

Inquérito Epidemiológico: Padrão de Reatividade Intradérmica ao Teste Cutâneo com Antígeno de Leishmania na Área Endêmica de Laje – Bahia, Brasil

Epidemiological Survey: Based Upon the Delayed Hypersensitivity Pattern of Montenegro's Skin Test in an Endemic Area, Laje – Bahia, Brazil

Andréa Straatmann, Eduardo Martins Netto, Iza Lobo, Maria Nakatani, Márcio O. Silva, Fábio Amorim, Renata C. Lopes, Melissa B. Falcão, Roberto Badaró, José Tavares-Neto
Faculdade de Medicina da Bahia e Complexo Hospital Universitário Prof. Edgard Santos, Salvador, Bahia, Brasil

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma zoonose endêmica na região sul do Estado da Bahia, onde foi realizado estudo de prevalência da infecção pela *Leishmania* sp., aplicando-se o teste intradérmico de Montenegro (IDRM). O inquérito clínico-epidemiológico foi realizado em uma amostra de 752 moradores do município de Laje, BA, sendo 495 do sexo feminino e 257 do masculino, com idades entre 18 a 80 anos. A IDRM foi positiva em 49 moradores (6,5%), sendo mais frequente nos maiores de 49 anos ($p < 0,02$). A presença de lesão cicatricial, compatível com LTA, foi verificada em 45% dos indivíduos IDRM-reativos e em 2,6% dos não-reativos ($p < 0,01$). Em conclusão, o município de Laje, onde há poucas áreas de florestas nativas, tem população com baixo percentual reativo para a IDRM. A positividade para a IDRM foi mais frequente nas faixas etárias mais elevadas, sugerindo maior transmissão de *Leishmania* sp. no passado.

Palavras-chave: Leishmaniose tegumentar americana, teste de Montenegro, inquérito epidemiológico, antígenos de leishmania, Bahia.

American cutaneous leishmaniasis (CL) is an endemic zoonosis at the South region of Bahia State, where a cross-sectional study was conducted to determine the prevalence of Leishmania sp. infection based upon the response to Montenegro's skin test (MST). In the study a sample of 752 Laje's city inhabitants were surveyed, 495 women and 257 men, with ages between 18 and 80. The MST was positive (>5mm) in 49 (6.5%) individuals, being more frequent on older than 49 years ($p < 0.02$). The presence of a typical scar was noted in 22 (45%) of the MST reactors and between 18 (2.6%) of the negative ones ($p < 0.01$). In conclusion, in Laje, where a few areas of native forests still remains, there is a low proportion of MST reactors between the local population. The positive responses among older people suggests Leishmania sp. that transmission was higher in the past.

Key-words: American cutaneous leishmaniasis, Montenegro's skin test, epidemiological survey, leishmania antigens, Bahia.

Recebido em 09/07/2005

Aceito em 06/10/2005

Endereço para correspondência: Dra. Andréa Straatmann, Rua Clara Nunes, 466, Apto. 1.301, bairro Pituba, 41810-425 Salvador, Bahia, Brasil. E-mail: astraatmann@uol.com.br

Gazeta Médica da Bahia

2005;75(2):Jul-Dez:127-132.

© 2005 Gazeta Médica da Bahia (ISSN 0016-545X).

Todos os direitos reservados.

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença de evolução crônica, que pode acarretar lesões mutilantes, provocada por protozoários do gênero *Leishmania* e transmitida por insetos conhecidos genericamente como flebotomíneos⁽¹⁾.

Há registro de LTA no Estado da Bahia desde o início do século XIX⁽¹⁷⁾. Epidemias da doença foram

associadas ao grande desmatamento ocorrido naquele período, em consequência da expansão da cultura de cacau, que atraiu trabalhadores de várias regiões do país, e da construção de estradas-de-ferro⁽⁴⁾. Atualmente, a LTA é ainda endêmica na região cacauceira, localizada no sul do Estado da Bahia⁽¹⁰⁾.

Em inquéritos epidemiológicos, a intradermorreação de Montenegro (IDRM) é um indicador útil da ocorrência prévia ou ativa de infecção pela *Leishmania* sp.⁽¹⁵⁾. Este teste tem elevada sensibilidade, especificidade e costuma ter bom valor preditivo positivo, tornando-o muito útil em estudos clínico-epidemiológicos⁽⁸⁾, especialmente nas áreas onde não há casos autóctones de calazar, como no município de Laje, Estado da Bahia.

O município de Laje tem registro de casos de LTA desde a década de oitenta do século XX. No período de 1999 a 2001, o coeficiente de incidência foi de 147,9 casos por 100 mil habitantes (Secretaria Municipal de Saúde do Município de Laje: comunicação pessoal, 2001), sendo mais elevado que o do Estado da Bahia e do Brasil⁽¹⁰⁾. Apesar de ser uma região de desmatamento antigo, a cacauicultura determina o consórcio do cacauceiro com as árvores nativas ou frutíferas de grande porte, característica que, aliada a outros fatores ecológicos e climatológicos, expõe os habitantes a maior risco de infecção pela *L. braziliensis braziliensis*, espécie predominante nessa região do Estado da Bahia⁽⁴⁾. Esse conjunto de características motivou o estudo da prevalência de infecção pela *Leishmania* sp. na população daquela localidade, buscando associar a resposta da IDRM à história de LTA e de cicatriz compatível com a mesma.

Material e Métodos

O estudo transversal foi realizado no município de Laje (latitude 13°11'0"; longitude 39°26'0"), situado a 228 km de Salvador, capital do Estado da Bahia, durante o mês de setembro de 2002. O município tem 19.601 habitantes, 5.118 (26,1%) residentes na área urbana e 14.483 (73,9%), na rural; 10.028 (51,2%) são mulheres e 9.573 (48,8%), homens⁽¹²⁾.

Inicialmente, os domicílios ocupados da área urbana e rural (fazendas) foram numerados consecutivamente e, na etapa seguinte, a primeira de cada três habitações foi selecionada de forma sequencial. Após a apresentação do estudo aos moradores, presentes em cada casa selecionada, foi lido e explicado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, aprovado, em 05 de junho de 2002, pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Prof. Edgard Santos (HUPES) da UFBA (Salvador, BA). Após a assinatura do termo pelo morador, foi realizado o agendamento do mesmo para a aplicação do questionário-padrão, exame clínico e a realização da intradermorreação de Montenegro (IDRM), excluindo-se os portadores de doenças imunodepressoras, com idades menores de 18 ou maiores de 80 anos e/ou aqueles com residência em Laje há menos de dois anos.

O questionário-padrão incluiu dados de identificação e demográficos do participante: nome, data de nascimento, sexo, grupo racial, naturalidade, endereço e dados clínicos. Na investigação retrospectiva sobre a possibilidade do prévio adoecimento por leishmaniose cutânea (executada antes da realização da IDRM), foi exaustivamente pesquisada a presença de lesões cicatriciais, compatíveis com aquela doença no passado. Também, foram levantadas informações sobre a realização de tratamento com antimonial ou outra droga específica para o tratamento de LTA; outro tratamento inespecífico relacionado à LTA; além de história da prévia realização da intradermorreação de Montenegro.

A intradermorreação de Montenegro (IDRM) consistiu-se da inoculação intradérmica de 0,1 mL de antígeno de leishmania (*L. mexicana amazonensis*, cepa MHOM/BR/76/Josefa), preparado no Laboratório de Medicina Tropical do HUPES, na concentração de 25 µgN por dose e de acordo com a descrição de Reed et al.⁽¹⁶⁾. A mensuração da induração produzida, após 48 a 72 horas da inoculação, foi considerada reativa se ≥ 5 mm e classificada: a) não-reativa, de 0 a 4,9 mm; b) reativa-fracas, de 5 a 9,9 mm; c) reativa, de 10 a 15 mm; e d) reativa-forte, > 15 mm. Após a realização do inquérito, os resultados foram

digitados e analisados pelo programa estatístico SPSS versão 9.0 “for Windows”. A análise estatística foi realizada utilizando-se o teste do qui-quadrado, com ou sem correção de Yates, ou teste exato de Fisher, conforme a indicação. Em casos de variáveis contínuas de distribuição normal, foi aplicado o teste t de Student ou, alternativamente, o teste não-paramétrico de Mann-Whitney quando adequado. Nesses testes, a probabilidade de erro tipo α foi considerada significativa se menor ou igual a 5,0%.

Resultados

Dos 787 indivíduos selecionados inicialmente, a maioria (n=752; 95,6%) retornou para leitura do teste cutâneo, sendo 495 (65,8%) do sexo feminino e 257 (34,2%) do masculino. Os 35 (4,4%) indivíduos que não retornaram para leitura da IDRМ apresentaram características demográficas semelhantes às da amostra total da população.

Dentre os 752 indivíduos incluídos no estudo, 49 (6,5%) foram reativos, entre esses 24 (3,2%) classificados como reativos ou reativos-fortes (IDRM ≥ 10 mm); 25 (3,3%) reativos-fracos e 703 (93,5%) não-reativos (Tabela 1). No conjunto dos reativos (≥ 5 mm), a média do diâmetro da induração foi de 10,4 ($\pm 5,3$)mm e a mediana de 9,0mm. Os indivíduos reativos (≥ 10 mm e =15mm) e reativos-fortes (>15 mm) tinham características demográficas semelhantes e, por isso, passaram a ser analisados em conjunto. Os 49 indivíduos que apresentaram reatividade à IDRМ apresentaram média de idade de 44,4 ($\pm 15,7$) anos, sendo esta média superior à dos 703 moradores não-reativos (35,0 \pm 13,6 anos) (p<0,0001).

A prevalência da resposta ao teste intradérmico IDRМ não diferiu significativamente (p>0,69) entre homens (7,0%) e mulheres (6,3%). A prevalência deste exame não variou marcadamente dentro de cada uma das sete faixas etárias consideradas na Tabela 2. Entretanto, na faixa etária de 18 a 49 anos, a proporção de reativos (≥ 5 mm) foi de 4,4% (27/610) e, nos maiores de 49 anos, de 9,3% (23/247), sendo essa diferença significativa (p<0,02).

Entre os moradores da área urbana (n=472), a proporção de reativos ao teste intradérmico foi de 5,1% (n=24), enquanto nos da área rural (n=279), de 9,0% (n=25), sendo essa diferença estatisticamente significativa (p<0,05). O local da residência de um morador não foi anotado.

Quanto à distribuição dos grupos raciais (mulato, negro e branco), foram semelhantes (p>0,30) as proporções de reativos e não-reativos, respectivamente nos reativos de 57,1% (n=28) mulatos, 28,6% (n=14) negros e 14,3% (n=7) brancos; já no grupo dos 702 não-reativos, a distribuição foi: 46,1% (n=324) mulatos, 33,3% (n=234) negros e 20,5% (n=144) brancos.

Ao exame físico, nenhum morador tinha lesão cutânea e/ou mucosa em atividade compatível com LTA. Dentre aqueles que apresentaram IDRМ não-reativa (n=703), 18 pessoas (2,6%) tinham lesão cutânea prévia (cicatriz) sugestiva de leishmaniose tegumentar e, dentre os 49 que apresentaram IDRМ-reativa, 22 (44,9%) também possuíam a mesma lesão. Isto corresponde a uma razão de prevalências de 17,3 (p<0,0001). Com esses resultados, a sensibilidade da IDRМ foi de 55% (22/40), a especificidade de 96,2% (685/712) e a concordância de 94% (22 + 685/752). Dentre as 40 pessoas com cicatriz sugestiva de LTA (18 IDRМ-não reativa + 22 IDRМ-reativa), o diâmetro da induração ao IDRМ teve média de 6,2mm, sendo significativamente maior (Mann-Whitney: p<0,0001) do que nos 712 casos sem o mesmo tipo de cicatriz (média de 0,44mm).

A localização das cicatrizes nas 22 pessoas com cicatriz e IDRМ-reativa estavam assim distribuídas: 66,6% (n=12) nos membros inferiores; 16,6% (n=3) nos superiores; 11,1% (n=2) no tronco; 5,5% (n=1) na região da cabeça (mucosa nasal) e pescoço; e em 18% (n=4) a localização não foi anotada. Nos 18 indivíduos IDRМ não-reativos, todas as 18 cicatrizes estavam localizadas nas extremidades, sendo 83,3% (n=15) nos membros inferiores e 16,6% (n=3) nos superiores.

Dentre os moradores IDRМ-reativos (n=49), quatro (8,2%) informaram teste intradérmico (IDRM) prévio, enquanto esta proporção nos não-reativos foi de 1,1% (8/703), sendo essa diferença significativa

Tabela 1. Teste intradérmico (IDRM) ao antígeno de *L. mexicana amazonensis*, segundo o sexo dos moradores do município de Laje (Estado da Bahia), 2002

IDRM (em mm)	Sexo, n (%)		Total
	Masculino	Feminino	
Não-reativo ($\leq 4,9$)	239 (93)	464 (93,7)	703 (93,5)
Reativo-fraco ($5,0 \text{---} 9,9$)	5 (1,9)	20 (4,1)	25 (3,3)
Reativo ($10 \text{---} 15$)	5 (2)	7 (1,4)	12 (1,6)
Reativo-forte (>15)	8 (3,1)	4 (0,8)	12 (1,6)
Total	257 (100)	495 (100)	752 (100)

Tabela 2. Teste intradérmico (IDRM) com antígeno de *L. mexicana amazonensis*, segundo faixa etária e sexo na população estudada de Laje (Bahia), 2002

Faixa etária (anos)	Sexo (n)	IDRM-reator, n (%)	p
18 --- 25 (A)	masculino (87)	2 (2,3)	>0,72*
	feminino (147)	6 (4,1)	
	total (234)	8 (3,4)	
26 --- 33 (B)	masculino (44)	1 (2,3)	>0,55*
	feminino (114)	7 (6,1)	
	total (158)	8 (5,1)	
34 --- 41 (C)	masculino (56)	3 (5,4)	>0,69**
	feminino (76)	3 (4,0)	
	total (132)	6 (4,5)	
42 --- 49 (D)	masculino (24)	2 (8,3)	>0,61**
	feminino (62)	3 (4,8)	
	total (86)	5 (5,8)	
50 --- 57 (E)	masculino (23)	3 (13,0)	$\cong 1,0^*$
	feminino (55)	6 (10,9)	
	total (78)	9 (11,5)	
58 --- 65 (F)	masculino (14)	5 (35,7)	>0,28*
	feminino (31)	5 (16,1)	
	total (45)	10 (22,2)	
66 --- 80 (G)	masculino (9)	2 (22,2)	>0,58**
	feminino (10)	1 (10,0)	
	total (19)	3 (15,8)	
Total	masculino (257)	18 (7,0)	>0,69
	feminino (495)	31 (6,3)	
	total (752)	49 (6,5)	

(*) qui-quadrado com correção de Yates; (**) teste exato de Fisher; (A + B + C + D) versus (E + F + G): $\chi^2=6,13$; $p<0,02$.

($p < 0,001$). Apenas 12 (1,7%) pessoas não-reativas relataram o prévio uso de antimonial (Glucantime®) ou outro tratamento específico para leishmaniose, sendo essa mesma proporção de 20,4% ($n=10$) nos reativos ($p < 0,001$).

Discussão

No presente estudo, a reatividade da intradermoreação de Montenegro (IDRM) foi de 6,5%, próxima à descrita em 1985 na região endêmica de Três Braços⁽⁵⁾, também localizada no Estado da Bahia. Essa baixa taxa de reatividade provavelmente indica menor risco de transmissão pela *L. b. braziliensis*, o que talvez seja consequência da atual ausência de condições ambientais favoráveis ou predisponentes, como a inexistência de áreas recentes de desmatamento no município de Laje⁽¹⁾.

O predomínio observado de indivíduos do sexo feminino na amostra da população do município de Laje decorreu da mais freqüente ausência, no momento da visita domiciliar, dos indivíduos do sexo masculino, especialmente daqueles com idades entre 18 a 60 anos, e isso por conta das atividades laborativas, sobretudo agrícolas, quase sempre distantes do local de moradia. Também, o maior número de moradores da área urbana do município deveu-se a adversidades encontradas no trabalho na área rural, especialmente o difícil acesso a diversas fazendas, bem como à dificuldade em localizar os seus moradores, porque muitos passam o dia desempenhando atividades agrícolas ou trabalhando em casas de farinha, muito comuns na região, distantes do local da residência.

Além dessas razões metodológicas, outros fatores podem também ter influenciado na prevalência da reatividade à IDRM observada, como: o uso de apenas um método diagnóstico, que apesar de freqüentemente aplicado em estudos epidemiológicos em áreas endêmicas⁽¹⁴⁾, reduz a sensibilidade diagnóstica para cerca de 75%⁽¹⁸⁾; o tempo prolongado entre a infecção ou doença e o momento do teste, apesar da discordância entre autores sobre o tempo de permanência da reatividade da IDRM após a cura da

leishmaniose (parecendo que as diferenças estão relacionadas às espécies causais), sendo de 15 a 20 anos para *L. braziliensis*^(5 13 15 19); e a capacidade sensibilizante do prévio teste de IDRM^(14 19). Nesse último caso, foi baixa a freqüência (1,6%) de moradores com esse tipo de relato, sendo 8,2% entre os IDRM-reativos e de 1,1% nos não-reativos.

Amplas variações na prevalência de reatividade à IDRM têm sido observadas em regiões endêmicas para leishmaniose cutânea. Estudos realizados em municípios próximos a Laje relataram prevalências de reatividade que variaram de 5,2% a 16%^(2, 3, 7, 9, 11). Variações na prevalência podem estar relacionadas a diferentes condições, como a concentração do antígeno utilizado na IDRM⁽⁵⁾, freqüência de infecções subclínicas que não deixam cicatriz reconhecível^(5,8), variação sazonal da infecção, as variações decorrentes da seleção da amostra e outras razões metodológicas, já assinaladas anteriormente.

A média de idade mais elevada entre os indivíduos IDRM-reativos, verificada no presente estudo, pode estar relacionada à exposição ocupacional⁽¹⁾, persistência da reatividade por infecção passada ou exposição ao agente por tempo mais prolongado⁽¹⁹⁾ ou até mesmo à ocorrência de maior taxa de infecção no passado.

A localização das cicatrizes típicas de LTA nos IDRM-reativos coincide com a descrita na literatura, havendo predominância de lesões nas extremidades⁽⁶⁾. No entanto, a discreta associação entre o achado de cicatriz típica de LTA e o teste IDRM reativo, pode estar relacionada à ocorrência de formas subclínicas de LTA^(8 15). Esse argumento é reforçado pela elevada freqüência de moradores de Laje que apresentaram IDRM reativa e negaram exame IDRM prévio ou o uso de tratamento específico para leishmaniose, o que pode indicar a apresentação subclínica e conseqüentemente a baixa demanda na procura de assistência médica. Um estudo prospectivo em área endêmica relatou reatividade ao teste IDRM em 12,3% entre assintomáticos no primeiro ano de acompanhamento, seguido respectivamente de 4,7% e 8,9% no segundo e terceiro ano, respectivamente⁽⁸⁾.

Em conclusão, o percentual mais elevado de

indivíduos reativos ao teste da IDRM nas faixas etárias mais elevadas sugere menor taxa de transmissão da *Leishmania* sp. do que aquela assinalada em passado recente, quando a incidência de LTA entre os habitantes do município de Laje foi a maior do país. Coincidentemente, nas duas últimas décadas, diminuiu-se o desmatamento da floresta atlântica nativa na região e também houve marcante êxodo rural decorrente da crise econômica na cacauicultura, o que pode ter contribuído para diminuir a intensidade de exposição ao agente causal.

Referências Bibliográficas

1. Araújo Filho NA. Leishmaniose Tegumentar Americana e o desmatamento da Amazônia. *Acta amaz* 11: 187-189, 1981.
2. Barreto AC, Cuba Cuba CA, Marsden PD, Vexenat JA, De Belder M. Características epidemiológicas da Leishmaniose tegumentar americana em uma região endêmica do Estado da Bahia, Brasil. I. Leishmaniose humana. *Bol Oficina Sanit Panam* 90: 415-22, 1981.
3. Costa JML, Osaho NK, Vale KC, Lago EL, França F, Vexenat JA, Marsden PD. Ocorrência familiar da Leishmaniose tegumentar americana em uma região endêmica, Corte de Pedra, Bahia. *Rev Soc Bras Med Trop* 19: 197-98, 1986.
4. Costa JML, Tada MS, Martins-Netto EM, Vale KC, Lago EL, Marsden PD. Procedência de pacientes portadores de Leishmaniose Tegumentar Americana nas áreas endêmicas de Três Braços e Corte de Pedra – Estado da Bahia - Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 21: 145-149, 1988.
5. Cuba Cuba CA, Marsden P, Barreto AC, Jones TC, Richards F. The use of different concentrations of leishmanial antigen in skin testing to evaluate delayed hypersensitivity in American Cutaneous Leishmaniasis. *Rev Soc Bras Med Trop* 18: 231-236, 1985.
6. Falqueto A, Sessa PA. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: Veronesi R, Focaccia R (ed) *Tratado de Infectologia*, Atheneu: São Paulo, p. 1221-1233, 1996.
7. Follador I, Araújo C, Cardoso MA, Tavares-Neto J, Barral A, Miranda JC, Bittencourt A, Carvalho EM. Surto de Leishmaniose Tegumentar Americana em Canoa, Santo Amaro, Bahia, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 32: 497-503, 1999.
8. Follador I, Araújo C, Bacellar O, Araújo CB, Carvalho LP, Almeida RP, Carvalho EM. Epidemiologic and Immunologic Findings for the Subclinical Form of *Leishmania braziliensis* Infection. *Clin infect dis* 34: 54-8, 2002.
9. França F, Lago EL, Tada S, Costa JML, Vale K, Oliveira J, Costa MA, Osaki M, Cheever L, Netto EM, Barreto AC, Johnson WD, Marsden PD. An outbreak of human *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 86: 169-74, 1991.
10. Fundação Nacional de Saúde (FUNASA). Centro Nacional de Epidemiologia. Ministério da Saúde. Brasil. *Bol eletrôn epidemiol*, Ano 02, Brasília, 2002.
11. Jones TC, Johnson WD, Barreto AC, Lago E, Badaró R, Cerf B, Reed SG, Netto EM, Tada MS, Franca F, Wiese K, Golightly L, Fikrig E, Costa JML, Cuba CC, Marsden P. Epidemiology of American Cutaneous Leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis braziliensis*. *J infect dis* 156: 73-83, 1987.
12. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Censo Demográfico 2000. Ministério do Planejamento/ Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Rio de Janeiro, 2000.
13. Mayrink W, Melo MN, Costa CA, Magalhães PA, Dias M, Coelho MV, Araújo FG, Williams P, Figueiredo YP, Batista SM. Intradermorreação de Montenegro na Leishmaniose Tegumentar Americana após terapêutica antimonial. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 18: 182-185, 1976.
14. Mayrink W, Williams P, Coelho MV, Dias M, Martins AV, Magalhães PA, Costa CA, Falcão AR, Melo MN, Falcão AL. Epidemiology of dermal leishmaniasis in the Rio Doce Valley, State of Minas Gerais, Brazil. *Ann Trop Med Parasit* 73: 123-37, 1979.
15. Pampiglione S, Manson-Mahr PEC, Placa ML, Borgatti MA, Micheloni F. Studies on Mediterranean leishmaniasis. IV The leishmanin skin test in cutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 70: 62-5, 1976.
16. Reed SG, Badaró R, Masur H, Carvalho EM, Loroço R, Lisboa A, Teixeira R, Johnson Jr WD, Jones TC. Selection of a skin test antigen for american visceral leishmaniasis. *Am j trop med hyg* 35: 79-85, 1986.
17. Torres I. A Leishmaniose na Bahia. *Arq bras med* 7: 374-425, 1920.
18. Weigle KA, Dávalos M, Heredia P, Molineros R, Saravia NG, D'Alessandro A. Diagnosis of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Colômbia: a comparison of seven methods. *Am j trop med hyg* 36: 489-96, 1987.
19. Weigle KA, Valderrama L, Arias AL, Santrich C, Saravia NG. Leishmanin skin test standardization and evaluation of safety, dose, storage, longevity of reactions and sensitization. *Am j trop med hyg* 44: 260-71, 1991.