

DIAGNOSTICO PARASITOLOGICO E INMUNOLOGICO DE LEISHMANIASIS TEGUMENTARIA AMERICANA¹

César A. Cuba Cuba,² Philip D. Marsden,² Air C. Barreto,²
Roxicler Rocha,² Raymunda R. Sampaio² y Lauro Patzlaff³

En este trabajo se trata de estimar el comportamiento diagnóstico de técnicas parasitológicas e inmunológicas usadas, en conjunto, en leishmaniasis tegumentaria americana. En Brasil, una de las dificultades básicas del diagnóstico radica en el hallazgo de los parásitos en las lesiones. Por esta causa, es indispensable la utilización de los métodos serológicos que, en la actualidad, no son lo suficientemente precisos y específicos. Esto último se comprueba por los resultados obtenidos en el presente estudio.

Introducción

El aumento notorio del número de casos de leishmaniasis tegumentaria americana (LTA), en el Servicio de Dermatología, del Hospital Docente de la Universidad de Brasilia, y el estudio de un área endémica de la enfermedad, localizada en el estado de Bahia, concentró el interés de los autores en el problema del diagnóstico de laboratorio de esta protozoosis.

En general, el diagnóstico de rutina se suele realizar a través de la investigación directa de amastigotes en las lesiones, y de

la intradermorreacción de Montenegro (1). Aún no se han evaluado en forma extensa otros medios de diagnóstico (inmunofluorescencia indirecta, IFA) (2, 3), o bien, no se emplean como métodos diagnósticos de rutina (aglutinación directa, AD; inmunodifusión) (4-6).

En relación con el agente etiológico de las diversas formas clínicas de LTA que ocurren en América del Sur, existe un creciente interés entre los investigadores para lograr el aislamiento de los parásitos, de modo que se puedan llevar a cabo investigaciones posteriores de sus características biológicas (7-10), bioquímicas (11, 12) y ultraestructurales (13), en la búsqueda de su correcta identificación.

En el presente trabajo, se señalan algunas observaciones efectuadas en pacientes con LTA, estudiados por métodos parasitológicos e inmunodiagnósticos y, asimismo, se discute la precisión de las pruebas utilizadas.

¹ Trabajo realizado con la ayuda del Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brasil. PDE 02-3-01, y de la Superintendencia de Campanhas de Saúde Pública (SUGAM), Ministério de Estado da Saúde, Brasil.

² Profesor, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasilia, Brasilia, Brasil.

³ Profesor, Instituto de Ciências Exatas, Universidade de Brasilia, Brasilia, Brasil.

Material y métodos

Pacientes seleccionados

Se estudió un total de 56 pacientes de LTA, en el Servicio de Dermatología del Hospital Docente de la Universidad de Brasilia (UISS), y en diversas localidades de los municipios de Cravolandia, Wenceslau Guimarães y Ubaíra, del estado de Bahia, Brasil. En todos los individuos se practicó un examen físico y, desde el punto de vista clínico, se clasificó a 29 como portadores de formas cutáneas activas, y a 27, de mucosas activas. De todos ellos se obtuvo una muestra de sangre venosa, para la realización de las pruebas serológicas. El tiempo de evolución de las lesiones fluctuó entre tres meses y 26 años. En todos los pacientes se descartó la posibilidad de ser portadores de enfermedad de Chagas y kala-azar.

Métodos de diagnóstico de laboratorio

En lo posible, en la gran mayoría de los pacientes seleccionados, se utilizaron en forma paralela y sistemática las siguientes pruebas de diagnóstico: 1) Métodos parasitológicos; 2) biopsias para la confección del frotis por aposición, cortes histológicos y triturados del tejido para la inoculación en cricetos, y 3) métodos inmunodiagnósticos, tales como intradermorreacción de Montenegro, inmunofluorescencia indirecta (IFA), y aglutinación directa (AD).

Procedimientos

Para cada paciente, se confeccionaron tres láminas de frotis por aposición, que se colorearon por el método de Giemsa (pH 7.5, durante una hora). Las biopsias destinadas a histología se fijaron en Formol-Zenker, por un tiempo máximo de seis horas, y luego se conservaron en alcohol

de 70%, hasta su procesamiento. Los cortes de 5 μ de espesor se colorearon con hematoxilina-eosina.

Los triturados de biopsias de los pacientes se inocularon en el hocico y patas posteriores de cricetos (*Cricetus auratus*), provenientes del Bioterio Central de la Universidad de Brasilia. Los animales se observaron periódicamente para constatar en forma sistemática la evolución de las infecciones. Con posterioridad, se practicaron nuevas inoculaciones en cricetos y ratones blancos Swiss 44. Los parásitos aislados se caracterizaron biológicamente según Lainson y Shaw (8-10). Se realizaron cultivos en medios NNN y LIT (14) mantenidos a 22°C, y luego examinados y repicados cada 15 días.

Intradermorreacción de Montenegro. El test intradérmico se realizó en todos los pacientes con antígeno (Leishmanina), preparados a partir en formas promastigotes de *Leishmania mexicana amazonensis* (cepa Josefa), aislada de un caso humano de lesión cutánea observado en la UISS, Brasilia, y mantenida en medios de cultivo NNN y LIT, y por nuevas inoculaciones periódicas en cricetos. El contenido proteico de una suspensión de aproximadamente 5×10^6 flagelados por ml, se determinó en 30 μ g de N/ml por la técnica de GOA (15). Se aplicó 0.1 ml de antígeno en el antebrazo derecho, e igual volumen de solución fisiológica fenolada, en el antebrazo izquierdo, como testigo. La lectura se registró en milímetros de induración perceptible al tacto, a las 72 horas después de la inyección.

Inmunofluorescencia indirecta (IFA). Se preparó antígeno de promastigotes de *L. mexicana amazonensis* y, en líneas generales, se siguió el esquema de Guimarães *et al.* (2). Se practicó la reacción en los sueros de los 56 pacientes. De acuerdo con el procedimiento descrito por Shaw y Lainson (16), se preparó antígeno de amastigotes de la misma cepa, y se empleó con los sueros de 24 pacientes parasitológicamente positivos. De este modo, fue posible realizar un

estudio comparativo de la precisión de los antígenos de promastigotes y amastigotes.

El conjugado empleado en ambas técnicas fue la antigamaglobulina humana, marcada con isotiocianato de fluoresceína (F/P 0.64), del Wellcome Research Laboratories, Inglaterra, lote K 0403, con microscopio de fluorescencia Zeiss-Jena, campo oscuro, fuente de luz y lámpara ultravioleta HBO50, filtros de barrera y excitadores (0G1 y BB 224, respectivamente). Para la lectura de resultados en los sueros investigados, se tomaron en consideración los criterios adoptados por Chiari (17), Guimarães *et al.* (2) y Shaw y Lainson (16).

Aglutinación directa (AD). En la preparación del antígeno y el esquema general de la prueba se siguió la metodología establecida por Allain y Kagan (4). La fuente de material antigénico fue la misma cepa anteriormente citada. Mediante esta prueba, se investigó un total de 46 pacientes.

Análisis estadístico

Se realizó a través del cálculo de la media geométrica de las recíprocas de los títulos (MGRT), pruebas de variaciones y prueba de medias (t de Student) de la frecuencia de distribución en los títulos de los sueros de pacientes. El nivel de las pruebas fue de $p < 0.1$ y $p < 0.05$.

Resultados

Demostración de amastigotes

De los 56 pacientes estudiados, 24 (42.8%) presentaron parásitos, de acuerdo con las técnicas utilizadas; 14/56 (25.0%) de los frotis efectuados fueron positivos y 15/55 (27.27%) de los cortes histológicos mostraron amastigotes. En el cuadro 1 se observan las características clínicas y hallazgos parasitológicos, de este grupo de 24 pacientes.

De los 56 pacientes, 29 eran portadores de forma cutánea activa y 27 de forma mucosa de la enfermedad. En el primer grupo, 16 (55.1%) presentaron amastigotes en las lesiones y en el segundo grupo, apenas ocho (29.6%) fueron parasitológicamente comprobados. Del total de casos positivos (cutáneos o mucosos), tres (12.5%) de los pacientes se diagnosticaron solo por la técnica de frotis; uno (4.1%) lo fue únicamente a través de los cortes histológicos, mientras que la inoculación de los cricetos resultó en forma aislada con seis (25.0%). Asimismo, siete pacientes con lesiones de evolución crónica prolongada (de 7 a 20 años) presentaron amastigotes en densidad relativamente alta, pues se encontraron parásitos, tanto en los frotis como en los cortes histológicos.

En cuatro pacientes con úlceras compatibles de LTA, de corto tiempo de evolución, solo se indicó la presencia del parásito cuando el material inoculado en los cricetos desarrolló nódulos parasitarios, con gran número de amastigotes.

De 17 inoculaciones en cricetos de material seguramente positivo a *Leishmania*, nueve animales desarrollaron la infección parasitaria; cinco no presentaron señal alguna de parasitismo cutáneo hasta el presente (cinco y nueve meses de observación); dos, por presentarse moribundos, fueron sacrificados, pero no mostraron señal de parásitos (a los siete meses de inoculados), y uno murió sin revisión. Se comprobó la visceralización de una cepa (en el paciente No. 21).

En forma preliminar, cabe mencionar que, hasta la fecha, los organismos aislados de los pacientes Nos. 1, 2 y 3, se han subinoculado en otros cricetos de seis a ocho veces consecutivas. Se ha comprobado que, si bien se ha acertado el periodo de incubación (de 35 a 40 días, probablemente debido a que la inoculación es cada vez más rica en parásitos), la evolución del parasitismo se mantiene con las mismas características. Es decir, crecimiento rápido de la

CUADRO 1—Características clínicas y hallazgos parasitológicos en 24 pacientes, con parasitismo a *Leishmania*.

Pacientes (en orden de numeración)	Características clínicas				Frotis	Histología	Inoculación en criceto
	Forma clínica	Lesión única	Lesión múltiple	Tiempo de evolución			
1	c	.	.	3 meses	—	—	+ (5 meses de inoculación)
2	c	.	.	3 meses	—	—	+ (5 meses de inoculación)
3	c	.	.	3 meses	—	—	+ (7 meses de inoculación)
4	c	.	.	3 meses	—	+	— (8 meses de inoculación) criceto sin infección
5	c	.	.	3 meses	—	—	+ (8 meses de inoculación)
6	c	.	.	4 meses	+	+	— (7 meses después inocu- lación)
7	c	.	.	6 meses	+	+	+ (2.5 meses de inoculación)
8	c	.	.	6 meses	+	—	— (5 meses de inoculación) criceto sin infección
9	c	.	.	10 meses	—	+	+ (3 meses de inoculación)
10	c	.	.	1 año	+	—	criceto muerto, sin revisar
11	c	.	.	2 años	+	+	— (9 meses de inoculación) criceto sin infección
12	c	.	.	2.6 años	+	+	+ (2.5 meses de inoculación)
13	c	.	.	6 años	—	—	+ (5 meses de inoculación)
14	c	.	.	7 años	+	+	+ (2.5 meses de inoculación)
15	c	.	.	9 años	+	+	No inoculado
16	c	.	.	12 años	+	+	+ (2.5 meses de inoculación)
17	m	.	.	5 años	—	+	+ (4 meses de inoculación)
18	m	.	.	12 años	+	+	+ (2.5 meses de inoculación)
19	m	.	.	5 meses	+	+	+ (4 meses de inoculación)
20	m	.	.	5 años	—	+	+ (3 meses de inoculación)
21	m	.	.	9 años	—	—	+ (5 meses de inoculación) visceralización
22	m	.	.	13 años	+	+	— (Sacrificado 7 meses después de inoculación)
23	m	.	.	16 años	+	+	— (Sacrificado 7 meses después de inoculación)
24	m	.	.	20 años	+	No realizada	— (5 meses de inoculación) criceto sin infección

lesión, ulceración precoz, intenso parasitismo cutáneo, y mínimo infiltrado inflamatorio; por otro lado, facilidad en la obtención de cultivos, y crecimiento exorbitante de las formas promastigotes. Asimismo, los organismos del paciente No. 3 produjeron metástasis en cricetos y ratones. Los tres aislados parasitarios se adaptaron con facilidad en ratones blancos Swiss 44. En cambio, los aislados parasitarios obtenidos de los pacientes Nos. 17 y 20

presentaron una evolución lenta y un área con pérdida de vello poco perceptible en el lugar de la inoculación. También se observó la presencia de un ligero nódulo parasitario no ulcerado, después de muchos meses de observación, con poquísimos parásitos y muy pobre crecimiento en medios de cultivo. Conviene indicar que se encuentra en preparación una publicación próxima, de estos y otros aislados, en estudio biológico y bioquímico.

CUADRO 2—Características clínicas y resultados de las pruebas inmunodiagnósticas en 24 pacientes de LTA.

Pacientes (en orden de numeración)	Características clínicas				Inmunofluorescencia indirecta (IFA)			
	Forma clínica	Lesión única	Lesión múltiple	Tiempo de evolución	ID Mont.	Ag promas- tigotes	Ag amasti- gotes	Aglutinación directa (AD)
1	c	.	.	3 meses	+	1: 320	1: 160	1: 128
2	c	.	.	3 meses	+	1: 40	1: 320	No realizada
3	c	.	.	3 meses	+	—	1: 40	1: 64
4	c	.	.	3 meses	+	—	1: 80	—
5	c	.	.	3 meses	+	1: 40	1: 40	1: 64
6	c	.	.	4 meses	+	—	—	1: 256
7	c	.	.	6 meses	— ^a	1: 320	1: 40	—
8	c	.	.	6 meses	+	—	1: 320	1: 64
9	c	.	.	10 meses	+	1: 40	1: 40	—
10	c	.	.	1 año	—	—	1: 80	1: 64
11	c	.	.	2 años	+	1: 40	1: 40	1: 64
12	c	.	.	2.6 años	+	1: 160	1: 160	1: 128
13	c	.	.	6 años	+	1: 80	1: 20	—
14	c	.	.	7 años	+	—	1: 20	1: 128
15	c	.	.	9 años	+	1: 80	1:1,280	1: 128
16	c	.	.	12 años	+	—	1: 20	1: 64
17	m	.	.	5 años	+	1: 160	1: 40	—
18	m	.	.	12 años	— ^a	1:1,280	1: 80	1:1,024
19	m	.	.	5 meses	+	1:1,280	1: 40	1: 128
20	m	.	.	5 años	+	1: 80	1: 80	1: 128
21	m	.	.	9 años	+	1: 40	1: 20	—
22	m	.	.	13 años	+	1: 80	1: 40	1: 128
23	m	.	.	16 años	+	1: 80	1: 80	1: 128
24	m	.	.	20 años	+	1: 640	1: 640	—
Total					21/24 (87.5)	17/24 (70.8) ^b	23/24 (95.8) ^b	16/23 (69.5)

^a Pacientes anérgicos cutáneos a prueba: PPD, Tricofitina, Candidina, DNCB.

^b Diferencia estadística significativa, prueba t ($p < 0.1$).

Intradermorreacción de Montenegro

La prueba intradérmica fue positiva en 94.6% del total de los individuos estudiados. Tres pacientes resultaron negativos, a pesar de las repetidas pruebas practicadas en épocas diferentes. Cuando se efectuaron otras pruebas intradérmicas con antígenos como PPD, Candidina y Tricofitina y la prueba de sensibilización con DNCB, dos de ellos tampoco reaccionaron, lo cual sugiere una deficiencia inmunitaria celular. La prueba intradérmica realizada en los 24 pacientes parasitológicamente com-

probados alcanzó una sensibilidad de 87.5% (cuadro 2).

Inmunofluorescencia indirecta (IFA, antígeno de promastigotes)

En los casos considerados, esta prueba indicó títulos positivos en 62.4% de los pacientes. Cuando en los sueros de los pacientes se estudió la frecuencia de la distribución de los títulos de anticuerpos fluorescentes circulantes:

a) En relación con la presencia de parásitos en la(s) lesión(es), en 24 casos con amastigotes ob-

CUADRO 3—Frecuencia de la distribución de los títulos de anticuerpos fluorescentes circulantes^a en sueros de 54 pacientes^b de LTA. Relación con el número de lesiones.

No. de lesiones	Número de sueros reaccionantes con títulos de: (Recíproca de los títulos)								No. de sueros (Pos./prueba)	% de positividad (Títulos ≥ 40)	MGRT ^c
	≤20	40	80	160	320	640	1,280	2,560			
Única	12	8	3	4	1	—	—	—	16/28	57.1	42 ^d
Múltiple	7	3	8	4	1	1	2	—	19/26	73	80 ^d

^a IFA: Ag de promastigotes.

^b Pacientes con diagnóstico clínico y Montenegro positivos.

^c Media geométrica de la recíproca de los títulos.

^d Diferencia estadística significativa, prueba t, (p < 0.05).

servados en los frotis, la reacción de IFA fue positiva en 17, y presentó una sensibilidad de 70.8%. Los títulos variaron de 1:40 a 1:1,280, con una MGRT de 78, y su distribución fue más frecuente entre los títulos 1:40 y 1:160. En los 32 casos de frotis negativos al parásito, la reacción fue positiva en 18. Los títulos fluctuaron entre 1:40 y 1:160, con MGRT de 43.

b) *En relación con el número de lesiones presentadas por los pacientes*, la prueba t de Student demostró una diferencia estadística significativa (p < 0.05) entre las medias de los dos grupos de pacientes estudiados. Estos resultados sugieren la influencia del número de lesiones en los títulos de anticuerpos circulantes (cuadro 3).

c) *En relación con el tiempo aproximado de surgimiento de la lesión inicial*, se establecieron dos grupos con los pacientes investigados: uno, formado por 23 individuos en un año de probable inicio de la lesión o lesiones y el otro, con más de un año. En general, la frecuencia de la distribución de los títulos positivos fue semejante en ambos grupos (entre 1:40 y 1:160), sin que se encontrara diferencia estadística significativa entre ellos.

d) *En relación con las formas clínicas de la enfermedad*, en este estudio se logró establecer diferencia estadística significativa (p < 0.1) entre las medias de los títulos de anticuerpos fluorescentes, detectados en pacientes con formas cutáneas y mucosas de leishmaniasis, lo cual sugiere que las formas clínicas de la enfermedad influirían en dichos títulos (cuadro 4).

Aglutinación directa (AD)

De los 46 sueros de pacientes estudiados (las limitaciones en el trabajo de campo impidieron obtener suero de los 56 pacientes del estudio), 60.8% presentaron títulos positivos para LTA. Los resultados obtenidos por el empleo de esta reacción serológica también se analizaron mediante la observación de la frecuencia de distribución en los títulos de anticuerpos, y su correlación con las mismas variables estudiadas para la IFA.

CUADRO 4—Frecuencia de la distribución de los títulos de anticuerpos fluorescentes circulantes (IFA) en sueros de 56 pacientes de LTA. Relación con las formas clínicas de la enfermedad.

Formas clínicas	Número de sueros reaccionantes con títulos de: (Recíproca de los títulos)								No. de sueros (Pos./prueba)	% de positividad (Título ≥ 40)	MGRT ^a
	≤20	40	80	160	320	640	1,280	2,560			
Cutánea	13	8	5	1	2	—	—	—	16/29	55.1	40 ^b
Mucosa	8	3	6	7	—	1	2	—	19/27	70.3	78 ^b

^a Media geométrica de la recíproca de los títulos.

^b Diferencia estadística significativa, prueba t, (p < 0.1 y 0.05).

En el cuadro 5, se observa que la frecuencia de los títulos positivos fue relativamente baja, tanto para los grupos parasitológicamente positivos, como negativos. Por otra parte, en 69.5% de los pacientes con amastigotes en las lesiones se presentaron títulos positivos ≥ 64 .

Al comparar las MGRT de los títulos de anticuerpos aglutinantes (79) y fluorescentes circulantes (78), no se logró hallar diferencia estadística significativa entre los dos grupos de pacientes, con parásitos en las lesiones, estudiados con las dos técnicas. Asimismo, la MGRT de los títulos negativos de anticuerpos aglutinantes (62) fue mayor que la de los anticuerpos fluorescentes (43), y se registró diferencia significativa ($p < 0.1$).

En la muestra estudiada, la IFA (promastigotes) y la AD presentaron prácticamente la misma sensibilidad diagnóstica.

El número de lesiones y el tiempo de evolución de la lesión inicial no ejercieron influencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$), en los títulos de anticuerpos aglutinantes circulantes. La prueba t de Student no reveló diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los títulos de anticuerpos aglutinantes, obtenidos en sueros de pacientes con formas cutáneas y mucosas.

En un grupo de 46 individuos, donde se realizaron las dos pruebas serológicas (IFA + AD) en forma concomitante, los resultados fueron los siguientes: total de positivos por una y/u otra reacción, 40/46

(86.9%); total de positivos por la IFA, 29/46 (63.0%), y total de positivos por la AD, 28/46 (60.8%). Mediante la IFA se encontraron como positivos 12 casos que no fueron detectados por la AD; a su vez, la AD permitió diagnosticar 11 casos no indicados como positivos por la IFA. En cambio, hubo concordancia para las dos pruebas, en 17 casos.

Cuando se estudió en forma comparativa el comportamiento de las pruebas serológicas en el grupo de pacientes parasitológicamente positivos, se obtuvieron los resultados consignados en el cuadro 2.

Los sueros de los pacientes examinados mediante la IFA (antígenos de promastigotes y amastigotes) y la AD demostraron que, el antígeno de amastigotes es sumamente preciso (95.8%) en el diagnóstico de LTA y significativamente más preciso ($p < 0.1$) que el antígeno de promastigotes (70.8%) y el de AD (69.5%). La frecuencia de la distribución de los títulos de anticuerpos fluorescentes fue semejante para ambos antígenos, con MGRT de 136 y 80, respectivamente.

Discusión

El hallazgo de formas amastigotes de *Leishmania* en lesiones de pacientes diagnosticados en forma clínica como portadores de LTA, no siempre se encuentra con facilidad en úlceras típicas de la enferme-

CUADRO 5—Frecuencia de la distribución de los títulos de anticuerpos aglutinantes (AD) en sueros de 46 pacientes de LTA.^a Relación con la presencia de parásitos en la lesión.

Demostración de amastigotes	Número de sueros reaccionantes con títulos de: (Recíproca de títulos)							No. de sueros (Pos./prueba)	% de positividad (Título ≥ 64)	MGRT ^b
	≤ 32	64	128	256	512	1,024	2,048			
Positivos	7	6	8	1	—	1	—	16/23	69.5	79
Negativos	11	7	2	2	—	1	—	12/23	52.1	62

^a Pacientes con diagnóstico clínico y Montenegro positivos.

^b Media geométrica de la recíproca de los títulos.

dad. En general, se acepta que las lesiones recientes presentan abundantes parásitos, y los frotis obtenidos de ellas demuestran con relativa facilidad los amastigotes. En lesiones de evolución crónica (mucosas o cutáneas), el hallazgo del parásito es difícil, y muchas veces imposible (18, 19). En esta casuística, en 25% de los pacientes se encontraron frotis positivos, al emplear el método por aposición de biopsias logradas por un dispositivo que permite tomar muestras por punción. En 75 pacientes con diagnóstico clínico de leishmaniasis cutánea, Zeledon y Ponce (20) encontraron parásitos en las lesiones, a través de frotis directo, en 36.0%. En los casos considerados en el presente estudio, todo indica la existencia de parásitos de los complejos *L. brasiliensis* y *L. mexicana* y, posiblemente, las diferencias en las proporciones de pacientes que presentaron amastigotes en los frotis coloreados, podrían deberse, en parte, a la incidencia de los parásitos del complejo *L. brasiliensis*.

Otro factor no esclarecido en forma total, es la manera en que se debería retirar el material para ser examinado, de las lesiones del individuo parasitado, así como la posterior confección del frotis. Esto parece tener importancia, pues existen criterios variados y procedimientos tales como la escarificación de los bordes internos de las úlceras, corte de un fragmento en cuña del borde de la lesión, y utilización del dispositivo que permite tomar muestras por punción, entre otros. Conviene recordar que Aragão *et al.* (21), han insistido acerca del cuidado con que debe tomarse y revisarse la muestra, para el diagnóstico parasitológico de la enfermedad.

Con respecto a la demostración de formas parasitarias en cortes histológicos, *Leishmania*, en general fue difícil o casi imposible encontrar en las secciones, aun cuando podía observarse con facilidad en los frotis. En este estudio, 25.4% de 55 pacientes presentaron amastigotes en los tejidos.

La utilización del criceto en el estudio de leishmaniasis experimental ha contribuido a avances significativos en la patología (22, 23), epidemiología (8, 10) y transmisión de cepas de *Leishmania* (24, 25). En las experiencias citadas en dicha bibliografía, el criceto demuestra gran susceptibilidad a la infección por *Leishmania*. Sin embargo, cuando se analiza el papel del roedor en el diagnóstico de la enfermedad, parecería que todavía no se dispone de un animal lo bastante susceptible, como para que permita aislar, en forma eficaz, las diversas subespecies del protozoo parásito, de los pacientes en estudio. En la experiencia de los autores, se observó que fue bajo el porcentaje de cricetos (35.8%), que desarrollaron la infección, cuando se les inoculó con material proveniente de los pacientes. Asimismo, la inoculación de animales con material de algunos pacientes, que clínica e inmunológicamente presentaban fuertes evidencias de infección activa por *Leishmania*, y con presencia de parásitos en frotis e histología, resultó en que varios cricetos no evidenciaron lesiones parasitarias, a pesar de haber sido observados por largos períodos (más de un año y medio). Es probable que esto se encuentre en relación con la densidad parasitaria de las lesiones de los pacientes, la viabilidad de las formas en la inoculación, o el hecho de no tener parásitos en la inoculación, entre otros factores. Pero también puede vincularse con la posibilidad teórica de que el criceto sea inapropiado o poco sensible, para el desarrollo de algunas cepas de *Leishmania* humana.

En todo caso, a pesar de las fallas señaladas, el criceto es el único animal de laboratorio que, en la actualidad, se dispone para aislar *Leishmania*, de pacientes con LTA. Es claro que en el diagnóstico de laboratorio de la enfermedad, la inoculación en animales susceptibles es de importancia secundaria. Pero cuando se pretende establecer un diagnóstico cierto, proporcionar una base para aplicar el tratamiento y eva-

luar la acción del medicamento usado en el paciente, la demostración de la existencia del parásito es de capital importancia y, muchas veces, esto solo se consigue a través de la utilización del criceto. Esta observación es evidente al analizar los cuadros 1 y 2. Los pacientes Nos. 1, 2, 3, 5, 13, y 20, con diagnóstico clínico y Montenegro positivos, presentan 2 ó 3 pruebas serológicas positivas, y los cricetos evidenciaron la infección activa de las lesiones humanas, al desarrollar nódulos parasitarios entre tres y ocho meses después de la inoculación del material infectante. En relación con este asunto, Medina y Belfort (26) recomiendan la inoculación del material humano sospechoso, en cricetos parcialmente inmunosuprimidos por la administración de esteroides, y estiman este método como de gran valor para el diagnóstico de LAT. En infecciones experimentales, la diseminación de *Leishmania brasiliensis brasiliensis* en cricetos inmunosuprimidos ha sido obtenida por Hommel et al. (27). Otros estudios clínico terapéuticos de los autores (28) precisan, en lo posible, informaciones donde se confirma la actividad del medicamento empleado, en relación con el parásito infectante, correctamente identificado.

En fecha muy reciente, Melo et al. (29) informaron de los resultados obtenidos con la prueba de Montenegro, realizada en pacientes clínica y parasitológicamente diagnosticados como portadores de LTA, mediante el uso de antígenos con concentraciones variadas de N proteico por mililitro. Demostraron que existe una relación lineal entre las áreas medias de las reacciones, y las concentraciones del antígeno empleadas; concluyeron que, con el antígeno de 40 μg N/ml, las reacciones obtenidas indicaron un mayor porcentaje de positividad. En el presente estudio, el antígeno empleado contenía 30 μg N/ml, y con él se obtuvieron 94.6% de reactores positivos. En la casuística de 24 pacientes parasitológicamente comprobados, el porcentaje fue de 87.5% de positividad a la prueba

intradérmica.

En época reciente, en la serología de leishmaniasis, se suele emplear en mayor grado la inmunofluorescencia indirecta para la detección de anticuerpos circulantes (2, 17 y 30). En el presente trabajo, la técnica de IFA con el empleo de antígeno preparado de las formas promastigotes de *Leishmania*, indicó una precisión relativamente baja, en la investigación de anticuerpos circulantes fluorescentes (62.4% de pacientes con diagnóstico clínico y Montenegro positivos; 70.8% de pacientes parasitológicamente comprobados). Esta afirmación es vertida a pesar de haberse adoptado técnicas de eficacia ya comprobada, con un mínimo de modificaciones capaces de interferir con los resultados. Además de la reconocida subjetividad en la lectura de láminas, los factores relacionados con las respuestas inmunitarias desencadenadas por el agente infeccioso determinan variaciones cualitativas y cuantitativas, en el transcurso de la evolución de la infección. Esto es lo que parecen sugerir las observaciones obtenidas en el cuadro 2, donde siete pacientes, con parásitos en sus lesiones activas, no presentaron niveles de anticuerpos detectables a través de la IFA (promastigotes).

Todo ello contrasta con el comportamiento de la IFA practicada con el antígeno de amastigotes (95.6% de positividad). A pesar de que el número de casos positivos es, en general, relativamente pequeño, los resultados obtenidos demuestran que el antígeno de amastigotes es sumamente preciso en el diagnóstico de LTA, en concordancia con lo consignado por Shaw y Lainson (16), y significativamente más preciso que el antígeno de promastigotes. En apariencia, cuando se compara la antigenicidad de las formas promastigotes y amastigotes de *Leishmania*, en el diagnóstico de LTA, las formas intracelulares permiten detectar con mayor precocidad y eficacia, a los anticuerpos circulantes. Para sustentar esta afirmación, pueden encon-

trarse evidencias en el cuadro 2, en que, de ocho pacientes con lesiones relativamente recientes (de tres meses a un año de evolución), siete presentaron títulos positivos con el antígeno de amastigotes, en tanto que solo tres lo hicieron con el de promastigotes.

En general, el antígeno de formas amastigotes puso en evidencia a los anticuerpos en títulos bajos, hecho que ya había sido observado tanto por Bray y Lainson (31), como por Convit y Pinardi (32).

Asimismo, en la muestra estudiada no pareció existir asociación entre los títulos de anticuerpos fluorescentes detectados por la IFA de amastigotes, y las formas clínicas de la enfermedad, tiempo de evolución de la infección y número de lesiones. Los títulos se distribuyeron entre 1:40 y 1:1,280; algunos relativamente altos son atribuidos a pacientes con formas cutáneas y mucosas de evolución crónica, a pesar de ser pocos los casos de lesiones muy recientes; sin embargo, serían necesarias otras observaciones.

Sin bien la casuística aquí considerada es relativamente pequeña, los hallazgos de los autores sugieren que las formas con compromiso mucoso influirían de manera significativa en los títulos de anticuerpos circulantes. Este hecho está en contradicción con lo informado por Bitencourt *et al.* (33), quienes consideraron que no existe relación entre el nivel de anticuerpos circulantes, y la forma clínica de la enfermedad.

El hallazgo de que los títulos de anticuerpos fluorescentes circulantes están influidos por el número de lesiones que tiene el paciente, ya había sido señalado por Chiari (17), en un grupo de pacientes con lesiones recientes y estrictamente cutáneas de LTA. La autora refiere que el tiempo de evolución de la lesión inicial, la comprobación parasitológica y la edad del paciente, no ejercieron influencia significativa en los títulos de anticuerpos circulantes.

En la reacción de inmunofluorescencia

indirecta, parece bastante razonable usar antígenos preparados a partir de las formas amastigotes del parásito, comprobar su eficacia en encuestas epidemiológicas de prevalencia de infecciones y, sobre todo, constatar su utilidad en el seguimiento de pacientes sometidos al tratamiento, o probar la eficacia de la acción de nuevos compuestos quimioterapéuticos (34).

En este estudio, la AD ha probado ser de razonable utilidad (su comportamiento en el diagnóstico es básicamente similar al de la IFA, promastigotes), y los autores consideran que si esta prueba se utiliza en condiciones de campo, sería aún más valiosa por su simplicidad y rapidez. La precisión de la AD no alcanzó a la obtenida por Allain y Kagan (4), pero por ahora, no se dispone de una explicación para ello. Sin embargo, conviene señalar que, en esta experiencia, el empleo simultáneo de las dos pruebas serológicas es capaz de mejorar en forma notoria el inmunodiagnóstico de leishmaniasis tegumentaria (86.9% de positividad).

En este trabajo se presentan, de manera parcial, algunas dificultades halladas en el diagnóstico de leishmaniasis tegumentaria, y se advierte que aún permanece distante la posibilidad de contar con técnicas parasitológicas e inmunodiagnósticas de precisión y eficacia ideales. Urge investigar técnicas que faciliten la demostración directa del parásito o que hagan viable su hallazgo por métodos indirectos (cultivos con medios apropiados, animales que por su mayor susceptibilidad desarrollen con rapidez lesiones manifiestas, técnicas histoquímicas, etcétera). Asimismo, es necesario refinar y estandarizar los antígenos parasitarios que permitan obtener una notoria mejoría en las pruebas serológicas empleadas en la actualidad.

Resumen

Se estudiaron 56 pacientes de leishmaniasis tegumentaria americana (LTA),

provenientes del Servicio Dermatológico, del Hospital Docente de la Universidad de Brasília, y de tres municipios del estado de Bahía, Brasil, portadores de formas clínicas cutáneas activas (29) y mucosas (27).

Los exámenes diagnósticos fueron: biopsias (frotis por aposición, cortes histológicos e inoculación en cricetos); intradermorreacción de Montenegro (antígeno leishmanina, 30 μg N/ml); inmunofluorescencia indirecta, IFA (antígeno promastigotes), y aglutinación directa, AD. En un grupo seleccionado de pacientes parasitológicamente positivos se utilizó la técnica de IFA con antígeno de amastigotes.

De 29 pacientes de formas cutáneas activas, 16 (55.1%) presentaron amastigotes en las lesiones comprobados a través de algún(os) de los exámenes. De los 27 individuos portadores de formas mucosas activas, apenas ocho (29.6%) fueron parasitológicamente comprobados. De los frotis efectuados, 14/56 (25.0%) fueron positivos y 15/55 (27.27%) de los cortes histológicos

evidenciaron amastigotes. De los cricetos inoculados, 35.8% evidenciaron nódulos parasitarios en períodos de incubación variables (de 2.5 a 8 meses).

La reacción de Montenegro fue positiva en 94.6% de los pacientes. Cuando se empleó el antígeno de promastigotes, la precisión de la IFA fue de 62.4% en pacientes con diagnósticos clínico y Montenegro positivos, y 70.8% para los pacientes con amastigotes observados en los frotis. En un estudio comparativo de la IFA (promastigotes y amastigotes) se concluye que el antígeno de amastigotes es sumamente preciso en LTA y significativamente más preciso que el de promastigotes. En la muestra estudiada, el empleo simultáneo de la IFA y de la AD mejoraron de manera notoria el inmunodiagnóstico de LTA (86.9%). Por otra parte, se observó una asociación significativa, cuando los títulos de la IFA de amastigotes se relacionaron con el número de lesiones presentes, y con las formas clínicas de la enfermedad. \square

REFERENCIAS

- (1) Marsden, P. D. y R. R. Nonata. Mucocutaneous leishmaniasis. A review of clinical aspects. *Rev Soc Bras Med Trop* 6:309-326, 1975.
- (2) Guimarães, M. C. S., V. L. Giovannini y M. E. Camargo. Antigenic standardization for mucocutaneous leishmaniasis immunofluorescence test. *Rev Inst Med Trop (São Paulo)* 16:145-148, 1974.
- (3) Kagan, G. I. Advances in the immunodiagnosis of parasitic infections. *Z Parasitenkd* 45:163-195, 1974.
- (4) Allain, D. S. y G. I. Kagan. A direct agglutination test for leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 24(2):232-236, 1975.
- (5) Bray, R. S. Immunodiagnosis of leishmaniasis. En: Cohen, S. y E. Sadun (Eds.). *Immunology of Parasitic Infections*. Londres: Blackwell Scientific Publications. Págs. 65-76, 1976.
- (6) Chaves, J. Immuno-Diffusion reactions among various samples of *Leishmania*. *Acta Cient Venez* 21:68-70, 1970.
- (7) Barbosa, W., M. C. Moreira de Souza, J. M. Souza, D. M. Rassi, B. B. Gerais y R. L. Oliveira. Note on the classification of the *Leishmania* sp. responsible for cutaneous leishmaniasis in the East Central Region of Brazil. *Ann Trop Med Parasitol* 70(4):389-399, 1976.
- (8) Lainson, R. y J. J. Shaw. Leishmaniasis in Brazil. V. Studies on the epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Mato Grosso State and observations on two distinct strains of *Leishmania* isolated from man and forest animals. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 64(5):654-667, 1970.
- (9) Lainson, R. y J. J. Shaw. Epidemiological considerations of the *Leishmanias* with particular reference to the New World. En: Fallis, A. (Ed.). *Symposium on Ecology and Physiology of Parasites*. Universidad de Toronto, 1971.
- (10) Lainson, R. y J. J. Shaw. Leishmaniasis of the New World. Taxonomic problems. *B Med Bull* 28:44-48, 1972.
- (11) Chance, M. L., W. Peters y L. Shchory. Biochemical taxonomy of *Leishmania*. I. Observations on DNA. *Ann Trop Med Parasitol* 68:307-316, 1974.
- (12) Gardener, P. J., M. L. Chance y W. Peters. Biochemical taxonomy of *Leishmania*. II.

- Electrophoretic variations of malate dehydrogenase. *Ann Trop Med Parasitol* 68:317-325, 1974.
- (13) Gardener, P. J., L. Shchory y M. L. Chance. Species differentiation in the genus *Leishmania* by morphometric studies with the electron microscope. *Ann Trop Med Parasitol* 71(2):147-154, 1977.
- (14) Camargo, E. P. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypansomes in liquid media. *Rev Inst Med Trop (São Paulo)* 6:93-100, 1964.
- (15) Goa, J. A microbiuret method for protein determination of total protein in cerebrospinal fluid. *Scand J Clin Lab Invest* 5:218-223, 1953.
- (16) Shaw, J. J. y R. Lainson. A simply prepared amastigote leishmanial antigen for use in the indirect fluorescent antibody test for leishmaniasis. *J Parasitol* 63:384-385, 1977.
- (17) Chiari, C. A. Pesquisa de anticorpos circulantes na leishmaniose tegumentar americana pela reação de imunofluorescência indirecta. Tesis. Belo Horizonte, Universidad Federal de Minas Gerais, 1971.
- (18) Furtado, T. A. Diagnóstico laboratorial de Leishmaniose tegumentar americana. *An Bras Derm* 47:211-218, 1972.
- (19) Azulay, R. D. Leishmaniose tegumentar. *JBM* 50-70, 1974.
- (20) Zeledon, R. y C. Ponce. Parasitological and immunological diagnosis of cutaneous leishmaniasis in the New World. *Proceedings of the 3th International Congress on Parasitology, Munich* 1:239-240, 1974.
- (21) Coutinho, E. *Tratado de Clínica das Doenças Infecciosas, Parasitárias e Peconhentas*. 6ª edición. Livraria Editora Guanabara Koogan, 1957.
- (22) Coelho, M. V. y E. Coutinho-Abath. Experimental cutaneous leishmaniasis. I. Infection of albino mice and Sriam hamsters by *Leishmania mexicana*. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 7:136-144, 1965.
- (23) Coutinho-Abath, E. y M. V. Coelho. Experimental cutaneous leishmaniasis. II. The pathology of leishmaniasis by *Leishmania mexicana*. *Rev Insti Med Trop São Paulo* 7:145-155, 1965.
- (24) Coelho, M. V. Recent researches on the transmission of South American cutaneous leishmaniasis. *Proceedings of the 7th International Congress on Tropical Medicine and Malaria*. 2:320-323, 1964.
- (25) Lainson, R., R. D. Ward y J. J. Shaw. Experimental transmission of *Leishmania chagasi*, causative agent of neotropical visceral leishmaniasis, by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Nature* 266:628-630, 1977.
- (26) Medina, R. y E. Belfort. Leishmaniasis de la mucosa naso-bucal. *Arch Venez Med Trop Parasitol Med* 1:307-316, 1973.
- (27) Hommel, M. W., W. Peters y M. L. Chance. *Leishmania braziliensis braziliensis* in immunosuppressed hamsters and nude mice. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 69, 1975.
- (28) Marsden, P. D., C. C. Cuba, A. C. Barreto, R. N. Sampaio y R. A. A. Rocha. Nifurtimox in the treatment of South American leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 73(4):391-394, 1979.
- (29) Melo, M. N., W. Mayrink, C. A. Costa, P. A. Magalhães, M. Dias, P. Williams, F. G. Araujo, M. V. Coelho y S. M. Batista. Padronização do antígeno de Montenegro. *Rev Inst Med Trop (São Paulo)* 19:161-164, 1977.
- (30) Walton, B. C., W. H. Brooks e I. Arjona. Serodiagnosis of American leishmaniasis by indirect fluorescent antibody test. *Am J Trop Med Hyg* 21:296-299, 1972.
- (31) Bray, R. S. y R. Lainson. The immunology and serology of leishmaniasis. I. The fluorescent antibody staining technique. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 59(5):535-544, 1965.
- (32) Convit, J. y M. E. Pinardi. Applying the indirect immunofluorescency test to the study of American cutaneous leishmaniasis. *Dermatologia Int* 8:17-20, 1969.
- (33) Bittencourt, A. L., A. Sodr  y Z. A. Andrade. Pesquisa de anticorpos circulantes pelo método de imunofluorescencia na leishmaniose tegumentar. *Rev Inst Med Trop (São Paulo)* 10(4):247-252, 1968.
- (34) Walton, B. C. The indirect fluorescent antibody test for evaluation of effectiveness of chemotherapy in American leishmaniasis. *J Parasitol* 56(2):480-481, 1970.

Parasitologic and immunologic diagnosis of American tegumentary leishmaniasis (Summary)

A study of 56 American tegumentary leishmaniasis (ATL) patients from the Dermatology Service of the Teaching Hospital of the Uni-

versity of Brasilia and three municipalities of the state of Bahia, Brasil, is reported. All were carriers of clinically active cutaneous forms (29)

and mucous forms (27).

The diagnostic tests were: biopsies (smears made by apposition, histological slicing, and inoculation in hamsters); Montenegro's intradermal reaction (leishmanine antigen, 30 μg N/ml); indirect immunofluorescence, IFA (promastigotes antigen), and direct agglutination, DA. On a select group of parasitologically positive patients, the technique of IFA was used with the amastigotes antigen.

One or more tests confirmed the presence of amastigotes in the lesions of 16 (55.1%) of the 29 patients with active cutaneous forms. Of the 27 individuals carrying the active mucous forms, only 8 (29.6%) were parasitologically confirmed. Of the smears made, 14/56 (25.0%) were positive and 15/55 (27.27%) of the histological slices showed amastigotes. Of the hamsters inoculated, 35.8% showed par-

asitic nodules with varying incubation periods (from 2.5 to 8 months).

The Montenegro reaction was positive in 94.6% of the patients. When the promastigotes antigen was used, the precision of the IFA was 62.4% in clinically diagnosed and Montenegro positive, patients, and 70.8% for patients with amastigotes observed in the smears. In a comparative study of the IFA (promastigotes and amastigotes), it was concluded that the amastigotes antigen is very precise in ATL and significantly more precise than the promastigotes antigen. In the sample studied, the simultaneous use of IFA and of DA improved notably the immunodiagnosis of ATL (86.9%). In addition, a significant association was observed when the IFA titers of amastigotes were compared with the number of lesions present and with the clinical forms of the disease.

Diagnóstico parasitológico e imunológico da leishmaníase tegumentária americana (Resumo)

Estudaram-se 56 pacientes com leishmaníase tegumentária americana (LTA), provenientes do Serviço Dermatológico do Hospital Docente da Universidade de Brasília e de três municípios da Bahia, Brasil, portadores de formas clínicas cutâneas ativas (29) e mucosas (27).

Os exames diagnósticos foram: biópsias (esfregaço por aposição, cortes histológicos e inoculação em cricetos); interdermorreação de Montenegro (antígeno leishmanina 30 μg N/ml); imunofluorescência indirecta, IFA (antígeno promastigotas), e aglutinação directa, AD. Num grupo escolhido de pacientes parasitologicamente positivos utilizou-se a técnica de IFA com antígeno de amastigotas.

Dentre 29 pacientes com formas cutâneas ativas, 16 (55,1%) apresentaram amastigotas nas lesões comprovadas através de alguns dos exames. Dentre os 27 indivíduos portadores de formas mucosas ativas, só oito casos (29,6%) ficaram parasitologicamente comprovados. Dos esfregaços, 14/56 (25,0%) foram positivos e 15/55 (27,27%) dos cortes histológicos mos-

taram evidências de amastigotas. Dos cricetos inoculados, 35,8% demonstraram a evidência de nódulos parasitários em períodos de incubação variáveis (de 2,5 a 8 meses).

A reação de Montenegro foi positiva em 94,6% dos pacientes. Quando se empregou o antígeno de promastigotas, a precisão da IFA foi de 62,4% nos pacientes com diagnóstico clínico e de Montenegro positivos, e 70,8% para pacientes com amastigotas observados nos esfregaços. Num estudo comparativo da IFA (promastigotas e amastigotas) conclui-se que o antígeno de amastigotas é sumamente preciso em LTA e significativamente mais preciso que o de promastigotas. Na amostra estudada, o emprego simultâneo da IFA e da AD melhoraram notadamente o imunodiagnóstico de LTA (86,9%). Por outro lado, observou-se uma associação significativa quando os títulos da IFA de amastigotas se relacionaram com o número de lesões presentes e com as formas clínicas da doença.

Diagnostic parasitologique et immunologique de leishmaniose tégumentaire américaine (Résumé)

L'étude a porté sur 56 malades porteurs de formes cliniques cutanées actives (29) et de leishmaniose tégumentaire américaine des muqueuses (LTA) (27), du Service de Dermatologie, Hôpital Clinique de l'Université de

Brasília et de trois municipalités de l'Etat de Bahia, Brésil.

Le diagnostic a été fait par biopsie (frotis par apposition, étude histologique et inoculation de hamsters), intradermoréaction de Montene-

gro (antigène leishmanine, 30 µg N/ml); inmunofluorescencia indirecta, IFA (antigène promastigote) et agglutination directa (AD). Dans le cas de malades effectivement infectés, la technique d'IFA a été utilisée avec l'antigène d'amastigotes.

Il a été trouvé par l'une des techniques ci-dessus mentionnées que 16 (55,1%) des 29 malades ayant des formes cutanées actives avaient des amastigotes dans ces lésions. Seulement 8 (29,6%) des 27 malades porteurs de formes muqueuses actives ont été confirmés. Dans le cas des frotis prélevés, 14/56 (25%) on été positifs, et 15/55 (27,27%) des coupes histologiques montraient des amastigotes. Il a été possible de mettre en évidence chez 35,8% des animaux inoculés des nodules parasitaires se trouvant à différentes périodes d'incubation (2,5 à 8 mois).

La réaction de Montenegro a été positive pour 94,6% des malades. En présence d'antigène promastigote, la précision de l'IFA a été de 62,4% pour les malades ayant un diagnostic clinique et une réaction de Montenegro positifs, et de 70,8% pour ceux des malades chez qui il a été trouvé des amastigotes dans les frotis effectués. Une étude comparative de l'IFA (promastigotes-amastigotes) permet de conclure que l'antigène d'amastigote est très précis pour le LTA, et significativement plus précis que dans le cas des promastigotes. L'emploi simultané de l'IFA et de l'AD a permis d'améliorer notablement l'immunodiagnostic de LTA (86,9%). Par ailleurs, il a été observé qu'il existe une association significative entre les titres de l'IFA d'amastigotes, le nombres des lésions et les formes cliniques de la maladie.

EL HABITO DE FUMAR COMO ACTITUD ANTISOCIAL

Constituye un hecho importante y alentador que ser fumador vaya resultando cada vez más incómodo en sociedad. La misma gente que antes recibía en un despacho con el aire espeso por el humo de cigarrillo, que fumaba cigarros sobre la comida de los otros, que echaba el humo de la pipa en el ascensor, empieza a sentirse molesta con su hábito. Ahora la presión social en general no está de parte del fumador, sino que más bien los fumadores empiezan a disculparse. Este es un signo muy saludable. . . La gente y los gobiernos empiezan a darse cuenta de que, si bien el fumar es un acto que solo puede realizarlo el individuo, afecta a la salud y a la calidad de la vida de todo el mundo y, por lo tanto, es un asunto que incumbe a la sociedad.

Por tanto, es un asunto que tiene que abordar la sociedad, porque la cohorte de fumadores constantemente incorpora nuevos miembros. Testigo de esto es la gran cantidad de niños que empiezan a fumar, el número cada vez mayor de mujeres que ya lo hacen. Por primera vez en 1979 hubo en Estados Unidos de América más fumadoras que fumadores en el grupo de diez a veinte años de edad. . . Si no tomamos rápidamente medidas, esta siniestra tendencia pronto se generalizará en los países desarrollados y también en los países en desarrollo.

(Tomado de: Halfdan Mahler, discurso pronunciado en la Cuarta Conferencia Mundial sobre el Tabaco y la Salud, celebrada en Estocolmo del 18 al 21 de junio de 1979. *WHO Chronicle* Vol. 34, No. 4, abril de 1980. Pág. 157.)