

Estudios sobre la sensibilidad cutánea en la leishmaniosis tegumentaria en Costa Rica

por

C. A. Echandi *

(Recibido para su publicación el 23 de noviembre de 1953)

Siendo la leishmaniosis tegumentaria americana una enfermedad relativamente frecuente en nuestro medio, se nos presentó la oportunidad de practicar la intradermo-reacción de Montenegro, como método para el estudio de la sensibilidad cutánea en nuestros casos de leishmaniosis.

La intradermo-reacción de Montenegro es una reacción biológica de naturaleza alérgica determinada por la sensibilización específica producida por la *Leishmania brasiliensis* en el organismo susceptible y desencadenada al contacto posterior del mismo antígeno o de antígenos similares (*Leishmania donovani*, *L. tropica* y *L. enriettii*) ya que es una reacción de grupo (19) (20).

Tuvimos la oportunidad de practicar la prueba cutánea, no sólo con el antígeno de *Leishmania brasiliensis*, sino también con antígeno preparado con cultivos de *Leishmania enriettii* procedentes del Laboratorio de Protozoología del Instituto Oswaldo Cruz.

Presentamos el resultado de las observaciones y experiencias que durante los años de 1950 a 1952 llevamos a cabo en el Laboratorio Bacteriológico del Hospital San Juan de Dios.

MATERIAL Y METODOS

Nuestras experiencias fueron llevadas a cabo en pacientes internados en los diversos pabellones del Hospital San Juan de Dios y en un menor número de pacientes de la consulta externa del mismo Hospital.

* Laboratorio Bacteriológico del Hospital San Juan de Dios.

La encuesta epidemiológica llevada a cabo en la región de Moravia de Chirripó (Provincia de Cartago), abarcó a la mayoría de los trabajadores y sus familias que habitan las fincas de "Moravia", "Pacuare" y "Grano de Oro".

En la preparación de los antígenos con que llevamos a cabo nuestras experiencias, seguimos la técnica propuesta por CORREA (8) pero utilizando una concentración final de 2 millones de leptómonas por centímetro cúbico, como lo recomienda PESSÔA & BARRETTO (24).

Preparamos dos antígenos. Uno con una cepa de *Leishmania brasiliensis* (cepa CM) aislada por nosotros y otro con la cepa de *L. enriettii*, traída de Brasil por el Prof. Trejos Willis.

Los cultivos los realizamos en medio de Rugai (30), en el cual se obtiene crecimiento abundante, óptimo para la preparación del antígeno.

Realizamos la prueba intradérmica en la cara anterior del antebrazo, aproximadamente 6 cm debajo de la línea de flexión del mismo. Para la inoculación del antígeno utilizamos jeringas hipodérmicas de 1 cc graduadas en décimas y provistas de aguja corta calibre 25. El inóculo de un décimo de centímetro cúbico, contenía más o menos 200.000 leptómonas.

La lectura de los resultados la hicimos al cabo de cuarenta y ocho horas. Para señalar la intensidad de las reacciones seguimos el siguiente criterio:

| | | |
|---------------------------------|--------|--------------|
| Induración de menos de 0,5 cm | | negativa |
| Induración de 0,5 hasta 0,9 cm. | | positiva + |
| Induración de 2,0 o más | | positiva +++ |
| Induración de 1,0 hasta 1,9 cm | | positiva ++ |

La designación positiva ++++ la aplicamos a todas aquellas reacciones que presentaban al cabo de cuarenta y ocho horas una zona de necrosis o vesiculación, no tomando en cuenta en estos casos el diámetro de la induración.

Al comenzar nuestras experiencias practicamos la intradermo-reacción en un grupo de trece personas con padecimientos de la piel de otra etiología. En ninguno de estos casos obtuvimos una respuesta alérgica a la inoculación de ambos antígenos.

COMPARACION DE LA ESTRUCTURA ANTIGENETICA DE *LEISHMANIA ENRIETTII* Y *L. BRASILIENSIS* CON RELACION A LA SENSIBILIDAD CUTANEA

Las experiencias llevadas a cabo para diferenciar las diversas especies del género *Leishmania* Ross, 1903 mediante pruebas serológicas, han dado resultados poco constantes y ninguno de los métodos utilizados con el fin de resolver el problema ha recibido confirmación unánime de parte de los investigadores que han tomado en sus manos dicho estudio.

DA CUNHA (11) llega a la conclusión de que las especies del género *Leishmania* que parasitan al hombre presentan, cuando están recientemente aisladas idéntica constitución antigenética, poseyendo únicamente un mismo antígeno común. Este antígeno sufre modificaciones, como consecuencia del mantenimiento de las cepas en cultivos, que consisten en el apareamiento de antígenos secundarios cuya naturaleza no depende de la especie a que pertenecen.

La opinión prevaleciente en la actualidad es que desde el punto de vista morfológico tampoco se puede hacer una distinción entre las leishmanias que parasitan al hombre, de manera que la identificación de las mismas se hace de acuerdo con sus manifestaciones clínicas.

Por otra parte, la hipersensibilidad desarrollada después de la infección por cualquier especie del género *Leishmania* se revela a través de una cutáneo-reacción con cualquier otra especie del mismo género (19) (20) (28).

MUNIZ & MEDINA (20), al estudiar el comportamiento inmunológico de la *Leishmania enriettii*, observan que la comunidad antigenética, ya advertida entre *Leishmania donovani*, *L. brasiliensis* y *L. tropica*, parece abarcar también la especie que parasita los cobayos. Al referirse al comportamiento inmunológico de esta nueva especie con relación a la sensibilidad cutánea señalan que las intradermo-reacciones practicadas en los casos de leishmaniosis tegumentaria americana fueron positivas tanto para el antígeno homólogo como también para el antígeno de *L. enriettii*. Las reacciones por ellos observadas fueron ligeramente más intensas para el antígeno de *L. brasiliensis*.

Posteriormente ROTBERG (28), estudiando la reactividad cutánea para los antígenos de *Leishmania brasiliensis*, *L. enrietti* y *Schizotrypanum cruzi* en los casos de leishmaniosis tegumentaria, encuentra que la intensidad de la reacción con el antígeno de *L. enriettii* ocupa un lugar intermedio entre las reacciones obtenidas con los otros dos antígenos, y que la reactividad cutánea, en relación a los antígenos de leishmanias, se manifestó en menor grado con el antígeno de *Leishmania enriettii*.

En base a las observaciones de MUNIZ & MEDINA (20), fué que incluimos el antígeno de *L. enriettii* en nuestras experiencias sobre la reactividad cutánea en los casos de leishmaniosis tegumentaria en Costa Rica.

Realizamos la intradermo-reacción de Montenegro utilizando ambos antígenos, con el objeto de confirmar los resultados obtenidos por los autores antes mencionados, en 158 personas con úlceras leishmaniósicas en diversos estados de evolución y en individuos provenientes de zonas endémicas que presentaban cicatrices atróficas en la piel.

La reactividad cutánea se manifestó sensiblemente igual para ambos antígenos ya que el 99 por ciento de los casos en los que obtuvimos intradermo-reacción positiva con el antígeno de *Leishmania brasiliensis*, reaccionaron con el antígeno de *L. enriettii*.

El comportamiento de cada uno de los antígenos utilizados, de acuerdo con la intensidad de la respuesta alérgica es el que vemos en el cuadro N^o 1:

CUADRO N^o 1

*Intensidad de la respuesta alérgica para los antígenos
de Leishmania enriettii y L. brasiliensis.*

| Resultado | <i>Leishmania enriettii</i> | | <i>Leishmania brasiliensis</i> | |
|-----------|-----------------------------|------|--------------------------------|------|
| | Número | % | Número | % |
| Negativo | 2 | 1,3 | 1 | 0,6 |
| + | 103 | 65,2 | 59 | 37,3 |
| ++ | 41 | 25,9 | 77 | 48,7 |
| +++ | 4 | 2,5 | 6 | 3,8 |
| ++++ | 8 | 5,1 | 15 | 9,6 |

Como puede apreciarse, obtuvimos dos intradermo-reacciones negativas con el antígeno de *Leishmania enriettii* y solamente una con el antígeno de *L. brasiliensis*. En el 65,2 por ciento de los casos observamos reacciones de una cruz con *L. enriettii* lo que parece indicar que este tipo de reacciones se presentan con mayor frecuencia cuando se usa este antígeno. Por el contrario, para el antígeno de *L. brasiliensis* las reacciones más frecuentes son las de dos cruces, observadas en el 48,7 por ciento de los casos. Las reacciones de tres cruces fueron observadas en un número relativamente pequeño de casos.

La intensidad de la respuesta alérgica fué igual para ambos antígenos en 97 de los 158 casos (Cuadro N^o 2):

CUADRO N^o 2

Casos en los cuales la respuesta alérgica fué igual para ambos antígenos

| Resultado | Número | % |
|-----------|--------|----|
| + | 56 | 58 |
| ++ | 31 | 32 |
| +++ | 2 | 2 |
| ++++ | 8 | 8 |

Obtuvimos una respuesta mayor para el antígeno de *Leishmania brasiliensis* en 59 casos. Las diferencias anotadas solamente excedieron de una cruz en cinco

casos que, habiendo reaccionado con intensidad de dos cruces para *Leishmania enriettii*, presentaron necrosis en la región inoculada con *L. brasiliensis* (Cuadro N° 3):

CUADRO N° 3

Casos en los cuales la respuesta fué mayor para el antígeno de *Leishmania brasiliensis*

| Antígeno de <i>L. enriettii</i> | | Antígeno de <i>L. brasiliensis</i> | | | |
|---------------------------------|-----------|------------------------------------|----|-----|------|
| Número | Resultado | + | ++ | +++ | ++++ |
| 2 | Negativo | 2 | — | — | — |
| 46 | + | — | 46 | — | — |
| 9 | ++ | — | — | 4 | 5 |
| 2 | +++ | — | — | — | 2 |

Solamente en dos casos la respuesta alérgica fué mayor para el antígeno de *Leishmania enriettii* siendo que en uno de ellos fué negativa para el antígeno de *L. brasiliensis*.

Todos los pacientes experimentaron, al cabo de cuarenta y ocho horas, intenso prurito en la región inoculada con el antígeno de *Leishmania brasiliensis*. Esta reacción local, ya observada por DA CUNHA (10), siempre fué menor, y en algunos no se presentó del todo en la región donde se inoculó el antígeno de *Leishmania enriettii*.

PRECOCIDAD Y DURACION DE LA SENSIBILIDAD CUTÁNEA

La precocidad con que aparece la reactividad cutánea en los casos iniciales de una enfermedad, es uno de los factores que hacen práctica, como método de diagnóstico, a las reacciones biológicas que la ponen de manifiesto.

Las experiencias realizadas por PESSÔA & PESTANA (26) con el objeto de determinar la precocidad de la intradermo-reacción en los casos de Leishmaniosis tegumentaria americana, les permiten establecer, como regla general, que la Intradermo-reacción de Montenegro es negativa o débilmente positiva en los casos iniciales de la enfermedad.

MAYER & PIFANO (16), al referirse a las experiencias hechas por Olsen, dicen que en los casos recientes de leishmaniosis tegumentaria, el número de anticuerpos específicos es insuficiente para obtener una respuesta alérgica, motivo por el cual el resultado de la prueba cutánea es incierto.

En nuestro medio hospitalario, es difícil determinar la precocidad con que se manifiestan las reacciones positivas, ya que los casos observados con una evolución menor de un mes son relativamente pocos.

En veinte pacientes en los que pudimos determinar aproximadamente la evolución de la enfermedad (Cuadro N° 4), encontramos dos que presentaron intradermo-reacción negativa.

CUADRO N° 4

Intradermo-reacción de Montenegro en casos iniciales de la enfermedad

| Resultado | EVOLUCION DE LA ENFERMEDAD | | |
|-----------------|----------------------------|---------|---------|
| | 8 días | 15 días | 30 días |
| Positivo | 1 | 4 | 13 |
| Negativo | — | — | 2 |

La intensidad de la reacción fué de una cruz en el único caso observado con una evolución de ocho días. En los casos en los cuales las lesiones databan de 15 días obtuvimos tres reacciones de dos cruces y una de una cruz. Aquellos pacientes que presentaron una intradermo-reacción negativa, reaccionaron positivamente al repetir la prueba cutánea días después. El resumen de estos dos casos es el siguiente:

Paciente C. G.—Hace aproximadamente un mes que estuvo en la región de Línea Vieja, lugar en donde la enfermedad es endémica. Presenta úlceras características en los brazos y piernas; positivas, al examen directo por leishmanias. La intradermo-reacción fué negativa (induración de 0,3 cm de diámetro). Un mes después la prueba cutánea fué positiva (induración de 0,6 cm de diámetro).

Paciente A. G.—Presenta una úlcera en la pierna que data aproximadamente de un mes. El examen directo fué positivo por leishmanias. La intradermo-reacción fué negativa, no habiéndose observado del todo induración. La prueba cutánea practicada mes y medio después fué positiva (induración de 1 cm de diámetro).

En resumen tenemos que la intradermo-reacción fué positiva en el 89 por ciento de los casos en los cuales la evolución de la enfermedad era entre ocho y treinta días.

Con el fin de determinar cuánto tiempo después de adquirida la infección, la prueba cutánea era positiva, DOSTROVSKY & SAGHER (13) inocularon artificialmente tres voluntarios con *Leishmania tropica*. En dos de ellos, la intradermo-reacción fué positiva al segundo día después de la inoculación, mientras que en el tercero, no fué sino hasta cinco semanas después que la intradermo-reacción fué francamente positiva.

TREJOS & ECHANDI (34) se auto-inoculan una suspensión de leptómonas con el objeto de comprobar el poder patógeno de los cultivos de *Leishmania brasiliensis*. Veinticinco días después de la inoculación, la prueba cutánea practicada con el antígeno homólogo fué positiva para A. T. W. y negativa para C. A. E.; A. T. W. presentó, además, aumento en el tamaño de los ganglios de la región crural vecina al lugar en donde se realizó la inoculación experimental.

La intradermo-reacción fué repetida en C. A. E., 17 y 24 días después, dando siempre resultado negativo. Cuatro meses después de la inoculación el resultado de la prueba intradérmica fué positivo (induración de 0,7 cm de diámetro).

Mientras que en A. T. W. la intradermo-reacción fué positiva doce días después de la aparición de una pequeña pústula, en C. A. E. la respuesta alérgica se manifestó a los tres meses después del apareamiento de los primeros síntomas. La mejor explicación en cuanto a la diferencia en la reactividad cutánea es la de que aquellas personas (A. T. W.) en las cuales por naturaleza se presentan fenómenos de tipo alérgico reaccionarán con mayor rapidez a la prueba cutánea. Se puede admitir que la precocidad de la intradermo-reacción está ligada principalmente al terreno alérgico en el cual se implanta el antígeno, y es independiente del período de evolución de las lesiones.

Cualquiera que sea la rapidez con que se desarrolla la hipersensibilidad en los casos de leishmaniosis, ésta se mantiene por toda la vida del paciente. Así, los individuos, una vez curados siguen reaccionando positivamente a la inoculación del antígeno.

Dicen PESSÔA & PESTANA (26) al referirse a la reactividad cutánea en los casos clínicamente curados:

"Como regla general, se puede decir que la alergia permanece durante toda la vida del paciente, permitiendo así un diagnóstico retrospectivo de la enfermedad en casi 100 por ciento de los casos".

En cincuenta personas que presentaban cicatrices atróficas en la piel, características de leishmaniosis y en las cuales no existían lesiones mucosas, obtuvimos reacciones desde una hasta cuatro cruces (Cuadro N° 5). En tres pacientes, que manifestaron haber padecido la enfermedad hacía más de cuarenta años, encontramos reacciones de dos, tres y cuatro cruces, lo que parece indicar que la intensidad en la reactividad cutánea no disminuye de acuerdo con el tiempo transcurrido después de la curación de las lesiones.

La importancia de estas observaciones es la de que si bien es cierto que una intradermo-reacción negativa excluye en la gran mayoría de los casos a la *Leishmania brasiliensis* como agente del proceso patológico en estudio, también lo es que una intradermo-reacción positiva no siempre indica que dicho proceso sea una leishmaniosis tegumentaria. Por ejemplo, en un individuo que presente úlceras en la piel o lesiones mucosas, y cicatrices atróficas como consecuencia de una leishmaniosis anterior, únicamente el hallazgo microscópico de las leishmanias puede asegurar el diagnóstico, ya que la positividad de la intradermo-reac-

ción corre por cuenta del estado alérgico adquirido durante la primera infección y en modo alguno se puede tomar como referencia del nuevo proceso que bien puede ser de otra etiología.

CUADRO N° 5

Intensidad de la respuesta alérgica en los individuos clínicamente curados

| Resultado | Número | % |
|-----------|--------|----|
| + | 15 | 30 |
| ++ | 24 | 48 |
| +++ | 3 | 6 |
| ++++ | 8 | 16 |

INTRADERMO-REACCION DE MONTENEGRO CON RELACION A LESIONES CUTANEAS Y CUTANEO-MUCOSAS

Según PESSÔA & PESTANA (26), el mayor porcentaje de reacciones fuertemente positivas corresponde a pacientes con lesiones cutáneo-mucosas. Aún cuando BUSS (4) dice que no consigue observar conexión entre la intensidad de la reacción y la evolución de la enfermedad, PESSÔA & PESTANA afirman que las reacciones fuertemente positivas (+++ y +++) se observan como regla general en los casos antiguos y en aquéllos que presentan compromiso de las mucosas. El hecho de que aquellos pacientes con lesiones cutáneo-mucosas reaccionen con mayor intensidad a la inoculación del antígeno se debe a la mayor sensibilización que adquieren, como consecuencia de un período de evolución más prolongado de las lesiones.

En Costa Rica, PEÑA CHAVARRÍA (21) señala que la severidad de las lesiones mucosas es mucho menor que la que se observa en América del Sur. Dice el autor que clínicamente la leishmaniosis costarricense puede considerarse como el eslabón intermediario entre las formas banales de Oriente y las formas destructivas tenebrantes que presenta a veces la leishmaniosis tegumentaria en América del Sur. Esta evolución particular de las lesiones mucosas contribuye a que nuestros pacientes permanezcan por más tiempo con las lesiones activas ya que en muchos de los casos éstas pasa desapercibidas.

Practicamos la intradermo-reacción en 71 pacientes que presentaban lesiones únicamente cutáneas y en 32 pacientes con lesiones cutáneo mucosas (Cuadro N° 6).

De 24 personas que reaccionaron fuertemente a la intradermo-reacción, 14 presentaban lesiones cutáneo-mucosas. Estos datos están de acuerdo con las obser-

vaciones de PESSÔA & PESTANA (26) quienes encontraron que de 67 pacientes con intradermo-reacción fuertemente positiva 38 presentaban lesiones mucosas (Cuadro N° 7).

CUADRO N° 6

Intensidad de la intradermo-reacción de Montenegro con relación a lesiones cutáneas y cutáneo-mucosas

| Resultado | CUTANEAS | | CUTANEO-MUCOSAS | |
|-----------------|----------|----|-----------------|----|
| | Número | % | Número | % |
| Negativo | 3 | 4 | — | 0 |
| + | 23 | 32 | 6 | 19 |
| ++ | 35 | 50 | 12 | 37 |
| +++ | — | 0 | 6 | 19 |
| ++++ | 10 | 14 | 8 | 25 |

En resumen, tenemos que más del cincuenta por ciento de las reacciones fuertemente positivas corresponden a casos en los cuales hay lesiones mucosas, por cuyo motivo se debe sospechar su existencia cuando la reactividad cutánea se manifiesta con una intensidad mayor de dos cruces.

Hay que tener presente que también se observan reacciones de una y dos cruces en casos con lesiones cutáneo-mucosas, aún cuando este tipo de reacciones son más frecuentes en los casos con lesiones únicamente cutáneas (Cuadro N° 8) :

CUADRO N° 7

Intradermo-reacciones positivas (+++ y +++) con relación a la presencia de lesiones cutáneas y cutáneo-mucosas

| TIPO CLINICO | Datos nuestros | | Datos de Pessoa <i>et al.</i> | |
|------------------------------|----------------|----|-------------------------------|--------|
| | Número | % | Número | % |
| Lesiones cutáneas | 10 | 29 | 42 % | 43,3 % |
| Lesiones cutáneo-mucosas ... | 14 | 38 | 58 % | 56,7 % |

CUADRO N° 8

Intradermo-reacciones positivas (+ y ++) con relación a la presencia de lesiones cutáneas y cutáneo-mucosas

| TIPO CLINICO | Número | % |
|------------------------------|--------|----|
| Lesión cutánea | 58 | 76 |
| Lesión cutáneo-mucosa | 18 | 24 |

ESPECIFICIDAD Y SENSIBILIDAD DE LA INTRADERMO-REACCION DE MONTENEGRO. CAUSAS DE FALSAS REACCIONES NEGATIVAS

ESPECIFICIDAD

Las experiencias llevadas a cabo sobre la especificidad de la intradermo-reacción de Montenegro son numerosas y los autores que han tomado en sus manos dicho estudio parecen estar de acuerdo en que la reacción intradérmica es positiva solamente en los casos de leishmaniosis tegumentaria. Los resultados discordantes obtenidos en un pequeño número de pacientes con tuberculosis ganglionar no han sido confirmados hasta el momento.

Vamos a referirnos a los trabajos realizados por otros autores sobre el comportamiento de la intradermo-reacción en diversas enfermedades no producidas por leishmanias. En primer lugar hemos creído conveniente enfocar los estudios que sobre el tema se han realizado en la enfermedad de Chagas. Dos han sido los motivos por los cuales trataremos preferentemente el comportamiento de la reacción cutánea en esta protozoosis. El primero, que no ha escapado al criterio de quienes lo realizaron, es la estrecha afinidad biológica entre *Schizotrypanum cruzi* y *Leishmania brasiliensis* y el segundo, es que dicha tripanosomiasis ha dejado de ser una enfermedad exótica en nuestro medio, como lo indican los trabajos de CÉSPEDES (6) en 1947 y ZELEDÓN (35) en 1952.

a) *Intradermo-reacción de Montenegro en la enfermedad de Chagas.*

MORALES & MOLINA, citados por MAYER & PIFANO (17) realizaron la prueba cruzada con "leishmanin" en seis pacientes con enfermedad de Chagas. Todos ellos desarrollaron después de 24 horas pequeños nódulos no característicos, sin reacción inflamatoria, que desaparecieron a las cuarenta y ocho horas.

Posteriormente, PESSÔA y CARDOSO (25) ensayan la intradermo-reacción en pacientes con enfermedad de Chagas y en animales sensibilizados por la inoculación de *S. cruzi*. En los tres pacientes con tripanosomiasis americana y en los doce animales sensibilizados, la intradermo-reacción practicada con antígeno de *L. brasiliensis* fué negativa.

b) *Intradermo-reacción de Montenegro en la lepra.*

ARANTES (1) realizó la prueba cutánea en 142 casos de lepra, llegando a las siguientes conclusiones:

I.—La intradermo-reacción de Montenegro da siempre resultado negativo (100 por ciento) en los casos de lepra, sin historia anterior de leishmaniosis.

II.—En enfermos de lepra que tuvieron probablemente leishmaniosis hace más de 20 años, la intradermo-reacción de Montenegro fué fuertemente positiva”.

MERCADAL PEYRÍ (18) confirma las observaciones de Arantes al no encontrar reactividad cutánea, al antígeno de leishmanias, en los casos de lepra tuberculoides.

c) *Intradermo-reacción de Montenegro en la tuberculosis.*

CORRÉA (7) estudia el comportamiento de la intradermo-reacción de Montenegro en pacientes con tuberculosis. Divide los pacientes en dos grupos. El primero constituido por enfermos con tuberculosis pulmonar sin reacción ganglionar aparente y el segundo grupo constituido por pacientes con lesiones ganglionares. Ninguno de los casos del primer grupo reaccionó positivamente a la intradermo-reacción practicada, pero todos los pacientes del segundo grupo (12 en total) reaccionaron tanto al antígeno de leishmanias, como también al antígeno de Frei.

Posteriormente ROTBERG (29) hace resaltar el hecho de que la intradermo-reacción practicada en tres pacientes con tuberculosis ganglionar fué negativa en todas sus lecturas.

En enfermedades de la piel de otra etiología, DOSTROVSKY (12) investigó el comportamiento de la intradermo-reacción utilizando antígenos preparados con *Leishmania tropica*. En 70 pacientes obtuvo únicamente 7 reacciones positivas, cuya intensidad en ninguno de los casos fué mayor de una cruz.

BATTISTINI & HERRER (2), en cinco pacientes con enfermedades de la piel de etiología no determinada obtienen dos resultados positivos. Estos dos casos fueron tratados con éxito con tártaro emético, lo que indica la etiología leishmaniósica de la enfermedad y habla en favor de la especificidad de la intradermo-reacción.

ROTBERG (29) en 29 personas sin leishmaniosis evidente ni procedentes de zonas en donde la enfermedad es endémica, entre los que se encontraban casos de sífilis (reciente y tardía), blastomycosis, micetoma, úlceras simples de la pierna, granuloma venéreo y tuberculosis ganglionar, obtuvo siempre resultado negativo.

BATTISTINI & HERRER (2) sobre 57 personas que padecían de enfermedades diversas, sin historia de leishmaniosis, así como en 7 individuos sanos que utilizaron como controles, no obtuvieron reacciones positivas.

LOPES & LAENDER (15) en 17 controles, entre los cuales se encontraban cinco pacientes con pián, obtienen invariablemente resultado negativo.

CROSTI & RIGGIO (9) sobre 104 personas afectadas de otras enfermedades obtienen únicamente cuatro resultados positivos. En pacientes con leishmaniosis

visceral y malaria, la intradermo-reacción con antígeno de *Leishmania tropica* fué siempre negativa.

ROSENFELD (27) señala que la prueba cutánea practicada con antígeno de *L. brasiliensis* es negativa en los casos de leishmaniosis visceral.

MERCADAL PEYRÍ (18) en 10 personas normales obtiene siempre resultados negativos, mientras que en 12 pacientes con lupus dos reaccionaron al antígeno de *L. brasiliensis*.

Al referirnos a los controles en la parte correspondiente a material y métodos, mencionamos que en trece personas con padecimientos de la piel, en las cuales practicamos la intradermo-reacción de Montenegro, no obtuvimos resultados positivos. No incluimos en esa oportunidad los resultados que obtuvimos en la encuesta epidemiológica llevada a cabo en la región de Moravia de Chirripó, por tratarse de personas que habitan una zona en donde la leishmaniosis es endémica y en la cual el índice alérgico alcanza cifras tan elevadas como 37.74 por ciento. En dicha encuesta encontramos, sobre 131 personas sin evidencia de tener o de haber padecido la enfermedad, tres (2.2 %) que reaccionaron positivamente al antígeno de *Leishmania brasiliensis*. En ninguno de estos casos la intensidad de la respuesta alérgica fué mayor de una cruz.

PESSÔA (23) al estudiar por medio del índice alérgico la diseminación de la leishmaniosis en las zonas rurales del Estado de São Paulo, encontró 16 resultados positivos, en más de tres mil reacciones practicadas en personas que minuciosamente examinadas no revelaron infección por leishmania. Dice el autor que la explicación de tal hecho se debe a formas abortivas de la enfermedad que no dejan vestigios en la piel, pero que son suficientes para tornar alérgicos a los pacientes.

Recordemos finalmente que los pacientes con leishmaniosis tegumentaria americana reaccionan a la inoculación de leptómonas de *Leishmania brasiliensis*, *L. tropica*, *L. donovani* y *L. enriettii*. Es ésta, por consiguiente, una reacción de grupo (19) (20) (29).

SENSIBILIDAD

La sensibilidad de la intradermo-reacción de Montenegro en los casos de leishmaniosis tegumentaria alcanza cifras elevadas. MONTENEGRO (19) obtiene reacciones positivas en el 86.4 por ciento de los casos.

SALLES GOMES (32) en 120 pacientes con diagnóstico clínico de leishmaniosis obtiene 117 reacciones nítidamente positivas (97,5 %). En un grupo de pacientes en los cuales confirma el diagnóstico por el hallazgo microscópico de los parásitos y por cultivos, encuentra 100 por ciento de positividad de la prueba cutánea.

ROTBERG (29) dice que: "...la gran mayoría de los casos (92.7 %) presentaron a la concentración de 10^7 leptómonas por cc reacciones papulosas precoces a las 48 - 72 horas, bien definidas, inflamatorias..."

CERRUTI (5) en 25 casos de leishmaniosis tegumentaria americana encuentra 100 por ciento de positividad.

Las experiencias llevadas a cabo en el botón de Oriente, han dado resultados muy similares a los obtenidos en la leishmaniosis tegumentaria americana.

En un total de 71 casos comprobados clínicamente por el aspecto de las lesiones, procedencia del paciente y mejora inmediata con la terapéutica apropiada, 30 de los cuales tenía leishmanias al examen microscópico, obtuvimos 68 reacciones positivas, lo que da un sensibilidad del 96 por ciento, muy similar a la encontrada por los autores brasileños. Dos de los tres casos que presentaron una intradermo-reacción negativa fueron ya mencionados en el capítulo correspondiente a la precocidad de la intradermo-reacción, el otro caso fué el de una niña (E. M.) de un año de edad, en la cual no pudimos precisar con exactitud el período de evolución de la enfermedad (posiblemente de seis a nueve meses). En este caso, la falta de reactividad cutánea bien puede explicarse como consecuencia del estado de desnutrición en que ingresó esta niña al Hospital.

CAUSAS DE LAS FALSAS REACCIONES NEGATIVAS

No hemos encontrado en la literatura consultada referencias a factores que puedan alterar la positividad de la intradermo-reacción en los casos comprobados de leishmaniosis. SAGHER (31) estudia un caso en el cual la enfermedad data de tres años y la intradermo-reacción es negativa. Como en los casos de botón de Oriente la regresión más o menos rápida de las lesiones es la regla, supone el autor que el curso clínico peculiar de la lesión va paralelo al nivel alérgico bajo del paciente y no es sino hasta que aumentan los anticuerpos durante el proceso de mejoría, que cambian también las condiciones alérgicas del mismo.

ARANTES (1) observa un caso de leishmaniosis con lesiones activas en el dorso de ambas manos y pequeñas úlceras en la cara, en el cual la intradermo-reacción es negativa. Dice el autor que este resultado negativo puede ser explicado por un estado particular de anergia.

Siendo la intradermo-reacción de Montenegro una reacción de naturaleza alérgica, similar bajo este punto de vista a la tuberculina, y no encontrando referencias sobre las causas determinantes de anergia en la leishmaniosis tegumentaria, pensamos en la posibilidad de relacionar aquellos factores que afectan la positividad de la tuberculina, con la falta de reactividad cutánea en algunos casos comprobados de leishmaniosis.

KOLMER & TUFT (14) dicen que en un pequeño número de pacientes con tuberculosis aguda, fulminante, o bien durante los últimos estados de la enfermedad, se obtienen reacciones negativas debido a que la piel se ha desensibilizado y es incapaz de reaccionar.

Bajo tales condiciones se dice que la piel se torna anérgica. Reacciones negativas se obtienen además en individuos que están en un estado incipiente de la enfermedad o bien en aquéllos mal nutridos, en personas que padecen o con-

valescen de sarampión, rubeola, difteria, tosferina, neumonía, fiebre tifoidea y escarlatina. También se pueden obtener reacciones negativas posiblemente durante el embarazo, durante la menstruación, en el curso de inmunización contra tifoidea o bien después de la anestesia.

En el transcurso de nuestras experiencias, tuvimos oportunidad de observar tres casos provenientes de zonas endémicas, en los cuales había perforación del *septum* nasal y cicatrices en la piel. En todos la intradermo-reacción de Montenegro fué negativa. Posteriormente repetimos la prueba cutánea en dos de ellos y obtuvimos resultado positivo (Cuadro N° 9). Estos pacientes presentaban en común el estar con sarampión.

En los dos casos en los cuales nos fué posible repetir la prueba cutánea, ésta fué positiva 10 días después de haber desaparecido la fiebre. En uno de ellos (M. C. A. F.), en el cual repetimos la intradermo-reacción seis días después, la reactividad cutánea aumentó en intensidad.

Pensamos pues en la posibilidad de que este comportamiento particular en la manera de reaccionar de estos pacientes fuera consecuencia del estado anérgico, condicionado por el padecimiento actual, ya que se mantiene en el transcurso de la enfermedad y desaparece gradualmente durante la convalecencia, lo que se traduce por un aumento progresivo en la intensidad de la reactividad cutánea.

Si bien es cierto que el número de casos estudiados es relativamente pequeño para asegurar que todas las enfermedades a virus son determinantes de estados anérgicos, creemos de importancia señalar que durante la encuesta llevada a cabo en Moravia de Chirripó, obtuvimos tres intradermo-reacciones negativas en niños con historia de leishmaniosis. Dos de ellos padecían de varicela y el otro convalescía de parotiditis epidémica.

Durante la epidemia de fiebre amarilla de 1951, observamos 10 casos con historia de leishmaniosis (cicatrices y procedencia) de los cuales seis presentaron intradermo-reacción negativa (Cuadro N° 10). Los cuatro pacientes restantes, en los cuales la prueba cutánea fué positiva, ya habían pasado el período febril de la enfermedad.

En ninguno de los pacientes con intradermo-reacción negativa tuvimos oportunidad de repetir la prueba cutánea.

CUADRO N° 9

Casos de sarampión con historia de leishmaniosis

| Nombre | Comienzo de sarampión | I. R. M. negativa | I. R. M. positiva |
|-------------|-----------------------|-------------------|-------------------|
| F. G. C. | 30-Mar. 1951 | 6-Abr. y 11-Abr. | — |
| A. A. V. | 27-Mar. 1951 | 3-Abr. | 12-Abr. |
| M. C. A. F. | 21-Ago. 1951 | 1-Sep. | 6 y 12 Sep. |

CUADRO N° 10

Casos de fiebre amarilla con historia de leishmaniosis

| Nombre | Comienzo de F. A. | I. R. M. | En período de estado |
|-----------|-------------------|---------------------|----------------------|
| P. M. S. | 9 Sep. 1951 | negativo el 18 Sep. | SI |
| J. J. Ch. | 8 Ago. 1951 | positivo el 25 Ago. | NO |
| R. A. F. | 18 Ago. 1951 | negativo el 25 Ago. | SI |
| M. J. M. | 2 Sep. 1951 | negativo el 8 Sep. | SI |
| A. E. B. | 24 Ago. 1951 | positivo el 2 Sep. | NO |
| W. H. H. | 27 Ago. 1951 | negativo el 2 Sep. | SI |
| J. V. V. | 1 Sep. 1951 | positivo el 8 Sep. | NO |
| A. A. P. | 2 Sep. 1951 | negativo el 8 Sep. | SI |
| R. B. H. | 3 Oct. 1951 | negativo el 14 Oct. | SI |
| C. C. C. | 7 Oct. 1951 | positivo el 14 Oct. | NO |

INTRADERMO-REACCION DE MONTENEGRO COMO METODO PARA DETERMINAR LA EDAD DE LOS FOCOS LEISHMANIOSICOS

La intradermo-reacción de Montenegro proporciona un método eficaz para investigaciones de orden epidemiológico en las regiones en donde la leishmaniosis constituye una enfermedad de carácter endémico.

El índice alérgico, o sea el porcentaje de personas que presenten una intradermo-reacción positiva, nos dará no solamente idea de los casos clínicamente curados sino también de los casos activos de la enfermedad, ya que es posible separar los pacientes con lesiones evolutivas que no presenten historia anterior de leishmaniosis. Este último grupo está constituido por aquellos pacientes que presentan úlceras parasitológicamente positivas por leishmanias.

Todos aquellos pacientes con intradermo-reacción de Montenegro positiva, con o sin lesiones evolutivas, pero con historia de leishmaniosis, nos indican la existencia anterior de la enfermedad en esa región, mientras que aquéllos con intradermo-reacción de Montenegro positiva que presentan úlceras evolutivas y sin cicatrices antiguos de leishmaniosis vienen a manifestarnos la existencia actual del padecimiento. Este último grupo de personas permite calcular el llamado índice endémico.

La relación entre los índices endémico y alérgico de una determinada región permite, teóricamente, calcular la edad de los focos leishmaniósicos. Así por ejemplo, aquellas regiones en las cuales las relaciones entre el índice endémico y alérgico se aproximan o son mayores que la unidad, constituyen focos recientes de endemia. A medida que el índice endémico baja, como ocurre en lugares en donde la enfermedad ha dejado de ser un problema epidemiológico grave, la relación entre los índices disminuye.

PESSÔA (23) en varias regiones del noreste del Brasil, verifica que en los lugares de fundación más antigua, como Andrandina, el 18,16 por ciento de los habitantes reaccionan positivamente a la intradermo-reacción y apenas un 10,34 por ciento muestran lesiones activas. A medida que la colonización se torna más reciente, los dos índices se aproximan, tal como sucede en Villa Queiroz, en donde los índices son respectivamente 34,33 y 25,83. Finalmente en lugares de colonización mucho más recientes los índices alérgico y endémico son idénticos o sensiblemente iguales.

En Costa Rica, los focos activos de leishmaniosis están localizados en determinadas regiones del territorio nacional. La distribución geográfica de la enfermedad fué estudiada por PEÑA CNAVARRÍA *et al.* (22) encontrando que la región Atlántica es la que acusa una mayor incidencia.

TREJOS & ROMERO (33) estudian uno de los focos principales, el de Moravia de Chirripó, encontrando un índice endémico de 10,34. Posteriormente, con el objeto de observar la reactividad cutánea, en esa misma zona, realizamos una encuesta utilizando, en esta oportunidad, la intradermo-reacción de Montenegro. El índice alérgico que obtuvimos sobre 204 intradermo-reacciones fué de 37,74.

La relación encontrada entre los índices endémico 10,34 y alérgico 37,74 es tan pequeña que nos permite asegurar que dicha zona no es un foco reciente de endemia.

Aún cuando el índice alérgico no da idea exacta de la extensión actual de la enfermedad, sí nos permite hacer algunas consideraciones en cuanto a la severidad de los focos endémicos. De esta manera, los índices alérgicos obtenidos en tres localidades de la región antes mencionada revelan que el foco más activo fué el de "Pacuare" en donde encontramos un 44 por ciento de reactores al antígeno de leishmanias (Cuadro N° 11).

CUADRO N° 11

Indices alérgicos determinados mediante la I. R. M.

| LUGAR | I. R. M. leídas | I.R.M. positivas | I. A. |
|----------------|-----------------|------------------|-------|
| Pacuare | 18 | 8 | 44 |
| Moravia | 161 | 62 | 38,5 |
| Grano de Oro | 25 | 7 | 28 |

Muchos de los casos de Moravia y Grano de Oro que reaccionaron positivamente a la intradermo-reacción, eran individuos que habitaban en la región de "Pacuare", lugar en donde habían contraído la enfermedad.

RESUMEN Y CONCLUSIONES

Este trabajo presenta varios aspectos relacionados con la reactividad cutánea en la leishmaniosis tegumentaria en Costa Rica.

Consideramos, en primer lugar, el comportamiento de los antígenos de *Leishmania brasiliensis* y *L. enriettii* con relación a la sensibilidad cutánea. Realizamos un total de 158 intradermo-reacciones, utilizando ambos antígenos, con el fin de comprobar la relación antigenética entre ambas especies del género *Leishmania*. Encontramos que la reactividad cutánea se manifestó sensiblemente igual para los dos antígenos ya que el 99 por ciento de los casos en los que obtuvimos una reacción positiva para *Leishmania brasiliensis* reaccionaron con el antígeno de *L. enriettii*.

La intensidad de la respuesta alérgica fué mayor para el antígeno de *Leishmania brasiliensis* en el 37 por ciento de los casos. Obtuvimos igual respuesta en el 61 por ciento y solamente en el 2 por ciento observamos una respuesta alérgica mayor hacia el antígeno de *Leishmania enriettii*.

Anotamos, como fenómenos locales, que todos los pacientes experimentaron intenso prurito en la región en donde se inoculó el antígeno de *L. Brasiliensis*. Esta reacción local fué menos intensa o no se presentó del todo en la región inoculada con *L. enriettii*.

La positividad de la intradermo-reacción para el antígeno heterólogo nos indica que *Leishmania enriettii* presenta antígenos comunes con *L. brasiliensis*, los cuales son responsables de las reacciones cruzadas en los casos de leishmaniosis tegumentaria. Estos hechos son similares a los observados entre las especies de leishmanias que parasitan al hombre.

Otro aspecto considerado es la precocidad y la duración de la sensibilidad cutánea. Encontramos, en 20 pacientes con lesiones cuya evolución era entre ocho días y un mes, que el 89 por ciento reaccionaron positivamente.

En dos casos en los cuales pudimos precisar exactamente el período de incubación y evolución de las lesiones, ya que se trataba de una inoculación experimental con cultivos de *Leishmania brasiliensis*, encontramos que la precocidad de la reactividad cutánea es independiente del período de incubación y evolución de las lesiones y está relacionada principalmente con el terreno alérgico peculiar de cada persona.

Observamos también que en Costa Rica, al igual que en otros países de América, la sensibilidad adquirida por la infección por leishmanias persiste por el resto de la vida del paciente, manifestándose a través de una intradermo-reacción positiva, cualquiera que haya sido el tiempo transcurrido desde su curación.

Realizamos la intradermo-reacción en personas con lesiones cutáneas y cutáneo-mucosas, encontrando que las reacciones fuertemente positivas se presentan en más del cincuenta por ciento de los pacientes en los cuales hay lesión mucosa. Por el contrario, las reacciones de una y dos cruces son más frecuentes en los casos con lesiones sólo cutáneas.

Realizamos la prueba cutánea en 13 personas con padecimientos de la piel de etiología no leishmaniósica. No obtuvimos ninguna reacción positiva. Sin

embargo, en 131 personas sin historia de leishmaniosis, pero residentes en zonas en donde la enfermedad es endémica, obtuvimos tres que reaccionaron con intensidad de una cruz. Pensamos como PESSÔA (23) que esas personas pueden haberse tornado alérgicas por infecciones sub-clínicas que no dejan vestigios en la piel.

Encontramos una sensibilidad del 96 por ciento, en un grupo de 71 pacientes cuyo diagnóstico clínico era de leishmaniosis.

Anotamos como causas de falsas reacciones negativas las enfermedades a virus como el sarampión y posiblemente la fiebre amarilla, la varicela y la parotiditis epidémica.

Finalmente se estudia la reactividad cutánea en la región de "Moravia de Chirripó" encontrando un índice alérgico de 37,74. El mayor número de reactivos corresponden a la zona de "Pacuare", lugar en donde el índice alérgico alcanza cifras tan elevadas como el 44 por ciento. Se señala a este último lugar como el foco principal de endemia.

RECONOCIMIENTO

Nuestro agradecimiento al Prof. Alfonso Trejos W. por sus valiosos consejos durante la realización de este trabajo.

RIASSUNTO E CONCLUSIONI

Il presente lavoro considera, sotto vari aspetti, quale é la reazione cutanea della leishmania tegumentaria in Costa Rica.

L'A. vuole osservare come si comporta la sensibilità cutanea con gli antigeni di *Leishmania brasiliensis* e di *L. enriettii*. Si eseguono 158 intradermoreazioni, usando entrambi gli antigeni, con lo scopo di comprovare se esiste una affinità antigenica fra le due speci del genere *Leishmania*. Nel 99 per cento dei casi sia la *Leishmania brasiliensis* che la *L. enriettii* danno una reazione cutanea positiva. La sensibilità é maggiore nella prima, nel 37 per cento dei casi, é uguale nel 6 per cento ed é maggiore nella seconda nel 2 per cento dei casi.

Come fenomeno locale tutti i pazienti inoculati con antigene di *L. brasiliensis* soffrirono di prurito intenso nel punto di inoculazione mentre invece per la *L. enriettii* non si ebbero i medesimi effetti.

Essendo la intradermoreazione positiva per un antigene eterologo l'A. pensa che la *L. enriettii* presenta antigeni comuni con la *L. brasiliensis* i quali sono responsabili delle reazioni incrociate. Questi dati sono simili a quelli osservati fra le speci di leishmania che parassitano l'uomo.

Un'altra considerazione fu quella relativa alla precocità e durata della sensibilità cutanea. La reazione fu positiva l'89 per cento in un gruppo di 20 pazienti con lesioni che evoluzionavano da 8 giorni a un mese. In due casi, nei quali si é potuto definire esattamente il periodo di incubazione e di evoluzione

delle lesioni dato che furono inoculati sperimentalmente con culture di *Leishmania brasiliensis*, si é osservato che la precocità della reazione cutanea é indipendente dalla' evoluzione delle lesioni e dal periodo di incubazione ma che dipende dalle condizioni allergiche peculiari di ciascuna persona.

In Costa Rica, come negli altri paesi americani, la sensibilità acquisita per infezione di leishmania persiste per tutta la vita manifestandosi con intradermoreazione positiva.

Le intradermoreazioni eseguite in pazienti portatori di lesioni cutaneo-mucose furono fortemente positive mentre quelle in pazienti con solo lesione cutanea furono positive con una o due croci.

Furono eseguite reazioni in 13 infermi di malattie cutanee non di origine leishmaniosica con risultato negativo. Ciò nostrante di 131 intradermoreazioni eseguite in persone non clinicamente inferme ma residenti nella zona endemica tre furono positive con una croce. Noi crediamo, come PESSÔA (23), che queste persone possono aver reagito per il fatto di aver sofferto una infezione subclinica senza lesioni cutanee visibili.

Di un gruppo di 71 pazienti il cui diagnostico clinico fu di leishmania si ebbero il 96 per cento di reazioni positive.

Come causa di falsa positività si considerano le malattie da virus come per esempio: morbillo, febbre gialla, varicella e parotidite epidemica.

L'A. conclude con uno studio della reazione cutanea nella regione di Moravia di Chirripó incontrando un indice allergico di 37,74. In "Pacuaire" l'indice allergico fu del 44 per cento per cui si considera questo ultimo paese come il foco endemico principale fra quelli considerati.

SUMMARY

This paper presents some aspects relating the cutaneous activity of leishmaniasis in Costa Rica.

The A. considers in the first place the behavior of the antigens of *Leishmania brasiliensis* and *L. enriettii* with relation to cutaneous sensitivity. He made a total of 158 intradermal-reactions using both antigenes in order to compare the antigenic relationship between the two species of the genus *Leishmania*. He found that the cutaneous activity was manifested with equal sensitivity to both antigens.

The allergic reaction was greater with the *Leishmania brasiliensis* antigen in 37 per cent of the cases. The cutaneous sensitivity was equal in 61 per cent of the cases and only 2 per cent the allergic response was higher for the *Leishmania enriettii* antigen.

The A. also noted among the local reactions that all the patients treated with the *Leishmania brasiliensis* antigen experienced a greater itching than those treated with the *Leishmania enriettii* antigen.

The positivity to the heterologous antigen showed that the *Leishmania enriettii* presents common antigens with the *L. brasiliensis* and that these are respon-

sible for the crossed-reactions in the cases of the leishmaniasis of the skin. These are same facts that have been observe in the other species of leishmanias which are parasitic to man.

Another point considered is the early beginning and the duration of the skin sensitivity. He found in 20 pacientes with lesions of 8 days to one month duration, that 89 per cent showed a positive reaction.

In two cases in which the inoculation was done experimentaly with *Leishmania brasiliensis*, he found that the beginning of the cutaneous sensitivity is independent of the incubation period and the time of evolution and is related only to the allergic background of each particular person.

The A. observed also that in Costa Rica, as in other countries in America, the sensitivity which is acquired with leishmaniasis persists for the rest of the life and is manifested with a positive skin-reaction regardless of the last period of activity.

He made intradermal-reactions in patients with cutaneous and muco-cutaneous lesions and found that the most positive reactions were given by patients with muco-cutaneous lesions.

The A. made skin-reactions in 13 patients with skin diseases of other etiology without obtaining positive reactions. In 131 patients without history of leishmaniasis but living in endemic areas he found 3 who gave positive skin-reactions. The A. thinks, as Pessoa (23), that those persons had a sub-clinical infection which did not give a skin evidence but an allergic one.

The A. found a sensitivity of 96 per cent in a group of 71 patients whose clinical diagnosis was laishmaniasis. He observed false negative reactions in patients with viral diseases such as measles, and probably yellow fever, varicela and mumps.

Finally, he studied the cutaneous reactivity in the geographical region of Moravia de Chirripo and he found an allergic index of 37,74 per cent. Most of the reactors were from Pacuare; in this place the index was as high as 44 per cent. This is the most important endemic area in Moravia.

BIBLIOGRAFIA

1.—ARANTES, S. C.

1941. A intradermo-reação de Montenegro na lepra. *Arqu. Hig. Saude Publ.*, 13:57-73.

2.—BATTISTINI, G. & A. HERRER

1945. Intradermo-reacción en la leishmaniosis tegumentaria en el Perú. *Rev. Med. Exper. Lima*, 4(2):101-116.

3.—BENETAZZO, B. & T. CICCHINI

1952. Leishmaniosi fenomeni immunitari (Studio critico-sintetico). *Arch. Ital. Sci. Med. Trop. Parasit.*, 33(4):187-229.

4.—BUSS, G.

1929. Untersuchungen mit Leishmania-Vakzine. *Arch. f. Schiffs-u. Trop.-Hyg.*, 33:65-83. Cit en ROTBERG (29).

5.—CERRUTI, H.

1945. A reação intradérmica de Montenegro nas cicatrizes inespecíficas dos leishmanióticos. *Arq. Dermat. Sif. Sao Paulo*, 9(13):71-79.

6.—CÉSPEDES, R.

1953. Comunicación personal.

7.—CORREA, C.

1941. A intradermo-reação de Montenegro na tuberculose. *Arqu. Hig. Saude Publ.*, 13:61-63.

8.—CORREA, M. O. A.

1941. Técnica do preparo da vacina e antígeno para a leishmaniose tegumentar americana. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 1(2):389-395.

9.—CROSTI, A. & T. RIGGIO

1948. Fenomeni immunitari e valore diagnostico della intradermoreazione con vaccino specifico nella leishmaniosi cutanea. *Giorn. Ital. Derm. Sifil.*, 89:585. Cit. en BENETAZZO (3).

10.—CUNHA, A. MARQUES DA

1931. Diagnostic de la leishmaniose tégumentaire par déviation du complément et intradérmico-réaction. *Comp. Rend. Soc. Biol.*, 108: 1076-1078.

11.—CUNHA, A. MARQUES DA

1942. A soro-aglutinação das leishmanias. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 37:35-76.

12.—DOSTROVSKY, A.

1935. The diagnostic value of *Leishmania* vaccine. *Ann. Trop. Med. Parasit.*, 29(2):123-128.

13.—DOSTROVSKY, A. & F. SAGHER

1946. The intracutaneous test in cutaneous leishmaniasis. *Ann. Trop. Med. Parasit.* 40(3-4):265-269.

14.—KOLMER, J. A. & L. TUFT.

1941. *Clinical immunology biotherapy and chemotherapy*. XIII × 941 pp. W. B. Saunders Co., Philadelphia.

15.—LOPES, C. F. & J. F. LAENDER

1945. A intradermo-reação de Montenegro no diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana. Empregos de antígenos velhos,—Intradermo-reação negativa em casos de boubá. *Reimpreso de Brasil Med.*, 59(5-6):3-17.

16.—MAYER, M. & F. PIFANO

1941. Sobre el cultivo de *Leishmania tropica* en Venezuela e intradermo-reacción con leishmania-antígeno. *Rev. Sanidad Asist. Soc.*, 6(3):281-289.

17.—MAYER M. & F. PIFANO

1941. Nuevos métodos para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. *Rev. Sa-
nidad Asist. Soc.*, 6(3):311-316.

18.—MERCADAL PEYRÍ, J.

1951. Primeras experiencias dermatológicas españolas sobre la reacción de Montene-
gro. *Rev. Ibérica Parasitol.*, 11(1):47-59.

19.—MONTENEGRO, J.

1926. A cutis-reação na leishmaniose. *Ann. Fac. Med. Univ. Sao Paulo*,
1:323-330.

20.—MUNIZ, J. & H. MEDINA

1948. Leishmaniose tegumentar do cobaio (*Leishmania evriettii* n. sp.). *O Hospi-
tal, Rio de Janeiro*, 33(1):35-59.

21.—PEÑA-CHAVARRÍA, A.

1934. La leishmaniosis tegumentaria en Costa Rica. *Memorias del Segundo Con-
greso Médico Centroamericano*, 204-212.

22.—PEÑA-CHAVARRÍA, A., J. C. OVARES, A. ROMERO, M. FALLAS & A. CASTRO

1946. Leishmaniosis tegumentaria en Costa Rica. *Rev. Med. Costa Rica*, 7(147-
152):66-97.

23.—PESSÔA, S. B.

1941. Índices de disseminação da leishmaniose tegumentar em algumas zonas novas do
Estado de Sao Paulo. *Rev. Biol. Hig.*, 11:1-9.

24.—PESSÔA, S. B. & M. P. BARRETTO

1948. *Leishmaniose tegumentar americana*. 527 pp. imprensa Nacional, Rio de
Janeiro.

25.—PESSÔA, S. B. & F. A. CARDOSO

1942. Notas sobre a imunidade cruzada na leishmaniose tegumentar e na molestia
de Chagas. *O Hospital, Rio de Janeiro*, 21:187-193.

26.—PESSÔA, S. B. & B. R. PESTANA

1940. A intradermo-reação de Montenegro nas campanhas sanitarias contra a leish-
maniose. *Sao Paulo Med.*, 15:133-151.

27.—ROSENFELD, G.

1945. Algumas considerações sobre a introdermo-reação de Montenegro nas leish-
maniasis visceral e tegumentar. *Rev. Paulista Med.*, 26:55-56.

28.—ROTBERG, A.

1951. Reações de Montenegro precoces e tardias. Dissociação pelos testes quanti-
tativos: incidência e aspectos na leishmaniose tegumentar americana. *O Hospi-
tal, Rio de Janeiro*, 39(2):263-274.

29.—ROTBERG, A.

1952. Contribuição para o estudo da alergia na leishmaniose tegumentar americana. *Rev. Hospital N. S. Aparecida*, 5(1):3-88.

30.—RUGAI, E.

1941. Cultura das leishmanias. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 1(1):153-159.

31.—SAGHER, F.

1946. Activation of an originally negative intracutaneous leishmania-vaccine reaction. *Acta Med. Orientalia*, 5(3):82-85.

32.—SALLES-GOMES, L.

1939. A intradermo-reação de Montenegro na leishmaniose e outras pesquisas afins. *Brasil Med.*, 53:1079-1087.

33.—TREJOS, A. & A. ROMERO

1949. Comunicación personal.

34.—TREJOS, A. & C. A. ECHANDI

1951. Comprobación del poder patógeno para hombre de cultivos de *Leishmania brasiliensis*, Vianna 1911. (Nota previa). *Rev. Med. Costa Rica*, 10(204): 91-92.

35.—ZELEDÓN, R.

1952. *El problema de la tripanosomiasis americana o Enfermedad de Chagas en Costa Rica*. Tesis de Grado. 109 pp.: Imprenta Nacional, San José, Costa Rica.