

14
209

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

“ CUAUTITLAN “



DIAGNOSTICO DE LEISHMANIASIS
20 AÑOS DE EXPERIENCIA

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A
FERMIN ESPINDOLA LEON

DIRECTOR DE TESIS :

M. V. Z. PH. D. ADRIANA A. LEBRIJA RODRIGUEZ
CUAUTITLAN IZCALLI EDO. DE MEX. 1987



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 está 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.

INDICE

	Pág.
CAPITULO I	
1. INTRODUCCION	1
1.1 Distribución Geográfica	2
1.2 Sinonimias	3
1.3 Ciclo Biológico	9
1.4 Reservorios	12
1.5 Vectores	16
1.6 Formas de la enfermedad	19
1.6.1 Leishmaniasis cutánea simple	19
1.6.2 Leishmaniasis cutánea de etiología - desconocida	24
1.6.3 Leishmaniasis mucocutánea o espundia	26
1.6.4 Leishmaniasis visceral o kala-azar	26
1.7 Relación huésped-parásito	29
CAPITULO II	
2. OBJETIVOS	38
CAPITULO III	
3. RESULTADOS.	
3.1 Leishmaniasis cutánea simple	39
3.1.1 Diagnóstico clínico-epidemiológico	39
3.1.2 Diagnóstico directo	41
3.1.3 Métodos de diagnóstico inmunológicos	44
3.1.4 Examen celular	49
3.1.5 Diagnóstico diferencial	53
3.2 Leishmaniasis cutánea diseminada	55
3.2.1 Manifestaciones clínico-patológicas	55
3.2.2 Examen directo	56
3.2.3 Exámenes indirectos	57
3.2.4 Diagnóstico diferencial	59

	Pág.
3.3 Leishmaniasis cutánea post-kala-azar	60
3.3.1 Inmuno Patología	60
3.3.2 Exámenes directos	61
3.3.3 Exámenes indirectos	61
3.3.4 Diagnóstico diferencial	63
3.4 Leishmaniasis recidiva	64
3.4.1 Inmunopatología	64
3.4.2 Examen directo	65
3.4.3 Examen indirecto	65
3.4.4 Diagnóstico diferencial	66
3.5 Leishmaniasis mucocutánea	
3.5.1 Manifestaciones clínicas	67
3.5.2 Examen directo	69
3.5.3 Examen indirecto	71
3.5.4 Diagnóstico diferencial	78
3.6 Leishmaniasis visceral	79
3.6.1 Patogénesis	79
3.6.2 Manifestaciones clínicas	80
3.6.3 Balance biológico	82
3.6.4 Métodos de diagnóstico estandar	84
3.6.5 Métodos de diagnóstico alternativos	87
3.6.5 (1) Métodos inespecíficos	87
3.6.5 (2) Métodos específicos	88
3.6.6 Diagnóstico diferencial	102
 CAPITULO IV	
DISCUSION	103
 CAPITULO V	
CONCLUSIONES	121
BIBLIOGRAFIA	127

ABREVIATURAS EMPLEADAS EN EL TEXTO

Ac.	Anticuerpo
AD.	Aglutinación directa
Ag.	Antígeno
AP.	Aglutinación pasiva
CIED.	Contra inmuno electro difusión
CIEP.	Contra inmuno electro foreshis
CMI.	Inmunidad mediada por células
DTH.	Hipersensibilidad tipo retardada
FC.	Fijación de complemento
ID.	Inmuno difusión
IDR.	Intradermorreacción de Montenegro
IED.	Inmuno electro difusión
IEP.	Inmuno electro foreshis
IHA.	Inhibición de la hemoaglutinación
LC.	Leishmaniasis cutánea
LCA.	Leishmaniasis cutánea americana
LCD.	Leishmaniasis cutánea diseminada
LCPKA.	Leishmaniasis cutánea post-kala-azar
LMC.	Leishmaniasis mucocutánea
LR.	Leishmaniasis recidiva
LV.	Leishmaniasis visceral o K. A. -kala-azar
RIA.	Radio inmuno ensayo
SRE.	Sistema retículo endotelial

CAPITULO I

1. INTRODUCCION

El término leishmaniasis, se refiere a un grupo de enfermedades parasitarias que comprende infecciones cutáneas, mucocutáneas y viscerales producidas por diferentes especies del protozoario del género Leishmania. Los parásitos de este género, infectan reptiles y mamíferos y estos últimos juegan un papel importante como reservorios de estas enfermedades (Snow, 1974, Fiennes, 1978, Belehu et al., 1980). La incidencia de la leishmaniasis es desconocida, pero por estimaciones conservadoras por lo menos 400,000 nuevos casos ocurren cada año (Marinkelle, 1980). La leishmaniasis es considerada como un problema de salud pública en algunas regiones de América, Africa, Asia y Europa y hay pronósticos de una mayor propagación en los próximos años (Williams y Coelho, 1978).

1.1. Distribución Geográfica

Las leishmaniasis ocurren en muchas áreas tropicales y subtropicales del mundo, a menudo focalmente, habiéndose demostrado casos autóctonos en todos los continentes excepto en Australia y la Antártida (Carrada, -- 1984, Kager, 1984). La enfermedad se presenta con mayor frecuencia en altitudes comprendidas entre los 0 y 800 m sobre el nivel del mar, temperatura media anual de 25°C y humedad de 75% o más, aunque también, se presenta entre los 1,000 y 3,000 m sobre el nivel del mar (Fuller et al., 1976, 1979, Bonfante, 1983). Las leishmaniasis se encuentran divididas geográficamente como: Leishmaniasis del Viejo Mundo (Asia, Africa, Europa) y del Nuevo Mundo (América) (Fig. 1).

Leishmaniasis del Nuevo Mundo

La distribución de la LCA: úlcera de los chicle--ros, espundia, pian-bois, Bay-sore, Úlcera de Baurú, leishmaniasis cutánea difusa, uta y bubas en las Américas, es un mosaico de focos endémicos a menudo traslapados, distribuidos desde el sureste de Texas y noreste de México; el parásito es del complejo de L. mexicana -

de subespecie desconocida, no se conoce el vector ni el reservorio (Camisa et al., 1985), pero este último probablemente sea un roedor. Este foco es ecológicamente distinto del gran foco del complejo de L. mexicana de - el sureste de México y que se extiende hasta los Andes - Peruanos en América del Sur, incluyendo algunas Islas - del Caribe. El límite norte del complejo de L. brazi- - liensis aún no ha sido definido; L. braziliensis pana- - mensis se sabe que se extiende desde Colombia hasta Cos - ta Rica y probablemente al sur de México (Walton, 1985).

En América del sur la distribución de los comple - jos de L. mexicana y L. braziliensis se traslapan en mu - chas áreas y la infección puede ocurrir con ambos. A - excepción de Chile y Uruguay se han detectado focos de - LCA en todo el continente americano (Bonfante, 1983, - Walton, 1985).

Respecto a la Leishmaniasis Visceral (LV) o Kala - Azar (KA), la enfermedad es hiperendémica en algunas re - giones de América y se encuentran pequeños focos desde - México hasta algunos países de América del Sur, donde - constituye un verdadero problema de salud pública (Shaw y Lainson, 1972, Lainson y Shaw, 1978) (Fig. 1).

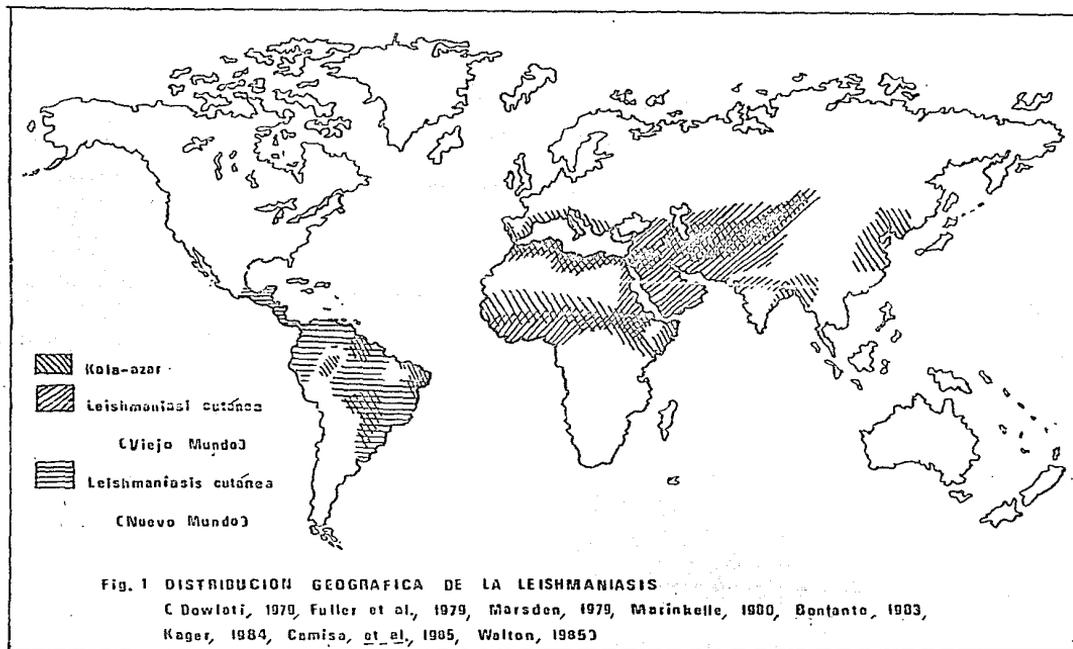
En el sur de los EUA se reportaron los primeros - casos autóctonos de KA canino (Anderson et al., 1980).

Leishmaniasis del Viejo Mundo

La distribución de las leishmaniasis en el Viejo_ Mundo al igual que las del Nuevo Mundo, dependen de la presencia del vector y su reservorio. La LC o botón de oriente y el KA poseen una amplia distribución; son endémicas en muchas partes, pero ciertas áreas muestran - una incidencia más alta. En Africa se presenta por -- arriba del grado 10 norte del Ecuador y es muy rara por debajo de este nivel (Dowlati, 1979, Fuller et al., -- 1979), extendiéndose hasta Europa meridional (costas - del Mediterráneo), Medio Oriente, Indochina y estados - sureños de la URSS (Camisa et al., 1985) (Fig. 1).

Leishmaniasis en México

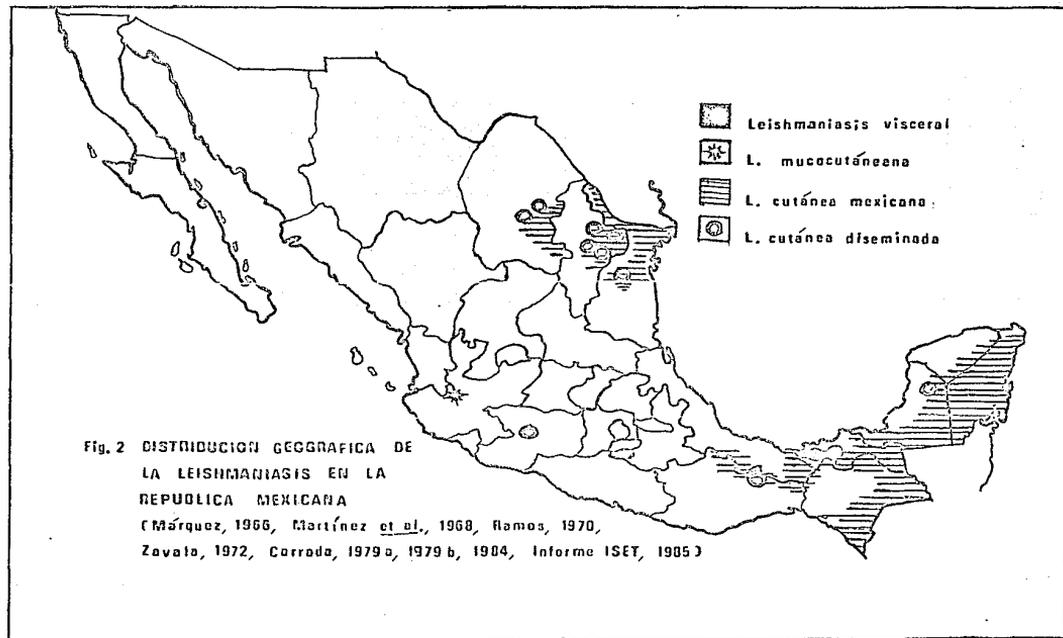
Aunque se ha mencionado que la enfermedad es rara en zonas áridas (Bonfante, 1983), en México la LC existe en una vasta zona endémica no tropical conocida como la Llanura del Golfo; zona semiárida que comprende el - oriente de Tamaulipas, Nuevo León hasta el centro de -



Coahuila y probablemente el Estado de Durango, lugares - donde se presenta una enfermedad similar al botón de - - oriente (Márquez, 1966, Martínez et al., 1968, Ramos, -- 1970). Los focos endémicos de LC son la porción orien-- tal de la Península de Yucatán, gran parte de Chiapas, - Campeche y Quintana Roo, norte de Oaxaca y sur de Vera-- cruz (Márquez, 1966, Zavala, 1972, Carrada, 1979a). Re-- cientemente se han demostrado casos autóctonos en Michoa_ cán, Morelos y Durango lo que nos hace pensar que la LC existe tal vez en la Huasteca y en la región tropical - del occidente de México (Carrada, 1984) (Fig. 2).

La LCD es reportada en los Estados de Tabasco, Ve_ racruz y noreste de México (Márquez, 1966, Informe -- ISET, 1985). Respecto a la LMC es rara en México. Sin embargo, en Jalisco se descubrió un caso aparentemente_ mucoso (Velasco, comunicación personal). Por otro lado el KA, se encuentra distribuido en la Cuenca semiárida_ del Río Balsas, en los Estados de Puebla, Morelos y Gue_ rrero (Carrada, 1979b, Carrada, 1984) (Fig. 2).

Las formas asociadas con enfermedad humana tanto_ en el Nuevo como en el Viejo Mundo están representadas_ en el Cuadro I.



Cuadro I.- Clasificación de Leishmania y Leishmaniasis

Género-especie	D. Geográfica	Enfermedad(es)
Complejo de <u>Leishmania mexicana</u>		
<u>L. mexicana mexicana</u>	México, Guatemala y Belice	LC/LCD
<u>L. mex. amazonensis</u>	Brasil	LC/LCD
<u>L. mex. pifanoi</u>	Venezuela	LCD
<u>L. mex. venezualensis</u>	Venezuela	LC
<u>L. mex. garhami</u>	Venezuela	LC
Complejo de <u>Leishmania tropica</u>		
<u>L. tropica</u>	Asia, Africa y Europa	LC/IMC/LCD
<u>L. major</u>	Asia y Africa	LC/LR
<u>L. aethiopica</u>	Africa	LC/LCD
Complejo de <u>Leishmania braziliensis</u>		
<u>L. braziliensis braziliensis</u>	América del Sur	IMC
<u>L. b. guayanensis</u>	América del Sur	LC
<u>L. b. panamensis</u>	América Central	LC/IMC/LR
<u>L. b. peruviana</u>	Perú	LC
<u>L. b. subespecies</u>	Venezuela	LC
Género-especie	D. Geografico	Enfermedad(es)

Género-especie	D.Geográfica	Enfermedad(es)
<u>Complejo de <i>Leishmania donovani</i></u>		
<u>L. donovani donovani</u>	Asia y Africa	KA/LCPKA/LMC
<u>L. d. infantum</u>	Asia, Africa y Europa	KA/LCPKA
<u>L. d. chagasi</u>	América	KA
<u>L. d. chinensis</u>	China	KA
<u>L. d. archibaldi</u>	Africa	KA

Leishmaniasis cutánea (LC), Leishmaniasis cutánea diseminada (LCD), --
 Leishmaniasis cutánea post-kala-azar (LCPKA), Leishmaniasis recidiva (LR), --
 Leishmaniasis mucocutánea (LMC), Leishmaniasis visceral (LV) o Kala-azar (KA).
 Convit y Kerdel, 1965, Bryceson, 1970, Farah y Malak, 1971, Lainson y Shaw,
 1972, 1974, Dowlati, 1979, Laroche et al., 1979, Walton y Valverde, 1979, --
 Lainson et al., 1981, Mavel y Behin, 1982, Bonfante, 1983, Bonfante et al.,
 1983, Ravisse et al., 1984, Walton, 1985.

1.2. Sinonimias

Las leishmaniasis reciben diversos sinónimos dependiendo de la forma de la enfermedad y la zona geográfica donde ocurren.

Leishmaniasis Cutánea: Leishmaniasis cutánea simple o localizada, uta úlcera de los chicleros, botón de oriente, botón de Alepo, botón de Briska, fúnculo de Jerico, enfermedad de Borovsky, Pian de la selva de Yuca--tán y otros.

Leishmaniasis Cutánea Diseminada: Leishmaniasis --anérgica hansenoide, forma anérgica lepromatosa lepromatoides, Leishmaniasis tegumentaria difusa o diseminada.

Leishmaniasis Mucocutánea: Espundia, Leishmaniasis americana, bubas brasileñas, Leishmaniasis cutáneo --muco-cutánea entre otros.

Leishmaniasis Visceral: Kala-Azar, Fiebre de Dum Dum, Fiebre negra esplénica infantil y otros.

1.3. Ciclo Biológico

En su ciclo biológico la Leishmania pasa por dos fases: amastigote, organismo aflagelado en el huésped - mamífero y promastigote, organismo flagelado en el insecto vector.

En el huésped vertebrado es un parásito intracelular obligado del SRE de la piel, mucosas, bazo y médula ósea. En ellos se multiplica como amastigote, organismos redondos u ovales de 1.5 a 3.0 μm por 3.0 a 6.5 μm en tamaño dependiendo de la especie (Snow, 1974, Preston y Dumonde, 1976, Belheu et al., 1980). Cuando el insecto vector, hembra del género Lutzomyia en el Nuevo Mundo y Phlebotomus en el Viejo Mundo ingieren sangre o tejido infectado de animales reservorios (cánidos, roedores o mamíferos) o del huésped accidental (hombre) - (Godfrey, 1978, Ranque et al., 1978, Marsden, 1979), su organismo favorece la transformación a la fase de promastigote, organismo que se multiplica por fisión binaria longitudinal y varía en tamaño de 1.5 a 3.0 μm por 16.0 a 40.0 μm (Lainson y Shaw, 1978) (Fig. 3).

El amastigote (Fig. 4) tiene la forma típica de -

las celdillas eucariotas. El protozoario esta revestido por una unidad de membrana (M), con dos capas electro-- densas y una capa media electrolucida; por debajo de la membrana se encuentran los microtúbulos subpelliculares_ (Mi-Tb); cada célula posee un núcleo central o excéntrico (N), limitado por una membrana doble, con gránulos - de cromatina dispersa que representa el DNA nuclear. El cinetoplasto (DNA-cin) es una estructura discoidal compuesta por microfibrillas de DNA extracelulares, ordenadas perpendicularmente en relación al eje longitudinal; íntimamente asociado con el cinetoplasto está la mito-- condria única (Mit); por la cara cóncava del cinetoplasto está colocado el flagelo del promastigote (Fig. 5) - con dos pares de microtubulillos centrales y nueve pa-- res periféricos, que sin formar membrana ondulante surge libre por la porción anterior. El parásito completa su ciclo vital en el tubo digestivo del díptero hemató- fago en un lapso cercano a diez días (Farah y Malak, - 1971) y son clasificados de acuerdo a la región anatómica del mismo:

Hipopilaria: en intestino posterior; pílora, -- íleon y recto.

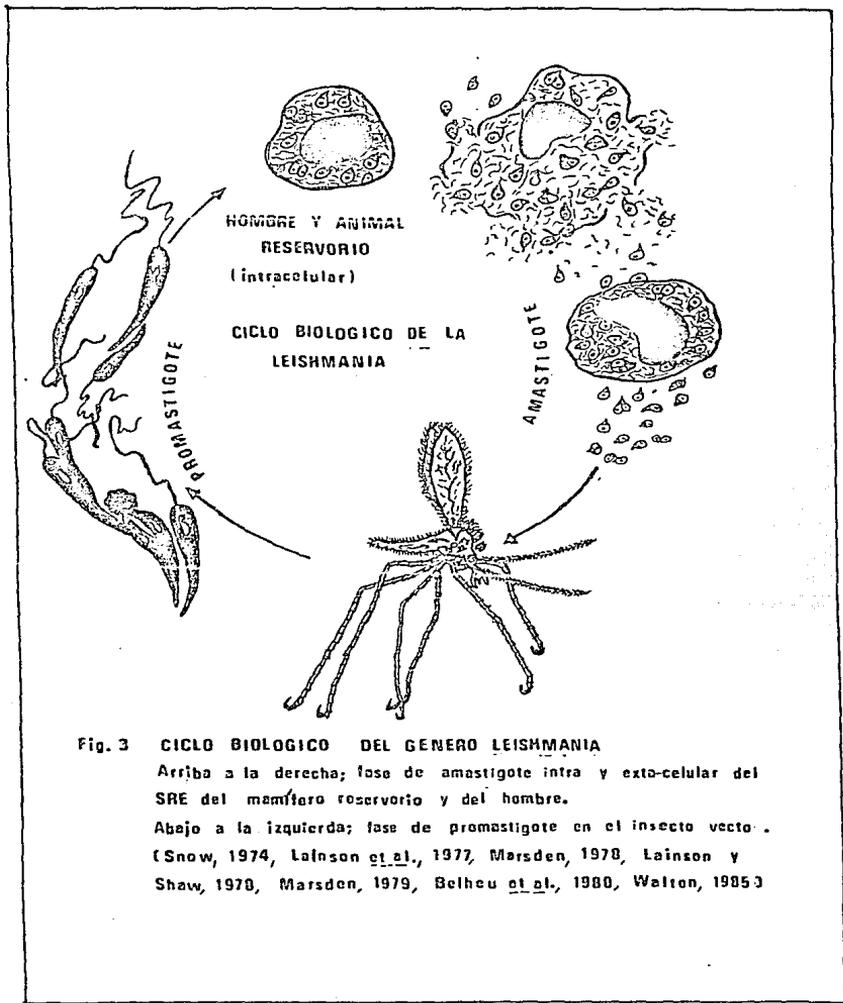


Fig. 3 CICLO BIOLÓGICO DEL GENERO LEISHMANIA

Arriba a la derecha; fase de amastigote intra y exto-celular del SRE del mamífero reservorio y del hombre.

Abejo a la izquierda; fase de promastigote en el insecto vector. (Snow, 1974, Lainson *et al.*, 1977, Marsden, 1978, Lainson y Shaw, 1978, Marsden, 1979, Belheu *et al.*, 1980, Walton, 1985)

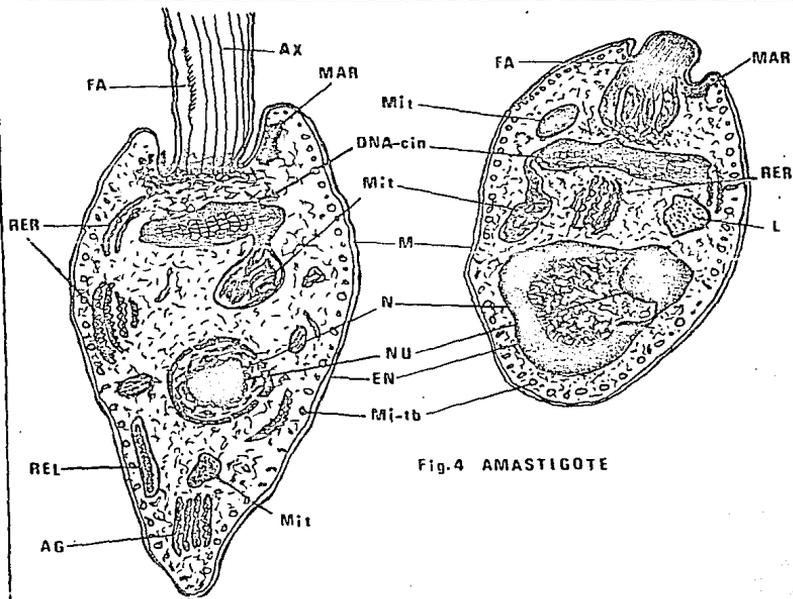


Fig.4 AMASTIGOTE

Fig.5 PROMASTIGOTE

ULTRERECTURA DEL GENERO LEISHMANIA

AG, Aparato de Golgi; AX, Axicoma; EN, Envoltura nuclear;
 N, núcleo; NU, Nucléolo; DNA-cin, Cinotoplasto; M, Membrana;
 Mit, Mitochondria; Mi-tb, Microtúbulos subpelviculares; MAR,
 Microtúbulos asociados de reserva; FA, filamento accesorio;
 L, Lípidos; RER, Retículo endoplásmico rugoso; REL, Retículo
 endoplásmico liso (Carrado, 1904, Pulido, 1984)

Peripilaria: en intestino posterior y anterior.

Suprapilaria: solamente en intestino anterior.

Los parásitos del complejo de L. braziliensis pertenecen al tipo Peripilaria y los del complejo de L. mexicana son de tipo Suprapilaria al igual que los complejos de L. tropica y L. donovani. Los del tipo Hipopilaria no infectan al hombre (Bonfante, 1983).

1.4. Reservorios

Los reservorios desempeñan una función importante en el ciclo evolutivo de estas enfermedades. Una amplia variedad de mamíferos salvajes son los huéspedes naturales del parásito y con la posible excepción de L. braziliensis peruviana todas las Leishmaniasis americanas son zoonosis selváticas. A pesar de que, el conocimiento de los reservorios naturales es aún muy incompleto y éstos no se han estudiado adecuadamente en los focos endémicos, los principales reservorios de la LC son pequeños roedores pertenecientes a varios géneros: Ototylomys, Nyctomys, Heteromys, Oryzomys, etc. en América y Rhombomys, Meriones, Arbicanthis, etc., este último también reservorio de la LMC en el Viejo Mundo -- (Milosey et al., 1969, Bobin et al., 1978, Ranque, 1978, Ranque et al., 1978, Arias et al., 1981, Bonfante, -- 1983).

Los roedores parecen ser los más importantes reservorios para muchas formas de L. mexicana, pero L. mexicana amazonensis tiene un amplio rango de animales reservorios y para L. braziliensis el perezoso (Cholepus hoffmanni) constituye el reservorio más importante.

En el caso del uta el único animal reservorio conocido es el perro doméstico (Shaw y Lainson, 1972, Lainson y Shaw, 1978). En el Viejo Mundo en áreas donde el botón de oriente es endémico los perros están infectados no así los roedores, por otro lado donde prevalece el tipo rural los roedores están infectados pero no los perros (Sedy y Nadim, 1967).

En la LV los reservorios están constituidos por el hombre, cánidos salvajes y domésticos (Lainson y Shaw, 1978, Flemmings et al., 1984). Puesto que, los perros domésticos están involucrados como reservorios de la LV humana en el área mediterránea, América del Sur y China, estos son sospechosos en la investigación epidemiológica de la enfermedad. En el Cuadro II se muestra la distribución por raza en un estudio del área mediterránea (Ranque et al., 1978). En esta área pueden seguirse tres modelos epidemiológicos (Laroche et al., 1978, Ranque, 1978).

a).- Tipo primario: constituido por numerosos animales salvajes. Los más frecuentes son los: roedores (rata, gerbiles, Arbicanthis, Spermophiles, etc.) y cánidos (chacal, zorro y cerval), lo que explica que la

enfermedad sea rural y esporádica. El vector es del -- tipo zoofflico.

b).- Tipo secundario: constituido por animales - domésticos o periodomésticos, la endemia canina es sostenida por un reservorio salvaje. La enfermedad tam- -- bién es esporádica tratándose de una zooantroponosis.

c).- Tipo terciario: no intervienen los animales, el hombre constituye el foco, la víctima y el reservo-- rio; la enfermedad evoluciona de un modo endemo-epidémico. A este tipo pertenece la LV en la India donde no - hay reportes de animales reservorios (Mahmound y Warren, 1977).

A pesar de que, es típico encontrar que para la - LC el reservorio lo constituyen pequeños roedores y para la LV los cánidos, recientemente se han encontrado - perros infectados naturalmente con Leishmania spp en -- Xalahui, Oaxaca (Informe Central de Actividades ISET, - 1985), existiendo además reportes en Latinoamérica que apoyan estos hallazgos (Herrer y Christensen, 1976).

Cuadro II.- Distribución de la leishmaniasis canina
por raza (%)

Boxer	19.7	Mastín corriente	1.1
Pastor Alemán	14.5	Pastores	1.1
Braques	6.8	Beagle	1.1
Cocker	5.7	Fox Terrier	0.6
Teckels	5.7	Bull	0.6
Sabuesos	5.1	Boyeros	0.6
Griffons	4.0	Basset	0.6
Lou Lou	3.4	Chow Chow	0.6
Beauceron	3.4	Caniches	0.6
Doberman	3.4	Crocnendal	0.6
Dogos	2.3	Korthal	0.6
Setter	2.2	Malinois	0.6
Pointers	1.1	Raza indeterminada	14.0

Ranque et al., 1978.

1.5. Vectores

Las leishmaniasis son transmitidas por pequeños - mosquitos pilosos pertenecientes a la familia Psychotidae, distribuidos ampliamente en todo el mundo. Los insectos que transmiten las enfermedades se agrupan en los - siguientes géneros (Ranque, 1978, Dowlati, 1979, Bonfante et al., 1981, Carrada, 1984, Walton, 1985):

En el Viejo Mundo

Phlebotomus; algunas de sus especies transmiten - los parásitos tanto de la forma cutánea como la visceral.

Sergentomyia; involucrados solamente en la transmisión de la forma cutánea.

En el Nuevo Mundo

Lutzomyia o Psychodopygus; algunas de sus especies son transmisoras de los parásitos tanto de la forma cutánea como de la visceral.

Bruntomysia; asociado con el armadillo.

En México

Los vectores sospechosos de transmitir la - -

leishmaniasis se representan en el siguiente cuadro (según Lewis, tomado de Pulido, 1984):

Género y subgénero o grupo	Especie	Enfermedad
<u>Lutzomyia</u>		
(<u>Lytzomyia</u>)	<u>longipalpis</u>	LC y LV
(<u>Nysomyia</u>)	<u>ydephiletor</u>	LC
	<u>olmeca</u>	
(<u>Psychodopygus</u>)	<u>panamensis</u>	LC

Los vectores del complejo de L. mexicana, usualmente pertenecen al complejo Lutzomyia y en especial el grupo olmeca-flaviscutellata, mientras que, aquellos - del complejo de L. braziliensis son transmitidos por diferentes especies de Lutzomyia (Bonfante, 1983, Walton, 1985), y L. donovani chagasi por Lutzomyia longipalpis (Lainson et al., 1977).

También se ha demostrado que la enfermedad cutánea puede ser transmitida mecánicamente por la mosca de establo Stomoxys calcitrans (Lagerholm et al., 1968), - sin que haya transformación a la fase de promastigote -

como en su ciclo natural (Pulido, 1984).

Otras formas raras de transmisión pueden ser por: contacto sexual, transfusión sanguínea (Kager, 1984), - autoinoculación (Lagerholm et al., 1968, Dowlati, 1979) y transplacentaria (Dowlati, 1979).

1.6. Formas de la enfermedad

Las leishmaniasis son zoonosis causadas por el -- protozoario del género Leishmania (Mahmound y Warren, - 1977, Marinkelle, 1980). Cuando un hombre es infectado un espectro de condiciones clínicas y patológicas pueden ocurrir, variando de lesiones cutáneas localizadas_ o diseminadas, mucocutáneas o la forma generalizada de la LV (Chance, 1981). Los patrones clínicos y patológicos dependen de la especie infectante, susceptibili-- dad natural o resistencia y la competencia inmunológica del huésped (Ridley, 1979, Mauel y Behin, 1982).

1.6.1. Leishmaniasis cutánea simple. Las especies respon-- sables de la LC son los complejos de L. tropica y L. mexicana, distribuidos generalmente como del Viejo y - Nuevo Mundo respectivamente. Las características epide-- miológicas en las dos áreas geográficas son específicas, pero las características clínicas de ambas enfermedades son similares a pesar de que difieren básicamente en el período de incubación, período de latencia, predilec-- ción por un sitio particular de la piel y el tamaño de_ la lesión.

Leishmaniasis del Viejo Mundo: Leishmaniasis cutánea rural o zoonótica. El agente etiológico de esta enfermedad es L. major (L. tropica major) y se caracteriza por su distribución rural. La infección es seguida por un período de incubación de unas semanas con úlceras "húmedas" las cuales sanan por si mismas algunos meses más tarde. La linfangitis es común y los parásitos son difíciles de demostrar (Preston, 1973).

Leishmaniasis cutánea urbana o antrozoonótica: El agente etiológico es L. tropica (L. tropica minor) y -- tiene una distribución urbana. Característicamente las úlceras "secas" tienen un período de incubación de meses hasta un año o más, la enfermedad es de curso crónico, su patogenicidad es baja, la linfangitis no es común y las úlceras pueden pasar inadvertidas a pesar de que los parásitos son numerosos.

Ambos tipos "húmeda" y "seca" pueden coexistir -- en un paciente en la misma área geográfica (Farah y -- Malak, 1971).

Leishmaniasis cutánea del Nuevo Mundo. La enfermedad cutánea es causada por algunas especies de -- Leishmanias.

L. mexicana mexicana. La enfermedad causada por este parásito es llamada úlcera de los chicleros. La infección por esta especie se observa predominantemente en la piel; la infección en orejas tiende a la cronicidad y destrucción moderada. Las lesiones localizadas en otras partes del cuerpo sanan espontáneamente en -- unos pocos meses. El ataque a los linfáticos es raro y no hay manifestaciones mucosas (Convit y Kerdel, 1965, Walton, 1985).

L. mexicana amazonensis. La infección por esta especie causa lesiones únicas o en número limitado, rara vez ataca el tejido auditivo o la mucosa nasal. Se han registrado varios casos de LCD causada por este parásito (Lainson y Shaw, 1974, Bonfante, 1983).

L. mexicana pifanoi. La enfermedad producida por esta especie es la LCD, enfermedad que comienza como lesión única, por lo general papulosa o nodular, que puede propagarse alrededor o algo más lejos invadiendo -- grandes superficies de piel; no ataca el cuero cabelludo ni las vísceras y tampoco destruye el tabique nasal. Las lesiones no involucionan espontáneamente ni con tratamiento específico (Bonfante, 1983).

L. mexicana venezualensis. Este parásito causa lesiones cutáneas ulceradas o de tipo nodular (Bonfante, 1983).

L. braziliensis guyanensis. La infección en el hombre ocasiona una enfermedad exclusivamente cutánea llamada "pian bois". Las úlceras son únicas o múltiples y aparecen con más frecuencia en las extremidades. Las lesiones linfáticas son relativamente frecuentes -- (Arias et al., 1981, Lainson et al., 1981).

L. braziliensis panamensis. Las lesiones de la piel son algunas veces dolorosas y las úlceras son -- usualmente de tipo "húmedo". Las lesiones rara vez sanan espontáneamente, y pocas veces causa manifestaciones mucosas (Shaw y Lainson, 1972, Bonfante, 1983).

L. braziliensis peruviana. El parásito causa la leishmaniasis llamada uta. La enfermedad no ataca las mucosas y cura espontáneamente. La inmunidad ocasionada parece ser duradera (Bonfante, 1983).

L. braziliensis subespecies. Hasta el momento no se ha podido diferenciar de L. braziliensis brazilien--sis. Las L. braziliensis subespecies que infectan --

al hombre producen úlceras cutáneas únicas o múltiples_ y se localizan en cualquier parte del cuerpo incluso en los genitales; pueden propagarse por vía linfática y -- raramente dan metástasis nasofaríngea. Las que infec-- tan asnos producen lesiones destructivas ulceradas loca_ lizadas con mayor frecuencia en la piel del escroto, pe_ ne y flancos. Las que atacan perros tienen predilec- -- ción por la piel del escroto, mucosa nasal, vulva y ore_ jas (Bonfante et al., 1981, Bonfante, 1983).

La histopatología en todos los casos de LC simple es muy similar en que se desarrolla una histiocitoma en el sitio del piquete. En su fase temprana la lesión -- exhibe hipertrofia del estrato córneo con acumulación - de fagocitos mononucleares. En este tiempo pueden ob-- servarse amastigotes libres y dentro de macrófagos, gra_ dualmente pueden observarse un infiltrado celular de -- linfocitos y células plasmáticas alrededor de la lesión. De la ulceración le sigue la necrosis la cual resulta - en la desintegración de la epidermis, sin embargo, no - se observa en todos los casos (Andrade et al., 1984). En alguna etapa de la infección el histiocitoma es inva_ dido por linfocitos, el número de macrófagos parasita-- dos disminuye, los parásitos radicalmente eliminados y_

la curación es garantizada.

1.6.2. Leishmaniasis cutánea de etiología desconocida.

Tres formas de LC que no sanan por sí solas se sabe que ocurren:

Leishmaniasis (Lupoides) Crónica o Recidiva (LR),
Leishmaniasis Cutánea Diseminada (LCD) y
Leishmaniasis Cutánea Post-Kala-Azar (LCPKA).

Leishmaniasis Recidiva. Manifestación observada - cuando las lesiones causadas por L. major (Dowlati, -- 1979) y L. braziliensis panamensis (Walton, 1985) nunca sanan completamente o sanan y nuevas lesiones aparecen cerca de los bordes de la cicatriz propagándose gradualmente sin desarrollar metástasis. Histológicamente la lesión muestra una respuesta celular intensa la cual -- forma un granuloma de tipo tuberculoide, los parásitos están ausentes o son escasos, la presencia de células plasmáticas sugiere el diagnóstico (Bryceson, 1970, -- Ardehali et al., 1980, Walton, 1985).

Leishmaniasis Cutánea Diseminada. Esta condición resulta de la respuesta inadecuada a los parásitos del complejo de L. mexicana (Walton, 1985) y L. tropica --

(Farah y Malak, 1971, Preston, 1973). La historia, es de un nódulo primario no ulcerado o curado el cual disemina después de un tiempo variable de semanas a meses - con metástasis en otras partes de la piel. Histológicamente se demuestran macrófagos altamente parasitados, - amastigotes libres y una remarcable ausencia de linfocitos y células epitelioideas con algunas células plasmáticas. Esta forma generalizada de la enfermedad puede estar gobernada por un defecto inmunológico del huésped, sea genético o adquirido o puede ser una variante del parásito (Convit y Kerdel, 1965). Sin embargo, esto último ya ha sido descartado (Walton, 1985).

Leishmaniasis Cutánea Post-Kala-Azar. La enfermedad es una secuela de la LV que después de una aparente curación, parásitos residuales de un carácter viscerotrópico cambian al dermatropismo. Las lesiones no ulceradas no sanan por si mismas y pueden ser máculas despigmentadas o hipopigmentadas y máculas eritematosas. Las primeras están asociadas con una reacción granulomatosa y con pocos parásitos, el tipo eritematoso muestra marcada infiltración granulomatosa con numerosos parásitos. Las máculas en ambos tipos se observan en cualquier parte del cuerpo y pueden más tarde ser nodulares,

especialmente en la cara (Haldar et al., 1981, 1983).

1.6.3. Leishmaniasis Mucocutánea o Espundia. La enfermedad es debida a la infección de la piel y membranas mucosas de la boca y nariz por parásitos del complejo de L. braziliensis braziliensis en el Nuevo Mundo (Walton y Valverde, 1979) y recientemente, se han descrito lesiones similares en el Viejo Mundo donde L. tropica -- (mauel y Behin, 1982, Ravisse et al., 1984) y el complejo de L. donovani (Marinkelle, 1980) se cree son los responsables. La enfermedad ocurre en dos formas -- relativamente distintas: lesiones mucosas ulceradas y no ulceradas, aunque también se presentan lesiones de tipo mixto como resultado de la respuesta inmune particular. Las lesiones no sanan espontáneamente y empiezan como una úlcera simple, algunos años más tarde después de una aparente curación, pueden activarse y producir destrucción de las membranas mucosas, cartilago del septum nasal y velo del paladar con resultados desfigurantes severos. La evolución de la enfermedad es más -- bien complicada y ninguna característica histológica -- puede ser formulada.

1.6.4. Leishmaniasis Visceral o Kala-Azar. La LV es cau

sada por el complejo de L. donovani: L. donovani donovani en el Viejo Mundo y L. donovani chagasi en el Nuevo Mundo. El período de incubación varía de un mes a algunos años, el ataque es generalmente insidioso. El parásito, después de un tiempo variable en la piel se disemina e invade el syncytum reticular de casi todos los órganos internos pero principalmente el bazo, hígado, médula ósea, nódulos linfáticos e intestino. Los aspectos histopatológicos y clínicos son prácticamente los mismos en todo el mundo. Los cambios histológicos del bazo y nódulos linfáticos consisten en una marcada atrofia de la pulpa blanca y de las áreas paracorticales respectivamente. Debido a las diferencias epidemiológicas, características clínicas y respuesta al tratamiento, la enfermedad se ha definido en varios tipos (Laroche et al., 1978, Kager, 1984): a) Kala-Azar Indú; enfermedad en niños y adultos causada por L. donovani; el hombre es el reservorio. b) Kala-Azar Mediterráneo: enfermedad causada por L. donovani infantum especialmente en niños pero también en adultos. El Kala-Azar Americano semeja a este tipo. c) Kala-Azar Africano: enfermedad observada entre los jóvenes causada por L. donovani infantum; los reservorios son roedores y probablemente el hombre.

Las diferencias en las características clínicas y la respuesta al tratamiento entre los tres tipos son -- graduales. La diferencia en endémica, esporádica y epidémica puede ser más relevante (Kager, 1984).

a) LV endémica: afecta principalmente a los ni--ños; el ataque es gradual.

b) LV esporádica: afecta a personas no indígenas de cualquier edad que visiten áreas endémicas. Usual--mente el ataque es agudo, con fiebre alta y pérdida de peso. Entre las complicaciones raras tenemos: anemia_ hemolítica aguda, daño renal agudo y hemorragia mucosa.

c) LV epidémica: pueden ser afectadas todas las_ personas de cualquier edad que no hayan sido infectadas en una primera epidemia; el ataque es agudo y las com--plicaciones agudas son raras.

La LV no tratada o con tratamiento inapropiado -- tiene un promedio de mortalidad muy alto.

1.7. Relación huésped-parásito.

Respuesta inmune. La respuesta inmune a la infección por especies del género Leishmania, ha sido en -- años recientes, sujeta a un interés especial debido a las características particulares las cuales la separan del concepto clásico de protección inmune a través de -- la fagocitosis y la acción de anticuerpos (Ac). El -- principal si no el único sitio de desarrollo del amastigote es intracelular, de aquí que sea brevemente expuesto a los Ac, y la fagocitosis puede no representar un -- factor limitante (Walton, 1985). La respuesta inmune -- es extremadamente compleja y difícil de estudiar debido a la necesidad de diferenciar entre factores mediados -- por el huésped (Bradley, 1977) y por el parásito (Lodner et al., 1983) cuando ambos se manifiestan en un -- amplio espectro de variación (Ridley, 1980, Walton, -- 1985). Sin embargo, algunos aspectos de significancia -- clínica han sido elucidados (Bryceson, 1970, Preston, -- 1973), los cuales se mencionan en el Cuadro III.

La respuesta inmune a la infección por Leishmania es predominantemente mediada por células (Preston, -- 1973, Pearson et al., 1982, Murray et al., 1983). Sin

Cuadro III.- Leishmaniasis como un espectro de enfermedad.

Reacción	Forma	Histología	DTH	Ac
Normal	Úlcera primaria	L, P++	+	+
Estimulada	Mucocutánea	L, P+	+	++
	Recidiva	L, P+/-	+	+
	LCPKA	L/H, P+	+	+
Suprimida	LCD	H, P+++	-	++
	KA	H, P+++	-	+++

L = linfocitos; L/H = linfocitos o histiocitos; H = histiocitos; P = parásitos; Ac = anticuerpos; DTH = hipersensibilidad tipo retardada. (Bryceson, 1970, Preston, 1973).

embargo, se sugiere que esta puede ser modificada por factores humorales (Zuckerman, 1975, Lodner et al., 1983, Hoover et al., 1984, Mosser y Edelson, 1984). La respuesta inmune mediada por células (CMI), puede ser valorada in vitro por transformación linfoblástica e inhibición de la migración de macrófagos, e in vivo por exámenes intradérmicos, pero la asociación de estos parámetros con la inmunidad protectora aún es conjetural (Zuckerman, 1975). En contraste, muchas de las gamma globulinas producidas no son Ac específicos y no son protectivos (Araujo y Mayrink, 1968, Preston, 1973), pero son atribuidos a la actividad continua de síntesis del sistema linfoide hipertrofiado, estos productos pueden ser auto-Ac producidos en respuesta al daño celular (Mansueto et al., 1975, Zuckerman, 1975) y tienden a disminuir con la eliminación del parásito por la quimioterapia apropiada (Walton et al., 1972, Chiari et al., 1973a, Walton, 1985).

La LC es considerada una forma "polar" similar a la lepra (Bryceson, 1970), los polos están representados por la LCD con marcada anergia cutánea específica a los antígenos (Ag) leishmaniales en un extremo y en el otro la LR y la forma mutilante de la LMC, las cuales tienen exagerada hipersensibilidad a los Ag - -

leishmaniales. Sin embargo, este concepto ignora el -- papel del parásito, a pesar de que, es obvio que hay -- gran diferencia entre la respuesta producida por dife-- rentes especies y subespecies de parásitos (Shaw y -- Lainson, 1975, Walton, 1985). Los pacientes con LCD -- no son inmunológicamente incompetentes en el sentido -- usual, la anergia es específica a la leishmanina (exa-- men de Montenegro) y a otros Ag homólogos ya que, exis-- te una respuesta normal a los Ag heterólogos como la le promina y tuberculina. Esta anergia es mediada por una población de células supresoras específicas (Howard et al., 1980, Petersen et al., 1984), pero no se sabe si estas células son debidas a la constitución genética -- del huésped o a la forma de la presentación del Ag -- (Walton, 1985).

Al igual que en la LCD, en el KA también existe -- una anergia específica tanto in vivo como in vitro, en este caso no puede ser atribuida al reducido número de células-T circulantes, al efecto inhibitorio de los monocitos o a factores del suero (Carvalho et al., 1981, Haldar et al., 1983). En ambos casos el examen de Montenegro es positivo después de una quimioterapia apropiada (Haldar et al., 1983, Ho et al., 1983).

Modelos experimentales. Ciertas características en los patrones de las leishmaniasis humanas se han reproducido en varios modelos animales: cobayos (Bryceson, 1970, Preston y Dumonde, 1975) y hamsters (Wilson y Lollini, 1960). Sin embargo, en vista de que la respuesta inmune no es igual -especialmente la de hamster- a la del hombre, estos solo han servido más bien como tubos de ensayo vivientes que como modelos de enfermedad humana (Zuckerman, 1975). Recientemente, ciertas líneas singénicas de ratones han funcionado como modelos animales de control genético, en estos modelos se observan variaciones en la susceptibilidad a la infección dependiendo de la cepa de ratones, especie de Leishmania y el tamaño de inóculo (Bradley et al., 1979, Hadman et al., 1979, Perez et al., 1979, Olobo et al., 1980, Barral et al., 1983). En las cepas resistentes como C₅₇BL/6, C₃H, CBA, A, AKR, etc. (Perez et al., 1978, Hadman et al., 1979, Grimaldi et al., 1980, Mitchell et al., 1980) se producen pequeñas lesiones localizadas en la piel que sanan espontáneamente acompañadas por una respuesta moderada de Ac y una hipersensibilidad de tipo retardada (DTH) de larga duración (Hadman et al., 1979, Crocker et al., 1984). Las cepas relativamente susceptibles o intermedias como A₂G, B₁₀D₂,

DBA y otras (Hadman et al., 1979, Perez et al., 1979, - Howard et al., 1980, Perez, 1980), desarrollan lesiones que no sanan por si solas o muestran una susceptibili--dad progresiva al ir aumentando la dosis. De particu--lar interés es la alta susceptibilidad de la cepa BALB/c, la cual sufre una enfermedad letal aún a dosis muy -bajas de parásitos. En estos animales, la infección --produce altos niveles de Ac pero con mínima o sin DTH, atribuible a la generación de células-T supresoras -- (Howard et al., 1980, Leclerc et al., 1982), a la invasión masiva o producción de altos niveles de complejos Ag-Ac (Alexander y Phillips, 1979, Grimaldi et al., -- 1980.

Dos niveles de regulación están involucrados en - estas enfermedades: la relativa susceptibilidad innata_ de los macrófagos y el subsecuente desarrollo de la -- CMI. La susceptibilidad innata se ha estudiado mapeando los genes reguladores y el análisis del mecanismo -- donde su control es expresado.

La resistencia innata de ratones singénicos a L. donovani es controlada por un gen simple el Lsh, además de elementos genéticos secundarios (H-2, H-11, Ir-2).

El gen Lsh es segregado por alelos de resistencia dominante incompleta Lsh^R y susceptible recesivo Lsh^S mapeados en el cromosoma I (Bradley 1977, Bradley et al., -- 1979). En el caso de L. major el análisis genético es el menos estudiado, sin embargo, se sabe que está regulado por genes diferentes del bien conocido Lsh del cromosoma I (Howard et al., 1980, Blackwell et al., 1983). Esto sugiere que la ruta de administración y de aquí el sitio de multiplicación determinan cual mecanismo de -- control genético deberá funcionar (Howard et al., 1980, Blackwell et al., 1983).

Interacción macrófago-parásito. La relación esta influenciada por la resistencia innata ya descrita. El proceso de fagocitosis incluye una amplia variedad de - eventos, las células que participan en este son: fagocitos polimorfonucleares (granulocitos) y los fagocitos mononucleares (monocitos y macrófagos). Se sugiere que bajo ciertas condiciones los Ac citofílicos y opsonizantes influncian el enlace, subsecuente fagocitosis y re producción o destrucción intracelular. La lisis de los parásitos es atribuída a la presencia de Ac naturales - que se enlazan al parásito activando tanto la vía clásica como la alterna del completo (Hoover et al., 1984, -

Mosser y Edelson, 1984). Estas determinaciones muestran por lo menos dos mecanismos por los cuales los macrófagos reconocen a los promastigotes (Mosser y Edelson, 1984). Así, se demuestra que los promastigotes de L. donovani son por lo menos diez veces menos susceptibles que los de L. tropica al efecto citotóxico del suero (Hoover et al., 1984).

Por otro lado, los metabolitos oxidativos generados durante la fagocitosis son importantes en la destrucción de los parásitos. La etapa de promastigote muestra mayor sensibilidad al mecanismo oxidativo, debido a que está virtualmente desprovisto de catalasa y glutatión peroxidasa y es exquisitamente sensible al H_2O_2 (Haidaris y Bonventre, 1982, Pearson et al., 1982, Murray y Cartelli, 1983). El amastigote es relativamente sensible debido a que evade la estimulación del transporte respiratorio del fagocito, posee relativamente más cantidad de óxido-dismutasa y es más resistente al O_2^- (Murray, 1981, Murray y Cartelli, 1983).

Se ha demostrado que los productos de los linfocitos (linfocinas) estimulan a los macrófagos para desarrollar su actividad anti-amastigote y anti-promastigote tanto para matar como para inhibir su replicación.

El interfón (IFN)-~~3~~, parece ser la molécula responsable dentro de las linfocinas que mejoran o realzan el mecanismo antiprotozoario oxígeno-dependiente e independiente (Murray et al., 1983).

CAPITULO II2. OBJETIVOS

a) Determinar cuáles métodos se han empleado en los últimos 20 años para el diagnóstico de las leishmaniasis así como las ventajas y limitaciones de estos, comparándolas entre sí de acuerdo a su sensibilidad, especificidad, simplicidad y utilidad a nivel de campo.

b) Determinar los antígenos empleados en las diferentes técnicas de diagnóstico y estudios epidemiológicos de la leishmaniasis, para comparar sus ventajas en cuanto a su sensibilidad, especificidad y facilidad de su preparación.

c) Determinar la utilidad de los procedimientos diagnósticos empleados actualmente en México.

d) Establecer qué técnicas serían aplicables en México tanto para los estudios epidemiológicos como diagnósticos de las leishmaniasis basados en los puntos anteriores.

CAPITULO III

3. RESULTADOS

3.1. Leishmaniasis Cutánea Simple.

3.1.1. Diagnóstico clínico-epidemiológico. El antecedente epidemiológico del sitio de residencia del paciente, así como las características macroscópicas de las lesiones, sirven para integrar el diagnóstico presuntivo (Zavala, 1972). Los antecedentes de tuberculosis, enfermedad de Chagas, paludismo y algunas micosis, son con el fin de evaluar adecuadamente (falsos positivos por cruzamiento antigénico) los resultados en la identificación serológica (Andrade et al., 1984).

Histopatología. La histopatología, en todos los casos de LC simple es muy similar en que se desarrolla un histiocitoma en el sitio del piquete de un insecto infectado. En la fase temprana; hasta un año de duración (Kurban et al., 1966), la úlcera clásica es circular con bordes descoloridos, márgenes internos ásperamente recorridos e hipertrofia del estrato córneo y del papilar con acumulación de fagocitos mononucleares. En este tiempo,

pueden observarse numerosos parásitos dentro y fuera de los macrófagos. Gradualmente aparece un infiltrado constituido principalmente de linfocitos entre los cuales - muchas células plasmáticas son observadas alrededor de la lesión. En presencia del parásito el infiltrado predominante es el plasmocitario y cuando no se observa este, el infiltrado es linfocitario y/o granulomatoso. Las células plasmáticas son indicadoras de la presencia del parásito (Lagerholm et al., 1968, Ridley, 1979, - - 1980, Azogue, 1983). En la fase tardía; más de un año de duración (Kurban et al., 1966), es característica la formación de granulomas tipo tuberculoide, comprometiendo principalmente linfocitos, células plasmáticas, histiocitos y comparativamente pocos granulocitos segmentados y células gigantes (Lagerholm et al., 1968, Ridley, 1979, Grimaldi et al., 1980, Andrade et al., 1984).

Patología. La patología producida por diferentes especies tienen algunas características distintivas, -- pero el cuadro es complicado por un amplio espectro de reacciones del huésped a cualquier parásito dado. La lesión primaria puede tomar algunas formas imitando un amplio espectro de condiciones dermatológicas; las lesiones pueden ser ulceradas, vegetativas, verrugosas o

nodulares, con mucho la mayoría presentes como úlceras. Sin embargo, cualquier pápula, úlcera o lesión de la piel semejando placas, persistiendo por tres semanas o más, no dolorosas, sin comezón y sin respuesta a la terapia antibacteriana, son sospechosas (Farah y Malak, - 1971, Farah et al., 1975, Zavala, 1972, Price y Silver, 1977, Walton, 1985).

Algunas características de las úlceras sin tratar son consideradas suficientemente indicativas del diagnóstico, aún cuando el parásito no se observe (Ridley, 1980, Azogue, 1983). Las características las cuales las distinguen de otros tipos de lesiones de la piel son: inflamación crónica intensa de la papila dermal, hiperplasi pseudoepiteliomatosa, inflamación granulomatosa, especialmente cerca de las glándulas sudoríparas en la periferia de la lesión, granulación del tejido de pobre calidad en el cráter y más bien infiltración perivascular que cambios en los vasos sanguíneos (Walton, - 1985).

3.1.2. Diagnóstico directo. El diagnóstico definitivo se basa en la observación y/o aislamiento del parásito. Para la demostración directa de los parásitos se utili-

zan las técnicas de improntas y cortes histológicos, --
teñidos con diferentes métodos de coloración tomando co
mo base la de Giemsa (Chulay y Bryceson, 1983).

Biopsia. El diagnóstico por biopsia o improntas_
teñidas puede ser muy fácil o muy difícil. El número -
de parásitos está en proporción inversa a la duración -
de la lesión, estos son usualmente escasos excepto en -
lesiones nuevas en desarrollo y en cerradas más que en_
abiertas (Farah y Malak, 1971, Marsden, 1979), también_
son más numerosos en infecciones con L. mexicana que --
con L. braziliensis (Walton, 1985) y con L. tropica más
que con L. major (Dowlati, 1979).

Para la confirmación también se requiere la demog
tración histológica (Freman y Melo, 1984), además, que_
nos permite hacer un diagnóstico diferencial con otras_
neoplasias (Zavala, 1972, Walton, 1985). Por este méto
do pueden ser observados en los casos tempranos - -
(Dowlati, 1979, Azogue, 1983), pero no en los casos de
evolución prolongada (Zavala, 1972, Andrade et al., --
1984).

Cultivo. El método más simple y eficaz de diag--

nóstico es el cultivo de biopsias o improntas de lesiones (Walton, 1985). Como no todas las especies de leishmanias tienen los mismos requerimientos nutricionales, más de un medio de cultivo deberá ser empleado para el aislamiento del parásito, para tal efecto comúnmente se emplean medios como NNN, RPMI-1640, Schneider entre otros, los cuales son descartados después de tres semanas (Farah y Malak, 1971, Price y Silvers, 1977, Hendricks y Wright, 1979). Comparando la sensibilidad del medio NNN con el de Schneider, este último mostró una sensibilidad de 67% en un promedio de 6 días contra una sensibilidad de 14% y un promedio de 11.6 días del medio NNN (Hendricks y Wright, 1979). En algunos casos los promastigotes fueron detectados a las 18 horas después de inocular el medio de Schneider, además de que no necesita muestreo al igual que el medio RPMI-1640 para su observación, puesto que puede hacerse con microscopio invertido en botellas de plástico estériles y así evitar contaminación por muestreo (Childs et al., 1978, Hendricks y Wright, 1979).

Aislamiento en animales de laboratorio. Alternativamente el aspirado de una lesión o la biopsia de tejido, pueden ser inoculados en hamsters, en líneas de -

ratones susceptibles como los BALB/c o en animales parcialmente inmunosuprimidos (Naseri y Modabber, 1979, -- Cuba Cuba et al., 1980, 1981). Sin embargo, cuando se analiza el papel de los roedores en el diagnóstico de la leishmaniasis, parecería que todavía no se dispone de un animal lo bastante susceptible como para que nos permita aislar en forma eficaz las diversas especies y subespecies del protozoario (Coelho y Coutinho, 1965, - Cuba Cuba et al., 1980). Por otro lado, se ha demostrado la gran susceptibilidad del hamster y ratón blanco a las cepas mexicanas de Leishmania (Davalos et al., - - 1968).

3.1.3. Métodos de diagnóstico inmunológicos. Las evidencias indirectas de infección leishmanial son proporcionadas por los exámenes serológicos y celulares. Sin embargo, puesto que los Ac y la positividad del examen intradérmico pueden ser de larga duración (Farah y Malak, 1971, Manson, 1971, Pampiglione et al., 1976, Menzel y Bienzel, 1978), los exámenes positivos no siempre están relacionados a una infección activa.

En la LC simple, los títulos de Ac son muy bajos o insignificantes (Bray y Lainson, 1967, Troung et al.,

1969, Ranque y Quilici, 1970, Zuckerman, 1975) y sólo se incrementan cuando están involucrados los linfáticos (Quilici et al., 1968, Ranque y Quilici, 1970). Sin embargo, factores como especie infectante, duración de la infección, tipo y tamaño de la lesión y la constitución genética del huésped también pueden afectar el título de Ac, lo que justifica análisis futuros (Pappas et al., 1983a).

Anticuerpos fluorescentes indirectos (IFAT). En la LC simple el examen de IFAT es el más apropiado y la reacción es más bien de grupo que específica de especie, para tal efecto se ha empleado como Ag, promastigotes y amastigotes de Leishmania, así como Leptomonas, Strigomonas y Trypanosoma (Fife, 1971, Zuckerman, 1975). A pesar de las similitudes antigénicas entre Leishmanias, se demuestra que dependiendo de la elección de la especie y etapa del parásito se obtienen diferencias en cuanto a sensibilidad y especificidad (Antony et al., 1980, Badaro et al., 1983). Cuando se emplea la fase de promastigote ocurren reacciones cruzadas con enfermedad de Chagas, tuberculosis pulmonar, malaria, tifo, larva migrans, lupus eritematoso y amibiasis (Camargo y Rebonato, 1969, Matossian et al., 1975, Edrissian y Darabian, - -

1979). Estas reacciones son eliminadas usando el amastigote como Ag (Walton et al., 1972, Childs et al., 1976, Shaw y Lainson, 1977), además de que es sumamente preciso (Cuba Cuba et al., 1980) y flouorece más intensamente que el promastigote (Badaro et al., 1983). Recientemente se demostró que la fase de promastigote es tan sensible y específica que cuando se emplean amastigotes (Pappas et al., 1983a), además de que la reacción es más fácil de interpretar (Guimaraes et al., 1974). Otra forma de eliminar las reacciones cruzadas, especialmente con tripanosomiasis y obtener resultados específicos es absorbiendo el suero con el Ag heterólogo -- (Camargo y Rebonato, 1969). El título de Ac fluorescentes es dado de acuerdo a la estandarización del método a determinado Ag y un título \geq de 1:8 (Anthony et al., 1980, Pappas et al., 1983a) o \geq de 1:16 (Edrissian y Darabian, 1979, Wyler et al., 1979, Camisa et al., 1985) o según la fluorescencia a una dilución simple, de 1+ a 4+ (Bittencourt et al., 1968) son considerados de valor diagnóstico.

Según numerosos autores el IFAT tiene una sensibilidad de 75 a 85%, especificidad de 95 a 100% y una reproducibilidad de 99 a 100% dependiendo del Ag (Camargo

y Rebonato, 1969, Walton et al., 1972, Guimaraes et al., 1974, Edrissian y Darabian, 1979, Badaro et al., 1983, Pappas et al., 1983a).

ELISA. Aunque todavía no se valora adecuadamente la utilidad clínico-epidemiológica del método en la LC, las primeras impresiones son favorables. Cuando se emplea el promastigote como Ag el examen es tan sensible y específico como IFAT-amastigote, el examen de ELISA - amastigote resulta muy insensible comparado al de ELISA promastigote (Anthony et al., 1980). Por este método se observan reacciones cruzadas a bajas diluciones con tuberculosis, toxoplasmosis, malaria y algunos controles sanos especialmente africanos, las reacciones a altas diluciones son con tripanosomiasis y lepra lepromatosa (Anthony et al., 1980, Roffi et al., 1980, Andrade et al., 1984). Los resultados positivos por este método -- van de 72 a 97% (Roffi et al., 1980, Andrade et al., -- 1984), tomando como valor diagnóstico una dilución \geq de 1:10 (Anthony et al., 1980) o a una absorbancia \geq de 0.40 (Edrissian y Darabian, 1979).

Aglutinación Directa. Debido a la simplicidad y especificidad de la AD comparable a IFAT, la técnica es

útil en el diagnóstico de LC (Allain y Kagan, 1975, -- Walton, 1985) aunque, las reacciones cruzadas con otras enfermedades no se hayan valorado adecuadamente (Pappas_ et al., 1983a). El Ag comúnmente empleado es el promastigote, quedando por evaluar el amastigote (Walton, -- 1980). A pesar de que, el examen es específico de grupo, se observan diferencias antigénicas a diferentes especies de Leishmania (Bray y Lainson, 1967, Allain y -- Kagan, 1975). El examen de AD detecta IgM y por tanto es más sensible en casos agudos que en crónicos. Los resultados positivos son de 54 a 81% con 1 a 2% de falsos positivos (Allain y Kagan, 1975) dependiendo del -- Ag.

Fijación de Complemento. La FC no es apropiada para fines diagnósticos, puesto que el título de Ac es variable y generalmente bajo (Ranque et al., 1975, -- Menzel y Bienzel, 1979), aún en los casos con marcada reacción ganglionar (Quilici et al., 1968, Troung et al., 1969, Mansueto et al., 1975). En este método se -- han empleado Ag homólogos y heterólogos de especie, los Ag heterólogos son preparados de Strigomonas, Trypanosomas, BCG y otros bacilos alcohol ácido resistentes (Quilici et al., 1968, Troung et al., 1969, Ranque et al.,

1975), pero los resultados positivos no van más allá de 40% (Menzel y Bienzel, 1978) tomando una dilución $\geq 1:4$ con valor diagnóstico.

Otros Métodos. Un método que ha demostrado Ac - específicos pero que no ha sido evaluado en estudios -- clínico-epidemiológicos es el Radioinmunoensayo (RIA). Este se emplea para medir Ac anti-Factor Excretor (Ac-EF) a nivel experimental en animales infectados, pero - el título es muy bajo para ser de valor diagnóstico. La alta sensibilidad para detectar mínimas cantidades de - EF, lo pueden hacer útil para detectarlo en suero y así tener valor diagnóstico en LC (El On et al., 1983). El xenodiagnóstico se emplea para demostrar infección en - animales reservorios, para tal efecto se usan insectos_ criados en el laboratorio que se ponen en contacto con_ el animal. Por este método se reportan los primeros ca sos positivos (Christensen y Herrero, 1972).

3.1.4. Examen celular. Una forma de evaluar la CMI in vitro es por la Transformación linfoblástica e Inhibición de la migración de macrófagos, e in vivo por la -- intradermorreacción (IDR de Montenegro).

Transformación linfoblástica. El Ag leishmanial

induce la transformación blástica de linfocitos de sangre periférica de los pacientes tanto de los IFAT negativos como de los positivos (Wyler et al., 1979), pero no de los controles sanos (Tremonti y Walton, 1970) lo cual lo hace útil para el diagnóstico diferencial - - (Witztum et al., 1978, Green et al., 1983).

Inhibición de la migración de macrófagos. El Ag leishmanial también inhibe la migración de macrófagos - (Blewett et al., 1971) siendo el Ag insoluble el de mejores resultados (Zeledon et al., 1976). Cuando se emplea el EF, el marcado efecto inhibitorio observado es mayor en la población de células adherentes (principalmente monocitos) que en las no adherentes (principalmente linfocitos) (Lodner et al., 1983).

Intradermorreacción (IDR). El examen intradérmico a la leishmanina es un examen cutáneo análogo a la tuberculina o lepromina expresando DTH. El examen es sensible pero no específico (Fife, 1971) y varias cepas de Leishmania se emplean como Ag (Southgate, 1967, Cahil, 1970, Shaw y Lainson, 1974, Neal y Miles, 1976) además de Ag heterólogo preparados de Trypanosomas, Crithidias

y leptomonas (Zeledon y Ponce, 1974, Shaw y Lainson, - 1975, 1976, Fuller et al., 1980). Un resultado positivo puede ser debido a infección activa, subclínica o a la inoculación con cepas de leishmanias no patógenas de mamíferos o de lagartijas; L. enrietti y L. adleri respectivamente (Southgate, 1967, Southgate y Manson-B, - 1967, Imperato et al., 1973), manteniéndose el estado - inmunológico por muchos años (Pampiglione et al., 1976) o tal vez toda la vida (Farah y Malak, 1971, Pampiglione et al., 1976). Los individuos con lesiones múltiples - dan reacción más marcada (Lynch et al., 1982) y se observa una clara asociación con el sexo (hombres más que mujeres) y la edad (adultos más que niños) (Abdalla et al., 1973, Pampiglione et al., 1975, 1976).

La concentración más apropiada es de por lo menos 1×10^6 promastigotes/ml (Pampiglione et al., 1975) o de 30 μg de N proteico/ml (Shaw y Lainson, 1972, Furtado, - 1973, Melo et al., 1977). La interpretación se hace después de 48-72 horas y los resultados registrados como - grados de positividad, +(5-6 mm), ++(6-8 mm), +++(8 mm) y ++++(con ampolla).

La IDR a la leishmanina tiene una sensibilidad -- de 80 a 100% (Walton, 1985), con una incidencia de falsos positivos en individuos aparentemente sanos de 1.5_ (Southgate y Oriedo, 1967) a 6.3% (Shaw y Lainson, - - 1975), pero tales reacciones no han sido asociadas con_ otras infecciones. También ocurren reacciones falsas - positivas con la solución control (0.1 ml de fenol al - 0.5% en salina) hasta en 4.7% (Imperato y Diakite, - - 1969).

Otras modalidades de la IDR es la reacción retardada de Rotberg la cual considera para propósitos diagnósticos una concentración de 1×10^7 promastigotes/ml y su interpretación de 5 a 8 días más tarde (Furtado, -- 1973). También se emplean Ag parcialmente purificados_ (polisacáridos) o Ag soluble crudo, que son ajustados a la concentración del Ag de Rotberg, eliminando así las_ reacciones de tipo tardío, dando resultados similares - hasta de 96% o más de positividad (Furtado, 1973, Zeledon et al., 1976).

Recientemente, se ha demostrado una reacción inmediata tipo liberación de histamina a Ag leishmaniales - que ocurre en una alta proporción de pacientes con LC -

activa. La reacción es producida por productos metabólicos o fracciones solubles de promastigotes de Leishmania o epimastigotes de Trypanosoma (Shaw y Lainson, 1974, 1975, 1976, Zeledon et al., 1976). En el Cuadro IV se mencionan los tipos de reacción que pueden ser provocados por estos Ag en los casos de LC, según Shaw y Lainson, 1974, 1975, 1976.

3.1.5. Diagnóstico diferencial. Úlcera tropical fagadénica, úlceras varicosas, esporotricosis, cromoblastomycosis, paracoccidiomycosis, lesiones iniciales de sifilís, miasis (*Dermatobia hominis*), aracnoidismo, amibiasis cutánea, impetigo, lepra, carcinoma de célula basa, paricondritis del pabellón auricular, tuberculosis cutánea, etc. (Zavala, 1972, Alsina, 1982, Azogue, 1983).

Cuadro IV.- Respuesta intradérmica a antígenos
Leishmaniales y Trypanosomiales.

Tipo de antígeno	Tipo de hipersensibilidad	
	Anafiláctica inmediata	Retardada
Leishmanina	-	+
Tripanosomina	-	+
LIEX (exo-antígeno Leishmanial)	+	+
TIEX (exo-antígeno tripanosomal)	+	-
LIEX 1:2	+	+
LIEX 1:2 (fenol)	-	+

Shaw y Lainson, 1974, 1975 y 1976, Zeledon et al., 1976.

3.2. Leishmaniasis Cutánea Diseminada (LCD)

3.2.1. Manifestaciones clínico-patológicas.

Inmunopatología. La LCD, también conocida como Leishmaniasis anérgica hansenoide debido a la semejanza clínica con la lepra lepromatosa, es una forma rara que se desarrolla solamente en pacientes que no producen -- una CMI adecuada (Bryceson, 1970, Preston, 1973, -- Zuckerman, 1975).

Histopatología. La LCD puede distinguirse histológicamente de la lepra lepromatosa por la formación de granuloma organizado o no, que en la LCD no es una característica común (Bryceson, 1969, Ridley, 1979). El examen histológico demuestra que el infiltrado inflamatorio está constituido casi exclusivamente por numerosos histiocitos vacuolados con abundantes parásitos, células epitelioides y linfocitos ausentes o escasos -- (Ridley, 1979, 1980) aunque, las células plasmáticas -- usualmente están presente (Bryceson, 1969).

Patología. Las primeras lesiones en la LCD son -- papulares y tienden a formar placas, esta etapa es se--

guida por erupciones a distancia que se incrementan gradualmente en número y tamaño sobre todo el cuerpo (Convit y Kerdel, 1965, Bryceson, 1969) especialmente en las protuberancias óseas de la cara y miembros, sin afectar las palmas de las manos, órganos internos ni membranas mucosas (Farah y Malak, 1971, Furtado, 1973, Dowlati, -- 1979), aunque se presentan casos con perforación del septum nasal pero no de la cavidad orofaríngea (Convit y Kerdel, 1965, Shaw y Lainson, 1981). Las lesiones no ulceran y es común una ligera despigmentación de las áreas infectadas. Una característica interesante es la marcada variabilidad de las lesiones que crecen y decrecen es pontáneamente sin causa aparente (Walton, 1985). La enfermedad progresa lentamente persistiendo por algunos -- años a pesar del tratamiento, sin que se afecte la salud general (Newman y Pomerantz, 1968, Simpson et al., 1968).

3.2.2. Examen directo. El diagnóstico definitivo se basa en la observación directa del parásito, puesto que la gran cantidad de Leishmanias en el frotis teñido con -- Giemsa o Wright es una característica muy notable (Convit y Kerdel, 1965) aún en los casos crónicos (Walton, 1985).

Biopsia. El examen de biopsias, improntas o cor--

tes histológicos muestra numerosos parásitos intra y extracelularmente tanto en piel normal como en la aparentemente normal; particularmente en áreas despigmentadas, placas y nódulos. A pesar de la variabilidad de las lesiones el número de parásitos no cambia, aún en casos crónicos de muchos años (Bryceson, 1969, 1970, Walton, 1985).

Cultivo. El parásito puede ser cultivado en el medio NNN, Davis, RPMI-1640, etc. de inoculos obtenidos por aspiración o de biopsias pero no de sangre periférica (Convit y Kerdel, 1965, Simpson et al., 1968).

Inoculación de animales. Alternativamente las muestras pueden ser inoculadas en hamsters y ratón blanco con resultados positivos solamente cuando la inoculación es intracutánea (Convit y Kerdel, 1965).

3.2.3. Exámenes indirectos.

Serológicos. No obstante que los títulos de Ac en la LCD son apreciablemente más bajos que en la infección simple (Bryceson, 1970, Zuckerman, 1975), en México se han demostrado altos niveles de Ac (Lebrija comu-

nicación personal). Esta presencia de Ac específicos - rechaza la hipótesis de "parálisis inmunológica" propuesta por Adler en 1964 a la "incapacidad de producir Ac específicos" de Convit y Kerdel en 1965.

IFAT. El suero de pacientes con LCD contiene Ac específicos y son demostrados por IFAT tanto con Ag homólogo como con heterólogo (Bittencourt et al., 1968, -- Behforous et al., 1976). La fase de amastigote da mejores resultados y los títulos son apreciablemente más altos con el Ag homólogo que con L. donovani chagasi - - (Shaw y Lainson, 1981). Empleando anti-IgG mono-específica se encuentra hasta 100% de positividad, a un título $\geq 1:10$, siendo negativos para la IgA con el Ac mono específico. Las reacciones cruzadas son principalmente con enfermedad de Chagas, KA y lupus eritematoso - - (Bittencourt et al., 1968, Shaw y Lainson, 1977, 1981).

Reacciones de precipitación. Los Ac específicos también son demostrados por medio de la Difusión en gel (ID) hasta en 60% de los casos resultando mejor el Ag - heterólogo L. braziliensis braziliensis (Chávez, 1970).

Métodos celulares. Los pacientes con LCD mues- -

tran marcada anergia tanto in vivo como in vitro - -
(Petersen et al., 1984). La anergia específica es de-
mostrada por la IDR a los Ag homólogos (Convit y Kerdel,
1965, Zuckerman, 1975), aunque algunos muestran reacción
anafiláctica débil (Furtado, 1973, Shaw y Lainson, 1975).
Solamente después de la curación el examen es positivo_
(Bryceson, 1970, Manson, 1971, Zuckerman, 1975).

3.2.4. Diagnóstico diferencial.

Lepra lepromatosa y Sarcoma de Boeck (Walton, - -
1985).

3.3. Leishmaniasis Cutánea Post-Kala-Azar (LCPKA)

3.3.1. Inmunopatología. En algunos casos los parásitos de la LV no son completamente erradicados después del tratamiento, y focos dermales secundarios de macrófagos infectados desarrollan una condición conocida como LCPKA (Zuckerman, 1975), aunque también ocurre sin haberse manifestado la enfermedad sistémica (Haldar et al., 1983). Las lesiones aparecen usualmente de uno a dos años después de una aparente curación y pueden durar un período prolongado (Bryceson, 1970, Zuckerman, 1975); los casos crónicos hasta por 30 años (Haldar et al., 1983). Así, el carácter viscerotrópico de L. donovani parece cambiar al dermatropismo, posiblemente debido al estado inmune alterado del huésped.

Patología. La LCPKA en el hombre se caracteriza por la aparición de lesiones no ulceradas de la piel que no sanan espontáneamente y pueden ser máculas des-- pigmentadas o hipopigmentadas y máculas de tipo eritema-- toso (Kager, 1984). Las máculas se observan en cualquier parte del cuerpo y pueden más tarde nodular especialmente en la cara (Madero et al., 1982, Kager, 1984)

Histología. El cuadro histológico en la LCPKA -

muestra abundante infiltrado inflamatorio con tendencia granulomatosa, constituido principalmente por histiocitos y números variables de linfocitos, células plasmáticas y algunas células gigantes (Furtado, 1973, Haldar et al., 1981, Kager, 1984).

3.3.2. Exámenes directos. El diagnóstico verdadero como en todos los casos de leishmaniasis es la demostración directa del agente causal. En el caso de la LCPKA los resultados dependen del tipo de máculas. Así, en el tipo eritematoso, los parásitos son abundantes y fáciles de demostrar, no así en el tipo hipopigmentado donde -- los parásitos son escasos y difíciles de demostrar -- (Haldar et al., 1981, Madero et al., 1982).

3.3.3. Exámenes indirectos.

Examen serológico. Muy poco se sabe acerca de la respuesta humoral en la LCPKA. Sin embargo, Ac específicos y no específicos son detectados, aunque su papel protector aún no se ha determinado (Preston y Dumonde, 1976). Ac anti-Leishmania se detectan en los casos recientes y crónicos de la enfermedad. Por medio de la Inhibición de la Hemoaglutinación (IHA), los títulos de

Ac son significativamente más altos en los primeros que en los casos crónicos, tales discrepancias no se observan por medio de ELISA, lo que demuestra que la respuesta serológica en ambos casos es diferente (Haldar et al., 1983). Tomando un título $\geq 1:200$ para ELISA y $\geq 1:64$ para IHA, ELISA es más sensible y específica que IHA en proporción de 95% contra 60% tomando ambos casos (recientes y crónicos). Esto no es igual si se toma en cuenta solo los casos recientes, donde ambos exámenes demuestran la misma sensibilidad y especificidad (Ghose et al., 1980, Haldar et al., 1981, 1983) de 100%.

Por medio de IFAT con Ag heterólogo (Crithidia) también se obtienen resultados positivos a títulos $\geq 1:80$, aún en los casos donde el examen parasitológico es negativo (Madero et al., 1982).

Examen celular. La respuesta en los pacientes -- con LCPKA es muy variable a los exámenes de CMI, tanto in vivo como in vitro. Usualmente los casos recientes exhiben mejor CMI que los casos crónicos (Haldar et al., 1981). La protección por CMI, puede no ser absoluta y probablemente dependa de otros factores relacionados al huésped, esto sugiere algunas variaciones con

respecto a la susceptibilidad, patogénesis y subsecuente recobro (Haldar et al., 1981, 1983).

3.3.4. Diagnóstico diferencial. El diagnóstico diferencial deberá hacerse con distintas entidades según sea el tipo de lesión (Madero et al., 1982).

Máculas hipopigmentadas: Ptiriasis versicolor -- (variedad acrómica, lepra lepromatosa, ptiriasis alba, esclerosis tuberosa, etc.

Máculas eritematosas: Erupciones por drogas, lupus eritematoso, lepra tuberculoide, etc.

Nódulos: Lepra, lesiones nodulares de la sarcoidosis, neurofibromatosis, adenoma sebáceo, xantoma tuberoso, etc.

3.4. Leishmaniasis (Lupide) Crónica o Recidiva (LR)

3.4.1. Inmunopatología. El estado lupoides se desarrolla en algunos casos en los cuales se adquirió la LC, por lo que se asume que, el estado es una expresión de la respuesta inmune del huésped más bien que de la cepa (Azadeh et al., 1985). La enfermedad es de evolución prolongada, encontrando casos hasta de 20 años o más (Asadeh, 1985).

Patología. La historia es de una lesión cutánea simple que nunca sana completamente o sana y relapsa (Bryceson, 1970). La metástasis no ocurre y la lesión de tipo nodular es indolente extendiendo continuamente sus límites; eventualmente el daño dermal puede ser extenso debido a la continua ulceración y cicatrización (Bryceson, 1970, Zuckerman, 1975).

Histología. Histológicamente la lesión muestra una respuesta celular intensa con cambios dermales variables. La biopsia de piel muestra granulomas epiteloides; que es la característica principal de la LR (Asadeh et al., 1985), junto con infiltración linfocítica con o sin células gigantes, sin caseación ni necro-

sis pero con la presencia de números insignificantes de células plasmáticas, que pueden sugerir el diagnóstico_ (Bryceson, 1969, 1970, Asadeh, 1985, Asadeh et al., -- 1985).

3.4.2. Examen directo. En la LR los parásitos son escasos o están ausentes (Bryceson 1970, Asadeh 1985) así que, las biopsias para cultivo y para su observación directa rara vez son positivas, no teniendo utilidad diagnóstica (Ardehali et al., 1980, Asadeh, 1985).

3.4.3. Examen indirecto.

Serológicos. Por el examen de IFAT el título de Ac específicos en LR es negativo (Matossian et al., -- 1975) o es muy bajo, similar al título reportado en los casos agudos de LC simple (Behforous et al., 1976, -- Ardehali et al., 1980). Resultados similares se obtienen por medio de la Aglutinación Directa (AD) (Ardehali et al., 1980). El título diagnóstico para IFAT es $\geq 1:32$ (Ardehali et al., 1980) o $\geq 1:100$ (Matossian et al., 1975) y para la AD $\geq 1:32$ (Ardehali et al., 1980). Por estos métodos no hay correlación entre el título de

Ac y la duración de la enfermedad o número de lesiones (Bryceson, 1970, Behforous et al., 1976, Ardehali et al., 1980).

Celulares. Para medir ambas respuestas; humoral y celular la IDR es de gran valor. En los casos lupoides la respuesta de DTH es muy marcada a los Ag - - leishmaniales, probablemente como resultado de una pobre respuesta humoral y celular, evidenciada por los bajos títulos de Ac y números insignificantes de células plasmáticas (Asadeh et al., 1985). La reacción de DTH ocurre en 100% de los casos (Zuckerman, 1975, Ardehali et al., 1980, Asadeh et al., 1985) y algunos con reacción tipo Arthus (Bryceson, 1970, Shaw y Lainson, 1975).

3.4.4. Diagnóstico diferencial. La ausencia de caseación y bacilos alcohol ácido resistentes no es una prueba definitiva contra la posibilidad de lupus vulgaris. El diagnóstico correcto depende del reconocimiento de las lesiones, examen cutáneo y serología así como también la ausencia de la evidencia clínica y radiológica de tuberculosis (Azadeh, 1985, Azadeh et al., 1985).

3.5. Leishmaniasis Mucocutánea (LMC) o Espundia.

3.5.1. Manifestaciones clínicas. La característica principal la cual distinguen a L. braziliensis de otras especies causantes de infección en el hombre es su propiedad de manifestar una etapa secundaria en la cual la -- metástasis difunde a la mucosa nasal, bucal y faríngea, que puede resultar en la destrucción de estos tejidos y cartílagos asociados (Walton y Valverde, 1979), sin -- afectar la salud general. Estas lesiones pueden ocu -- rrir de meses a años después de la aparente curación de la lesión inicial (Walton y Valverde, 1979, Ravisse et al., 1984).

Patología. La espundia se presenta en dos formas relativamente distintas; lesiones mucosas ulceradas y -- no ulceradas, aunque pueden presentarse lesiones de tipo mixto probablemente como resultado de la respuesta -- inmune particular (Walton y Valverde, 1979, Walton, -- 1985). En el tipo ulcerativo se produce mutilación excesiva por destrucción del tejido blando, causada por -- la hipersensibilidad aguda, complejos inmunes y autoant -- icuerpos (Desjeux et al., 1980, Ridley et al., 1980), y la destrucción del cartílago por el parásito. La en --

fermedad de tipo no ulcerativo presenta hipertrofia y edema local principalmente del labio superior (Walton, 1985).

Ambos tipos afectan tanto el tejido blando como el duro y las lesiones no están limitadas a las membranas, una característica común son las perforaciones del septum anterior (Sirol et al., 1978, Ravisse et al., 1984), en raras ocasiones existe invasión ocular siendo la córnea y conjuntiva parpebral los tejidos más afectados (Roinzenblatt, 1979).

Histología. La evolución de la enfermedad es más bien compleja y ninguna característica histológica simple es diagnóstica (Marsden, 1979). Esto es válido si se considera desde el punto de vista de la taxonomía -- del parásito, inmunogénesis de la enfermedad, curso clínico, pronóstico y variación geográfica (Lainson y Shaw, 1979), por lo que es necesario estudiar el problema en una localidad dada y en pacientes individuales (Ridley, 1980, Ridley et al., 1980). Sin embargo, hay algunas características histológicas tanto en presencia como en ausencia del parásito: en ausencia del parásito el infiltrado inflamatorio es linfocitario y/o granulomatoso,

organizado o no, con algunas células epitelioides o células gigantes. En presencia del parásito el infiltrado se modifica siendo de carácter histio-plasmocitario con algunos granulomas de células epitelioides y gigantes - con necrosis (Milosev et al., 1969, Azogue, 1983). En ambos hemisferios se observan características especiales en cuanto al tipo de respuesta celular, fibroide o mixta (Ridley, 1980).

3.5.2. Examen directo.

Biopsia. En general se acepta que en lesiones recientes los parásitos son abundantes (Cuba Cuba et al., 1980, 1981), así, en los casos no ulcerados el diagnóstico es posible por frotis directo (Milosev et al., 1969). Sin embargo, en muchos casos de evolución prolongada el hallazgo resulta difícil y un diagnóstico rápido es difícil o imposible (Milosev et al., 1969, Abdalla et al., 1975, Sirol et al., 1978, Walton, 1985).

Cultivo. Cuando el examen directo es negativo, el material de biopsia puede ser cultivado, obteniendo resultados positivos en un bajo porcentaje, alrededor de la tercera semana (Mahmound y Warren, 1977, Marsden,

1979). Puesto que, L. braziliensis braziliensis se desarrolla pobremente en los medios de cultivo (Walton -- et al. 1972), se demostró que los parásitos de pacientes aislados y mantenidos en cultivo por algunos meses, no mostraron signos de leishmaniasis, mientras que la mayoría de los pacientes de los cuales el parásito aislado murió dentro de las tres semanas siguientes en cultivo, sufrieron más tarde de espondia nasofaríngea -- (Marinkelle, 1981).

Inoculación de animales. A pesar de que aún no -- se dispone de un animal lo bastante susceptible para -- aislar en forma eficaz el protozoario, el hamster es el único animal que en la actualidad se emplea para tales propósitos, obteniendo un bajo porcentaje de infección con los casos comprobados parasitológicamente (Cuba Cuba et al., 1980, 1981). En el caso de lesiones ulceradas el diagnóstico solo es posible por este método -- (Milosev et al., 1969). Los resultados positivos se obtienen de 3 a 5 meses (Milosev et al., 1969) o de 6 meses a un año (Cuba Cuba et al., 1980), lo que retrasa -- considerablemente el diagnóstico (Marsden, 1979).

3.5.3. Examen indirecto.

Serológicos. En los pacientes donde la enfermedad es estrictamente cutánea y de corta duración no se detectan Ac específicos (Chiari et al., 1973a, 1973b), solo son demostrados cuando ocurre la metástasis.

IFAT. El examen de Ac fluorescentes es el método más apropiado (Walton, 1985) y es más bien específico de género que de especie (Zuckerman, 1975). La especificidad de IFAT depende de la fuente del Ag (Anthony et al., 1980). Cuando se emplea la fase de promastigote ocurren reacciones cruzadas con suero de enfermedades de especies relacionadas (Bitencourt et al., 1968, Zuckerman, 1975) y no relacionadas tales como lepra lepromatosa, enfermedad de Chagas y blastomycosis entre otras (Camargo y Rebonato, 1969, Furtado, 1973, Guimaraes et al., 1974). Estas reacciones pueden ser eliminadas empleando la fase de amastigote (Walton, 1970, Childs et al., 1976, Walton et al., 1980), además de que es sumamente preciso y detecta con mayor precocidad y eficacia los Ac, aún a títulos bajos (Shaw y Lainson, 1977, Cuba Cuba et al., 1980). Recientemente, se ha demostrado que el promastigote es claramente tan sensible,

especifico y reproducible que cuando se emplean amastigotes como Ag (Pappas et al., 1973a), además de que la reacción es más fácil de interpretar (Guimaraes et al., 1974). La reacción es considerada positiva cuando más del 50% del organismo muestra fluorescencia (Pappas et al., 1983a).

Se ha demostrado que en la espondia, el título de Ac fluorescentes es más alto en el Viejo que en el Nuevo Mundo (Abdalla, 1977), con títulos hasta de 1:6400 y 1:1440 respectivamente (Chiari et al., 1973a, Abdalla, 1977), en caso de lesiones múltiples que en simples - - (Chiari et al., 1973b, Pappas et al., 1983a) y son aun más marcados cuando están involucradas las mucosas - - (Chiari et al., 1973a, Cuba Cuba et al., 1980).

Los resultados positivos en casos comprobados parasitológicamente varían de 86 (Walton et al., 1972, -- Cuba Cuba et al., 1981) a 100% (Abdalla, 1977, Shaw y Lainson, 1977). Considerando de valor diagnóstico un título $\geq 1:8$ en el Nuevo Mundo y $\geq 1:200$ en el Viejo - Mundo (Walton et al., 1972, Abdalla, 1977).

Métodos de aglutinación. Otro de los métodos de

diagnóstico apropiado es la AD, este examen es más específico pero menos sensible que IFAT, puesto que se observan títulos significativamente más alto con AD que con IFAT (Allain y Kagan, 1975). Por este método las reacciones cruzadas son principalmente con enfermedad de Chagas a bajas diluciones (Walton, 1985). Empleando simultáneamente la AD y el IFAT, se mejora notablemente el inmunodiagnóstico puesto que algunos sueros son positivos por uno u otro y otros por ambos, al título diagnóstico $\geq 1:20$ (Cuba Cuba et al., 1980, 1981).

El examen de IHA muestra gran sensibilidad y especificidad (91% de positividad a títulos hasta de 1:5120), pero a menos que el título sea elevado, el examen no tiene valor diagnóstico. Las reacciones cruzadas son con esquistosomiasis y enfermedad de Chagas a títulos no más altos de 1:80 (Antunes et al., 1972).

Métodos de precipitación. Estos métodos ofrecen alternativas diagnósticas, especialmente en el Viejo Mundo donde el título de Ac es significativamente más alto que en el Nuevo Mundo.

La ID y la CIEP, muestran gran sensibilidad; 82 y

75% respectivamente, no existiendo relación entre el título de Ac fluorescentes y la fuerza y número de líneas de precipitación (Abdalla, 1977).

ELISA. Esta técnica ampliamente usada en el KA, - aún no ha sido valorada como procedimiento diagnóstico_ en LMC (Walton, 1985), aunque las primeras impresiones_ son favorables. El examen es altamente sensible pero - un poco menos específico que el IFAT, presentando reac- ción cruzada con tuberculosis, malaria y toxoplasmosis a bajas diluciones y con tripanosomiasis y lepra leproma- tosa a diluciones altas (Anthony et al., 1980, Roffi et al., 1980, Guimaraes et al., 1981). El Ag que da mejores - resultados es el obtenido de promastigotes que el de -- amastigotes (Anthony et al., 1980), y en algunos casos_ el Ag heterólogo mejor que el homólogo (Guimaraes et - al., 1981). Por este método se obtienen resultados posi- tivos de 76 a 100%, con falsos positivos hasta de 7.4% dependiendo del área geográfica (Roffi et al., 1980, - Guimaraes et al., 1981). El título de valor significan- te es $\geq 1:10$ (Guimaraes et al., 1981) o en tres de cua- dro diluciones y sospechosos para las demás, según el - siguiente cuadro (Roffi et al., 1980).

Resultado	DILUCION			
	1:40	1:80	1:160	1:320
Negativo	$A < 0.63$	$A < 0.42$	$A < 0.26$	$A < 0.16$
Sospechoso	$0.63 \leq A < 0.71$	$0.42 \leq A < 0.48$	$0.26 \leq A < 0.30$	$0.16 \leq A < 0.19$
Positivo	$A \geq 0.71$	$A \geq 0.48$	$A \geq 0.30$	$A \geq 0.19$

A = absorbencia a 400 nm.

El método muestra una relación entre el título de Ac y el número o severidad de las lesiones.

En los casos mucocutáneos la IgA se eleva relativamente más que en otros tipos de leishmaniasis (Antunes et al., 1972). En estudios preliminares con el conjugado monoespecífico (IgA), los resultados son favorables tanto para IFAT (sensibilidad de 94%) como para ELISA - (sensibilidad de 56.3%, especificidad de 87.1% y un valor predictivo de 72%), no observando relación entre la clase IgG o IgA (Shaw y Lainson, 1981, Guimaraes et al., - 1984).

Otros. Un método que ha demostrado Ac específicos a nivel experimental en casos de LMC humana, pero que no se ha evaluado enteramente como herramienta de

diagnóstico es el examen de Radioalergoabsorbente (RAST). Este examen es empleado para cuantificar IgE anti- Leishmania y podría ser de gran utilidad especialmente en el Nuevo Mundo donde los niveles de este Ac son significativamente más altos en comparación con las leishmaniasis del Viejo Mundo (LC, LCD y KA). Los niveles también son más altos en el caso de lesiones simples que en mucosas, causadas por L. braziliensis (Afchain et al., 1983).

Examen celular. Los exámenes celulares in vitro no son comúnmente empleados en la LMC. Sin embargo, en estudios de inhibición de la migración de macrófagos se obtienen mejores resultados con el Ag insoluble que con el soluble (Zeledon et al., 1976).

Intradermorreacciones. El examen intradérmico no es específico de especie y varias cepas de Leishmania se han valorado como Ag: promastigotes (Neal y Miles, 1976, Southgate, 1967), extracto crudo o parcialmente purificado (Furtado, 1973, Pellegrino et al., 1977) y Exo--Ag (sobrenadante del medio de cultivo) (Sergiev y Shuikina, 1970, Shaw y Lainson, 1975), además de Ag heterólogos: Exo-Ag y epimastigotes de Trypanosoma cruzi (Shaw y Lainson, 1974, 1975). La concentración de Ag y la interpretación es similar a los casos de LC, en este

caso existe una relación lineal entre las áreas de reacción y la concentración del Ag (Melo et al., 1977).

La IDR puede ser negativa en pacientes con lesiones recientes debidas a L. braziliensis braziliensis -- (Curban y Brito, 1969, Castro et al., 1972), esta se -- torna positiva conforme progresa la enfermedad y es marcadamente positiva en pacientes con enfermedad de muchos años, persistiendo su reactividad por mucho tiempo aún después de curados. (Bryceson 1970, Zeledon et al., 1976, Marzochi et al., 1980). El Ag soluble solo produce reacción inmediata en casos curados, persistiendo por lo menos 48 horas (Zeledon et al., 1976) y la respuesta es más intensa que la producida con la leishmanina (Furtado, 1973). Por otro lado, algunas personas reaccionan más intensamente a la leishmanina, otros al Exo-Ag y otros más tienen respuesta similar a ambos. Sin embargo, las respuestas retardadas fueron más intensas con el Exo-Ag en los casos de enfermedad simple causada por L. braziliensis braziliensis (Shaw y Lainson, 1975).

La IDR de Montenegro refleja algunas diferencias: más reacciones positivas ocurren en hombres que en muje

res y en adultos que en niños (Aston y Thorley, 1970), en infección involucrando las mucosas que en la infección simple (Castro et al., 1972, Shaw y Lainson 1975, Zeledon et al., 1976). También refleja diferencias raciales: reacciones más intensas son observadas en negros descendientes de africanos que en indígenas americanos, aún con Ag de baja potencia (Aston y Thorley, - 1970, Walton y Valverde, 1979).

Según numerosos autores, se obtienen resultados positivos de 84 a 100% (Castro et al., 1972, Furtado, - 1973, Shaw y Lainson, 1974, 1975, Zeledon et al., 1976, Walton, 1985), dependiendo del Ag.

La IDR a la leishmanina da reacciones falsas positivas con algunas micosis: esporotricosis, cromomomicosis y paracoccidiodomicosis (Aston y Thorley, 1970, - Guimaraes et al., 1984).

3.5.4. Diagnóstico diferencial. Rinoscleroma, neoplasias, blastomicosis, paracoccidiodomicosis, tuberculosis de la laringe (mucosa) y miasis nasal (Walton 1985).

3.6. Leishmaniasis Visceral (LV) o Kala-Azar (KA).

3.6.1. Patogénesis. El KA es la forma visceral de la -- leishmaniasis, el síndrome clínico es producido por la infección con los parásitos del complejo de L. -- donovani en ambos hemisferios y es debido a la inva--- sión de las células del SRE del bazo, hígado, médula -- ósea, nódulo linfático y piel. Después del piquete de un insecto infectado, el parásito entra a las células - del SRE probablemente por simple fagocitosis donde so-- breviven y multiplican dentro de los fagolisosomas - - (Mahmound y Warren, 1977, Marsden, 1979), desarrollando una reacción granulomatosa con histiocitos cargados de_ parásitos. De aquí, el parásito se disemina a linfáti- cos locales y así, vía el sistema sanguíneo, dentro de macrófagos a bazo, hígado, médula ósea y otras partes. Algunas reacciones pueden ocurrir: una reacción granulo matosa inmunocelular eminente a la enfermedad subclíni- ca y curación espontánea o ulterior multiplicación del_ parásito con eminente enfermedad clínica (Marsden, -- 1979, Kager, 1984). Un aspecto importante de la LV es_ la supresión de la reacción de inmunidad celular especí fica e inespecífica (Bryceson, 1970, Carvalho et al., - 1981, Leclerc et al., 1982).

3.6.2. Manifestaciones clínicas.

Síntomas. Después de un periodo de incubación, - generalmente algunos meses (Mahamound y Warren, 1977): pero que varía considerablemente de 10 días a 10 años - (Kager, 1984), el ataque es gradual, algunas veces agudo, con bruscos incrementos de temperatura, escalofríos y - malestar general. La fiebre es un importante síntoma - (Andre et al., 1978, Benallegue y Tabbakh, 1978, - - Gendron et al., 1978), y aunque no hay patrones específicos, si hay aumentos clásicos (de 2 a 3/24 horas), en la mayoría de los pacientes acompañado por escalofríos. Muchos pacientes experimentan incomodidad y dolor abdominal del hipocondrio izquierdo. Las complicaciones -- más comunes son: dolor de cabeza, malestar general, pérdida de peso, tos y diarrea (Benallegue y Tabbakh, 1978, Kager, 1984).

Signos. En el KA agudo, el bazo puede no ser palpable, el hígado está agrandado algunas veces considerablemente pero la hepatosplenomegalia es menos franca -- que la esplenomegalia. La linfadenopatía generalmente se observa en pacientes de las costas del Mediterráneo y en Africa del este, raramente en la India. La epista

sis es frecuente, pueden ocurrir lesiones de las membranas mucosas de nasofaringe o laringe: las lesiones orales parecen nódulos o úlceras de labio, lengua y paladar. Otras manifestaciones menos frecuentes son: ictericia, ascitis, daño severo al hígado, pancitopenia sin esplenomegalia y "leishmaniasis de ganglio linfático": linfadenopatía sin hepatosplenomegalia (Daneshbod, - - 1972, 1978, Chulay y Bryceson, 1983).

En la enfermedad crónica, hay disminución del músculo de los miembros y pecho, distensión del abdomen -- por agrandamiento del bazo e hígado. La esplenomegalia casi siempre esta presente y los pacientes en esta etapa se encuentran debilitados y extenuados (Andre et al., 1978, Kager, 1984).

Las complicaciones más comunes de la enfermedad son las infecciones del tracto respiratorio, la epistaxis es frecuente pero la cirrosis no es común. La coagulopatía intravascular difusa, glomerulonefritis (con deposición de complejos inmunes) y amiloidosis del riñón con síndrome nefrótico, son complicaciones más bien raras (Benallegue y Tabbakh, 1978).

En áreas endémicas se ha observado la infección - subclínica que ocurre en personas que son infectadas pero que no desarrollan la enfermedad clínica (Pampiglione et al., 1974, Marsden, 1979, Kager, 1984).

El cuadro clínico evoca fuertemente el diagnóstico en una zona endémica (Culay y Bryceson, 1983), este se completa con un balance biológico y la prueba parasitológica (Benallegue y Tabbakh, 1978, Laroche et al., - 1978).

3.6.3. Balance biológico.

Signos hematológicos. En el hemograma, la leucopenia es franca, la cuenta diferencial muestra neutropenia, mono y linfocitosis relativa con ausencia parcial o total de eosinófilos. La agranulocitosis es rara o no se observa, la anemia es severa y esta presente en casi todos los casos con niveles de hemoglobina cerca del 50% de lo normal. Las anomalías morfológicas que acompañan la disminución de eritrocitos son: micro, anisocitosis y poiquilocitosis. Sin embargo, la leucopenia ocurre primero que la anemia (Clayton, 1971, Daneshbod, - 1972, Quilici et al., 1978, Laroche et al., 1978, - -

Andreoli et al., 1985).

El mielograma reviste tres aspectos (Benallegue y Tabbakh, 1978): a).- La médula muestra hiperplasia reticular importante: eritropoyesis normoblástica activa, -- granulopoyesis y megacariocitos prepresentes. b).- Frecuentemente es una médula pobre con ausencia total de megacariocitos, granulopoyesis y eritropoyesis deprimida. c).- A veces la médula es bastante rica con eritro y granulopoyesis presente pero con ausencia de megacariocitos.

Signos humorales. En el curso de la LV el título de inmunoglobulinas aumenta considerablemente; inicialmente la concentración de la clase IgM está incrementada, más tarde aumenta la IgG (policlonal) (Ghose et al., 1980, Kager, 1984), en cuanto a la clase IgA, no presenta cambios significantes (Benallegue y Tabbakh, 1978). Las globulinas pueden representar hasta el 50% de las proteínas totales, pero muchas de estas no son Ac específicos y no son protectivos (Zuckerman, 1975).

Las reacciones serológicas específicas y no específicas se discuten más adelante.

Exploraciones particulares. En la hemostasia el tiempo de coagulación es normal, fibrinógeno disminuido y el tiempo de protrombina a menudo levemente prolongado (Kager, 1984). En la exploración hepática los niveles de las enzimas Transaminasa Glutámico Oxalacética y Glutámico Pirúvica pueden estar levemente aumentadas, usualmente los niveles de bilirrubinas son normales. Sin embargo, la función hepática puede ser perturbada (Daneshbod, 1972, Benallegue y Tabbakh, 1978). Una fuerte proporción de IgG caracteriza la proteinuria observada en cerca del 50% de los casos (Benallegue y Tabbakh, 1978). Los reportes de albuminuria son variables (Daneshbod, 1972, Kager, 1984).

3.6.4. Métodos de diagnóstico estándar.

Examen directo. La identificación del parásito es sin duda el mejor método de diagnóstico, y aunque no hay métodos de tinción especiales para Leishmania, el organismo se observa mejor en preparaciones de tejidos teñidos con hematoxilina y eosina (Daneshbod, 1972). Los parásitos pueden ser demostrados en frotis confeccionado de aspirado de: bazo (+ 98%), médula ósea (punción externa) (+ 85%), hígado (+ 60%) o nódulo linfático

co (\pm 60%) Sen Grupta, 1969, Rassam y Al Mudhaffar, - - 1980b, Kager, 1984). En los casos clínicamente sospe-- chosos se mejora considerablemente el diagnóstico me-- diante el aspirado de médula previa esplenotomía con adrenalina (Mayrink y Magalhanes, 1969). El aspira-- do de bazo es el más apropiado pero su seguridad es du-- dosa, por lo que deberá emplearse solo para el diagnós-- tico individual con las máximas precauciones y no para-- estudios epidemiológicos (Andre et al., 1968, Daneshbod, 1972, Andreoli et al., 1985, Jones et al., 1985). Las mismas precauciones deberán tomarse para los métodos me-- nos efectivos en los casos sospechosos (Cahill, 1970).

Cultivo. En los centros médicos urbanos el culti-- vo es un procedimiento estándar complementario, espe-- cialmente si la muestra es aspirado de médula o sangre-- periférica puesto que teóricamente un solo parásito via-- ble puede multiplicarse y ser detectado en cultivo. Pa-- ra tal efecto los medios bifásicos tales como el NNN y el Senekje o sus modificaciones son preferidos, aunque-- también se cuenta con medios semisólidos como el Adler-- y medios líquidos como el RPMI-1640 y el medio de inse-- cto de Drosophila de Schneider (Cahill, 1970, Hendricks-- y Wright, 1979, Rassam y Al Mudhaffar, 1979), los cua--

les son descartados de 2 (medios líquidos) a 4 (medios bifásicos) semanas. Recientemente, se demostró que el cultivo de aspirado en el medio de Schneider es más sensible que el método tradicional (cultivo en NNN y fro--tis) para el diagnóstico de LV (Hendricks y Wright, -- 1979, Hockmeyer et al., 1981, Lightner et al., 1983).

Por el método de cultivo se obtienen resultados -- positivos de 55 a 100% con un valor predictivo de 52 a 85% dependiendo del medio y tipo de aspirado (Hendricks y Wright, 1979, Rassam y Al Mudhaffar, 1979, Hockmeyer et al., 1981, Lightner et al., 1983). Sin embargo, para el diagnóstico inicial ambos métodos: cultivos y examen directo deberán ser empleados (Lightner et al., -- 1983).

Otra forma de diagnosticar el KA, es por medio de la inhibición del cultivo; examen basado en la presen--cia o ausencia de flagelados libres, que en contacto -- con Ac específicos tienden a disminuir o desaparecer -- del medio de cultivo. Por este método se obtienen tftu los $\geq 1:1000$, demostrando Ac de naturaleza específica -- (Jadin et al., 1969).

Inoculación de animales. Alternativamente, el -- aspirado puede ser inoculado en hamster y otros anima-- les de laboratorio: los amastigotes son demostrados en el bazo después de 2 semanas (Mahamound y Warren, -- 1977), lo que retrasa considerablemente el diagnóstico_ (Cahill, 1970).

3.6.5. Métodos de diagnóstico alternativos

3.6.5(1) Métodos inespecíficos. Como ya se men-- cionó, en el transcurso de la LV existe un aumento con-- siderable de globulinas, que pueden ser coaguladas, flo-- culadas o precipitadas y su presencia es la base de los exámenes de formol-leucogelificación, floculación de -- MacLagan o Hanger, examen de antimonio y precipitación_ acuosa mencionados en la literatura pasada (Fife, 1971, Ranque et al., 1975, Zuckerman, 1975). A pesar de la -- naturaleza no específica de muchas globulinas, estos -- exámenes son diagnósticos en los casos activos de KA -- (Sen Grupta, 1969). Las reacciones cruzadas son princi-- palmente con suero de enfermos donde exista elevación -- de globulinas: malaria, tripanosomiasis, lepra, tubercu-- losis, esquistosomiasis entre otras (Cahill, 1970, -- Ranque et al., 1975, Zuckerman, 1975).

3.6.5(2) Métodos específicos.

Fijación de complemento. El examen de FC es el método clásico para el serodiagnóstico de muchas enfermedades infecciosas y parasitarias y como tal, es un método bien estandarizado (USPH Monograph #78, 1968). Sin embargo, la técnica es tediosa, varía en sensibilidad día a día y ocurren reacciones anti-complementarias en porcentajes variados (Quilici et al., 1968, Mansueto et al., 1975, Flemmings et al., 1984, Pappas et al., -- 1984a). El examen no es específico de especie y para tal efecto se han empleado Ag preparados de Leishmania; crudo y parcialmente purificado (Cahill, 1970, Oelerich et al., 1974, La Placa et al., 1975, Pappas et al., - 1984a), Crithidia, Leptomona, Trypanosoma (Quilici et al., 1968, Garrido, 1969, Sen Gupta, 1969, Ranque et al., 1975), BCG y otros bacilos alcohol ácido resistentes (Chavez y Torrealba, 1965, Araujo y Mayrink, 1968, Garrido, 1969, Cahil, 1970, Ranque et al., 1975, - - Zuckerman, 1975).

Los resultados obtenidos por FC varían dependiendo del Ag, resultando mejor el homólogo que el preparado de otros flagelados (Oelerich et al., 1974, Hedge et

al., 1978) y solo el Ag proteico puso en evidencia Ac -
especificos (La Placa et al., 1975). Por otro lado, el
Ag micobacterial es tan sensible y especifico como el -
Ag homólogo (Mayrink et al., 1972, Oelerich et al., --
1974). No obstante que la reacci6n en este caso es des-
conocida se propone la hip6tesis de auto-Ac o la presen-
cia de Ag parcialmente compartidos (Oelerich et al., -
1974, Mansueto et al., 1975). El rango de reacciones -
cruzadas y falsos positivos es incierto (Cahil, 1970).
Las reacciones cruzadas son principalmente con enferme-
dad de Chagas (Furtado, 1973, Oelerich et al., 1974),
otras leishmaniasis (Araujo y Mayrink, 1968, Quilici et
al., 1968, Troung et al., 1969, Afchain et al., 1983) y
algunas afecciones febriles (Ranque et al., 1975, - -
Zuckerman, 1975) o no se observan (Pappas et al., - -
1984a).

No obstante que la sensibilidad del examen es com-
prometida por las reacciones anti-complementarias - -
(Pappas et al., 1984a), se obtienen resultados positi--
vos de 80 (Mansueto et al., 1975) a 100% (Chavez y - -
Torrealba, 1965) dependiendo del Ag y del título diag--
n6stico el cual es tomado desde $\geq 1:4$ (Mannweiler et al.,
1978) hasta $\geq 1:100$ (Quilici et al., 1968, Ranque et -
al., 1975).

Aglutinación directa. La AD es específica de grupo, aunque se registran diferencias entre los Ag empleados; los Ag preparados de promastigotes de L. tropica son los más reactivos pero menos específicos que el Ag homólogo L. donovani en los casos de KA (61% al título $\geq 1:65$ y 97% al título $\geq 1:32$ respectivamente y con 2% de falsos positivos en ambos). Las reacciones cruzadas son con la enfermedad de Chagas pero siempre a bajos títulos ($\leq 1:128$) y no constituye un problema donde coexisten ambas puesto que el título diagnóstico para esta última es $\geq 1:512$ (Allain y Kagan, 1975).

Aglutinación pasiva. Para el examen de AP se emplean partículas de latex sensibilizadas con Ag heterólogo BCG, obteniendo una sensibilidad y especificidad de 100% no registrado reacción con suero de enfermedad de Chagas, lepra lepromatosa y tuberculoide y tuberculosis (Mayrink et al., 1972, Hawking, 1973).

Hemaglutinación indirecta. La IHA se emplea muy poco para el serodiagnóstico de KA. Este método muestra gran variabilidad aún con el mismo Ag leishmanial: sensibilidad de 40% al título $\geq 1:10$ (Mannweiler et al., 1978) a 74% al título $\geq 1:64$ (Ghose et al., 1980).

Métodos de precipitación. En las técnicas de inmunoprecipitación se emplean Ag preparados de promastigotes de Leishmania (Le Ray et al., 1973, Kohanteb et al., 1980, 1984), somático o metabólico (Monjour et al., 1978) y otros flagelados heterólogos: Strigomona y -- Leptomona (Ranque et al., 1968, 1969, 1975). Estos métodos son simples de realizar, dan excelente orientación diagnóstica (Ranque et al., 1975) y se consideran como exámenes de elección para estudios epidemiológicos (Mansueto et al., 1982).

Inmunodifusión. La ID demostró ser mejor para identificar la reactividad homóloga, puesto que todos los sueros de pacientes con leishmaniasis dieron de 1 a 5 líneas de precipitación con el Ag leishmanial, con algunas variaciones individuales (Rassam y Al Mudhaffar, 1980b) lo que demuestra la existencia de Ag comunes -- (Bray y Lainson, 1966, Chavez, 1970). El suero de pacientes con LV da líneas de precipitación más intensas y abundantes con el Ag homólogo L. donovani que con T. cruzi (Oelerich et al., 1974). Los resultados que se obtienen por este método van de 62 a 100% con el Ag -- leishmanial (Ranque et al., 1972, 1975, Abdalla, 1980, Rassan y Al Mudhaffar, 1980b) y hasta 6% de falsos posi

tivos en un foco endémico (Abdalla, 1980) pero no con_afecciones febriles, hidatidosis, toxoplasmosis y tripa_nosomiasis africana (Oelerich et al., 1974, Ranque et al., 1975).

IEP. Por este método se obtienen de 4 a 14 arcos de precipitación, pudiéndose dividir en tres grupos de migración: lenta, intermedia y rápida (Ranque et al., - 1969, Chavez, 1970). El patrón inmunolectroforético - en todos los casos de LV muestra dos arcos de precipita_ción característicos (Rassam y Al Mudhaffar, 1980b), - que no se presentan con suero de otras enfermedades (Le Ray et al., 1973). El examen es específico pero bajo - en sensibilidad (Rassam y Al Mudhaffar, 1980b).

Contrainmunolectroforesis. Método altamente -- sensible y específico, que produce de 1 a 4 líneas de - precipitación con el Ag leishmanial (Rassam y Al - - Mudhaffar, 1980b). Los resultados por CIEP en casos de LV van de 80 a 100% (Rezai et al., 1977, Rassam y Al - Mudhaffar, 1980b) dependiendo del Ag (Mansueto et al., 1978) y/o curso de la enfermedad (Andreoli et al., -- 1985), con falsos positivos hasta de 10% en un foco en_démico (Abdalla, 1980), en cirrosis o desordenes sangui_fneos (Mansueto et al., 1978) o no se observan (Andreoli

et al., 1985).

Inmunolectrodifusión. Usando la técnica de IED, fueron detectados Ac específicos contra L. donovani en todos los pacientes con LV, no siendo útil L. enriettii como Ag, puesto que no se observan líneas de precipitación o no son tan claras como en el sistema homólogo -- (Kohanteb et al., 1980). El método es altamente sensible (100%) y específico (100%) y aunque la existencia de reacciones cruzadas es indiscutible, no constituye un factor limitante ya que se obtienen arcos de precipitación constantes y comunes en todos los casos de LV, que pueden ser comparados con sueros de referencia positivos (Monjour et al., 1978).

CIED. Método menos sensible y específico que -- IED, puesto que se obtienen falsos negativos en casos de LV comprobada. El patrón y número de bandas de precipitación es diferente de un paciente a otro, diferencias debidas probablemente a la respuesta inmune particular (Kohanteb et al., 1984). Al igual que en IED, el Ag homólogo da los mejores resultados (Kohanteb et al., 1980, 1984).

Métodos con reactivos marcados. IFAT. De los métodos inmunodiagnósticos el IFAT es considerado el más apropiado para el diagnóstico de la LV (Fife, 1971, - - Ranque et al., 1972, 1975, Zuckerman, 1975). La reacción como ya se mencionó, es más bien específica de género que específica de especie (Zuckerman, 1975) y como es poco lo que se ha hecho por estandarizar el método - (Mayrink et al., 1967, Araujo y Mayrin, 1968), no existe una forma o especie de parásito que sea aceptada en forma general para su empleo como Ag (Camargo y Rebonato, 1969, Shaw y Lainson, 1977, Badaro et al., 1983), - de tal suerte que se emplean Ag homólogos: amastigotes (Herman, 1965, Troung et al., 1969), promastigotes - - (Mayrink et al., 1967, Araujo y Mayrink, 1968, Camargo y Rebonato, 1969, Ranque et al., 1975, Krampitz et al., 1981, Badaro et al., 1983) y flagelados heterólogos: - Crithidia (Hedge et al., 1978, López, 1979) Strigomona (Quilici et al., 1968) y Trypanosoma (Camargo y Rebonato, 1969, Cahill, 1970).

Los resultados por este método varían de tinción no específica a buena especificidad del examen y es tomado como positivo cuando más del 50% del parásito fluye (Pappas et al., 1983a). El título diagnóstico pa-

ra la LV es muy variable y va de $\geq 1:20$ (Troung et al., 1969, Mannweiler et al., 1978) a $\geq 1:256$ (Edrissian et al., 1981), aunque debe considerarse $\geq 1:400$ en una zona endémica (Abdalla, 1980) o $\geq 1:10$ cuando se usa IgG - monoespecífica (Shaw y Lainson, 1981). La sensibilidad del IFAT, por consiguiente varía de acuerdo al título - diagnóstico y la fuente del Ag (Krampitz et al., 1981, - Badaro et al., 1983) de 75 (Quilici et al., 1968, - - Edrissian et al., 1981) a 100% (Troung et al., 1969, - Mannweiler et al., 1978, Rezai et al., 1978, Rezai et al., 1977, Shaw y Lainson, 1981). Aunque el flagelado Crithidia se emplea en el diagnóstico temprano de LV -- (López, 1978, 1979, López et al., 1979, López, 1980), - resulta mejor el Ag homólogo (Quilici et al., 1968, - Latif et al., 1979). A pesar de las similitudes antigénicas entre Leishmanias, se demuestra que dependiendo - de la elección de la etapa y especie, se obtienen diferencias en la sensibilidad y especificidad (Badaro et al., 1983), aún entre diferentes cepas de L. donovani (Krampitz et al., 1981).

La especificidad del IFAT como ya se mencionó, también depende del sistema antigénico empleado y ésta va de 86 a 100% (Badaro et al., 1983) con una reproducibi

lidad del 98 al 100% (Pappas et al., 1983a), las reacciones cruzadas principalmente son con malaria, esquistosomiasis, filariasis, larva migrans, tripanosomiasis africana, lepra, lupus eritematoso, tuberculosis, actinomicosis a bajos títulos (Troung et al., 1969, Cahill, 1970, Ranque et al., 1975, Zuckerman, 1975) y con enfermedad de Chagas a títulos altos (Badaro et al., 1983), los cuales disminuyen o son más específicos si se absorbe el suero con epimastigotes de T. cruzi (Camargo y -- Rebonato, 1969).

El IFAT también puede realizarse en muestras obtenidas sobre papel filtro resultando de especificidad -- y sensibilidad similar a la técnica donde se emplea suero, siendo válida para el diagnóstico clínico de LV (Al Alousi et al., 1980).

ELISA. El método de ELISA es aplicado ampliamente en el inmunodiagnóstico de muchas enfermedades parasitarias y en especial al diagnóstico de la LV (Hommel, 1976, Hommel et al., 1978). Debido a que la fase de -- amastigote no es tan sensible y específica como la de -- promastigote (Anthony et al., 1980), los estudios característicamente emplean como Ag una preparación de ex --

tracto soluble crudo de estos últimos (Hommel, 1976, -
Rassam y Al Mudhaffar, 1980a) resultando mejor el Ag --
heterólogo L. braziliensis con títulos significantemen-
te más altos que con el Ag homólogo L. donovani - -
(Guimaraes et al., 1981). El examen es interpretado -
visual o espectrofotométricamente. En el método visual,
un color amarillo-rojizo; que corresponde a una absorban-
cia (A) ≥ 0.7 (Ho et al., 1983), es tomado como positivo
y el título expresado como la más alta dilución dando -
reacción positiva. Al límite inferior con valor diag-
nóstico $\geq 1:200$ (Haldar et al., 1983) o $\geq 1:27\ 000$ - -
(Jahn y Diesfeld, 1983), el examen tiene una sensibili-
dad de 98.5 (Ho et al., 1983) a 100% (Jahn y Diesfeld,
1983), especificidad de 94 (Haldar et al., 1983) a 100%
(Ho et al., 1983), y reproductibilidad del 80 al 99% -
(Pappas et al., 1984a). Espectrofotométricamente, el -
título del punto final con valor diagnóstico es dado --
por una A ≥ 0.120 a A ≥ 0.7 como límite umbral inferior -
(Hommel et al., 1978, Edrissian y Darabian, 1979, Jahn_
y Diesfeld, 1983, Cock et al., 1985). La sensibilidad_
dentro de estos parámetros es de 87 (Xu et al., 1982) a
100% (Edrissian y Darabian, 1979, Xu et al., 1982, Cock
et al., 1985), especificidad de 97 a 100% y reproducti-
bilidad de 99%: con variación de ± 1 dilución en 1% -

(Pappas et al., 1984a). En ambas técnicas se observan falsos negativos (1.6%), falsos positivos hasta de 3.3% en un foco endémico y 80% con enfermedad de Chagas - - (Jahn y Diesfeld, 1983, Pappas et al., 1984a). Muchas - de las reacciones falsas positivas: malaria, esquistoso miasis, tripanosomiasis africana, sífilis, disenteria, tuberculosis, lepra, etc. (Hommel et al., 1978, Edrissian y Darabian, 1979, Haldar et al., 1981, Xu et al., 1982) son negativas a altas diluciones, no así los casos de - enfermedad de Chagas, donde muchos aún son positivos - (Jahn y Diesfeld, 1983). Sin embargo, la absorción del suero de LV con T. cruzi intactos reduce el porcentaje de falsos positivos sin afectar la sensibilidad en pa-- cientes con LV (Mohammed et al., 1985).

Aunque ambos métodos dan resultados satisfacto- - rios, los bajos niveles de Ac enlazantes son diferencia dos apropiadamente por fotómetro mientras que, los al-- tos niveles visualmente son equivalentes o aún superiores (Jahn y Diesfeld, 1983) y además, la combinación de ELISA-IgG y ELISA-IgM mejora la sensibilidad del método (Said y Rachid, 1985) y empleando promastigotes enteros como Ag, los valores de A son ligeramente más altos que los obtenidos por la técnica estándar (MOhammed et al., 1985).

Dot-ELISA. Recientemente, se implemento un método inmunoenzimático para el diagnóstico de la LV el - - cual emplea promastigotes intactos como Ag en volúmenes muy pequeños "dotted" absorbidos en discos de papel filtro de nitrocelulosa (Dot-ELISA) (Pappas et al., 1983a). El examen es interpretado visualmente por una coloración de puntos azules sobre fondo blanco, tomando como positivos aquellos con intensidad de 1+ a 4+. Este método es tan sensible y específico como la técnica convencional de ELISA (Pappas et al., 1984a). Al título diagnóstico $\geq 1:32$ se tiene una sensibilidad de 95 -- (Pappas et al., 1984a, b) a 100% (Pappas et al., 1985a), reproducibilidad de 100%: con variación de ± 1 dilución en 10% de estos y falsos positivos entre personas sanas hasta de 2% y 80% en caso de tripanosomiasis (Pappas et al., 1983b). Sin embargo, el empleo de anti-IgG (cadena pesada específica) disminuye considerablemente el -- porcentaje de falsos positivos en el caso de tripanosomiasis de 80 a 20%, sin alterar la sensibilidad y especificidad en los pacientes con LV (Pappas et al., 1985b).

Radio inmuno ensayo. Este método es empleado para detectar Ac anti-EF, pero los Ac específicos en el suero de pacientes con LV muestran solamente de 1.8 a -

3.1 veces más anti-EF comparado con los controles normales y no son de valor diagnóstico (El On et al., 1983). Los autores creen que la alta sensibilidad del examen para detectar mínimas cantidades de EF, puede ser de -- utilidad en la detección de este en el suero de LV y -- así tener valor diagnóstico.

Examen celular. Aunque, los métodos celulares in vitro no son exámenes de rutina en el diagnóstico de la LV, se demuestra que las células mononucleares de sangre periférica de pacientes con LV no responden al Ag leishmanial en ensayos de transformación blástica -- (Carvalho et al., 1981). Por otro lado, el examen celular in vivo (IDR) es apropiado para valorar la incidencia presente pasada y futura de la LV (Pampiglione et al., 1975). Como ya se mencionó, el examen no es específico de especie y varias cepas de Leishmania así como otros flagelados heterólogos de especie tales como -- Strigomona y Trypanosoma, se han empleado como Ag -- (Rezai et al., 1978, Cahill 1970, La Placa et al., -- 1975). La interpretación, tiempo y cantidad de inóculo es similar a los casos de LC. El examen es negativo durante la etapa activa de la enfermedad (Cahill, 1970, -- Pampiglione et al., 1975, Fuller et al., 1976, 1979).

Sin embargo, se reportan porcentajes altos de positividad con Ag polisacárido (Mayrink et al., 1971), sin tomar conclusiones apropiadas. El examen es positivo en casos subclínicos y en la etapa temprana de LV; de pocas semanas a 2 años después de la curación espontánea o química permaneciendo positiva hasta por 52 años, con variaciones individuales (Pampiglione et al., 1975). El grado de induración se incrementa con repetida o prolongada exposición, indicando un incremento concomitante en la respuesta inmune individual (Fuller et al., 1976). La IDR al igual que en los otros tipos de leishmaniasis parece estar relacionado a la edad, sexo y ocupación (Pampiglione et al., 1975, Fuller et al., 1979).

En áreas endémicas de LV la positividad a la leishmanina es adquirida sin evidencia clínica de infección y varía inversamente con la incidencia de LV (Southgate y Oriedo, 1967) indicando población inmune (Southgate y Manson, 1967). El examen positivo en la zona endémica es probablemente el resultado de a) inoculación de Leishmanias no patógenas, b) inoculación de L. donovani de baja virulencia y/o c) resistencia del huésped humano a L. donovani (Fuller et al., 1976).

3.6.6. Diagnóstico diferencial. En el diagnóstico diferencial debe ser considerado: malaria, fiebre tifoidea, brucelosis, endocarditis bacteriana, histoplasmosis generalizada y algunas veces tripanosomiasis africana y esquistosomiasis hepato-esplénica, complicada por salmonelosis. En una área no endémica la LV debe ser considerada en el diagnóstico diferencial de la enfermedad de Hodgkin y otros linfomas, leucemia mieloide crónica, histiositosis maligna y algunas veces sarcoidosis, tuberculosis y cirrosis de hígado (Kager, 1984).

CAPITULO IV

DISCUSION

Solamente en los últimos 30 años se ha aceptado - en general que los parásitos inducen una respuesta inmune en el hombre y animales infectados. Durante este periodo la serologia ha jugado un papel muy importante y de la gran cantidad de métodos inmunológicos implementados, muchos permanecen como técnicas de investigación - en la relación huésped-parásito (Fife, 1971, Ranque et al., 1975, Zuckerman, 1975) y otros se han mejorado debido a la producción de Ags más específicos (Voller y Savigny, 1981).

Tanto en México como en otras regiones del mundo, el diagnóstico clínico inicial se establece conforme a los siguientes criterios: a) antecedente epidemiológico, b) cuadro clínico y evolución, c) respuesta a la -- quimioterapia y d) estudios histopatológicos que permitan descartar a la leishmaniasis de otros padecimientos. Puesto que, clínicamente la propia naturaleza de la - - leishmaniasis semeja una amplia variedad de procesos infecciosos, el médico y epidemiologista deben contar con_

métodos inmunológicos que apoyen el diagnóstico clínico individual. Clásicamente, este apoyo ha tomado la forma de: identificación directa del parásito en material de biopsia, aspirado o improntas de lesión y cortes histológicos, que si bien el hallazgo de una "leishmania" en una lesión cutánea no suele ser tarea difícil, en el peor de los casos la investigación puede repetirse cuantas veces sea necesario sin peligro ni molestias para el paciente, no es lo mismo en la LV donde es necesario realizar una punción esplénica o medular, que aunque en ciertos lugares se cuenta con personal altamente calificado es difícil, peligrosa y desagradable para el paciente (Garrido, 1969, Cahill, 1970, Abdalla, 1980, -- Pappas et al., 1983b).

El diagnóstico definitivo se basa en el cultivo o aislamiento del agente causal y a pesar de que no se ha establecido un método de como realizar la toma de muestra de una lesión cutánea (Cuba Cuba et al., 1980, -- 1981), se sabe que el número de parásitos está en proporción inversa a la duración y tipo de lesión y especie infectante (Ridley, 1979, 1980, Ridley et al., -- 1980), por lo tanto el diagnóstico directo solo es posible en los casos agudos de la LCA (Zavala, 1972, -- --

Zeledon y Ponce, 1974, Andrade et al., 1984, Freman y -
 Melo, 1984), lesiones causadas por L. tropica (Dowlati,
 1979), lesiones de tipo eritematoso de la LCPKA (Haldar
et al., 1983) y en la LCD en donde el número de parási-
 tos no cambia aún en lesiones de curso crónico (Walton,
 1985). El examen es de dudosa utilidad en los casos --
 crónicos de la LCA (Zavala, 1972, Andrade et al., 1984),
 LR (Walton, 1985), maculas hipopigmentadas de la LCPKA_
 (Haldar et al., 1983) y por la infección debida a L. -
major (Kurban et al., 1966, Dowlati, 1979). Respecto a
 la LMC del Viejo Mundo, el diagnóstico por este método_
 solo es posible en los casos no ulcerados (Milosev et -
al., 1969, Abdalla et al., 1978, Sirol et al., 1978) y
 en la LV, se obtienen mejores resultados en frotis con-
 feccionado de aspirado de bazo seguido de médula, híga-
 do y nódulo linfático con + 98, 85, 60 y 60% respectiva
 mente (Sen Grupta, 1969, Cahill, 1970, Rassam y Al - -
 Mudhaffar, 1980b, Kager, 1984).

El método más simple y efectivo para el diagnósti-
 co de la leishmaniasis, especialmente en la enfermedad_
 causada por los complejos de L. mexicana, L. tropica y
L. donovani es el cultivo de aspirado, biopsia o corte_

histológico. Para tal efecto se ha empleado una amplia variedad de medios de cultivo obteniendo resultados positivos de 14 a 100% en la LC (Hendricks y Wright, 1979) y de 55 a 91% en la LV (Hockmeyer et al., 1981) con un valor predictivo en ambos casos de 55 a 84% (Lightner et al., 1983) dependiendo del curso de la enfermedad en la LC, tipo de aspirado en la LV y del medio de cultivo (Hendricks y Wright, 1979, Rassam y Al Mudhaffar, 1979, Lightner et al., 1983). El medio más sensible comparado con otros basados en sangre comúnmente empleados (NNN o sus modificaciones) es el medio de insecto de Schneider (Hendricks y Wright, 1979, Hockmeyer et al., 1981) y resulta mejor que la identificación directa (Lightner et al., 1983). En la enfermedad causada por el complejo de L. braziliensis, este método tiene valor limitado debido a que los parásitos son difícil de aislar y cultivar (Walton et al., 1972, Hendricks y Wright, 1979) especialmente en la enfermedad crónica (Mahamound y Warren, 1977, Marsden 1979) por lo que es recomendable más de un medio de cultivo para el aislamiento primario (Walton, 1985).

El diagnóstico por medio de la inoculación de animales no es un método comúnmente empleado en la

leishmaniasis debido a que no se cuenta con animales lo bastante susceptibles para aislar en forma eficaz las diferentes especies y sub-especies del protozoario -- (Coelho y Coutinho, 1965, Cuba Cuba et al., 1981). En la espundia se obtiene un bajo porcentaje de positividad, aún en casos comprobados parasitológicamente (Cuba Cuba et al., 1980, 1981), en la LV retrasa considerablemente el diagnóstico, lo cual es crítico en este tipo de leishmaniasis (Kagan, 1979, Rassam y Al Mudhaffar, 1980b) y en la LC al igual que en los otros tipos de -- leishmaniasis el diagnóstico inicial está basado en el antecedente epidemiológico y cuadro clínico (Bryceson, 1969, Benallegue y Tabbakh, 1978, Alsina, 1982, Andrade et al., 1984, Ravisse et al., 1984, Azadeh et al., -- 1985, Walton, 1985).

Las evidencias indirectas de infección leishmanial son proporcionadas por los métodos humorales (detección de Ac) y celulares (IDR). En el curso de la -- leishmaniasis el título de Ac específicos y no específicos se incrementan notablemente, siendo afectado por -- factores como: especie infectante, duración de la infección, tipo y tamaño de la lesión y la constitución genética del huésped (Pappas et al., 1983a). Los tipos

de Ac producidos en la leishmaniasis pertenecen a la -- clase IgM e IgG (Bryceson, 1970, Preston, 1973, -- Zuckerman, 1975, Behforous et al., 1976) la clase IgA -- no muestra cambios significantes excepto en la LMC -- (Abdalla et al., 1973, Antunes et al., 1973, Shaw y -- Lainson, 1981, Guimaraes et al., 1984). El título de Ac puede llegar a ser estimado cualitativa y cuantitativa- mente, para ello se ha recurrido a una serie de reaccio- nes inmunológicas que con mayor o menor fortuna consi- guen su fin (Garrido, 1965, Voller et al., 1976, Kagan, 1979, Mansueto et al., 1980). Los resultados positivos, en la LC no siempre están relacionados a una infección_ activa (Farah y Malak, 1971, Manson, 1971, Menzel y -- Bienzel, 1978), no así en la LMC y LV donde son diagnós- ticos de infección activa (Bittencourt et al., 1969, -- Laroche et al., 1978, Latif et al., 1979) y un resulta- do es interpretado como curación radical (Walton, 1970, Zuckerman, 1975, Walton, 1980).

En el examen de IFAT, método ampliamente usado en el serodiagnóstico de la leishmaniasis y el más apropia- do (Walton, 1985) la reacción es más bien específica de género que específica de especie y para su realización_ se emplean promastigotes y amastigotes de Leishmania, --

así como Ag de otros géneros; Leptomonas, Strigomonas, Crithidias y Trypanosomas (Ranque et al., 1975, - - Zuckerman, 1975) resultando mejor el Ag homólogo. Sin embargo, a pesar de las similitudes antigénicas entre Leishmanias se demuestra que dependiendo de la especie y etapa del parásito se obtienen diferencias en cuanto a la sensibilidad y especificidad (Anthony et al., - - 1980, Badaro et al., 1983), aún entre diferentes cepas de la misma especie (Krampitz et al., 1981).

Tanto en la IC como en la LMC se sugiere que la forma de amastigote es la más sensible y específica - que la fase de promastigote (Walton et al., 1972) resultando mejor los obtenidos de lesión que los obtenidos in vitro o liberados de células Vero (Pappas et al., 1983a). Recientemente se demostró que los promastigotes son tan sensibles y específicos como los -- amastigotes (Badaro et al., 1983, Pappas et al., 1983a) los cuales dan un título medio geométrico más alto que los amastigotes (Pappas et al., 1983a). En la IV, enfermedad asociada con hipergamaglobulinemia y títulos de Ac generalmente más altos que en las otras leishmaniasis, no se ha adoptado en forma general la especie o etapa del parásito para su uso en el IFAT (Shaw y -

Lainson, 1977, Badaro et al., 1983).

En la leishmaniasis cutánea no complicada los títulos de Ac fluorescentes son muy bajos o insignificantes (Bray y Lainson, 1967, Troung et al., 1969), sin embargo, cuando los linfáticos están involucrados estos son demostrados (Ranque y Quilici, 1970, Manson, 1971, Zuckerman, 1975). Al título diagnóstico $\geq 1:8$ (Walton et al., 1972) o $\geq 1:16$ (Edrissian y Darabian, 1979, Wyler et al., 1979) se obtiene una sensibilidad de 75 a 85%, especificidad de 95 a 100% y reproducibilidad de 98 a 100% dependiendo del Ag (Camargo y Rebonato, 1969, - - Walton et al., 1972, Guimaraes et al., 1974, Badaro et al., 1983).

En los tipos de LC que no sanan espontáneamente - los resultados son variables: en la LCD se obtienen resultados positivos de 100% al título $\geq 1:10$ empleando - el conjugado anti-IgG monoespecífico (Shaw y Lainson, - 1981), en México el título de Ac de esta enfermedad es significativamente más alto que el de otras regiones -- (Lebrija, comunicación personal). El Ag con mejores resultados es el homólogo (Shaw y Lainson, 1977, 1981).

En la LCPKA, el examen es positivo aún en los casos don de la observación directa es negativa, empleando - - Crithidias como Ag al título $\geq 1:80$ con valor diagnósti co (Madero et al., 1982). En la LR, el título de Ac -- fluorescentes es negativo o similar a los casos agudos de la LC simple (Matossian et al., 1975) sin ir más - - allá del título de 1:128 (Ardehali et al., 1980).

En la LMC, los Ac fluorescentes solo son demostra dos cuando ocurre la metástasis (Bittencour et al., -- 1968, Walton et al., 1972). Al título diagnóstico $\geq 1:8$ en el nuevo mundo (Walton et al., 1972) y $\geq 1:200$ en el viejo mundo (Abdalla, 1977) se tienen resultados positi vos de 86 (Cuba Cuba et al., 1980, 1981) a 100% - - (Abdalla, 1977, Shaw y Lainson, 1977). Por otro lado, en los casos mucocutáneos la IgA se eleva relativamente más que en otros tipos de leishmaniasis. En estudios - preliminares empleando el conjugado IgA mono específico se ha demostrado una sensibilidad hasta de 94% (Antunes et al., 1972).

- En la LV, el título con valor diagnóstico es muy variable y es tomado de $\geq 1:20$ (Truong et al., 1969, -- Manweiler et al., 1978) o $\geq 1:256$ (Edrissian et al., -

1981), aunque debe ser considerado $\geq 1:400$ en una zona endémica (Abdalla, 1980) o $\geq 1:10$ si se emplea anti-IgG monoespecífico (Shaw y Lainson, 1981). Dentro de estos parámetros se tiene una sensibilidad de 75 (Quilici et al., 1968, Edrissian et al., 1981) a 100% (Truong et al., 1969, Rezai et al., 1977), especificidad de 86 a 100% (Badaro et al., 1983) y reproducibilidad de 98 a 100% (Pappas et al., 1983a) dependiendo del Ag (Badaro et al., 1983, Pappas et al., 1983a).

Las raciones cruzadas pueden ser eliminadas en gran medida por la absorción del suero con el Ag heterólogo (Camargo y Rebonato, 1969).

De los métodos de aglutinación, la AD es otro de los exámenes apropiados para el diagnóstico de la leishmaniasis (Walton, 1985). El método es un poco más específico pero menos sensible que IFAT (Cuba Cuba et al., 1980). El Ag comúnmente empleado es un extracto soluble de promastigotes (Walton, 1980) y a pesar de que es una reacción específica de género, el Ag que da mejores resultados es el homólogo (Bray y Lainson, 1967, Allain y Kagan, 1975). El examen es más sensible en los casos agudos de la LC, con resultados de 58 a

81% (Allain y Kagan, 1975), en la LMC de 62 a 78% (Cuba Cuba et al., 1980, 1981), en la LV de 61 a 97% y en la LCPKA de 64 a 80% con un porcentaje de falsos positivos en todos los casos de 1 a 2% (Allain y Kagan, 1975) dependiendo del Ag y título diagnóstico.

Respecto a la IHA, en la LCPKA se obtienen mejores resultados en los casos agudos (100% de especificidad) que en los casos crónicos. Tomando ambos casos la sensibilidad disminuye hasta 60% al título diagnóstico $\geq 1:64$ (Ghose et al., 1980, Haldar et al., 1981, 1983). En la LMC, los resultados positivos son hasta de 91% al título diagnóstico $\geq 1:80$ (Antunes et al., 1972).

La AP, se emplea en el diagnóstico de la LV americana. Este método es altamente sensible y específico - (100%) con el Ag heterólogo BCG, sin que se presenten reacciones cruzadas con enfermedad de Chagas y enfermedades por micobacterias (Mayrink et al., 1972, Hawking, 1973).

La FC es otro método empleado en el diagnóstico de la leishmaniasis, la reacción no es específica de especie y se emplea para su ejecución Ag leishmanial - -

(Cahill, 1970, La Placa et al., 1975, Pappas et al., -- 1984a), Ag heterólogo: Crithidias, Strigomonas, Leptomonas (Quilici et al., 1968, Sen Grupta, 1969, Ranque et al., 1975), BCG y otros bacilos alcohol ácido resistentes (Chavez y Torrealba, 1965, Araujo y Mayrink, 1968). Estos últimos resultan tan sensibles y específicos como el Ag homólogo (Mayrink et al., 1972, Oelerich et al., 1974).

En la LC, la FC no es el método más apropiado para fines diagnósticos puesto que el título de Ac es generalmente bajo, aún en los casos con marcada reacción ganglionar (Troung et al., 1969, Ranque et al., 1975, - Menzel y Bienzel, 1979). En la LV a pesar de que la -- sensibilidad es comprometida por las reacciones cruzadas y anticomplementarias (Pappas et al., 1984a), se obtienen resultados positivos de 80 (Mansueto et al., -- 1975) a 100% (Chavez y Torrealba, 1965) dependiendo del Ag (Mannweiler et al., 1978) y título diagnóstico que - es tomado de $\geq 1:4$ (Mannweiler et al., 1978) o $\geq 1:100$ (Quilici et al., 1968, Ranque et al., 1975).

Otro de los métodos altamente sensibles pero algo menos específico que el IFAT es la técnica de ELISA --

(Anthony et al., 1980, Roffi et al., 1980), la cual emplea como Ag un extracto crudo o promastigotes enteros (Hommel et al., 1978, Voller et al., 1981, Mohamed et al., 1985). El examen es interpretado visual o espectrofotométricamente. El título de Ac es ligeramente -- más alto si se emplean promastigotes enteros (Mohamed et al., 1985), la sensibilidad se mejora con la combinación de ELISA-IgM e -IgG (Said y Rachid, 1985) y en algunos casos resulta mejor el Ag heterólogo L. braziliensis (Guimaraes et al., 1981).

La sensibilidad en la LC a una $A \geq 0.4$ (Edrissian y Darabian, 1979) o diluciones $\geq 1:10$ (Guimaraes et al., 1981, 1984) es de 72 a 97% (Roffi et al., 1980, Andrade et al., 1984), en la LCPKA al título diagnóstico $\geq 1:200$ la sensibilidad es de 95 a 100% (Ghose et al., 1980, Haldar et al., 1981) y en la LMC es de 76 a 100% (Guimaraes et al., 1981). En estudios preliminares de la LMC con el Ac IgA monoespecífico, la sensibilidad es de 57%, especificidad de 87% y valor predictivo de 72% (Shaw y Lainson, 1981, Guimaraes et al., 1984).

En la LV, a diluciones $\geq 1:200$ (Haldar et al., 1983) o $\geq 1:27\ 000$ (Jahan y Diesfeld, 1983) y $A \geq 0.12$ -

(Luzzio et al., 1979, Cock et al., 1985) o $A \geq 0.7$ - - (Edrissian y Darabian, 1979, Xu et al., 1982) con valor diagnóstico, la sensibilidad es de 87 (Xu et al., 1982) a 100% (Jahan y Diesfeld, 1983), especificidad de 94 - (Haldar et al., 1983) a 100% (Ho et al., 1983) y reproducibilidad de 99% (Pappas et al., 1984a).

Las reacciones cruzadas son principalmente con enfermedad de Chagas hasta en 80% (Pappas et al., 1984a), 1.6% de falsos negativos y hasta 10% de falsos positivos dependiendo del área geográfica (Roffi et al., 1980, Guimaraes et al., 1981, 1984). Estas reacciones no límitan el valor de ELISA puesto que la mayoría son negativas a altas diluciones (Jahan y Diesfeld, 1983) o son eliminadas absorbiendo el suero con epimastigotes de -- Trypanosoma en el caso de tripanosomiasis (Camargo y -- Rebonato, 1969, Pappas et al., 1984a).

Los métodos de precipitación no son empleados en la LC sin embargo, en la LCD la ID tiene una sensibilidad de 60% siendo más específico el Ag heterólogo L. - braziliensis (Chavez, 1970). En la LMC ofrecen alternativas diagnósticas, especialmente en el Viejo Mundo donde el título de Ac es más alto que en el Nuevo Mundo --

(Abdalla, 1977). El mejor método es la ID con sensibilidad de 82% y la CIEP con 75% (Abdalla, 1977). En la LV, estas reacciones se consideran de elección para estudios epidemiológicos (Ranque et al., 1975, Mansueto et al., 1982), con mejores resultados si se emplea el Ag homólogo (Oelerich et al., 1974). La IEP, método específico pero bajo en sensibilidad, muestra arcos de precipitación característicos que no se presentan con suero de otras enfermedades (Le Ray et al., 1973, - - Rassam y Al Mudhaffar, 1980b), la CIEP es altamente sensible y específica con resultados de 80 a 100% (Rezai et al., 1977, Rassam y Al Mudhaffar, 1980b) dependiendo del Ag (Mansueto et al., 1978) y/o curso de la enfermedad (Andreoli et al., 1985). La IED, muestra arcos de precipitación constantes y característicos que pueden ser comparados con sueros de referencia positivos (Monjour et al., 1978), y con sensibilidad y especificidad de 100% (Kohanteb et al., 1980). Por otro lado - la CIED, muestra líneas de precipitación diferentes de un paciente a otro resultando poco sensible y específica (Kohanteb et al., 1980, 1984).

Recientemente, se implementó un método inmunoenzimático (Dot-ELISA) para el diagnóstico de la IV, el - -

cual es tan sensible y específico como la técnica tradicional de ELISA (Pappas et al., 1983b, 1984a). Sin embargo, esta es más rápida y conservativa en Ag y no requiere aparatos sofisticados. (Pappas et al., 1984a). Otra ventaja es que se disminuye el porcentaje de falsos positivos en el caso de tripanosomiasis con el uso de anti-IgG cadena pesada específica hasta en 60% (Pappas et al., 1985a). Respecto a la LCD, también se ha empleado el Dot-ELISA en estudios experimentales, demostrando títulos hasta de 1:2000 o más (Lebrija comunicación personal) lo cual contrasta con reportes previos.

La IDR a la leishmanina (promastigotes muertos y preservados en fenol), es un examen de piel análogo a la tuberculina o lepromina los cuales expresan DTH al Ag. El examen es sensible pero no específico (Fife, 1971, Zuckerman, 1975) y varias cepas de Leishmania y Trypanosoma, así como sus productos metabólicos se han empleado como Ags (Pampiglione et al., 1975, Neal y Miles, 1976, Shaw y Lainson, 1976). Las variantes comúnmente examinadas han sido descriptivas de tiempo, lugar y persona (Southgate y Oriedo, 1967). El examen muestra algunas diferencias: reacción más marcada dependiendo del sexo, edad y ocupación (Pampiglione et al., 1975).

La sensibilidad en la LC va de 80 a 100% (Walton, 1985) y la reacción es más marcada en pacientes con lesiones múltiples que en aquellos con lesiones simples - (Shaw y Lainson, 1974, Zeledon et al., 1976), en la LR la reacción de DTH ocurre en 100% de los casos, algunos con reacción tipo Arthus (Ardehali et al., 1980, Azadeh et al., 1985), en la LCPKA la respuesta es muy variada pero usualmente los casos agudos exhiben mejor CMI - - (Haldar et al., 1981), en la LMC, los casos recientes son negativos y se tornan positivos conforme progresa la enfermedad, siendo más reactivos cuando están involucradas las mucosas (Castro et al., 1972, Zeledon et al., 1976). Por otro lado, los descendientes de africanos muestran mayor reactividad a los Ag leishmaniales que los indígenas americanos (Aston y Thorley, 1970, Walton y Valverde, 1979). Tanto en la LCD como en la LV, la anergia específica es muy marcada (Convit y Kerdel, - - 1965, Zuckerman, 1975) y solo después de la curación es positivo (Bryceson, 1970, Manson, 1971, Pampiglione et al., 1975, Fuller et al., 1976). En la LV la IDR se emplea para valorar la incidencia presente, pasada y futura (Pampiglione et al., 1975) puesto que la IDR varía inversamente con la incidencia de LV (Southgate y Oriedo, 1976).

En resumen, la identificación del agente causal - en la leishmaniasis es concluyente. Sin embargo, este método no es enteramente confiable en los casos donde - los parásitos son escasos o están ausentes, a pesar de la severidad de la enfermedad (Voller et al., 1976, -- Abdalla, 1977, Kagan, 1979, Pappas et al., 1984a). Los exámenes serológicos se han empleado como sustitutos -- de gran ayuda, pero la gran mayoría presenta reacciones cruzadas en grados variables en zonas endémicas donde - coexisten otras enfermedades tropicales (Fife, 1971, -- Ranque et al., 1975, Zuckerman, 1975). Por otro lado, la IDR se ve afectada por la infección con cepas de - - Leishmania no patógenas o por la resistencia del huésped a cepas patógenas (Southgate y Oriedo, 1976).

La preparación y utilización de Ac monoclonales - específicos de especie (Pratt et al., 1982, Jaffe, 1984) y aún específicos de etapa (Jaffe y Pratt, 1983) pueden incrementar la seguridad y sensibilidad de los métodos serológicos (Jaffe, 1984). Así, el panel de Ag específicos y Ac monoclonales podrán ser usados para distinguir especies y subespecies de Leishmanias que pueden - ser de gran utilidad tanto para el diagnóstico directo (Pratt y David, 1981, Jaffe, 1984) como para estudios - clínicos y epidemiológicos (Pratt et al., 1982).

CAPITULO VCONCLUSIONES

El diagnóstico de la leishmaniasis en los focos - endémicos se ha basado por mucho tiempo en el antecedente epidemiológico, cuadro clínico, evolución y estudios histopatológicos (especialmente para descartar otros -- procesos infecciosos). Sin embargo, la identificación directa del parásito en muestras clínicas es concluyente del diagnóstico, pero es de poca utilidad en la LCA crónica, LR, infección por L. major, LCPKA crónica y - casos tempranos de KA. Es muy útil en la LCD, LCA aguda, infección por L. tropica, LCPKA aguda y KA crónico.

La IDR de Montenegro es de gran valor tanto para estudios epidemiológicos como diagnósticos. Así, en -- áreas endémicas de KA y en la LCD un resultado negativo indica la presencia de enfermedad activa, mientras que un resultado positivo implica curación o ausencia de enfermedad. En la LMC y LR; enfermedades hyperergicas, - la IDR es de suma importancia pero no en la LC simple - donde un resultado positivo no necesariamente implica - enfermedad activa.

Debido a que diferentes técnicas serológicas detectan diferentes títulos de Ac, para obtener máxima sensibilidad y especificidad es recomendable emplear más de un método. Sin embargo, esto dependerá de las limitaciones financieras de cada laboratorio.

De los primeros exámenes utilizados para el diagnóstico de la leishmaniasis y que algunos siguen en uso debido al mejoramiento de preparaciones antigénicas, -- además de que son relativamente fácil de realizar y que dan excelente orientación diagnóstica en la LMC del Viejo Mundo y que deben ser considerados de elección en estudios epidemiológicos en la LV, son las reacciones de precipitación de los cuales sobresalen la ID, IED, y la CIEP. Estos métodos son específicos pero poco sensibles, requieren altas cantidades de Ag, su interpretación resulta algo difícil y no son apropiados para la LCA. Por su parte, los métodos de aglutinación también son específicos pero poco sensibles. De esta manera, -- la AD es útil en la LCA, la AP resulta altamente sensible y específica en la LV americana y la IHA es apropiada en la LCPKA y LMC.

Estos exámenes son recomendables si se emplean -- conjuntamente con otros métodos inmunodiagnósticos.

El método mundialmente más popular y altamente recomendable que puede evaluarse tanto en laboratorios especializados como a nivel de campo es la técnica de - - ELISA. El método es altamente sensible y específico, - requiere pequeñas cantidades de Ag, los títulos de Ac - son significativamente más altos que los de IFAT y el resultado se obtiene el mismo día si se cuenta con placas previamente sensibilizadas con el Ag. El examen resul- ta ligeramente menos específico que IFAT. Dentro de la técnica de ELISA, una variante que ha ganado terreno especialmente en la IV es el Dot-ELISA, el método requie- re mucho menos cantidad de Ag que ELISA, los títulos de Ac son significativamente más altos y es tan sensible y específico como IFAT o el RIA.

El IFAT es el método más empleado para fines diag- nósticos y como tal el más estandarizado. Este examen- requiere mínimas cantidades de Ag, es sensible y espe- cífico pero los títulos son significativamente más bajos que los obtenidos por ELISA y aún más por los de Dot- ELISA, además de que está confinado a laboratorios bien equipados.

La respuesta a la quimioterapia seguida de un exa

men serológico para monitorear el título de Ac es apropiado para evaluar el tratamiento y es altamente recomendable en la LMC y LV. En este tipo de leishmaniasis un resultado seropositivo implica enfermedad activa o tratamiento inadecuado, en la LC, tiene valor limitado debido a que los Ac son de larga duración por lo que el resultado debe interpretarse con precaución.

A nivel mundial el empleo de diferentes especies de Leishmanias como Ag, a dado una amplia variedad de resultados y puesto que los parámetros (sensibilidad, especificidad, valor predictivo y reacciones cruzadas) esenciales para evaluar cualquier procedimiento inmunodiagnóstico dependen en gran medida del sistema antigénico, son necesarias preparaciones de referencia estandarizadas sino a nivel mundial; que es difícil, si a nivel regional. Para tal efecto es recomendable la fase de promastigote, la cual resulta más fácil y económica en su preparación, además, es la entidad que entra en contacto primeramente con el huésped.

Por otro lado, en estos sistemas generalmente se hace uso de un conjugado polivalente (Ig anti-humano) sin saber que tipo de Ig es responsable de resultados -

positivos, por lo que es necesario adoptar en el futuro (empleado con excelentes resultados en algunos exámenes preliminares) el Ac monoclonal, IgG cadena pesada específica o el Ac monoespecífico, para obtener resultados_ altamente satisfactorios.

Por medio del RIA, recientemente se han demostrado Ag circulantes excretados por el parásito en sangre del huésped, por lo que en adelante si se requiere un examen parasitológico directo será necesario demostrar estos -- Ag, mientras que, cualquier inmunoensayo de Ac solo servirá como diagnóstico presuntivo.

En México, el diagnóstico de la leishmaniasis se ha basado en el cuadro clínico inicial, antecedente epidemiológico, estudios histopatológicos y la IDR de Monte negro por lo que es necesario y urgente, técnicas serológicas tanto para estudios epidemiológicos como para el diagnóstico clínico individual. Puesto que, el título de Ac en la LC mexicana (por los pocos informes reportados) es bajo o insignificante, se requieren métodos altamente sensibles y específicos, siendo recomendables el IFAT, ELISA o sus variantes. Sin embargo, estos deberán estandarizarse, si es necesario de acuerdo a parámetros_

propios de cada región endémica.

Claramente los métodos mencionados (cuadro clínico, antecedente epidemiológico, estudios histopatológicos e IDR) aunque de gran utilidad, no siempre son contundentes en la investigación epidemiológica y diagnóstica de la enfermedad debido a que el cuadro clínico -- puede semejar otros procesos infecciosos o complicarse por infecciones secundarias y pasar desapercibida. Respecto a la IDR, por ejemplo puede ser positiva por la infección con cepas no patógenas o ser negativa por la resistencia del huésped a cepas patógenas. Por otro lado, en algunos tipos de leishmaniasis o en el curso de estas el número de parásitos puede ser escaso y no ser demostrado en frotis o cultivo, además de que la toma de muestra es peligrosa y desagradable para el paciente. En tales condiciones los exámenes serológicos son de -- gran utilidad, por lo que el diagnóstico, "diagnóstico integral" deberá consistir del cuadro clínico mencionado, examen parasitológico directo, IDR y el examen serológico, aunado a la quimioterapia.

BIBLIOGRAFIA

1. Abdalla, R. E. (1977). Inmunodiffusion, counterimmuno-electrophoresis and immunofluorescence in diagnosis of Sudan mucosal leishmaniasis. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 26 (6), 1135-1138.
2. Abdalla, R. E. (1980). Serodiagnosis of visceral leishmaniasis in an endemic area of the Sudan. Annals of Tropical Medicine and Parasitology 74 (4), 415-419.
3. Abdalla, R. E., Ali, M., Wasfi, A. I. y El Hassam, A. M. (1973). Cutaneous leishmaniasis in the Sudan. Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 67 (4), 549-559.
4. Abdalla, R. E., El Amin, A., Ahmed, M. A. y El Hassam, A. M. (1975). Sudan mucosal leishmaniasis. Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 69, 443-449.
5. Afchain, D., Desjeux, P., La Fuente, C., Le Ray, D. y Cesbron, J. I. (1983). Especific IgE antibodies to Leishmania braziliensis in patients with mucocutaneous leishmaniasis. Annals of Immunology 134c, 331-319.
6. Al Alousi, I. T., Latiff, A. M. B. y Al Shenawi, F. A. (1980). Detection of antibodies to Leishmania in dried blood on filter paper by indirect fluorescent antibody test. Annals of Tropical Medicine and Parasitology 74 (5), 503-506.
7. Alexander, J. y Phillips, R. S. (1978). Leishmania tropica and Leishmania mexicana: Cross immunity in mice. Experimental Parasitology 45 (1), 93-100.
8. Allain, S. D. y Kagan, G. I. (1975). A direct agglutination test for leishmaniasis. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 24 (2); 232-236.
9. Alsina, M. (1982) ¿Cuál es su diagnóstico? Medicina Cutánea Ibero Latino Americana 10 (5), 353-354.

10. Anderson, D. C., Buckner, R. G., Glenn, B. L. y Mac Vean, D. Q. (1980). Endemic canine leishmaniasis. Veterinary Pathology 17, 94-96.
11. Andrade, N. F., García, M. M. R., Cruz R. A. N., Canto, S. B. y Simmonds, D. E. (1984). Estudio preliminar de correlación clínica histopatológica e inmunológica de la leishmaniasis cutánea mexicana en el hombre. Archivos de Investigación Médica (México) 15, 267-280.
12. Andre, L. J., Sirol, J., Vourch, L. E., La Begorre, J. V. y Cochevelou, D. (1978). Kala-azar Soudanais en Afrique de l'ouest. Medicine Tropicale 38 (4), 435-442.
13. Andreoli, A., Cambie, M., Manzoni, D., Bonara, G., Gargantini, G., Giaracuni, G., y Perletti, L. (1985) Discrezione di un caso di leishmaniosi viscerale. Minerva Pediatrica 37, 479-484.
14. Anthony, L. R., Christensen, A. H. y Johnson, M. C. (1980). Micro Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for the serodiagnosis of New World leishmaniasis. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 29 (2), 190-194.
15. Antunes, J. L., Reis, P. A., Tavares, P.A.C. y Pellegrino, J. (1972). Dosagem das imunoglobulinas e recao de hemaglutinacao passiva em pacientes com leishmaniose cutaneo-mucosa. Revista del Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo 14 (3), 203-206.
16. Araujo, G. F. y Mayrink, W. (1968). Fluorescent antibody test in visceral leishmaniasis II. Study on the specificity of the test. Revista del Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo 10 (1), 41-45.
17. Ardehali, S., Sodeiphy, M., Haghghi, P., Rezai, H. y Vollum, D. (1980). Studies on the chronic (Lupoid) leishmaniasis. Annals of Tropical Medicine and Parasitology 77 (4), 439-445.
18. Arias, J. R., Naiff, R. D., Miles, M. A. y Sousa, A. A. (1981). The opossum Didelphis marsupialis (Marssupiiata; Dideiphidae) as a reservoir host of Leishmania braziliensis guyanensis in the Amazon basin of Brazil. Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 75 (4), 534-541.

19. Aston, L. D. y Thorley, P. A. (1970). Leishmaniasis in central Brazil: results of the Montenegro skin test among Amerindias in the Xingu National Park. Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 64 (5), 671-678.
20. Azadeh, B. (1985). "Localized" leishmania linfadenitis: a light and electron microscopic study. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 33 (3), 447-455.
21. Azadeh, B., Samad, A. y Ardehali, S. (1985). Histological spectrum of cutaneous leishmaniasis due to Leishmania tropica. Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 79, 631-636.
22. Azogue, C. E. (1983). Diagnóstico histopatológico de la leishmaniasis cutánea y cutáneo-mucosa en Bolivia. Memorias del Instituto Oswaldo Cruz 78 (1), 13-20.
23. Azulay, D. R., Monteiro, M. y Vaz, M. E. (1968). Imunofluorescencia na leishmaniose tegumentar. Anais Brasileiro de Dermatologia 43, 76-77.
24. Badaro, R., Reed, G. S. y Carvalho, M. E. (1983). Immunofluorescent antibody test in American Visceral Leishmaniasis: sensitivity and specificity of different morphological forms of two Leishmania species. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 32, 277-285.
26. Behforous, N., Rezai, H. y Gettner, S. (1976). Application of immunofluorescence to detection of antibody in Leishmania infection. Annals of Tropical Medicine and Parasitology 70 (3), 293-301.
27. Belehu, A., Louis, J. A., Pujin, P. y Miescher, P. A. (1980). Immunological aspects of leishmaniasis. Springer Seminars in Immunopathology 2, 399-415.
28. Benallegue, R. y Tabbakh, E. (1978). La leishmaniose viscerale en Algerie. Medicine Tropicale 38 (4), 425-433.

29. Bittencourt, L. A., Sodre, A. y Andrade, A. I. (1968). Pesquisas de anticorpos circulantes pelo metodo de imunofluorescencia na leishmaniose tegumentar. Revista del Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo 10 (4), 217-225.
30. Blackwell, J. M., Ulczak, O. M. y Channon, L. Y. (1983). Immunogenetics and immunoregulation of parasitic infection in mice with specific reference to leishmaniasis. In Experimental Bacterial and Parasitic Infections (eds. G. Keusch y T. Wadstom), pp. 365-373. New York, Amsterdam y Oxford.
31. Blewett, T. M., Kadivar, D.M.H. y Sulzby, E.J.L. (1971). Cutaneous leishmaniasis in the guinea pig. Delayed type-hypersensitivity, lymphocyte stimulation, and inhibition of macrophage migration American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 20 (4), 545-551.
32. Bobin, P., Barabe, P., Bordahandy, R., Calzolari, M. y Dedet, P. J. (1978). La leishmaniose cutanee en Algerie, Medicine Tropicale 38 (4), 419-424.
33. Bonfante, G. R., Torres, R. y Morillo, N. (1981). Phlebotomidae en una zona de leishmaniasis tegumentaria difusa en Venezuela. Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana 90 (5), 410-414.
34. Bonfante, G. R. (1983). Leishmanias y leishmaniasis en América Latina. Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana 95 (5), 418-426.
35. Bradley, D. J. (1977). Regulation of Leishmania population within the host. II. Genetic control of acute susceptibility of mice to Leishmania donovani infection. Clinical of Experimental Immunology 30, 134-140.
36. Bradley, D. J., Taylor, B. A., Blackwell, J. M., Evans, E. P. y Freeman, J. (1979). Regulation of Leishmania population within the host. III. Mapping of the locus controlling susceptibility to visceral leishmaniasis in the mous. Clinical of Experimental Immunology 37, 7-14.

37. Bray, S. R. y Lainson, R. (1966). The immunology and serology of leishmaniasis IV. Results of Ouchterlony double diffusion test. Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 60 (4), 605-609.
38. Bray, S. R. y Lainson, R. (1967). Studies on the immunology and serology of leishmaniasis V. The use of particles as vehicle in passive agglutination test. Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 61 (4), 490-505.
39. Bryceson, A. D. M. (1969). Diffuse cutaneous leishmaniasis in Ethiopia I. The clinical and histological features of the disease. Transaction of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 63, 708-737.
40. Bryceson, M. D. A. (1970). Immunological aspects of clinical leishmaniasis. Proceeding of the Royal Society of Medicine 63, 1056-1062.
41. Cahill, M. K. (1970). Field techniques in the diagnosis of kala-azar. Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 64 (1), 107-110.
42. Camargo, E. M. y Rebonato, C. (1969), Cross-reactivity in fluorescent test for Trypanosomiasis and Leishmaniasis. A simple inhibition procedure to ensure specific results. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 18 (4), 500-505.
43. Camisa, C., Plouffe, J., Parks, A. y Green, B. (1985). Cutaneous leishmaniasis - Ohio. M. M. W. R. 254 (10), 1295.
44. Carrada, B. T. (1979a). Epidemiología de la leishmaniasis cutánea en México. Medicina al Día (IMSS) 2, 45.
46. Carrada, B. T. (1984). Las leishmaniasis en los niños: Progresos recientes. Boletín del Hospital Infantil de México 41 (7), 356-362.

47. Carvalho, M. E., Teixeira, S. R. y Jhonson, D. W. Jr. (1981). Cell-mediated immunity in American Visceral Leishmaniasis: Reversible immunosuppression during acute infection. Infection and Immunity 33 (2), 498-502.
48. Castro, M. R., Manni, N. M. E., Ermetice, N. E. L. y Toyada, K. (1972). The positivation of the Montenegro test during the treatment of mucocutaneous leishmaniasis. Revista del Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo 14 (5), 338-338.
49. Chance, M. L. (1981). Leishmaniasis. The British Medical Journal 283, 1245-1246.
50. Chavez, J. J. (1970). Immuno-diffusion reaction among various samples of Leishmanias. Acta Científica Venezolana 21, 68-70.
51. Chavez, J. J. y Torrealba, W. J. (1965). Leishmaniasis visceral humana: sud iagnóstico por la reacción cuantitativa de fijación de complemento en gotas. Acta Científica Venezolana 16, 613-614
52. Chiari, A. C., Magalhães, A. P. y Mayrink, W. (1973b). Pesquisa de anticorpos por imunofluorescencia, em soros de pacientes com leishmaniose Tegumentar Americana apresentado lesões cutaneas recientes. Revista del Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo 15 (5), 304-309.
53. Chiari, A. C., Mayrink, W. y Magalhães, A. P. (1973a). Reacao de imunofluorescencia indirecta no controle de tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana. Revista del Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo 15 (5), 298-303.
54. Childs, E. G., Foster, K. A. Y McRoberts, J. M. (1978). Insect cell culture media for the cultivation of New World Leishmania. International Journal for Parasitology 8, 255-258.
55. Childs, E. G., McRoberts, J. M. y Foster, K. A. (1976). Partial purification of amastigotes from cutaneous lesions of American Leishmaniasis. Journal of Parasitology 62 (5), 672-679.

56. Christensen, A. M. y Herrer, A. (1972). Detection of Leishmania braziliensis by xenodiagnostic. Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 66 (5), 798-799.
57. Chulay, D. J. y Bryceson, D. M. A. (1983). Quantitation of amastigotes of Leishmania donovani in smear of splenic aspirates from patients with visceral leishmaniasis. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 32 (3), 475-479.
58. Clayton, J. R. (1971). Leishmaniasis. Lancet 1, 194.
59. Cock, K. M., Hodgen, A. N. Channon, J. Y., Siougek, T. K., Lucas, S. F. y Ress, P. H. (1985). Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for the diagnosis of visceral leishmaniasis in Kenya. Journal of Infectious diseases 151 (4), 450-452.
60. Coelho, M. V. y Coutinho, A. E. (1965). Experimental cutaneous leishmaniasis. Infection of albino mice y Syrian hamster by Leishmania mexicana. Revista de Medicina Tropical de Sao Paulo 7, 136-144.
61. Convit, J. y Kerdel, V. F. (1965). Disseminated cutaneous leishmaniasis. Archives of Dermatology 91, 439-447.
62. Crocker, R. P., Blackwell, M. J. y Bradley, J. D. (1984). Expression of the natural resistance gene Lsh in resident liver macrophages. Infection and Immunity 43 (3), 1033-1040.
63. Cuba Cuba, A. C., Marsden, D. P., Barreto, C. A., Rocha, R., Sampaio, R. y Patzloff, L. (1980). Diagnóstico parasitológico e imunológico de Leishmaniasis Tegumentaria Americana. Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana 89 (3), 195-206.
64. Cuba Cuba, A. C., Marsden, D. P., Barreto, C. A., Rocha, R., Sampaio, R. y Patzloff, L. (1981). Parasitologic and immunologic diagnostic of American (mucocutaneous) Leishmaniasis. Bulletin of Pan-American Health Organization 15 (3), 249-259.
65. Curban, G. B. y Brito, A. (1969). Intradermorreacao de Montenegro negativa na leishmaniose tegumentar americana. Medicina Cutanea 3, 565-568.

66. Daneshbod, K. (1972). Visceral leishmaniasis (kala-azar) in Iran: A pathologic and electron microscopic study. American Journal of Clinical Pathology 57, 156-166.
67. Daneshbod, K. (1978). Localized lymphadenitis due to Leishmania simulating toxoplasmosis. Value of electron microscopy for differentiation. American Journal of Clinical Pathology 69, 462-467.
68. Davalos, M. A., Ruiz, B. C., Gasca, F. E. y Morales, C. M. (1968). Infección experimental con cepas mexicanas del agente causal de la leishmaniasis cutánea. Salud Pública de México 10 (2), 159-171.
69. Desjeux, P., Santoro, F., Afchain, D., Loyens, M. y Capron, A. (1980). Circulating immune complex and anti-IgG antibodies in mucocutaneous leishmaniasis. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 29 (2), 195-198.
70. Dowlati, Y. (1979), Cutaneous leishmaniasis. International Journal of Dermatology 18 (5), 362-368.
71. Edrissian, Gh. H. y Darabian, P. (1979). A comparison of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Indirect Fluorescent Antibody Test in the serodiagnosis of cutaneous y visceral leishmaniasis in Iran. Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 73 (3), 289-292.
72. Edrissian, G. H., Darabian, P., Zovein, Z., Rasti, S.M.A. y Nadim, H. (1981). Application of indirect fluorescent antibody test in the serodiagnosis of cutaneous and visceral leishmaniasis in Iran. Annals of Tropical Medicine and Parasitology 75 (1), 19-24.
73. El On, J., Zehavi, U., Avraham, H., y Greenblatt, Ch. L. (1983). Leishmania tropica and Leishmania donovani: Solid phase radioimmunoassay using leishmanial Excreted Factor. Experimental Parasitology 55 (2), 270-279.
74. Farah, S. F. y Malak, A. J. (1971). Cutaneous leishmaniasis. Archives of Dermatology 103, 467-474.

75. Farah, F. S., Samara, S. A. y Nuwayari, S. N. (1975). The role of the macrophages in cutaneous leishmaniasis. Immunology 29, 755-764.
76. Fiennes, R. N. (1978). Zoonoses and the origins and ecology of human diseases, pp. 117-118. London, New York y San Francisco. Academic Press.
77. Fife, H. E. Jr. (1971). Advances in methodology for immunodiagnosis of the parasitic diseases. Experimental Parasitology 30, 132-163.
78. Flemming, J. B., Pappas, M. G., Keenan, M. Ch. y Hockmeyer, W. T. (1984). Immune complex descomplementation of canine sera for use in complement-fixation test for diagnosis of visceral leishmaniasis. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 33 (4), 553-559.
79. Freeman, K. y de-Melo, W. (1984). Leishmanin skin test in the diagnosis of American cutaneous leishmaniasis. International Journal of Dermatology 24 (1), 52-53.
80. Fuller, K. G., Lemma, A. y Haslet, T. (1980). A comparison of skin test responses using antigen from Leishmania donovani and lizard trypanosome. Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 74 (2), 205-208.
81. Fuller, K. G., Lemma, A., Haile, T. y Atwood, L. C. (1979). Kala-azar in Ethiopia. I. Leishmanin skin test in Setit Humera, a kala-azar endemic area in Northwestern Ethiopia. Annals of Tropical Medicine and Parasitology 70 (2), 147-163.
82. Fuller, K. G., Lemma, A., Haile, T. y Geneda, N. (1976). Kala-azar in Ethiopia; survey of Southwest Ethiopia. Leishmanin skin test and epidemiological studies. Annals of Tropical Medicine and Parasitology 73 (5), 417-431.
83. Furtado, T. (1973). Immunology of American Leishmaniasis. International Journal of Dermatology 12 (2); 88-94.
84. Garrido, A. J. (1969). El diagnóstico inmunológico de las leishmaniasis. Medicina Tropical (Madrid) 45, 189-200.

85. Gendron, Y., Laroche, R. y Sirol, J. (1978). Une leishmaniose viscerale de diagnostic parasitologique difficile avec complication imprevises. Medicina Tropicale 38 (4), 443-445.
86. Ghose, C. A., Haldar, P. J., Mishra, P. B. y Mishra, K. K. (1980). Serological investigation of Indian kala-azar. Clinical of Experimental Immunology 40, 318-326.
87. Godfrey, D. G. (1978). Identification of economically important parasites. Nature 273, 600-603.
88. Green, M. S., Kark, J. D., Greenblatt, C. L., Lodner, N. V., Frankenburg, S. y Jacobson, R. (1983). The cellular and humoral immune response in subjects vaccinated against cutaneous leishmaniasis using Leishmania tropica major promastigotes. Parasite Immunology 5, 337-344.
89. Grimaldi, J. C., Moriearty, L. P. y Hoff, R. (1980). Leishmania mexicana. Immunology and histopathology in C₃H mice. Experimental Parasitology 50, 45-56.
90. Guimaraes, S. M. C., Celeste, J. B., de Castilho, A. E., Mineo, R. J. y Diniz, P. J. M. (1981). Immuno-enzymatic assay (ELISA) in mucocutaneous leishmaniasis, kala-azar and chagas disease: an epimastigote Trypanosoma cruzi antigen able to distinguish between antitrypanosoma and anti-leishmania antibodies. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 30 (5), 942-947.
91. Guimaraes, S. M. C., Ferreira, W. A., Cruce, C. L., Carvalho, B. M., Celeste, J. B. y Belda, W. (1984). Anti-leishmania IgA immunoenzymatic assay in mucocutaneous leishmaniasis (preliminary report). Revista del Instituto de Medicina Tropical do Sao Paulo 26 (6), 352-356.
92. Guimaraes, S. M. C., Giovannini, V. L. y Camargo, E. M. (1974). Antigenic standarization for mucocutaneous leishmaniasis immunofluorescent test. Revista del Instituto de Medicina Tropical do Sao Paulo 16 (3), 145-148.

93. Hadman, E., Cereding, R. y Mitchell, G. F. (1979). Murine cutaneous leishmaniasis: disease patterns in intact and nude mice of various genotypes and examination of some differences between normal and infected macrophages. Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science 57 (1), 9-29.
94. Haidaris, G. C. y Bonventre, F. P. (1982). A role for oxygen-dependent mechanism in killing of Leishmania donovani tissue forms by activated macrophages. Journal of Immunology 129 (2), 850-855.
95. Haldar, P. J., Saha, C. K. y Ghose, C. A. (1981). Serological profiles in Indian post-kala-azar dermal leishmaniasis. Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 75 (4), 514-517.
96. Haldar, P. J., Saha, C. K., Ghose C. A. y Ghose, S. (1983). Cell-mediated immune response in Indian kala-azar and post-kala-azar dermal leishmaniasis. Infection and Immunity 42 (2), 702-707.
97. Hadking, F. (1973). Leishmaniasis. Tropical Diseases Bulletin 75, 228.
98. Hedge, E. C., Moody, H. A. y Ridley, S. D. (1978). An easily cultured Crithidia spp. as antigen for immunofluorescent test for kala-azar. Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 72 (4), 445.
99. Hendricks, L. y Wright, N. (1979). Diagnosis of cutaneous Leishmaniasis by in vitro culture of saline aspirates in Schneider drosophila medium. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 28 (6), 962-964.
100. Herman, R. (1965). Fluorescent antibody studies on the intracellular form of Leishmania donovani grown in cell culture. Experimental Parasitology 17, 218-228.

93. Hadman, E., Cereding, R. y Mitchell, G. F. (1979). Murine cutaneous leishmaniasis: disease patterns in intact and nude mice of various genotypes and examination of some differences between normal and infected macrophages. Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science 57 (1), 9-29.
94. Haidaris, G. C. y Bonventre, F. P. (1982). A role for oxygen-dependent mechanism in killing of Leishmania donovani tissue forms by activated macrophages. Journal of Immunology 129 (2), 850-855.
95. Haldar, P. J., Saha, C. K. y Ghose, C. A. (1981). Serological profiles in Indian post-kala-azar dermal leishmaniasis. Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 75 (4), 514-517.
96. Haldar, P. J., Saha, C. K., Ghose C. A. y Ghose, S. (1983). Cell-mediated immune response in Indian kala-azar and post-kala-azar dermal leishmaniasis. Infection and Immunity 42 (2), 702-707.
97. Hacking, F. (1973). Leishmaniasis. Tropical Diseases Bulletin 75, 228.
98. Hedge, E. C., Moody, H. A. y Ridley, S. D. (1978). An easily cultured Crithidia spp. as antigen for immunofluorescent test for kala-azar. Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 72 (4), 445.
99. Hendricks, L. y Wright, N. (1979). Diagnosis of cutaneous Leishmaniasis by in vitro culture of saline aspirates in Schneider drosophila medium. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 28 (6), 962-964.
100. Herman, R. (1965). Fluorescent antibody studies on the intracellular form of Leishmania donovani grown in cell culture. Experimental Parasitology 17, 218-228.

101. Herrero, A. y Christensen, H. A. (1976). Natural cutaneous leishmaniasis among dogs in Panama. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 25 (1), 59-63.
102. Ho, M., Leeuwenburg, J., Mbugua, G., Wamachi, A. y Voller, A. (1983). An Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for field diagnosis of visceral leishmaniasis. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 32 (5), 943-946.
103. Hockmeyer, W. T., Kager, P. A., Rees, P. H. y Hendricks, L. D. (1981). The culture of Leishmania donovani in Schneiders insect medium: its value in the diagnosis and management of patients with visceral leishmaniasis. Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 75 (6), 861-863.
104. Hommel, M. (1976). Enzymeimmunoassay in leishmaniasis. Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 70 (1), 15-16.
105. Hommel, M., Peters, W., Ranque, J., Quilici, M. y Lanotte, G. (1978). The micro-ELISA technique in the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. Annals of Tropical Medicine and Parasitology 72 (3), 213-218.
106. Hoover, L. D., Berger, M. Nancy, A. C., Hockmeyer, T. W. y Meltzer, S. W. (1984). Killing of Leishmania tropica amastigotes by factors in normal human serum. Journal of Immunology 132 (2), 893-897.
107. Howard, J. C., Hale, C. y Chang, L. W. L. (1980). Immunological regulation of experimental cutaneous leishmaniasis: I. Immunogenetic aspects of susceptibility to Leishmania tropica in mice. Parasite Immunology 2, 303-304.
108. Imperato, P. J. y Diakite, S. (1969). Leishmaniasis in the Republic of Mali. Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 63, 236.

109. Imperato, J. P., Fontana, B. y Sow, O. (1973). Positive leishmanin skin sensitivity in the absence of clinical leishmaniasis. Journal of Tropical Medicine and Hygiene 76 (3), 132-134.
110. Informe General de Actividades: Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales (ISET): (1985).
111. Jadin, J., Le Ray, D. y Fameree, L. (1969). Diagnostic de la leishmaniose viscerale par la reaction de l'inhibition de la culture. Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique 62, 334-339.
112. Jahn, A. y Diesfeld, J. H. (1983). Evaluation of visually read ELISA for serodiagnosis and seroepidemiological studies of kala-azar in Varingo Distrit Kenya. Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 77 (4), 451-454.
113. Jaffe, C. L. (1984). Production and characterization of species-specific monoclonal antibodies against Leishmania donovani for immunodiagnosis. Journal of Immunology 133 (1), 440-447.
114. Jaffe, C. L. y McMahon, P. D. (1983). Monoclonal antibodies specific for Leishmania tropica. I. Characterization of antigens associated with stage and species-specific determinants. Journal of Immunology 131 (4), 1987-1993.
115. Jones, L., Davies, S. N., Newland, A. C. y Jenkins, G. C. (1985). A narrow escape from splenectomy. British Medical Journal 290, 687-688.
116. Kagan, G. I. (1979). Diagnostic, epidemiologic and experimental parasitology: immunologic aspects. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 28 (3), 429-439.
117. Kager, P. A. (1984). Visceral leishmaniasis: clinical manifestations, diagnosis and treatment. Acta Leidensia 52 (1), 31-39.
118. Kohanteb, J., Ardehali, S. y Rezai, R. H. (1980). Studies on antigenic relationship of Leishmania promastigotes by electroimmunodiffusion and crossed-electroimmunodiffusion test.

119. Kohanteb, J., Rezai, R. H. y Ardehali, S. (1984). Application of electroimmunodiffusion and crossed-electroimmunodiffusion test for the diagnosis of visceral leishmaniasis. Journal of Tropical Medicine and Hygiene 87, 201-205.
120. Krampitz, H. E., Loeschnert, G. W. y Pruefer, L. (1981). Evaluation of antigens for serodiagnosis of kala-azar and oriental sore by means of the IFAT. Infection 9 (6), 264-267.
121. Kurban, A. K., Malak, J. A., Farah, F. S. y Chaglassian, H. T. (1966). Histopathology of cutaneous leishmaniasis. Archives of Dermatology 93, 396.
122. La Placa, M., Pampiglione, S., Bogartti, M. y Zerbini, M. (1975). Complement fixation and intradermal skin test with partially purified "proteic" and "polysaccharidic" antigens from Leishmania donovani. Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 69 (4), 396-398.
123. Lagerholm, B., Gip, L. y Lodin, A. (1968). The histopathological and cytological diagnosis of cutaneous leishmaniasis in two cases of Leishmania tropica. Acta Dermato-Venerologica 48, 600-607.
124. Lainson, R. y Shaw, J. J. (1972). Leishmaniasis of the New World. Taxonomic problems. British Medical Bulletin 28 (1), 44-48.
125. Lainson, R. y Shaw, J. J. (1974). Las leishmanias y las leishmaniasis del Nuevo Mundo, con particular referencia al Brasil. Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana 76 (2), 93-114.
126. Lainson, R. y Shaw, J. J. (1978). Epidemiology and ecology of leishmaniasis in Latin America. Nature 273, 595-603.
127. Lainson, R. y Shaw, J. J. (1979). The role of animals in the epidemiology of South American leishmaniasis. En Biology of Kinetoplastidae, eds. Lumsden, W. H. R. y Evans, D. A., Vol. II, pp. 1-116. London y New York: Academic Press.

128. Lainson, R., Shaw, J. J., Redy, P. D., Miles, M. A. y Pova, M. (1981). Leishmaniasis in Brazil XVI. Isolation and identification of leishmania species from sandflies wild mammals and man in North Para State with particular reference to Leishmania braziliensis guyanensis causative agent to "pian bois". Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 75 (4), 530-536.
129. Lainson, R., Ward, R. D. y Shaw, J. J. (1977). Experimental transmission of Leishmania chagasi causative agent of neotropical visceral leishmaniasis by Lutzomyia longipalpis. Nature 266, 298-301.
130. Laroche, R., Sirol, A. F. y Al Alousi, I. T. (1978). Les leishmanioses viscerales ou kala-azar. Medicine Tropicale 38 (4), 195-198.
131. Latif, A. M., Shenawi, A. F., y Poli, L. (1979). The indirect fluorescent antibody test for diagnosis of kala-azar infection in Iraq. Annals of Tropical Medicine and Parasitology 73 (1), 31-35.
132. Le Ray, D., Afchain, D., Jadin, J., Capron, A., Yasarol, S., Lanotte, G. y Fameree, L. (1973). Diagnostic immunoelectrophoretique de la leishmaniose viscerale a l'aide d'un extrait antigenique hydrosoluble de Leishmania donovani: resultats preliminaires. Annals of Society Belga of Medicine Tropicale 53 (1), 31-41.
133. Lebrija, R. A. comunicaci3n personal.
134. Leclerc, C., Modabber, F., Deraud, E., Djoko, T. J. y Chedi3, L. (1982). Visceral Leishmania tropica infection of BALB/c mice: Cellular analyses of in vitro unresponsiveness to sheep erythrocytes. Infection and Immunity 37 (3), 895-902.
135. Lightner, K. L., Chulay, D. J. y Bryceson, D. M. A. (1983). Comparison of microscopic and culture in the detection of Leishmania donovani from splenic aspirated. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 32 (2), 296-299.
136. Lodner, M. V., Frankenburg, S., Slutzky, G. M. y Greenblatt, Ch. L. (1983). Action of leishmanial

- excreted factor (EF) on human lymphocyte blast transformation. Parasite Immunology 5 (2), 249-256.
137. López, B. M. (1978). Diagnóstico serológico de la leishmaniasis visceral utilizando Crithidia spp como antígeno (nota preliminar). Revista de Sanidad e Higiene Pública 52, 1543-1544.
138. López, B. M. (1979). Diagnóstico serológico por inmunofluorescencia indirecta de la leishmaniasis visceral mediante la utilización del protozoo Crithidia spp como antígeno. Revista de Sanidad e Higiene Pública 53, 1109-1115.
139. López, B. M. (1980). Diagnosis and serological follow-up in three patients with visceral leishmaniasis using Crithidia spp as antigen. Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 74 (2), 283-284.
140. López, B. M., Iturriaga R. y Aparicio, M. (1979). Early serological diagnosis in visceral leishmaniasis using Crithidia spp as antigen. Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 73 (3), 348.
141. Luzzio, J. A. McRoberts, J. M. y Euliss, H. M. (1979). Quantitative estimation of Leishmania antibody titers by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. Journal of Infectious Diseases 140 (3), 370-372.
142. Lynch, R. H., Yarzabal, L., Verde, O., Avila, J. J., Monzon, H. y Convit, J. (1982). Delayed-type hypersensitivity and immunoglobulin E in American cutaneous leishmaniasis. Infection and Immunity 38 (3), 877-881.
143. Madero, L. L., Iturraga, M. R., Aparicio, M. N. y López, B. M. (1982). Complicación tardía y valor diagnóstico de la serología por "Crithidia". Anales Españoles de Pediatría 16 (1), 88-91.
144. Mahmoud, A. A. F. y Warren, K. S. (1977). Algorithms in the diagnosis and management of exotic diseases XXIV. Leishmaniasis. Journal of Infectious Diseases 136 (1), 160-163.

145. Mahuel, J. y Behin, R. (1982). Leishmaniasis: Immunity, immunopathology and immunodiagnosis. In immunology of parasitic infection (eds. S. Cohen y K. S. Warren) pp. 299-355. Oxford: Blackwell Scientific Publications.
146. Mannweiler, E., Lederer, I. y Felde, Z. (1978). Das antikörperbild bei patienten mit leishmaniosen. Zentralblatt für Bakteriologie Parasitenkunde 240, 397-402.
147. Manson, P. E. C. (1971). Leishmaniasis. International Review of Tropical Medicine 4, 123-140.
148. Mansueto, S., Migneo, G. y La Cascla, C. (1975). La reazione di fissazione del complemento con BCG nella leishmaniosi viscerale. Bollettino de Instituto Sieroter di Milan 54 (2), 140-144.
149. Mansueto, S., Miceli, M. D. y Quartararo, P. (1982). Counterimmunoelectrophoresis (CIEP) and ELISA test in diagnosis of canine leishmaniasis. Annals of Tropical Medicine and Parasitology 76 (2), 229-231.
150. Mansueto, S., Migneo, G., Trip, S. y Picone, D. M. (1980). Simplified counter-immunoelectrophoresis (CIEP) with a commercially produce antigen on cellulose acetate membrane for the diagnosis of hydatidosis. Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 74 (2) 260-261.
151. Mansueto, S., Picorne, D., Di Rosa, S. y Cascla, C. (1978). La contrainmunoelectroforesis (CIEP) nella leishmaniosi viscerale. Bollettino de Instituto Sieroter di Milan 57 (5), 622-630.
152. Marinkelle, J. C. (1980). The control of leishmaniasis. Bulletin of the World Health Organization 53, 807-818.
153. Marinkelle, J. C. (1981). The practical importance of culturing leishmania isolated from patients with cutaneous or mucocutaneous leishmaniasis. Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 75 (4), 609-610.
154. Marquez, F. I. (1966). Leishmaniasis cutánea diseminada anérgica. Presentación del primer caso observado en México. Medicina Cutánea 3, 287-292.

155. Marsden, D. P. (1979). Current concepts in parasitology. Leishmaniasis. New England Journal of Medicine 300 (7), 350-352.
156. Martínez, R. J. L., Alvarez, F. G. y Biagi, F. (1968). Presencia de la leishmaniasis cutanea generalizada en México. Revista de Investigación en Salud Pública (México) 28, 107-118.
157. Marzochi, M. C., Coutinho, G. S. Sabroza, C. P. y Sousa, S. W. (1980). Reacao de imunofluorescencia indirecta e intradermoreacao para leishmaniasis tegumentar Americana em moradores na area de Jacarepagua (Rio de Janeiro): estudio comparativo dos resultados observados em 1974 e 1978. Revista del Instituto de Medicina Tropical do Sao Paulo 22 (3), 149-153.
158. Matossian, M. R., Kurban, A. K. y Malak, A. J. (1975), Circulating antibodies in cutaneous leishmaniasis: Their detection by immunofluorescence, Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 69 (5), 450-452.
159. Mayrink, W., Araujo, G. F. y Magalhanes, A. P. (1967). Fluorescent antibody test in visceral leishmaniasis I. Sensitivity of the test. Revista del Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo 9, 172-174.
160. Mayrink, W., Chiari, C. A., Magalhanes, A. P. y Costa, A. C. (1972). Test do latex no diagnostico do calazar Americano. Revista del Instituto de Medicina Tropical do Sao Paulo 14 (4), 273-276.
161. Mayrink, W. y Magalhanes, A. P. (1969). Diagnostico do calazar I. Emprego da esplenocntracao com adrenalina. Revista del Instituto de Medicina Tropical do Sao Paulo 11 (1), 11-12.
162. Mayrink, W., Magalhanes, A. P., Batista, M. S. y da Costa, A. C. (1971). Diagnostico do calazar II. Estudo do Montenegro e pesquisa de Leishmania em material de pele proveniente de pacientes portadores de calazar, antes e apos terapeutica antimonial. Revista del Instituto de Medicina Tropical do Sao Paulo 13 (4), 268-271.

163. Melo, N. N., Mayrink, W., da Costa, A. C., Magalhães, A. P., Diaz, M., Williams, P., Araujo, G. F., Coelho, M. V. y Batista, S. M. (1977). Padronizacao do antigen da Montenegro. Revista del Instituto de Medicina Tropical do Sao Paulo 19, 161-1t4.
164. Menzel, S. y Bienzle, U. (1978). Antibody responses in patients with cutaneous leishmaniasis of the Old World. Tropenmedizin Parasitenkunde 29, 194-197.
165. Milosey, B., Daoud, H. E., Hadi, A., El hassam, A. M. y Satit, H. M. (1969). Mucosal leishmaniasis in the Sudan. Annals of Tropical Medicine and Parasitology 63 (1), 123-128.
166. Mitchell, G. F., Curtis, J. M., Hadman, E. y McKenzie, I. F. C. (1980). Cutaneous leishmaniasis in mice disease patterns in reconstituted nude mice of several genotypes infected with Leishmania tropica. Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science 58, 521-532.
167. Mohammed, E. R., El, A., Wright, P. E., Kager, A. P., Laarman, J. J. y Pondman, W. K. (1985), Enzyme-Linked Immunosorbent Assay using intact promastigotes for immunodiagnosis of kala-azar. Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 79, 344-350.
168. Monjour, L., Mille, C., Druilhe, P. y Gentiline, M. (1978). Application de l'immuno-electrodiffusion sur membrane d'acetate de cellulose: an diagnostic de la leishmaniose viscerale humaine et canine. Annals of the Society Belga of Medicine Tropicale 58, 293-300.
169. Mosser, M. D. y Edelson, J. P. (1984). Activation of the alternative complement pathway by Leishmania promastigotes: parasite lysis and attachment to macrophages. Journal of Immunology 132 (3), 1501-1505.
170. Murray, H. W. (1981). Susceptibility of leishmania to oxigen intermeditates and killing by normal macrophages. Journal of Experimental Medicine 153, 1302-1315.

171. Murray, H. W. y Cartelli, D. M. (1983). Killing of intracellular Leishmania donovani by human mononuclear phagocytes. Evidence for oxygen-dependent and-independent leishmanicidal activity. Journal of Clinical Investigation 72 (1), 32-44.
172. Murray, H. W., Rubin, B. Y. y Rothermel, C. F. (1983). Killing of intracellular Leishmania donovani by lymphokine-stimulated human mononuclear phagocytes. Evidence that interferon-J is the activatin lymphokine. Journal of Clinical Investigation 72 (4), 1506-1510.
173. Nasserri, M. y Modabber, F. Z. (1979). Generalized infection and lack of delayed hypersensitivity in BALB/c mice infected with Leishmania tropica major. Infection and Immunity 26, 611-614.
174. Neal, A. R. y Miles, A. R. (1976). The Montenegro reaction in guinea pig infected by Leishmania enrietti and the effect of antigens prepared from various Leishmania isolated. Journal of Tropical Medicine and Hygiene 70 (1), 32-37.
175. Newman, A. B. y Pomerantz, M. L. (1968). Disseminated cutaneous leishmaniasis (tropica). Archives of Dermatology 98, 105-106.
176. Oelerich, S., Buttner, D. W. y Mainweiler, E. (1974). Cross-reaction in the serological diagnosis of Chagas disease and kala-azar, including sera of tuberculosis and leprous patients. Zentralblatt fur Bakteriologie Parasitenkud, Infektionskran Kheiten und Hygiene 226, 283-290.
177. Olobo, J. O., Hadman, E., Curtis, J. M. y Mitchell, G. (1980). Antibodies to Leishmania tropica promastigotes during infection in mice of various genotypes. Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science 58, 595-611.
178. Pampiglione, S., La Placa, M. y Schlack, G. (1974). Studies in the Mediterranean leishmaniasis I. An outbreak of visceral leishmaniasis in Northern Italy. Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 68, 349-359.

179. Pampiglione, S., Manson, B. P. C., La Placa, M., Bogartti, M. A. y Micheloni, G. (1976). Studies in Mediterranean leishmaniasis 3. The leishmanin skin test in kala-azar. Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 70 (1), 62-65.
180. Pampiglione, S., Manson, B. P. C., La Placa, M., Bogartti, M. A. y Musumeci, S. (1975). Studies in Mediterranean leishmaniasis 3. The leishmanin skin test in kala-azar. Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 69 (1), 60-68.
181. Pappas, M. G. Hajkowski, R., Cannon, T. L. y Hockmeyer, T. W. (1984a). Dot-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Dot-ELISA); comparison with standar ELISA and complement fixation assay for the diagnosis of human visceral leishmaniasis. Veterinary Parasitology 14 (3-4), 239-249.
182. Pappas, M. G., Hajkowski, R., Diggs, L. C. y Hockmeyer, T. W. (1985b) Disposable nitrocellulose filtration plates simplify the Dot-ELISA for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 79 (1), 136.
183. Pappas, M. G., Hajkowski, R. y Hockmeyer, T. W. (1984 b). Standardization of Dot-ELISA for human visceral leishmaniasis. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 33 (6), 1105-1111.
184. Pappas, M. G., Hajkowski, R. y Hockmeyer, T. W. (1983 b). Dot-ELISA: A micro technique for the rapid diagnosis of visceral leishmaniasis. Journal of Immunological Methods 64 (1-2), 205-214.
195. Pappas, M. G., Hajkowski, R. Tang, B. D. y Hockmeyer, T. W. (1985a). Reduce false positive reactions in the Dot-ELISA for human visceral leishmaniasis. Clinical Immunology and Immunopathology 34, 392-396.
186. Pappas, M. G., McGreevy, P. B., Hajkowski, R., Hendricks, L. D. Oester, Ch. N. y Hockmeyer, T. W. (1983a). Evaluation of promastigotes and American cutaneous leishmaniasis. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 32 (6), 1260-1267.

187. Pearson, D. R., Marcus, J. L., Symes, H. P., Romito, R. y Donowitz, R. (1982). Failure of the phagocytic oxidative response to protect human monocyte-derived macrophages from infection by Leishmania donovani. Journal of Immunology 129 (5), 1282-1286.
188. Pellegrino, J., Pereira, H. L. y Furtado, T. (1977). Mucocutaneous leishmaniasis: intradermal test with a promastigote suspension and a crude extract from Leishmania braziliensis. Revista del Instituto de Medicina Tropical do Sao Paulo 19 (6), 393 - 396.
189. Pérez, C. A. H. (1980). La infección experimental del ratón con la Leishmania mexicana; efecto del número de parásitos inoculados sobre el curso de la infección. Acta Científica Venezolana 31, 174-179.
190. Pérez, H., Arredondo, B. y González, M. (1978). Comparative study of American cutaneous leishmaniasis and diffuse cutaneous leishmaniasis in two strain of inbred mice. Infection and Immunity 22, 301-307.
191. Pérez, H. Arredondo, B. y Machado, R. (1979). Leishmania mexicana and Leishmania tropica: Cross immunity in C₅₇BL/6 mice. Experimental Parasitology 49 (1), 9-14.
192. Petersen, A. E., Neva, A. F., Barral, A., Correa, C. R., Bogaert, D. H., Martinez, D. y Ward, E. F. (1984). Monocyte suppression of antigen specific lymphocyte responses in diffuse cutaneous leishmaniasis in patients from the Dominican Republic. Journal of Immunology 132 (5), 2603-2606.
193. Pratt, M-D., Bennett, E. y David, R. J. (1982). Monoclonal antibodies that distinguish subspecies of Leishmania braziliensis. Journal of Immunology 129 (3), 926-927.
194. Pratt, M-D. y David, R. J. (1981), Monoclonal antibodies that distinguish between New World of Leishmania. Nature 291, 581-583.
195. Preston, P. M. (1973). Immunology in cutaneous leishmaniasis. Proceeding of the Royal Society of Medicine 66, 276-277.

196. Preston, P. M. y Dumonde, D. C. (1976). Immunology of clinical and experimental leishmaniasis. In immunology of parasitic infection. pp. 167-202. (eds. S. Cohen y E. H. Sadun). Oxford: Blackwell Scientific Publication.
197. Price, M. S. y Silver, N. D. (1977). New World Leishmaniasis. Archives of Dermatology 113, 1415-1416.
198. Pulido, P. R. (1984). Ulcera de los chicleros y leishmaniasis tegumentaria diseminada en México. Tesis UNAM.
199. Quilici, M., Dunan, S. y Ranque, J. (1968). L'immunofluorescence dans les leishmanioses. Comparaison avec la reaction de fixation du complement. Medicine Tropicale 28 (1), 37-43.
200. Quilici, M., Dunan, S. y Ranque, J. (1978). Le diagnostic biologique des leishmanioses. Medicine Tropicale 38 (4), 385-389.
201. Ramos, A. C. (1970). Leishmaniasis en la region carbonifera de Coahuila. Dermatológica; Revista de México 14, 39-45.
202. Ranque, J. y Quilici, M. (1970). Recent advances in immunodiagnosis. Journal of Parasitology 56, 277-278.
203. Ranque, J., Quilici, M., Belleudi, P. y Dunan, S. (1978). Les reservoirs de virus de la leishmaniose viscerale em provence. Medicine Tropicale 38 (4), 405-409.
204. Ranque, J., Quilici, M., Dunan, S. y Assadourian, Y. (1969). Reaction d'immunoprecipitation em gelosa dans les leishmanioses. Medicine Tropicale 29 (1), 70-75.
205. Ranque, J., Quilici, M., Dunan, S. y Cabassu, H. (1968). Diagnostic immunologique de la leishmaniose canine par les methodes de precipitation em gelosa (premier resultats). Bulletin de L'Academie Nationale de Medicine 152, 453-455.

206. Ranque, J., Quilici, M., Dunan, S. y Ranque, Ph. (1972). La leishmaniose viscerale mediterraneenne et son diagnostic immunologique. Press Medicale 1, 1363.
207. Ranque, J., Quilici, M., Dunan, S. y Ranque, Ph. (1975). Diagnostic immunologique de la leishmaniose viscerale (10 annees d'experience). Annals of the Society Belga of Medicine Tropical 55 (5), 579-584.
208. Ranque, Ph. (1978). Les leishmanioses au Senegal (etude epidemiologique et ecologique). Medicine Tropicale 38 (4): 413-417.
209. Rassam, B. M. y Al Mudhaffar, A. S. (1979). The primary isolation of Leishmania donovani from Iraq on different culture media. Annals of Tropical Medicine and Parasitology 73 (4), 345-347.
210. Rassam, B. M. y Al Mudhaffar, A. S. (1980a). The micro-ELISA sandwich technique for the quantitation of Leishmania donovani soluble antigen. Annals of Tropical Medicine and Parasitology 74 (6), 591-595.
211. Rassam, B. M. y Al Mudhaffar, A. S. (1980b). Comparative diagnosis study of kala-azar. Annals of Tropical Medicine and Parasitology 74 (3), 283-287.
212. Ravisse, P., Bensimon, P. y La Picorey, G. (1984). Un cas de leishmaniose laryngee de longue evolution. Bulletin de la Societe Pathologie Exotique 77, 305-311.
213. Rezai, R. H., Ardehali, M. S., Amirhakini, G. y Kharazmi, A. (1978). Immunological aspects of Kala-azar. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 27 (6), 1079-1083.
214. Rezai, R. H., Behforous, N., Amirhakini, G. y Kohanteb, J. (1977). Immunofluorescence and countrimmuno-electrophoresis in the diagnosis of kala-azar. Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 71 (2), 149-151.
215. Ridley, D. S. (1979). The pathogenesis of cutaneous leishmaniasis. Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 73 (2), 150-160.

216. Ridley, D. S. (1980). A hiatological classification of cutaneous leishmaniasis and it's geographical expression. Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 74 (4), 515-521.
217. Ridley, D. S., Marsden, P. D., Cuba, C. C. y Barreto, A. C. (1980). A histological classification of mucocutaneous leishmaniasis in Brazil and its clinical evaluation. Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 74 (4), 510-514.
218. Roffi, J., Dedet, J. P., Desjeux, P. y Garre, M. T. (1980). Detection of the circulating antibodies in cutaneous leishmaniasis by Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA). American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 29 (2), 183-189.
219. Roizenblatt, J. (1979). Interstitial keratitis caused by American (mucocutaneous) leishmaniasis. American Journal of Ophthalmology 87, 175.
220. Sadid, B. M. y Rachid, B. S. M. (1985). Valuer du test ELISA-IgG et-IgM dans le diagnostic et la surveillance post-therapeutique. Annals of the Society Belga of Medicine Tropicale 65, 31-40.
221. Sen Gupta, C. P. (1969). Immunodiagnosis of kala-azar. Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 63 (1), 145-147.
222. Sergiev, V. P. y Shuikina, E. V. (1970). On the presence of soluble antigens in Leishmania tropica major. Tropical Diseases Bulletin 67, 145-146.
223. Shaw, J. J. y Lainson, R. (1972). Leishmaniasis in Ameridians. Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 66, 507.
224. Shaw, J. J. y Lainson, R. (1974). An immediate intradermal reaction to leishmanial antigen in human cutaneous leishmaniasis. Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 68 (2), 168-169.

225. Shaw, J. J. y Lainson, R. (1975). Leishmaniasis in Brazil X. Some observation of intradermal reaction to different Trypanosomatidae antigen of patients suffering from cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 69 (3), 323-325.
226. Shaw, J. J. y Lainson, R. (1976). Skin test reaction in cutaneous leishmaniasis and Chagas disease. Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 70 (3), 258.
227. Shaw, J. J. y Lainson, R. (1977). A simply prepared amastigote leishmanial antigen for use in indirect fluorescent antibody test for leishmaniasis. Journal of Parasitology 63 (2), 384-385.
228. Shaw, J. J. y Lainson, R. (1981). Leishmaniasis in Brazil XIV. Leishmanial and Trypanosomal IgA antibody in patients with leishmaniasis and Chagas disease. Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 75 (2), 254-257.
229. Simpson, H. M., Mullins, J. F. y Ston, O. J. (1968). Disseminated anergic cutaneous leishmaniasis. Archives of Dermatology 97, 301-302.
230. Sirol, J., Laroche, R., Guintran, J. L. y Vedy, J. (1978). Les leishmanioses cutanees et muqueuses. Medicine Tropicale 38 (4), 391-400.
231. Snow, K. R. (1974). Infects and disease, pp. 133-142 London: Rotledge and Kegan Paul.
232. Sodafi, M., Aminlari, A. y Rezai, H. (1981). Ophthalmic leishmaniasis. Clinical and Experimental Dermatology 6 (5): 485-488.
233. Southgat, A. B. (1967). Leishmania adleri and natural immunity. Journal of Tropical Medicine and Hygiene 70 (1), 33-36.
234. Southgat, A. B. y Manson-B, C. E. P. (1967). Studies in the epidemiology of East African Leishmaniasis 4. The significance of the positive leishmanin test. Journal of Tropical Medicine and Hygiene 70 (1), 29-33.

235. Southgat, A. B. y Oriedo, B. V. E. (1967). Studies in the epidemiology of East African Leishmaniasis 3. Immunity as adeterminant of geografic distribution. Journal of Tropical Medicine and Hygiene 70 (1), 1-4.
236. Tremonti, L. y Walton, B. C. (1970). Blast transformation and migration-inhibition in toxoplasmosis and leishmaniasis. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 19 (1), 49-56.
237. Troung, K. T., Ambroise, T. P., Quilici, M., Dunan, S. y Ranque, Ph. (1969). Diagnostic serologique des leishmanioses par immunofluorescence sur copes de foies ou de rates de hamsters infestes avec *Leishmania donovani*. Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique 62, 1077-1084.
238. U. S. Department of Public Health, Education and Welfare, Public Health Service, (1968). Standarized diagnostic complement fixation. Method and adaptation to micro-test. Public Health Monogrph No. 74.
239. Velasco, R. Comunicaci6n personal.
240. Voller, A., Bartlett, A. y Biowell, D. S. (1976). Enzyme immunoassays for parasitic diseases. Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 70 (2), 98-105.
241. Voller, A. y Savigny, D. (1981). Diagnostic serologic of parasitic diseases. Journal of Immunological Methods 46 (1), 1-29.
242. Walton, C. B. (1970). The IFAT for evaluation of effectiveness of chemotherapy in American Leishmaniasis. Journal of Parasitology sec III part 2. 56 (2), 480-481.
243. Walton, C. B. (1980). Evaluation of chemotherapy of American Leishmaniasis by the immunofluorescent antibody test. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 29 (5), 747-752.
244. Walton, C. B. (1985). New World cutaneous/mucocutaneous leishmaniasis. Tropical Diseases. R. S. Goldsmith y D. Heyneman, eds. Lang Medical Publications. pp. 1-37.

245. Walton, C. B., Brooks, H. W. y Arjona, I. (1972). Serodiagnosis of American Leishmaniasis by indirect fluorescent antibody test. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 21(3), 296-299.
246. Walton, C. B. y Valverde, L. (1979). Racial differences in espundia. Annals of Tropical Medicine and Parasitology 73 (1), 23-29.
247. Wilson, H. R. y Lollini, A. (1980). Leishmania braziliensis braziliensis: metastatic infection in a golden hamster. Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 74, 833.
248. Williams, P. y Coelho, M. B. (1978). Taxonomy transmission of Leishmania. Advances in Parasitology 16 (1), 1-42.
249. Witztum, E., Spira, T. D. y Zuckerman, A. (1978). Blast transformation in different stages of cutaneous leishmaniasis. Israel Journal of Medical Scientific 14, 244-247.
250. Wyler, J. D., Weinbaum, I. F. y Herrod, R. H. (1979). Characterization of in vitro proliferative responses of human lymphocytes to leishmania antigens. Journal of Infectious Diseases 140(2); 215-221.
251. Xu, Z., Xiong, J., You, J., Zhong, H., Chen, W., Zhao, E., Jiao, L. y Li, J. (1982). Micro Enzyme Linked Immunosorbent Assay in diagnosis of kala-azar. Chinese Medical Journal 95 (9) 649-652.
252. Zavala, V. J. (1972). Leishmaniasis en Yucatán. Gaceta Médica de México. 104 (1), 1-7.
253. Zeledon, R. y Ponce, C. (1974). Parasitological and immunological diagnosis of cutaneous leishmaniasis in the New World. Proceeding of the third International Congress of Parasitology 1, 239-240.
254. Zeledon, R., Ponce, E. y Ponce, C. (1976). The Montenegro and MIF in three cured and one chronic case of human leishmaniasis. Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 70 (5-6), 536-537.

255. Zovein, A., Edrissian, G. H. y Nadim, A. (1984). Application of the indirect immunofluorescent antibody test in serdiagnosis of cutaneous leishmaniasis in experimental infected mice and naturally infected Rhombomys opimus. Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 78 (1), 73-77.
256. Zuckerman, A. (1975). Current status of the immunology of blood and tissue protozoa 1. Leishmania. Experimental Parasitology 38. 370-400.

Pag. 129

25. Barral, A., Petersen, E., Sack, D.F. y Neva, F.A. (1983) Late metastatic leishmaniasis in the mouse. A model for mucocutaneous disease. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 32, 177-285

Pag. 131

45. Carrada, B.T. (1979b). La leishmaniasis visceral o Kala-azar en México. Medicina al día (IMSS) 2, 45