas del Distrito Federal de la Escuela Nacional de Medicina, trabajadores del INDRE y personas que solicitaron examen médico en el centro de salud Manuel González, que nunca hayan estado en zonas endémicas. Las personas fueron pareadas por edad y sexo con los enfermos (Cuadro 5).

### CUADRO 3. CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES CON LEISHMANIOSIS

No.	NOMBRE	SEXO	EDAD (años)	EVOLUCION (meses)	TIPO DE LESION	TAMAÑO DE LESION	LOCALIZACION	PARASITOS- COPIA	IDR
1	JVG	M	17	3	U	G	antebrazo	-	+
2	RMC	F	39	8	U	P	brazo	-	+
3	TGP	F	41	3	U	P	pierna	+	+
4	PO	F	44	8	U	G	pierna	-	+
5	JSA	M	15	4	U	P	brazo	+	+
6	CCA	F	28	7	U	G	brazo	+	+
7	LLC	M	54	?	U	?	codo	-	-
8	EAG	F	16	3	U	P	antebrazo	-	+
9	RSH	M	72	13	U y N (3)	G	brazo	+	-
10	GSG	F	27	2	U	?	pierna	-	+
11	JMG	M	33	?	U y N	P	antebrazo	-	-
12	FGR	M	22	3	N	?	antebrazo	+	-
13	CVC	M	17	?	U	P	brazo	-	+
14	JGH	M	39	12	U	G	antebrazo	+	+
15	ANN	M	28	4	U	?	cara	-	+
16	JCO	M	44	3	U	G	oreja	-	+
17	BHA	F	42	5	U	P	antebrazo	-	+
18	BGL	M	18	12	U	P	brazo	+	+
19	CLG	F	39	9	U	P	pierna	-	+
20	CIL	M	50	18	U	?	cuello	-	+
21	MCA	F	33	9	U	G	pierna	-	+
22	PVC	F	34	12	U	G	brazo	-	+
23	ABC	M	34	5	P.A.	?	oreja	+	+
24	LMN	M	37	7	U	G	brazo	-	+
25	BCN	F	26	6	U	G	tórax	-	+
26	CAS	M	16	12	U	G	?	+	+
27	AJC	M	29	2	U	G	pie	-	+
28	GDC	F	39	4	U (2)	G y P	?	+	+
29	FOC	M	73	2	U	G	brazo	-	-
30	BJM	M	22	6	U y N	G y P	cuello	+	+
31	RCG	M	22	7	N	?	brazo	-	+
32	GBM	M	57	5	U	G	antebrazo	-	+
33	AHH	F	55	8	U	?	?	+	-

**CUADRO 3. CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES CON LEISHMANIOSIS  
(continuación)**

No.	NOMBRE	SEXO	EDAD (años)	EVOLUCION (meses)	TIPO DE LESION	TAMAÑO DE LESION	LOCALIZACION	PARASITOS- COPIA	IDR
34	JRM	M	15	4	U	G	brazo	+	+
35	VGC	M	39	3	U	P	antebrazo	+	+
36	CVR	M	54	7	U	G	brazo	+	+
37	JGG	M	15	4	U	G	antebrazo	-	+
38	GLS	M	78	10	U (2)	P	mano, antebr.	+	+
39	JVG	M	19	4	U	P	antebrazo	+	+
40	JRC	M	23	6	U	G	pierna	+	+
41	JRA	M	20	5	U	P	antebrazo	-	+
42	MCM	M	18	4	U	G	pierna	+	+
43	INB	F	26	3	U	P	pierna	+	+
44	STV	F	20	5	U	G	pie	-	+
45	GJG	F	35	2	U	P	cara	+	+
46	CGC	M	16	12	U	P	brazo	-	-
47	EEG	F	43	6	U	G	pierna	+	+
48	JCC	M	16	6	U	G	cara	+	+
49	JMP	M	?	4	U	G	antebrazo	+	+
50	AAC	F	32	4	P.A.	?	cara	-	-
51	DBP	F	21	9	U	G	pierna	+	+
52	AHJ	F	56	3	U	G	pierna	+	+
53	PJR	M	64	5	U	P	brazo	+	+
54	ECC	F	40	4	U	G	mano	+	+
55	NLC	M	23	2	U	G	tórax	+	+
56	ICB	M	75	20	U	?	antebrazo	-	+
57	ICC	M	29	8	U	P	brazo	-	+
58	AAJ	M	25	5	U	P	cara	+	+
59	TGR	M	23	6	U	G	brazo	-	+

U: Úlcera  
N: Nódulo

P: Pequeña  
G: Grande

P.A.: Placa atrófica  
IDR: Intrademorreacción de  
Montenegro

**CUADRO 4. CARACTERISTICAS DEL GRUPO DE PACIENTES  
SELECCIONADOS PARA EL ESTUDIO**

No.	NOMBRE	SEXO	EDAD (años)	TIEMPO DE EVOLUCION (meses)	TIPO DE LESION	TAMAÑO	LOCALIZACION	PARASITOS- COPIA	*IDR
1	T.G.P.	F	41	3	Úlcera	P	Pierna	+	+
2	J.S.A.	M	15	4	Úlcera	P	Brazo	+	+
3	C.C.A.	F	28	7	Úlcera	G	Brazo	+	+
4	R.S.H.	M	72	13	Úlcera y nódulo	G	Brazo	+	-
5	P.G.R.	M	22	3	Nódulo	?	Antebrazo	+	-
6	J.G.H.	M	39	12	Úlcera	G	Antebrazo	+	+
7	A.N.N.	M	28	4	Úlcera	?	Cara	+	+
8	B.G.L.	M	18	12	Úlcera	P	Brazo	+	+
9	A.B.C.	M	34	5	Placa Atrófica	?	Oreja	+	+
10	C.A.S.	M	16	12	Úlcera	G	?	+	+
11	G.D.C.	F	39	4	2 Úlceras	G y P	?	+	+
12	B.J.M.	M	22	6	Úlcera y Nódulo	G y P P	Cuello	+	+
13	J.R.M.	M	15	4	Úlcera	G	Brazo	+	+
14	C.V.R.	M	54	7	Úlcera	G	Brazo	+	+
15	V.G.C.	M	39	3	Úlcera	P	Antebrazo	+	+
16	G.L.S.	M	78	10	2 Úlceras	P	Mano y Brazo	+	+
17	J.V.G.	M	19	4	Úlcera	P	Antebrazo	+	+
18	J.R.C.	M	23	6	Úlcera	G	Pierna	+	+
19	M.C.M.	M	18	4	Úlcera	G	Pierna	+	+
20	I.N.B.	F	26	3	Úlcera	P	Pierna	+	+
21	G.J.G.	F	35	2	Úlcera	P	Cara	+	+

**CUADRO 4. CARACTERISTICAS DEL GRUPO DE PACIENTES  
SELECCIONADOS PARA EL ESTUDIO  
(Continuación)**

No.	NOMBRE	SEXO	EDAD (anos)	TIEMPO DE EVOLUCION (meses)	TIPO DE LESION	TAMAÑO	LOCALIZACION	PARASITOS- COPIA	*IDR
22	E.E.G.	F	43	6	Ulcera	G	Pierna	+	+
23	J.C.C.	M	16	6	Ulcera	G	Cara	+	+
24	J.M.P.	M	?	4	Ulcera	G	Antebrazo	+	+
25	D.B.P.	F	21	9	Ulcera	G	Pierna	+	+
26	A.H.J.	F	56	4	Ulcera	G	Pierna	+	+
27	P.J.R.	M	64	5	Ulcera	P	Brazo	+	+
28	E.C.C.	F	40	4	Ulcera	G	Mano	+	+
29	N.L.C.	M	23	2	Ulcera	G	Torax	+	+

\*IDR: INTRADERMORREACCIÓN  
DE MONTENEGRO

G:GRANDE

P:PEQUEÑA

**ANEXO 1.****HISTORIA CLINICA**

NOMBRE \_\_\_\_\_

1.- Número de Historia \_\_\_\_\_

2.- Edad \_\_\_\_\_

3.- Sexo \_\_\_\_\_

4.- Escolaridad \_\_\_\_\_ (último año aprobado)

5.- Ocupación \_\_\_\_\_

6.- Domicilio \_\_\_\_\_

7.- Teléfono \_\_\_\_\_

8.- ¿Siempre ha vivido en el DF? (SI) (NO)

9.- ¿Ha residido alguna vez en los siguientes Estados de la República?

Tamaulipas ( ) Veracruz ( ) Yucatán ( )

Nuevo León ( ) Quintana Roo ( ) Tabasco ( )

Coahuila ( ) Chiapas ( ) Campeche ( )

Durango ( ) Puebla ( ) Guerrero ( )

Morelos ( ) Michoacán ( ) Oaxaca ( )

10.- ¿Que tiempo en cada parte? \_\_\_\_\_

11.- Antecedentes patológicos familiares \_\_\_\_\_

12.- Antecedentes patológicos personales (úlceras anteriores)

\_\_\_\_\_

### CUADRO 5. CARACTERISTICAS DEL GRUPO DE SUJETOS APARENTEMENTE SANOS EN EL D.F.

No.	NOMBRE	EDAD (anos)	SEXO	LUGAR	IDR (mmd*)	OCUPACION
1	A.R.B.	15	M	D.F	2	ESTUDIANTE
2	A.L.L.	15	M	D.F	4	ESTUDIANTE
3	F.T.R.	14	M	D.F	0	ESTUDIANTE
4	S.C.M.	13	M	D.F	0	ESTUDIANTE
5	A.L.M.	16	M	D.F	2	ESTUDIANTE
6	A.C.M.	14	M	D.F	0	ESTUDIANTE
7	C.P.R.	16	M	D.F	3	ESTUDIANTE
8	G.P.R.	17	M	D.F	0	ESTUDIANTE
9	R.M.P.	17	M	Hgo	4	ESTUDIANTE
10	L.L.L.	18	M	D.F	2	ESTUDIANTE
11	E.B.E.	18	M	D.F	3	ESTUDIANTE
12	G.S.H.	18	M	Edo.Mex.	4	ESTUDIANTE
13	G.S.C.	19	M	D.F	5	LABORATORISTA
14	A.B.O.	19	M	D.F	5	ESTUDIANTE
15	A.C.A.	20	M	D.F	4	ESTUDIANTE
16	L.V.V.	21	F	D.F	4	ESTUDIANTE
17	R.M.O.	22	M	D.F	3	LABORATORISTA
18	R.C.B.	22	M	D.F	2	INTENDENCIA
19	A.C.R.	23	M	D.F	5	INTENDENCIA
20	J.G.G.	24	M	D.F	3	LABORATORISTA
21	A.S.G.	23	M	D.F	3	LABORATORISTA
22	L.E.R.	27	M	D.F	3	LABORATORISTA
23	G.M.P.	28	F	D.F	0	ADMINISTRATIVO
24	R.A.B.	27	M	D.F	5	LABORATORISTA
25	A.C.	28	M	D.F	5	LABORATORISTA
26	A.O.D.	31	F	D.F	5	LABORATORISTA
27	H.D.R.	31	F	D.F	2	ADMINISTRATIVO
28	F.P.M.	34	M	D.F	5	ADMINISTRATIVO
29	A.L.A.	35	M	D.F	3	LABORATORISTA
30	E.C.E.	36	F	Edo.Mex.	4	LABORATORISTA
31	V.G.R.	38	F	D.F.	5	LABORATORISTA
32	J.V.V.	39	F	D.F.	3	LABORATORISTA
33	M.C.C.	38	M	D.F.	2	LABORATORISTA
34	A.C.E.	36	M	D.F.	5	LABORATORISTA
35	A.E.I.	36	M	D.F.	4	ADMINISTRATIVO
36	J.R.A.	40	M	D.F.	5	LABORATORISTA

**CUADRO 5. CARACTERISTICAS DEL GRUPO DE SUJETOS  
APARENTEMENTE SANOS EN EL D.F. (continuación)**

37	T.N.C.	40	F	D.F.	1	ADMINISTRATIVO
38	P.A.G.	39	F	D.F.	5	ADMINISTRATIVO
39	E.M.S.	44	F	D.F.	3	HOGAR
40	E.M.R.	44	F	D.F.	7	ADMINISTRATIVO
41	G.C.V.	45	F	D.F.	0	ADMINISTRATIVO
42	B.C.G.	45	F	D.F.	5	ADMINISTRATIVO
43	P.L.E.	42	M	D.F.	5	LABORATORISTA
44	F.G.S.	42	M	D.F.	5	INTENDENCIA
45	F.O.M.	53	M	D.F.	5	MEDICO
46	R.G.G.	55	M	D.F.	8	LABORATORISTA
47	H.Z.C.	55	F	D.F.	3	LABORATORISTA
48	M.D.T.	56	F	D.F.	4	LABORATORISTA
49	O.G.H.	64	M	D.F.	6	ADMINISTRATIVO
50	E.S.R.	71	M	D.F.	7	INTENDENCIA
51	M.V.R.	71	M	D.F.	5	INTENDENCIA
52	M.N.R.	72	M	D.F.	6	ADMINISTRATIVO
53	H.D.S.	73	M	D.F.	4	INTENDENCIA
54	A.R.H.	36	F	D.F.	2	ENFERMERA
55	Y.M.F.	25	F	D.F.	2	LABORATORISTA
56	J.F.G.	30	F	Edo.Mex.	2	LABORATORISTA
57	G.G.M.	47	F	D.F.	0	LABORATORISTA
58	C.M.L.	50	F	D.F.	0	MEDICO
59	B.S.R.	22	F	D.F.	4	ESTUDIANTE
60	P.H.N.	25	F	D.F.	4	LABORATORISTA
61	S.G.Q.	23	F	D.F.	4	LABORATORISTA
62	A.M.H.	24	F	D.F.	4	ESTUDIANTE
63	K.P.B.	16	F	D.F.	5	ESTUDIANTE
64	V.M.H.	24	F	Edo.Mex.	5	ESTUDIANTE
65	L.C.S.	29	F	D.F.	5	LABORATORISTA
66	F.G.D.	26	M	D.F.	5	LABORATORISTA
67	G.S.A.	15	F	Edo.Mex.	5	ESTUDIANTE
68	C.P.C.	24	M	D.F.	3	ESTUDIANTE
69	P.C.I.	34	F	D.F.	0	ADMINISTRATIVO

\*mmd: milímetros  
de diametro

**7.3- Grupo testigo de área endémica sin antecedentes de leishmaniosis.** La existencia de sujetos que reaccionan a la leishmanina en las regiones de endemia es un factor muy importante para comprender la epidemiología de esta enfermedad, pues aunque los individuos no hayan sufrido leishmaniosis clínica, la presencia de respondedores asintomáticos en un área endémica permite conocer la frecuencia de individuos que han estado en contacto con el parásito pero que han quedado probablemente protegidos.

Por estos motivos se formó un tercer grupo de 94 sujetos sin antecedentes de úlceras, pero residentes de la zona endémica de Comalcalco, también pareados por edad y sexo con los enfermos, a los cuales se les aplicó la leishmanina en la misma forma (Cuadro 6).

**7.4.- Análisis estadístico.** El análisis estadístico se realizó a los 3 grupos estudiados para saber si las diferencias entre cada grupo de edades eran estadísticamente significativas o no. La fórmula que se aplicó fue la  $\chi^2$  corregida por Yates (111) que se muestra a continuación.

$$\chi^2 \text{ Yates} = \frac{[(ad-bc)-N/2]^2}{(a+c)(c+d)(b+d)(a+c)}$$

a= individuos sanos positivos a la prueba (falsos positivos)

b= individuos sanos negativos

c= enfermos positivos a la prueba

d= enfermos negativos a la prueba (falsos negativos)

N= número total de muestras

El valor de  $\chi^2$  se busca en tablas para obtener la cifra de la probabilidad (p) tomando en cuenta los grados de libertad (N-1).

### CUADRO 6. CARACTERÍSTICAS DEL GRUPO DE SUJETOS APARENTEMENTE SANOS DE COMALCALCO, TABASCO

No	NOMBRE	EDAD (años)	SEXO	LUGAR	IDR mmd*	OCUPACION
1	H.S.A.	15	M	COMALCALCO	5	ESTUDIANTE
2	E.R.C.	15	M	COMALCALCO	3	ESTUDIANTE
3	F.R.P.	15	M	COMALCALCO	3	ESTUDIANTE
4	I.R.C.	15	M	COMALCALCO	5	ESTUDIANTE
5	J.V.M.	15	M	COMALCALCO	3	ESTUDIANTE
6	J.S.H.	16	M	COMALCALCO	5	ESTUDIANTE
7	O.R.C.	16	M	COMALCALCO	6	ESTUDIANTE
8	A.T.G.	16	M	COMALCALCO	5	ESTUDIANTE
9	W.R.C.	16	M	COMALCALCO	5	ESTUDIANTE
10	J.V.P.	16	M	COMALCALCO	5	ESTUDIANTE
11	O.R.M.	16	M	COMALCALCO	5	ESTUDIANTE
12	J.R.B.	16	M	COMALCALCO	4	ESTUDIANTE
13	L.R.R.	16	M	COMALCALCO	2	ESTUDIANTE
14	A.R.M.	16	M	COMALCALCO	5	ESTUDIANTE
15	J.S.C.	16	M	COMALCALCO	0	ESTUDIANTE
16	R.R.D.	16	M	COMALCALCO	4	ESTUDIANTE
17	C.V.R.	17	M	COMALCALCO	5	ESTUDIANTE
18	J.V.C.	17	M	COMALCALCO	0	ESTUDIANTE
19	C.T.C.	16	M	COMALCALCO	0	ESTUDIANTE
20	L.R.O.	19	M	COMALCALCO	2	ESTUDIANTE
21	F.S.J.	17	M	COMALCALCO	5	?
22	V.C.C.	19	M	COMALCALCO	8	LABORATORISTA
23	L.A.H.	20	F	COMALCALCO	0	ENFERMERA
24	S.A.R.	20	F	COMALCALCO	5	ADMINISTRATIVO
25	B.C.H.	22	F	COMALCALCO	4	ADMINISTRATIVO
26	C.H.A.	23	M	COMALCALCO	10	INTENDENCIA
27	P.C.A.	23	M	COMALCALCO	7	INTENDENCIA
28	F.A.J.	23	M	COMALCALCO	7	INTENDENCIA
29	A.P.	25	M	COMALCALCO	0	ADMINISTRATIVO
30	A.S.Z.	26	M	COMALCALCO	6	MÉDICO
31	C.A.M.	25	M	VILLA HERMOSA	0	MÉDICO
32	M.Z.F.	25	M	COMALCALCO	6	MÉDICO
33	A.M.V.	25	M	CÁRDENAS	11	LABORATORISTA
34	N.L.G.	28	F	CÁRDENAS	5	ADMINISTRATIVO
35	L.L.O.	29	F	COMALCALCO	0	MÉDICO
36	Z.B.C.	26	F	COMALCALCO	4	INTENDENCIA
37	A.C.A.	28	M	COMALCALCO	7	ADMINISTRATIVO
38	S.S.S.	26	M	COMALCALCO	0	MÉDICO

**CUADRO 6. CARACTERÍSTICAS DEL GRUPO DE SUJETOS  
APARENTEMENTE SANOS DE COMALCALCO, TABASCO**  
(continuación)

No	NOMBRE	EDAD (años)	SEXO	LUGAR	IDR mmd*	OCUPACION
39	G.M.C.	27	M	CUNDUACÁN	0	MÉDICO
40	M.B.C.	31	F	COMALCALCO	3	INTENDENCIA
41	V.L.M.	29	F	COMALCALCO	0	MÉDICO
42	O.H.H.	35	M	PARAISO	3	MÉDICO
43	J.L.G.	33	M	VILLA HERMOSA	7	MÉDICO
44	L.S.R.	35	M	PARAISO	5	MÉDICO
45	T.A.G.	35	F	COMALCALCO	2	ADMINISTRATIVO
46	E.A.G.	35	F	COMALCALCO	0	INTENDENCIA
47	E.H.O.	35	F	COMALCALCO	0	ENFERMERA
48	J.V.P.	38	F	COMALCALCO	7	ENFERMERA
49	M.A.M.	37	F	COMALCALCO	8 X 16	INTENDENCIA
50	E.R.B.	37	F	COMALCALCO	15	?
51	R.R.G.	39	M	COMALCALCO	4	CHOFER
52	L.C.C.	35	M	COMALCALCO	7	CHOFER
53	A.C.G.	37	M	COMALCALCO	6	INTENDENCIA
54	J.A.F.	39	M	COMALCALCO	3	MÉDICO
55	M.H.D.	36	M	COMALCALCO	7	INTENDENCIA
56	H.P.P.	36	M	COMALCALCO	0	MÉDICO
57	F.M.M.	35	F	COMALCALCO	4	HOGAR
58	M.E.G.	40	F	COMALCALCO	5	ADMINISTRATIVO
59	M.M.C.	40	F	COMALCALCO	5	ENFERMERA
60	P.S.	40	F	COMALCALCO	3	HOGAR
61	M.C.R.	38	F	COMALCALCO	0	HOGAR
62	F.I.S.	38	F	COMALCALCO	6	HOGAR
63	H.A.F.	43	F	COMALCALCO	5	HOGAR
64	M.S.G.	40	F	COMALCALCO	9	HOGAR
65	M.R.L.	44	F	COMALCALCO	5	HOGAR
66	M.L.M.	43	M	COMALCALCO	7	INTENDENCIA
67	J.C.C.	42	M	COMALCALCO	5	INTENDENCIA
68	N.C.A.	54	M	COMALCALCO	0	CAMPESINO
69	C.L.G.	53	M	COMALCALCO	0	COMERCIANTE
70	C.D.V.	54	M	COMALCALCO	6	CHOFER
71	T.R.G.	55	F	COMALCALCO	5	HOGAR
72	M.I.E.	56	F	COMALCALCO	6	HOGAR
73	J.C.L.	63	M	COMALCALCO	19	CAMPESINO
74	L.C.M.	68	M	COMALCALCO	6	MAESTRO

**CUADRO 6. CARACTERÍSTICAS DEL GRUPO DE SUJETOS  
APARENTEMENTE SANOS DE COMALCALCO, TABASCO**  
(continuación)

No	NOMBRE	EDAD (años)	SEXO	LUGAR	IDR mmd*	OCUPACION
75	F.A.G.	69	M	COMALCALCO	10	CAMPESINO
76	P.Z.M.	75	M	COMALCALCO	8	CAMPESINO
77	E.C.P.	74	M	COMALCALCO	10	MAESTRO
78	J.G.O.	81	M	COMALCALCO	16	CAMPESINO
79	I.R.C.	23	F	COMALCALCO	2	ADMINISTRATIVO
80	R.I.A.	25	F	COMALCALCO	3	ADMINISTRATIVO
81	C.M.P.	31	M	COMALCALCO	5	MÉDICO
82	M.L.M	48	F	COMALCALCO	6	INTENDENCIA
83	E.A.M.	23	F	COMALCALCO	5	ENFERMERA
84	F.G.J.	24	F	COMALCALCO	4	ENFERMERA
85	J.V.S.	23	F	COMALCALCO	2	ENFERMERA
86	J.J.L.	15	M	COMALCALCO	3	ESTUDIANTE
87	J.T.H.	14	M	COMALCALCO	4	ESTUDIANTE
88	J.V.C.	15	M	COMALCALCO	0	ESTUDIANTE
89	S.V.D.	15	M	COMALCALCO	5	ESTUDIANTE
90	W.R.C.	15	M	COMALCALCO	4	ESTUDIANTE
91	V.Z.A.	15	M	COMALCALCO	0	ESTUDIANTE
92	E.R.M.	15	M	COMALCALCO	0	ESTUDIANTE
93	J.R.G.	15	M	COMALCALCO	3	ESTUDIANTE
94	E.Z.P.	15	M	COMALCALCO	5	ESTUDIANTE

\*mmd: milímetros de  
diámetro

## VIII. RESULTADOS

Para establecer el valor a partir del cual la prueba cutánea es considerada como positiva, se analizaron los resultados de las tres poblaciones estudiadas. Se interpretaron los datos y los hallazgos de los 59 pacientes de leishmaniosis cutánea para el análisis de la intradermorreacción, pero sólo se consideraron los 29 individuos (cuadro 4) en los que se confirmó la presencia del parásito en las improntas.

**1.- PACIENTES CON LEISHMANIOSIS CUTÁNEA.** Las características de los 59 enfermos que presentaron una lesión típica de leishmaniosis cutánea se resumen en el cuadro 3. De estos 57 (96.6%) fueron diagnosticados como LCL y 2 (3.4%) como LCD. El tiempo de evolución de la lesión fue variable. El más largo fue de 20 meses y el más corto de 2 meses, con un promedio de  $6.3 \pm 3.8$  meses. El tamaño de la lesión se consideró como "grande", cuando la lesión tenía más de 1 cm de diámetro y "pequeño", en el caso contrario.

La distribución por edad y sexo de estos pacientes se muestra en el cuadro 7. De ellos, 38 (64.4 %) fueron hombres y 21 (35.6 %) mujeres; el intervalo de edades fue de 15 a 78 años, con una edad promedio de 34.2 años, una desviación estandar de  $\pm 16.7$ . Los grupos de edad afectados fueron los de 15 a 24 años (35.6%) 25 a 34 años (22.03 %) y de 35 a 44 años (80.66 %), que en conjunto hacen un 80.66 %. La edad promedio en los enfermos de LCL es de 35.71 años de los cuales 36 son hombres y 21 mujeres. Mientras que la edad promedio en los pacientes con LCD es de 47 años y los 2 únicos pacientes son de sexo masculino .

En el cuadro 8 se describe la localización de las lesiones. Como puede observarse, el 54.23 % de los pacientes presenta la lesión en los miembros superiores, de estos, el 44.06 % fueron hombres y el 10.17 % mujeres; el 22.05 % tuvieron la lesión en los miembros inferiores y en este caso, 16.95 % mujeres y el 5.1 % hombres.

## CUADRO 7. DISTRIBUCIÓN POR EDAD Y SEXO DE LOS 59 PACIENTES

EDADES (años)	DISTRIBUCIÓN POR SEXO				TOTAL	(%)
	HOMBRES	(%)	MUJERES	(%)		
10-14	0	0	0	0	0	0
15-24	18	30.5	3	5.1	21	35.6
25-34	6	10.17	7	11.86	13	22.03
35-44	4	6.77	9	15.25	13	22.03
45-54	3	5.1	0	0	3	5.1
55-64	2	3.39	2	3.39	4	6.77
65-74	2	3.39	0	0	2	3.39
75+	2	3.39	0	0	2	3.39
DESCONOCIDO	1	1.69	0	0	1	1.69
<b>TOTAL</b>	<b>38</b>	<b>64.4</b>	<b>21</b>	<b>35.6</b>	<b>59</b>	<b>100</b>

**CUADRO 8. DISTRIBUCIÓN DE TOPOGRAFÍA LESIONAL Y SEXO  
EN LOS 59 PACIENTES CON LEISHMANIASIS CUTÁNEA**

<b>Topografía lesional</b>	<b>Hombres N</b>	<b>%</b>	<b>Mujeres N</b>	<b>%</b>	<b>Total N</b>	<b>%</b>
Miembro superior	26	44	6	10.17	32	54.23
Miembro inferior	3	5.1	10	16.95	13	22.05
Cara	3	5.1	2	3.39	5	8.49
Torax	1	1.69	1	1.7	2	3.39
Cuello	2	3.38	0	0	2	3.38
Oreja	2	3.38	0	0	2	3.38
No especificada	1	1.69	2	3.39	3	5.08
<b>Totales</b>	<b>38</b>	<b>64.4</b>	<b>21</b>	<b>35.6</b>	<b>59</b>	<b>100</b>

El hallazgo de la lesión en otros sitios fue menor: 8.49 % en cara, 3.39 % en torax, 3.38 % en oreja y 3.38 % en cuello. En 5.08 % de los pacientes (3 casos) no se especificó el sitio de la lesión. Los dos pacientes con LCD presentaron una lesión de forma nodular y placa atrófica, mientras que los enfermos con manifestación LCL una lesión en forma de úlcera, exceptuando 3 casos que tuvieron úlcera y nódulo y un sólo caso con placa atrófica.

## **2.- PACIENTES CON LEISHMANIOSIS CUTÁNEA CONFIRMADA.**

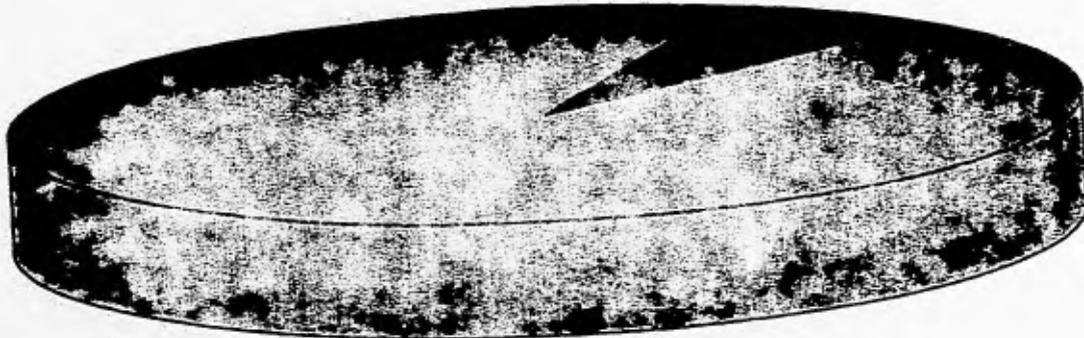
De los 59 enfermos con leishmaniosis cutánea estudiados en la zona endémica, se seleccionaron 29 sujetos en los que la enfermedad se confirmó por hallazgo del parásito en improntas teñidas con Giemsa. Las características clínicas se muestran en el cuadro 4. El 69 % de estos pacientes fueron hombres y el 31 % mujeres; la edad promedio fue de 33.7 años, DS de  $\pm 17.5$  años. El tiempo promedio de evolución fue de  $5.7 \pm 3.2$  meses. La reacción cutánea fue positiva (induración  $> 5$  mm de diámetro) en 27 de estos pacientes (93.1 %) y negativa en 2 pacientes (6.9 %) (Fig. 5). Estos últimos no presentaban una lesión ulcerosa típica, sino lesiones nodulares (Cuadro 3, casos 9 y 12; Cuadro 4, casos 4 y 5), lo que sugiere una leishmaniosis cutánea difusa en ambos casos, que generalmente va acompañada por anergia específica (cuadros 3 y 4, casos 9,4). Uno de ellos tenía 72 años y es de sexo masculino, mientras que el otro paciente también masculino tenía 22 años.

## **3.- POBLACIÓN TESTIGO DE LA ZONA NO ENDÉMICA (DF).**

Como sujetos que constituyen el grupo de controles negativos se utilizaron personas residentes en el Distrito Federal, a las que se sometió a un interrogatorio que está incluido en métodos (Anexo 1) para verificar que no existieran antecedentes de residencia en las zonas endémicas ya conocidas de leishmaniosis. Fueron incluidos 69 individuos; de ellos 9 no dieron ninguna reacción (13.04 %); uno dió una reacción de 1

# ENFERMOS CON LEISHMANIASIS CUTÁNEA

NEGATIVOS LCD 2 (6.9 %)



POSITIVOS LCL 27 (93.1 %)

**Fig. 5. Representación del porcentaje de enfermos positivos a la IDR**

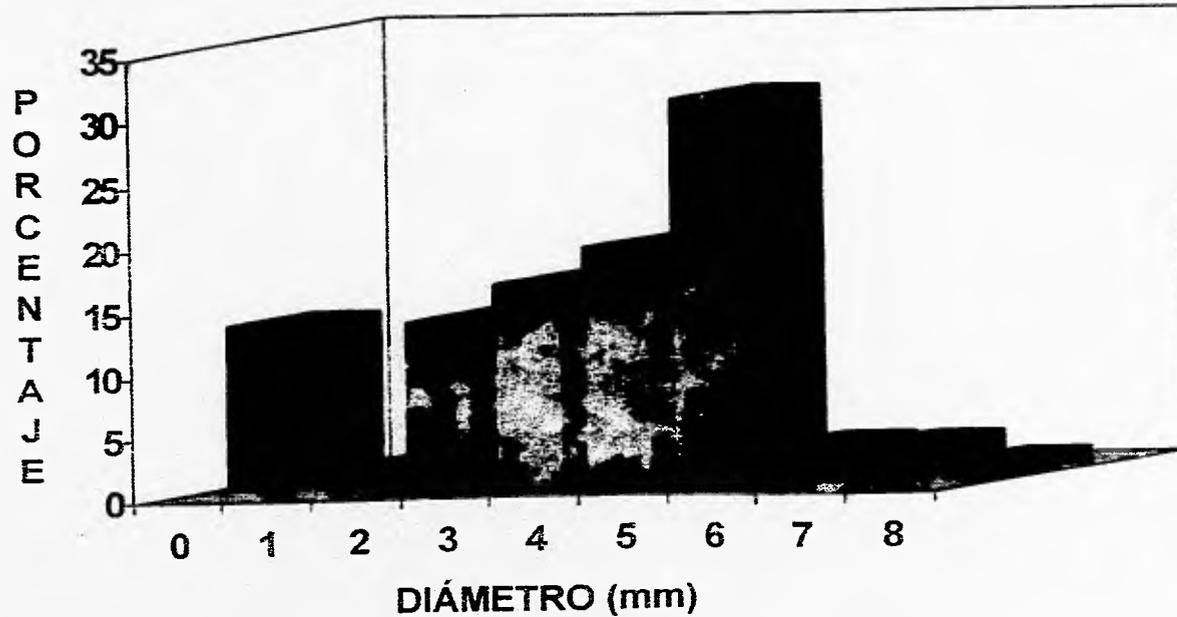
mm de diámetro (1.45 %), en 9 la induración alcanzó 2 mm (13.04 %), en 11 fue de 3 mm (15.94 %), en 13 hubo una reacción de 4 mm (18.84 %) y en 21 llegó a 5 mm (30.43 %). Estos resultados se esquematizan en la figura 6, en la que se puede observar que hubo 5 personas cuya reacción fue > de 5 mm (7.25 %). De esta forma el 92.75 % resultó menor o igual a 5 mm (Figura 7).

#### 4.- POBLACIÓN TESTIGO DE LA ZONA ENDÉMICA (COMALCALCO, TABASCO).

En este grupo se incluyeron 94 individuos residentes de Comalcalco, Tabasco, sin antecedentes de haber padecido leishmaniosis. Los resultados de las reacciones intradérmicas se presentan en la figuras 8 y 9. De ellos, 18 personas fueron totalmente negativos (19.15 %); ninguno presentó reacciones de 1 mm, 5 tuvieron una reacción de 2 mm (5.32 %); 10 la presentaron de 3 mm (10.64 %); 9 respondieron con 4 mm (9.57 %); 23 montaron respuesta de 5 mm (24.47 %); 9 tuvieron 6 mm (9.57 %) y 8 respondieron con 7 mm (8.51 %); se observaron reacciones de 11 mm, 15 mm, 16 mm y 19 mm, en un individuo por cada tamaño de reacción (1.06 % para cada uno). En una persona se observó una induración que medía 16 mm de largo (longitudinalmente al antebrazo) por 8 mm de ancho. Para lo cual no se tiene una explicación satisfactoria, pero por ser una reacción totalmente desproporcionada, que es completamente fuera de lo común, este caso se incluyó en el grupo de reacciones con 8 mm.

El 69.15 % (65 individuos) presentó una reacción menor o igual a 5 mm, por lo que fueron considerados como negativos (figura 9), mientras que el 30.85 % (29 individuos) fueron positivos, ya que presentaron una reacción mayor de 5 mm.

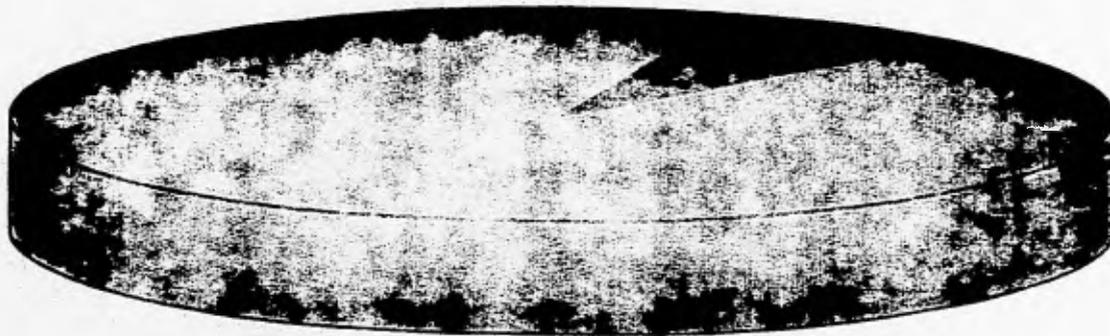
Para poder establecer el valor de corte para la positividad de la intradermorreacción, se analizaron los resultados de los sujetos aparentemente sanos de la zona no endémica y se encontró que el 92.75% correspondía a valores menores



**Fig. 6. Tamaño de la reacción en personas sin antecedentes de leishmaniosis, en el D. F.**

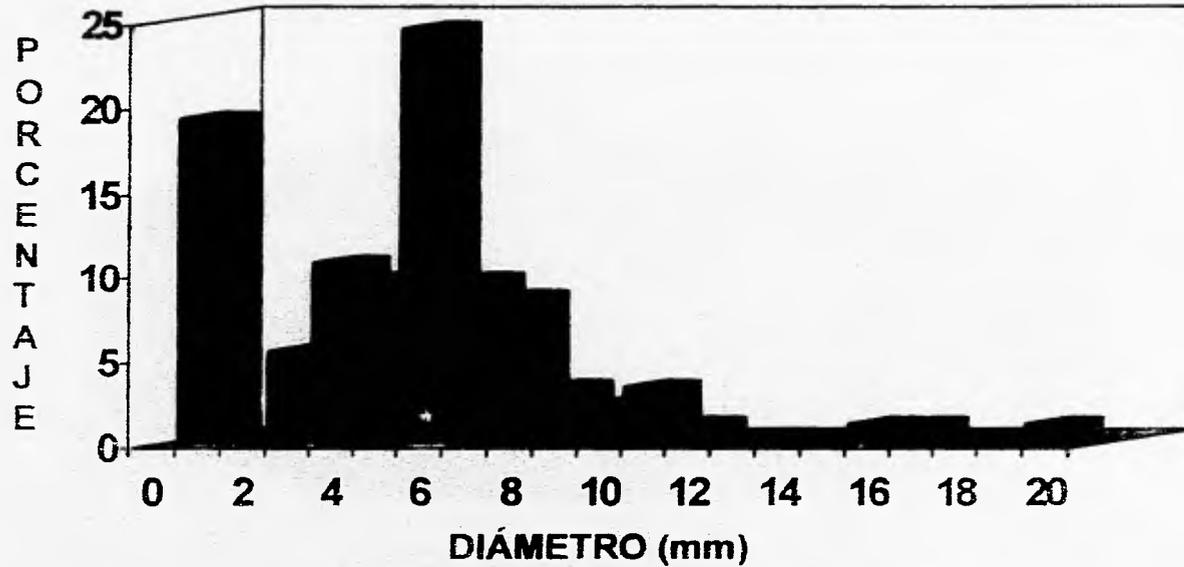
## PERSONAS SANAS DEL D.F.

POSITIVAS 5 (7.25 %)



NEGATIVAS 64 (92.75 %)

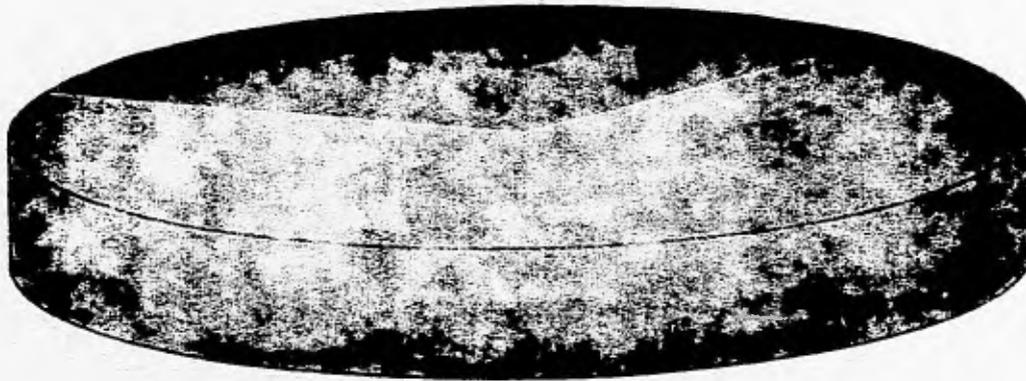
**Fig. 7. Porcentaje de individuos positivos en una zona endémica**



**Fig. 8. Tamaño de la IDR en personas sin antecedentes de leishmaniosis en Comalcalco, Tabasco**

# PERSONAS SANAS DE COMALCALCO

POSITIVAS 29 (30.85 %)



NEGATIVAS 65 (69.15 %)

**Fig. 9. Porcentaje de personas negativas a la IDR en una zona endémica**

o iguales a 5 mm de diámetro en la induración de la reacción, por lo que valores > 5mm fueron considerados como positivos en el caso de individuos de la zona endémica y como falsos positivos para los individuos aparentemente sanos del grupo control de la zona no endémica.

Una vez establecido el valor de positividad como > 5 mm, se hizo un análisis estadístico entre los 3 grupos estudiados, utilizando la prueba de  $X^2$  de Yates.

El cuadro 9 muestra claramente diferencias significativas entre los resultados de positividad entre enfermos y sanos, al igual que entre los dos grupos de sanos, lo que indica que una reacción positiva mayor de 5 mm se debe a la presencia de una respuesta celular en contra del parásito en individuos que han caído ya en enfermedad, pues la frecuencia de la induración es significativamente menor en sujetos asintomáticos de la misma área y todavía menor en una zona no endémica como el D.F.

**CUADRO 9. Análisis estadístico de la positividad de la respuesta intradérmica**

	Tamaño de la induración (mm)	Porcentaje de positividad	X yates	p**
	X			
Sanos de Comalcalco vs enfermos	3.39/>5*	30.85%/100%	33.42	<0.00001
Sanos del D.F. vs enfermos	3.5/>5*	7.25%/100%	67.9	<0.00001
Sanos del D.F. vs sanos de Comalcalco	3.5/3.39	7.25%/30.85%	14.89	0.0001

\* La medida de la induración de los enfermos no se nos proporcionó, motivo por el cual no se les incluyó. Sin embargo, eran positivas, es decir mayor de 5 mm.

\*\* Esta diferencia es para la positividad de la reacción.

## IX. DISCUSIÓN

De los 29 enfermos de leishmaniosis cutánea confirmada, 2 presentaron una reacción negativa (<de 5 mm); uno de ellos (caso 4, Cuadro 4), aunque tuvo una úlcera ya cicatrizada en el extremo inferior del antebrazo izquierdo, presentaba 3 nódulos en rosario en el mismo brazo, lo que es característico de la LCD, el otro paciente (caso 5, Cuadro 4), también presentaba un nódulo. En ambos casos, el parásito estaba presente en la lesión y por el tiempo de evolución de la enfermedad los pacientes debían haber desarrollado una respuesta inmunológica adecuada (13 meses, caso 4 y 3 meses, caso 5). Sin embargo fueron completamente anérgicos al antígeno específico comparados por ejemplo con los casos 21 y 29 (Cuadro 4) que tenían 2 meses de evolución y presentaron una reacción positiva (> 5 mm de diámetro). Por lo tanto, la reacción negativa en estos dos casos se debe, muy probablemente, a una anergia específica, que es característica en la LCD (31, 41).

Considerando a los pacientes de leishmaniosis cutánea difusa como no respondedores, se puede aseverar que la sensibilidad de la prueba es del 100 %, pues hay un 93.1 % de positividad en los 29 enfermos estudiados, con un 6.9 % de anergia específica que corresponde a los 2 casos de LCD y que son los resultados que se esperan. No fue posible determinar la especificidad de la prueba por carecer de enfermos con padecimientos que presentan anticuerpos de reacción cruzada con *Leishmania*, tales como tripanosomiasis, lepra y tuberculosis (112).

Sin embargo, hay evidencias muy claras de que esta reacción es altamente específica para la leishmaniosis, además de que permite conocer el estado de inmunidad celular del enfermo, ya que no es positiva en ninguno de los padecimientos antes mencionados, particularmente en el caso de *Trypanosoma* que es un parásito muy estrechamente relacionado con *Leishmania*, ya que ambos pertenecen a la familia Trypanosomatidae (26, 103)

En el cuadro 7, de los 59 enfermos seleccionados el 64.4 % (38) fueron hombres y el 35.6% (21) mujeres. Probablemente no es una diferencia real en términos de que haya asociación con algún factor ya sea hormonal, metabólico o un verdadero ligamento al cromosoma X. Más bien se debe a que los hombres tienen mayor facilidad de tener contacto con el parásito por su trabajo, pues muchos de ellos son campesinos o trabajan en los cacaotales donde el medio es muy propicio para la sobrevivencia de los flebotomos y en consecuencia del parásito. No obstante el porcentaje de mujeres (35.6%) es mayor en comparación a estadísticas anteriores. Esto puede deberse a que muchas personas tienen dentro de los cacaotales sus casas (mujeres) y las personas que habitan en ellas están en contacto directo con el parásito. En el cuadro 8 se muestra la frecuencia con la que ocurren las lesiones en un determinado sitio del organismo de acuerdo al sexo. Llama la atención que en los hombres hay una mayor frecuencia en los miembros superiores (44%) y en las mujeres en los miembros inferiores (10.17 %). La explicación más evidente es que los hombres tienen cubiertas las piernas por los pantalones, mientras que las mujeres usan faldas (sobre todo en comunidades donde las mujeres no acostumbran el uso de pantalones).

La existencia de un 38.85 % de reacciones positivas en los individuos sanos de la zona endémica, probablemente se debe a que estos sujetos tuvieron contacto con la *Leishmania* pero no desarrollaron una enfermedad clínica, ya que justamente están en contacto con el parásito por vivir en una área endémica. Curiosamente, los individuos sanos que presentaron una reacción positiva en el área no endémica (5 personas), eran de edad avanzada, por lo que podría pensarse que su respuesta inmunológica se encuentra alterada por la edad y tal vez por lo mismo hay respuestas anormales debidas al reconocimiento de determinantes antigénicos comunes que pueden estar presentes en distintos patógenos, o tal vez se genera una respuesta cruzada contra antígenos de otras afecciones de la piel que no son poco frecuentes en el anciano. El objetivo de este trabajo ha sido la estandarización de la prueba cutánea para el

diagnóstico de la leishmaniosis y se logró establecer el valor de positividad como mayor de 5 mm. Esta prueba puede ahora usarse en estudios epidemiológicos, ya que ofrece una sensibilidad del 100 % y aparentemente no existen reacciones celulares cruzadas con otros padecimientos (103), sin embargo, esto deberá ser confirmado en estudios más amplios que incluyan otras enfermedades. Según los expertos de la OMS (5), tales reacciones no existen entre la tripanosomiosis y la leishmaniosis, lo cual es muy importante, ya que en México estos dos padecimientos co-existen en algunas zonas, por lo tanto, si la respuesta celular no presenta reacciones cruzadas, la prueba podrá ser la de elección para estudios epidemiológicos en los que se podrá determinar el número de individuos que han estado en contacto con el parásito en las zonas endémicas.

Sin embargo, no debe perderse de vista que esta prueba sólo identifica a los casos de LCL, en los cuales la presencia del parásito es difícil de encontrar pero la respuesta celular específica se halla intacta, algo muy importante es que con esta prueba no pueden identificar a los casos con LCD, pues son anérgicos y su respuesta inmunológica celular está abatida, aunque en este tipo de pacientes es muy fácil confirmar la existencia del parásito debido a su gran abundancia en las lesiones nodulares.

La leishmanina es un producto biológico, fácil de producir, barato, que se puede utilizar para estudios epidemiológicos o de diagnóstico. Para su producción se pueden utilizar una o varias cepas o un pool de cepas de *Leishmania*, la concentración del parásito varía de un autor a otro, nosotros utilizamos una concentración de  $5 \times 10^6$  parásitos/ml debido a un artículo previamente publicado (99), en el que se hace un análisis similar al nuestro. Por último la prueba se diseñó para permitir el descubrimiento más preciso de aquellos individuos que presentaran reacciones débilmente positivas con un menor número de parásitos.

## X.- CONCLUSIONES

1.- El 93.75 % de las personas aparentemente sanas del área no endémica (D,F) presentó una induración  $\leq 5\text{mm}$  por lo cual, cuando el diámetro es  $>5\text{mm}$  se consideró la IDR como positiva.

2.- El 93.1 % de los pacientes con leishmaniosis responden positivamente a la prueba cutánea. Hubo un 6.9 % de falsos negativos lo que corresponde a dos pacientes que habían sido diagnosticados como LCD, pero es bien conocido que este tipo de pacientes son anérgicos, por lo tanto la sensibilidad de la prueba es del 100 %.

3.- Se encontró un 7.25 % de falsos positivos en testigos del área no endémica lo cual corresponde a 5 personas de edad avanzada. Este hallazgo puede deberse a que la frecuencia de dermatosis diversas es mayor en ancianos o a que la respuesta inmunológica puede estar alterada por la edad.

4.- Hubo un 30.85 % de falsos positivos en testigos del área endémica. Lo que sugiere que hay un buen número de personas que están en contacto con el parásito sin desarrollar una enfermedad clínica y probablemente están protegidas, pues desarrollan una respuesta inmunológica celular específica adecuada.

5.- El análisis estadístico de los grupos estudiados reveló que la respuesta a la IDR es significativamente mayor en enfermos que en sujetos sanos y que la respuesta en testigos de áreas endémicas puede deberse a contacto con el parásito.

6- Por los resultados obtenidos en este trabajo, la IDR bajo las condiciones mencionadas, resulta una prueba que puede ser de gran utilidad para aplicarse en estudios epidemiológicos.

En conclusión los resultados muestran que la reacción de Montenegro es una prueba que puede ser de gran valor para conocer la prevalencia o incidencia de la enfermedad tanto en México como en otras regiones geográficas afectadas por la leishmaniosis.

## XII. BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Wirth DF, Rogers WO, Barker R, Dourado H, Suesebang L y Albuquerque B. Leishmaniasis and malaria: new tools for epidemiologic analysis. *Science*. **234**:975-977, 1986.
- 2.- Chance ML. The six diseases of the WHO, Leishmaniasis. *Brit. Med. J.* **283**:1245-1247, 1981.
- 3.- Walsh JA y Warren KS. Selective primary health care. An interim strategy for disease control in developing countries. *New Engl. J. Med.* **301**:967-974, 1979.
- 4.- Velasco Castrejón O. Las leishmaniasis en México. *Rev Lat- Amer. Microbiol.* **29**:119-126, 1987.
- 5.- WHO Expert Comitee. The Leishmaniasis, WHO Technical Report Series, WHO, Switzerland, 1984.
- 6.- Barker DC. Molecular approaches to DNA diagnosis. *Parasitology*. **99**:S125-S146, 1989.
- 7.- Wirth DF y McMahon-Pratt D. Rapid identification of *Leishmania* species by specific hybridization of kinetoplast DNA in cutaneous lesions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **79**:6999-7003, 1982.
- 8.- Lopes UG y Wirth DF. Identification of visceral *Leishmania* species with cloned sequences of kinetoplast DNA. *Mol. Biochem. Parasitol.* **20**:77-84, 1986.
- 9.- Dávalos Mata A, Briseño Ruiz BC, Gasca F E, Cancino M.M. Infección experimental con cepas mexicanas del agente causal de la Leishmaniasis cutánea. *Rev. Invest. Salud Pública (Méx)* **x**: 159-171, 1968.
- 10.- Shnur LF y Suckerman A. Leishmanial excreted factor (EF) serotypes in Sudan, Kenya and Ethiopia. *Ann. Trop. Med. and Parasitol.* **71**:273-294, 1977.
- 11.- Shnur LF, Pearlman E, Greenblatt CL y Slutzky GM. Production of excreted factors (EF) by strains of *Endotrypanum* m. *J. Protozool. (Suppl.)*, **27**:66A, 1980.
- 12.- MacMahon-Pratt D y David JR. Monoclonal antibodies that distinguish between New World species of *Leishmania*. *Nature*. **291**:581-583, 1981.

13.- Barker DC, Arnot DE, David E y Butcher J. DNA characterization as a taxonomic tool for identification of kinetoplastic flagellate protozoans. En: Proceedings of the Workshop of Pan American Health Organization. Biochemical Characterization of *Leishmania*. Washington, DC. Ed. Chance ML y Walton BC. pp. 139-180. Ginebra, UNDP/World Bank/WHO, 1980.

14.- Arnot DE y Barker DC. Biochemical identification of cutaneous *Leishmania* by analysis of kinetoplast DNA. II Sequence homologies in *Leishmania* kDNA. Mol. Biochem. Parasitol. 3:47-56, 1981.

15.- Jackson PR, Wohlhieter JA, Jackson JE, Sayles P, Diggs CL y Hockmeyer WT. Restriction endonuclease analysis of *Leishmania* kinetoplast DNA characterizes parasites responsible for visceral and cutaneous disease. Am J. Trop. Med. Hyg. 33:808-819, 1984.

16.- Lanham MS. Kits for isoenzyme characterization of *Leishmania* isolates in the field. En: Proceedings of the Workshop of Pan American Health Organization. Biochemical Characterization of *Leishmania*. Washington, DC. Ed. Chance ML y Walton BC. pp. 87-98. Ginebra, UNDP/World Bank/WHO, 1980.

17.- Hernández AG. Lectins as a tool in parasite research. En: Proceedings of the Workshop of Pan American Health Organization. Biochemical Characterization of *Leishmania*. Washington, DC. Ed. Chance ML y Walton BC. pp. 181-196. Ginebra, UNDP/World Bank/WHO, 1980.

18.- Holz GG y Beach HD. Categorization of Old World leishmaniasis by ciclopropano fatty acid content of cultured promastigotes. En: Proceedings of Pan American Health Organization. Biochemical Characterization of *Leishmania*. Washington, DC. Ed. Chance ML y Walton BC. pp. 197-203. Ginebra, UNDP/World Bank/WHO, 1980.

19.- Decker-Jackson JE y Tang DB. Identification of *Leishmania* spp by radiorespirometry II: A statistical method of data analysis to evaluate the reproducibility and sensitivity of the technique. En: Proceedings of the Pan American Health Organization. Biochemical Characterization of *Leishmania*. Washington, DC. Ed. Chance ML y Walton BC. pp. 205-245. Ginebra, UNDP/World Bank/WHO, 1980.

20.- Lainson R y Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution. En: The leishmaniasis in biology and medicine. Ed. Peter W y Killick Kendrick R. Vol. 1, pp. 1-20, Academic Press, New York, 1987.

21.- Johnson PT, McConnel E y Hertig M. Natural and experimental infections of leptomnad flagellates in panamanian *Phlebotomus* sandflies. J. Parasitol. 48:158, 1962.

- 22.- Hertig M y McConnel E. Experimental infection of panamanian *Phlebotomus* sandflies with *Leishmania*. *Exp. Parasitol.* 14 92-106, 1963
- 23.- Shaw JJ. Taxonomy of the Genus *Leishmania*. Traditionalist's view and modern concepts. En: Proceedings of the Workshop of Pan American Health Organization Biochemical Characterization of *Leishmania*. Washington, DC. Ed. Chance ML y Walton BC. pp. 9-24, Ginebra, UNDP/World Bank/WHO, 1980.
- 24.- Lainson R y Shaw JJ. The role of animals in epidemiology of South American leishmaniasis. En: *Biology of the kinetoplastida*. Ed. Lumsden WHR y Evans DA. Vol. 2, pp. 1-120, Academic Press, Nueva York, 1987.
- 25.- Sacks DL, Hieng S y Sher A. Identification of cell surface carbohydrate and antigenic changes between non-infective and infective developmental stages of *Leishmania major* promastigotes. *J. Immunol.* 135:564-569, 1985.
- 26.- Rioux J. *Leishmania*. Taxonomy and Phylogeny. Montpellier. IMEEE, 1986.
- 27.- Cruz López O. Parasitología. 2a Ed. Editorial Francisco Méndez Oteo, México, D.F., pp.175, 1981.
- 28.- Gardener PJ, Shchory L y Chance ML. Species differentiation in the genus *Leishmania* by morphometric studies with electron microscope. *Annal. Trop. Med. Parasitol.* 21:142-155, 1977.
- 29.- Alexander J y Russell DG. Parasite antigens, their role in protection, diagnosis and escape. *Current Topics Microbiol. Immunol.* 120:43-67, 1985.
- 30.- Behind R y Louis J. Immune response to *Leishmania*. *Critical Rev. Trop. Med* 2:14-188, 1984.
- 31.- Petersen EA, Neva FA, Oster CA y Diaz HB. Specific inhibition of lymphocyte-proliferation responses by adherent supressor cells in diffuse cutaneous leishmaniasis. *New Engl. J. Med.* 306:387-392, 1982.
- 32.- Walton BC y Velasco O. The distribution and aetiology of diffuse cutaneous leishmaniasis in the New World. En: *Leishmaniasis. The current status and strategies for control*. Ed. Hart DT. Nueva York & Londres, Plenum Press, 1989.
- 33.- Velasco O, Savarini SJ, Walton BC, Gam AA y Neva FA. Diffuse cutaneous leishmaniasis in Mexico. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 41 :280- 288, 1989.
- 34.- Barral A, Badaro R, Barral-Netto M, Grimaldi G, Momen H y Carvalho EM. Isolation of *Leishmania mexicana amazonensis* from the bone marrow in a case of american visceral leishmaniasis. 35:732-734, 1986.

- 35.- Bellazzong S, Lanotte G, Maazoun R, Prallong F y Rioux JA. A new enzymatic variant of *Leishmania infantum* Nicolle, 1908, causative organism of cutaneous leishmaniasis. *Ann. Parasitol.* **60**:1-3, 1985.
- 36.- Schnur LF, Chance MI, Ebert F, Thomas SC y Peters W. The biochemical and serological taxonomy of visceralizing *Leishmania*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **71**:131-144, 1981.
- 37.- Prallong F. Simultaneous presence in dogs of 2 zimodemes of *Leishmania infantum* complex. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* **64**(4):312- 314, 1989.
- 38.- Martínez-Ruiz JL, Alvarez-Fuertes G y Biagi F. Presencia de la leishmaniasis cutánea generalizada en México. *Rev. Invest. Salud Pública (Mex)* **28**:107-109, 1968.
- 39.- Bryceson ADM. Diffuse cutaneous leishmaniasis in Ethiopia. I. The clinical and histological features of the disease. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **63**:708-737, 1969.
- 40.- Southgate BA y Manson-Bahr PEC. Studies in the epidemiology of east african leishmaniasis. 4. the significance of the positive leishmanin test. *J. Trop. Med. Hyg.* **70**:29-32, 1967.
- 41.- Bryceson ADM. Diffuse cutaneous leishmaniasis in Ethiopia. III. Immunological studies. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **64**: 380-387, 1970.
- 42.- Bryceson, ADM. Diffuse cutaneous leishmaniasis in Ethiopia. IV. Pathogenesis of the diffuse cutaneous leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **64**:387-393, 1970.
- 43.- Convitt J, Pinardi ME y Rondon AJ. Diffuse cutaneous leishmaniasis: a disease due to an immunological defect of the host. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **66**:603-610, 1971.
- 44.- Castes M, Agnelli A, Verde O y Rondon AJ. Characterization of the cellular immune response in American cutaneous leishmaniasis. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **27**:176, 1983.
- 45.- Bryceson ADM. Diffuse cutaneous leishmaniasis in Ethiopia. II. Treatment. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **64**:369-379, 1970.
- 46.- Wyler DJ, Weinbaum FI y Herrod HR. Characterization of *in vitro* proliferative responses of human lymphocytes to leishmanian antigens. *J. Infect. Dis.* **140**:215, 1979.

- 47.- Carvalho EM, Teixeira RS y Johnson WD. Cell-mediated immunity in American visceral leishmaniasis: reversible immunosupresion during acute infection. *Infect. Immun.* **33**:498-500, 1981.
- 48.- Biagi F. Intradermoreacciones con leishmanina de Escárcega, Camp., México *Medicina, Rev. Mex.* **33**:255-260, 1953.
- 49.- Marroquín F y Biagi F. Estudio de 19 biopsias de leishmaniasis tegumentaria en México. *Rev. Lat. Anatom. Patol.* **1**:145-150, 1957.
- 50.- Walton BC. Evaluation of chemoterapy of American leishmaniasis by the indirect fluorescent antibody test. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **29**:747-752, 1980.
- 51.- Barabe P. Therapeutique des leishmaniosis. *Med. Trop.* **41**:599-605, 1981.
- 52.- Huszar M, Shor R, Trau H, Gazit E y Passwell JH. The T cell phenotypes in the lesion of patients with cutaneous leishmaniasis. *Clin. Exp. Dermatol.* **12**:103-107, 1987.
- 53.- Modlin RL, Tapia FJ, Bloom BR, Gallinoto ME, Castes M, Rondon AJ, Rea TH y Convit J. *In situ* characterization of the cellular immune response in American cutaneous leishmaniasis. *Clin. Exp. Immunol.* **60**:241-248, 1985.
- 54.- Liew FY. Functional heterogeneity of CD4+ T cells in leishmaniasis. *Immunology Today.* **10**:40-44, 1989.
- 55.- Lara ML, Layrise Z, Scorza JV, Stoikow Z y García E. HLA-B22 and HLA-DQw3 association with American localized cutaneous leishmaniasis in Venezuelan mestizos. *Proceedings of the V LatinoAmerican Workshop* . Ed: C Gorodezky, G Sierp, E. Albert. *Lab. immunogenetics, Munich 1992*.pp
- 56.- Petzl-Erler ML, Belich MP y Queiroz-Telles F. Association of mucosal leishmaniasis with HLA. *Human Immunol.* **32**:254-260, 1991.
- 57.- Gorodezky C, Guzmán J, De la Rosa G, Hobart O, Castro L, Hernández O, Carranza JM, Granados G, Flores J y Pérez H. DR, DQ and DP antigens are associated with localized cutaneous leishmaniasis in Mexicans. *Human Immunol* **32**:60, 1991.
- 58.- Bradley DJ. Regulation of *Leishmania* population within the host. II. Genetic control of acute susceptibility of mice to *Leishmania donovani* infection. *Clin. Exp. Immunol* **30**:130-140, 1977.

- 59.- Bradley DJ, Taylor BA, Blackwell J, Evans EP y Freeman J. Regulation of *Leishmania* population within the host. III. Mapping of the locus controlling susceptibility to visceral leishmaniasis in the mouse. *Clin. Exp. Immunol.* **37**:7-14, 1979.
- 60.- Blackwell J, Freeman J y Bradley D. Influence of H-2 complex on acquired resistance to *Leishmania donovani* infection in mice. *Nature.* **283**:72-74, 1980.
- 61.- De Tolla LJ, Semprevivo LH, Palczuc NC y Passmore HC. Genetic control of acquired resistance to visceral leishmaniasis in mice. *Immunogenetics.* **10**:353-361, 1980.
- 62.- Blackwell JM. *Leishmania donovani* infection in heterozygous and recombinant H-2 haplotype mice. *Immunogenetics.* **18**:101-109, 1983.
- 63.- Preston PM, Behbehani K y Dumonde DC. Experimental cutaneous leishmaniasis. VI. Anergy and allergy in the cellular immune response during non-healing infection in different strains of mice. *J. Clin. Lab. Immunol.* **1**:207-219, 1978.
- 64.- Handman E, Ceredig R y Mitchell GF. Murine cutaneous leishmaniasis; disease patterns in intact and nude mice of various genotypes and examination of some differences between normal and infected macrophages. *Aust. J. Biol. Med. Sci.* **57**:9-29, 1979.
- 65.- Howard JG, Hale C y Chan-Liew WL. Immunological regulation of experimental cutaneous leishmaniasis: I. Immunogenic aspects of susceptibility to *Leishmania tropica* in mice. *Parasite Immunol.* **2**:303-314, 1980.
- 66.- Howard JG, Hale C y Liew FY. Immunological regulation of experimental cutaneous leishmaniasis. III. Nature and significance of specific suppression of cell-mediated immunity in mice highly susceptible to *Leishmania tropica*. *J. Exp. Med.* **152**:594-607, 1980.
- 67.- De Tolla LJ, Scott PA y Farrel JP. Single gene of resistance to cutaneous leishmaniasis in mice. *Immunogenetics.* **14**:29-39, 1981.
- 68.- Blackwell JM, Howard JG, Liew FY y Hale C. Mapping of the gene controlling susceptibility to cutaneous leishmaniasis. *Mouse Newsletter.* **70**:86, 1984.
- 69.- Blackwell JM, Roberts MB y Alexander J. Response of BALB/c mice to leishmanial infection. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **122**:97-106, 1985.
- 70.- Blackwell JM and Plant JE. Expression of the natural resistance gene (Lsh) in wild mice infected experimentally with *Leishmania donovani* or *Salmonella typhimurium*. *curr. Top. Microbiol. Immunol.* **127**:323-330, 1986.

- 71.- Louis JA, Moeder E, MacDonald HR y Engers HD. Recognition of protozoan parasites by murine T lymphocytes. II. Role of the H-2 gene complex in interactions between antigen presenting macrophages and *Leishmania*-immune T lymphocytes. *J. Immunol.* **126**:1661-1666, 1981.
- 72.- Shaw PK, Quigg LT, Altain DS, Juranek DD y Healy GR. Autochthonous dermal leishmaniasis in Texas. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **25**:788-796, 1976.
- 73.- Wilson , Reed CM, McGreevy PB, Pappas MG, Fox JC y Lawyer PG. Human cutaneous leishmaniasis acquired in Texas. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **34**:58-63, 1985.
- 74.- Del Ponte E. Consideraciones sobre la epidemiología de la leishmaniasis tegumentaria en Argentina. *Bol. Of. Sanit. Panam.* **32**:223-231, 1952.
- 75.- Seideling H. Leishmaniasis and babesiasis in Yucatán. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **6**:295, 1912.
- 76.- Incháustegui A. De la leishmaniasis americana y de la úlcera de los chicleros. Tesis de Licenciatura. Escuela Nacional de Medicina, IPN. México, 1918.
- 77.- Shattuck GC. The Penninsula of Yucatan. Medical, biological, meteorological and sociological study. Carnegie Institute, Washington Publ. 43, 1937.
- 78.- Beltrán E y Bustamante ME. Datos epidemiológicos acerca de la úlcera de los chicleros (leishmaniasis americana) en México. *Rev. ISET* **3**:1-28, 1942.
- 79.- Ramos-Aguirre C. Reporte preliminar de un caso de leishmaniasis en la región carbonífera de Coahuila. *Mem. III Congr. Mex. Dermatol.* pp. 91-92, 1965.
- 80.- Ramos-Aguirre C. Leishmaniasis en la región carbonífera de Coahuila. Reporte de dos casos de la forma anérgica difusa. *Dermatol. Rev. Mex.* **14**:39-45, 1970.
- 81.- Welsh-Lozano O y González B. Leishmaniasis en Nuevo León. *Mem. VI Congr. Mex. Dermatol.* pp. 78-80, 1971.
- 82.- Welch-Lozano O. Leishmaniasis. VIII Congr. Mex. Dermatol. pp. 477-480, 1975.
- 83.- Canales-Falcón Y. Leishmaniasis cutánea en Santiago Jalahui, Oax. Tesis de Postgrado en Dermatología. Centro Dermatológico Pascua, México, 1979-1981.
- 84.- Velasco-Castrejón O, Sánchez T, Gamboa T, Parra CI y Rodríguez JC. Nayarit, un nuevo foco de leishmaniasis cutánea en México. Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales. Informe de Actividades, pp. 109, 1987.

- 85.- Velasco O, Savarini S, Graniel A, García E, Guzmán-Bracho C, Pérez P y Mandujano G. Las leishmaniasis cutáneas en Tabasco, con especial referencia a la Chontalpa. *Revista Mex. Parasitol.* **1**, 20-44, 1989.
- 86.- Secretaría de Salud Pública del Estado de Tabasco. Evolución de las leishmaniasis en el Estado de Tabasco. Documento mimeográfico, 1989.
- 87.- Palomar L y García E. Leishmaniasis de mucosa faringea. *Actas Fac. Med. Univ. Aut. Guadalajara*, 1980.
- 88.- Baez-Villaseñor J, Ruiloba J, Rojas E, Treviño V y Campillo S. Presentación de un caso de kala-azar. *Rev. Invest. Clin. (Mex)*. **4**:57, 1952.
- 89.- Aguirre A, Biagi F y Hernández-Nieto A. Segundo caso autóctono de kala-azar en México. *Bol. Med. Hosp. Inf. (Mex)*. **20**:317-333, 1962.
- 90.- Shin-Wel J y Chao D. Use of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of circulating antibodies to human leishmaniasis. *J. Zoon.* **13**:131-137, 1986.
- 91.- Heney C. Interleukin 7: effects on early events in lymphopoiesis. *Immunol. Today*. **10**:170-176, 1989.
- 92.- Mosman TR y Moore KW. The role of IL-10 in crossregulation of TH1 and TH2 responses. *Immunol. Today*. **12**:A49-A53, 1991.
- 93.- Wagner EH. A skin reaction to extracts of *Leishmania tropica* and *Leishmania infantum*. *Univ. Calif. Publ. Zool.* **20**:477-488, 1923.
- 94.- Wagner EH y Koch DA. The biological relationship of *Leishmania* and certain Herpetomonads. *Univ. Calif. Publ. Zool.* **28**:365-386, 1926.
- 95.- Montenegro JA. Cuti-reacao na leishmaniose. *Ann. Fac. Med. Sao Paulo* **1**:323-330, 1926.
- 96.- Jessner M. Wie sind die Aussichten einer immunisierung gegen hautleishmaniose und einer therapie der erkrankung mit *Leishmania*-vakzine. *Arch. F. Schiffs. U. Trop. Hyg.* **31**:72-74, 1927.
- 97.- Buss G. Untersuchungen mit *Leishmania*-vakzine. *Arch. F. Schiffs. U. Trop. Hyg.* **33**:65-83, 1929.
- 98.- Salles-Gomes L. A intradermo-reacao de Montenegro na leishmaniose e outras pesquisas afines. *Brazil Medico.* **53**:1079- 1087, 1939.

- 99.- Leeuwenburg J, Bryceson ADM, Mbugua GG y Arap-Siongok TK. The use of the skin-test to define transmission of leishmaniasis in Baringo District, Kenya. *East Afr. Med. J.* **60**:81-84, 1983.
- 100.- Pifano F. La evaluación de la leishmaniasis tegumentaria americana en el Valle de Aroa, estado de Yaracuy, mediante el índice alérgico (intradermorreacción con antígeno de *Leishmania braziliensis*). *Arch. Venezol. Med. Trop. Parasit. Med.* **4**:25-35, 1962.
- 101.- Liew FY. Cell mediated immunity in experimental cutaneous leishmaniasis. *Parasitol. Today.* **2**:264-270, 1986.
- 102.- Sokal JE. Ball-Point pen technique for measuring induration of skin-test reactions. *New England J. Med.* **293**:501-502, 1975.
- 103.- Navarrete F y Biagi F. Leishmaniasis cutánea, especificidad de la reacción intradérmica de Montenegro. *Prensa Med. Mex.* **25**:321-323, 1960.
- 104.- Restrepo M y Gómez ME. La reacción de inmunofluorescencia indirecta en el diagnóstico de la leishmaniasis tegumentaria americana. *Biomédica (Colombia).* **3**:15-21, 1983.
- 105.- Rodríguez-Toro G. Leishmaniasis. *Biomédica (Colombia).* **3**:77- 99, 1983.
- 106.- Arzubíaga C, Huayanay J y Biaggioni I. An epidemiology study of a American cutaneous leishmaniasis in Maipuco, Perú. *Bol.PAHO Bull.* **18**:19-25, 1984.
- 107.- Senekjic HA. Biochemical reactions, cultural characteristics and growth requirements of *Trypanosoma cruzi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **23**:523-531, 1943.
- 108.- Tobie EJ y Rees CW. The cultivation of *Trypanosoma cruzi* in dialysate medium. *J. Parasitol.* **34**:162-163, 1948.
- 109.- Moore GE, Gerner RE y Franklyn HA. Culture of normal human leukocytes. *JAMMA.* **199**:87-92, 1967.
- 110.- Lowry O, Rosenbrough N, Farr A y Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**:265, 1951.
- 111.-Svejgaard A y Ryder LP. Disease Associations. En *histocompatibility techniques*. Ed. HM, Dick y F. Kissmeyer Nielsen. Elsevier/North Holland. Amsterdam. pp.185-205, 1979

99.- Leeuwenburg J, Bryceson ADM, Mbugua GG y Arap-Siongok TK. The use of the skin-test to define transmission of leishmaniasis in Baringo District, Kenya. *East Afr. Med. J.* **60**:81-84, 1983.

100.- Pifano F. La evaluación de la leishmaniasis tegumentaria americana en el Valle de Aroa, estado de Yaracuy, mediante el índice alérgico (intradermorreacción con antígeno de *Leishmania braziliensis*). *Arch. Venezol. Med. Trop. Parasit. Med.* **4**:25-35, 1962.

101.- Liew FY. Cell mediated immunity in experimental cutaneous leishmaniasis. *Parasitol. Today.* **2**:264-270, 1986.

102.- Sokal JE. Ball-Point pen technique for measuring induration of skin-test reactions. *New England J. Med.* **293**:501-502, 1975.

103.- Navarrete F y Biagi F. Leishmaniasis cutánea, especificidad de la reacción intradérmica de Montenegro. *Prensa Med. Mex.* **25**:321-323, 1960.

104.- Restrepo M y Gómez ME. La reacción de inmunofluorescencia indirecta en el diagnóstico de la leishmaniasis tegumentaria americana. *Biomédica (Colombia).* **3**:15-21, 1983.

105.- Rodríguez-Toro G. Leishmaniasis. *Biomédica (Colombia).* **3**:77-99, 1983.

106.- Arzubíaga C, Huayanay J y Biaggioni I. An epidemiology study of a American cutaneous leishmaniasis in Maipuco, Perú. *Bol. PAHO Bull.* **18**:19-25, 1984.

107.- Senekjic HA. Biochemical reactions, cultural characteristics and growth requirements of *Trypanosoma cruzi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **23**:523-531, 1943.

108.- Tobie EJ y Rees CW. The cultivation of *Trypanosoma cruzi* in dialysate medium. *J. Parasitol.* **34**:162-163, 1948.

109.- Moore GE, Gerner RE y Franklyn HA. Culture of normal human leukocytes. *JAMMA.* **199**:87-92, 1967.

110.- Lowry O, Rosenbrough N, Farr A y Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**:265, 1951.

111.- Sveigaard A y Rydor LP. Disease Associations. En histocompatibility techniques. Ed. HM, Dick y F. Kissmeyer Nielsen. Elsevier/North Holland. Amsterdam. pp.185-205, 1979

112.- Reed SG, Badaro R y Lloyd RM. Identification of specific and cross-reactive antigens of *Leishmania donovani chagasi* by human infection sera. J. Immunol. **138**: 1596-1601, 1987.