

ARTIGOS

CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA EM UMA REGIÃO ENDÊMICA DO ESTADO DA BAHIA. II LEISHMANIOSE CANINA

Air C. Barretto, Cesar Cuba Cuba, Júlio A. Vexenat,
Ana C. Rosa, Philip D. Marsden e Albino V. Magalhães

Um inquérito em cães realizado na região de Três Braços, Bahia, mostrou que 3,0% de 98 animais tinham amastigotas em lesões de pele. Parasitos não foram encontrados em pele normal da orelha. De uma amostra selecionada de 13 cães, portadores de lesão cutânea ativa, nove (69,2%) deles estavam comprovadamente infectados. Sete amostras de lesão produziram infecção em hamsters. O estudo biológico (crescimento em meio de cultura, evolução da lesão em hamster e desenvolvimento no tubo digestivo de Lutzomyia longipalpis) identificou o parasito como pertencente ao complexo L. braziliensis. A caracterização bioquímica (mobilidade eletroforética de enzimas em placas de acetato de celulose) e o estudo imunotaxonomico (anticorpos monoclonais) definiram as amostras como L. braziliensis braziliensis.

O papel do cão como um possível reservatório de L. b. braziliensis na região de Três Braços é discutido.

Palavras chaves: Leishmaniose canina. *L. braziliensis braziliensis*. Caracterização de cepas. Epidemiologia.

Desde o trabalho de Pedroso²⁶, há 70 anos, até os dias atuais, o achado de parasitos do gênero *Leishmania* em lesões cutâneas de cães de áreas endêmicas de leishmaniose tegumentar tem sido relatado, com frequência, em vários países do continente^{6 8 9 10 19 20 21 22 26 27 28 29 30 31}. Entretanto, o papel desse animal como um possível reservatório dessas *Leishmanias* dermatrópicas nunca foi esclarecido. Na realidade, nem mesmo o parasito era adequadamente identificado devido, principalmente, à pobreza de conhecimentos sobre as várias espécies e subespécies de *Leishmania*. Somente após trabalhos recentes definindo os Complexos de *Leishmania* e suas subespécies, pelo emprego de modernas técnicas que permitem a separação desses parasitos, através de suas características biológicas^{12 13}, bioquímicas^{11 24 25} e imunológicas²³, novos campos foram abertos para um melhor conhecimento taxonômico desses flagelados e um melhor entendimento da ecologia e epidemiologia das leishmanioses.

Muito recentemente, trabalhos preliminares apresentados em Congresso mostraram, pela primeira vez, que parasitos isolados de lesões de cão provenientes da Bahia^{3 4}, Rio de Janeiro¹⁷ e Venezuela¹ foram caracterizados bioquimicamente como *Leishmania braziliensis braziliensis*.

A presença de cães portadores de extensas lesões cutâneas em uma área endêmica de leishmaniose tegumentar (Três Braços, Bahia) levou-nos à realização deste trabalho, visando a determinação da prevalência de infecção nesse animal e a identificação do maior número possível de amostras isoladas de lesões.

MATERIAL E MÉTODOS

Inicialmente foi realizado um inquérito em cães, preliminar, casa/casa na vila de Três Braços e fazendas adjacentes. Essa região, endêmica de leishmaniose tegumentar, está localizada nos municípios de Cravolândia, Ubaira e Wenceslau Guimarães no Estado da Bahia e situada entre 12° 40' latitude Sul e 39° 45' longitude Oeste. Foram examinados 98 cães, dos quais era retirado um fragmento da ponta da orelha ou da borda da lesão, quando existente, para confecção de esfregaços. Amostras de sangue foram coletadas em papel de filtro para a realização de reação de fixação de complemento (RFC^c) para calazar.

Trabalho realizado com o auxílio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) 403690/82 U.S. Public Health Service AI 16282 e Ministério da Saúde (SUCAM).

Endereço para correspondência: Faculdade de Ciências da Saúde - Núcleo de Medicina Tropical e Nutrição, Universidade de Brasília, Brasília, DF - 70910 - Brasil.

Recebido para publicação em 9/3/84.

Posteriormente, treze cães portadores de lesão ativa, suspeitos de leishmaniose foram selecionados para o segundo objetivo deste trabalho. A lesão era cuidadosamente lavada com salina a 0,8% e duas amostras eram retiradas. Um dos fragmentos era colocado em formol-zenker para estudo histopatológico. A segunda amostra era destinada à feitura de esfregaços por aposição e, logo após, triturada com salina e inoculada em focinho e patas de um hamster. A tentativa de isolamento primário através de meio de cultura foi evitado devido à constante contaminação por fungos. Os hamsters inoculados eram observados até um período máximo de um ano. Quando havia suspeita de infecção, pelo aparecimento de lesão cutânea ou emagrecimento progressivo do animal, característica de visceralização de parasitos isolados nessa área, material de pele e/ou vísceras (baço, fígado) eram retirados para confecção de esfregaços, isolamento em meios de cultura (NNN, LIT, Agar Sangue Difco³³) e subinoculações em novos hamsters. Criopreservação dos isolados era também realizada.

Uma vez obtida a infecção em hamster, exemplares de *Lutzomyia longipalpis*, provenientes da colônia mantida em nosso laboratório, eram alimentados nas lesões cutâneas, utilizando-se um aparelho simples idealizado por Vexenat³². Os insetos eram dissecados após a oviposição (4 a 5 dias depois do repasto), com a finalidade de observar o padrão de desenvolvimento do parasito no tubo digestivo (Lainson e cols.^{14 15}).

A caracterização bioquímica dos isolados foi realizada a partir de formas de cultura, com as quais foram preparados os lisados. O estudo eletroforético foi feito em placas de acetato de celulose, e o padrão isoenzimático foi determinado com as enzimas ALAT, ASAT, G6PD e ACP (Laboratório de Microbiologia e Imunologia da Universidade de Brasília – Prof. Isaac Roitman).

Uma bateria de sete anticorpos monoclonais espécie e subespécie específicos para *L. braziliensis* e *L. mexicana* foi empregada para a análise de sete estoques isolados de cães, através da técnica de imunofluorescência indireta (IFI). Os clones utilizados foram: VI 4B9D10, XIII 3F4F6, XIII 3E6B11, IX 1F9D8, XIII 2A5A10, LXVII 1D7B8 e LXVIII 4E12D8, sendo um específico para *L. braziliensis*, três subespecíficos para *L. b. braziliensis*, um para *L. m. amazonensis* e dois para *L. m. mexicana*. Os anticorpos monoclonais de *L. mexicana* foram diluídos a 1:1.000 e os de *L. braziliensis*, 1:100. O anti-

geno empregado foi promastigotas cultivados em meio de Schneider adicionado com 20% de soro bovino fetal e citocentrifugado em lâminas de microscópio (Citocentrifuga Shandon Cytospin). O conjugado fluorescente (coelho) IgG anti-camundongo F ab¹ 2 (Cappel Laboratories) foi usado a uma diluição 1:20. As amostras utilizadas como controle foram LTB-363 (*L. b. braziliensis*) L. 3. (*L. mexicana amazonensis*). A leitura foi realizada empregando-se uma escala arbitrária. Positividade: uma cruz (+) a três (+++). A fluorescência de membranas e flagelos foi também considerada. Negatividade: os organismos apresentavam-se sem brilho e de cor vermelha na luz ultravioleta.

RESULTADOS

De 98 cães examinados durante o inquérito preliminar, três (3,%) mostraram amastigotas em esfregaço de lesão cutânea. As lesões variaram desde pequenas, com bordas regulares, até aquelas extensas e mutilantes e que se localizavam em toda a orelha do animal (Fig. 1). Não foram encontrados parasitos em pele normal e a reação sorológica para calazar foi negativa para todas as amostras, inclusive para os cães, portadores da doença.

De treze cães selecionados, portadores de lesões ativas no focinho, orelhas ou patas, suspeitas de leishmaniose, nove (69,2%) estavam comprovadamente infectados com parasitos do gênero *Leishmania*. Apenas três mostraram raros amastigotas em esfregaços de lesão e sete, incluindo dois positivos por esfregaço, produziram infecção em hamster. De um outro cão, a amostra foi isolada através de meio de cultura e as formas promastigotas não infectaram hamster (Tabela 1). As lesões de patas ou focinho dos hamsters infectados tiveram crescimento lento e relativamente poucas formas amastigotas em esfregaço – uma das características do complexo *L. braziliensis*. Todas as amostras que infectaram hamsters e cujos animais sobreviveram o maior período de tempo produziram visceralização. Em duas amostras foi verificado apenas visceralização, sem lesão cutânea. Em nenhum caso houve metástase, como ocorre freqüentemente com parasitos do complexo *L. mexicana* (Tabela 1).

Nenhum dos isolados cresceu em meio LIT, porém, todos cresceram de modo discreto em NNN e relativamente abundante em Difco Agar Sangue (Tabela 1). Também, quando cultivados em meio de Schneider (Schneider's Drosophila Medium) com a finalidade de preparação do antígeno, o parasito cresceu de forma abundante.



Figura 1 – Úlceras leishmanióticas em cães naturalmente infectados com *Leishmania braziliensis braziliensis*.

Tabela 1 – Caracterização biológica e bioquímica de amostras de *Leishmania* isoladas de lesões cutâneas de cães da região de Três Braços, Bahia

Amostras esfregaço	Comportamento das amostras								Identificação Isoenzimática (ALAT, ASAT, G6PD e ACP***)
	Meio de cultura		Hamster				Tubo digestivo <i>Lu. longipalpis</i> (Pós/Total)		
	LIT	NNN	Crescimento		Tropismo				
	DIFCO	Lento	Rápido	Visceralização	Metástase cutânea				
CTB-17	+	-	-	+	-	+	-	Peripilário (1/46)	<i>L. b. braziliensis</i>
CTB-25	+	-	++	+++	+	-	+	Peripilário (3/04)	<i>L. b. braziliensis</i>
CTB-31	-	-	++	+++	+	-	+	Peripilário (7/13)	<i>L. b. braziliensis</i>
CTB-39	-	-	++	+++	+	-	+	Peripilário (1/05)	<i>L. b. braziliensis</i>
CTB-ITA	+	-	NF	NF	-	NF	-	NF	NF
CTB-49	-	-	++	+++	+	-	+	Peripilário (20/22)	<i>L. b. braziliensis</i>
CTB-52	-	-	++	+++	+	-	+	- (0/02)	<i>L. b. braziliensis</i>
CTB-142	-	-	++	+++	+	-	M*	Peripilário (2/05)	NF
CTB-147	NF	-	++	+++	**	-	-	NF	NF

* O hamster morreu, não se observando metástase ou visceralização.

** Isolamento primário em meio de cultura, promastigotas não infectaram hamster.

*** Perfil enzimático indistinguível da amostra padrão M2904 (*L. b. braziliensis*).

NF Não feito.

Tabela 2 – Reatividade de promastigotas de amostras de *Leishmania* isoladas de cães de Três Braços, Bahia, Brasil, a anticorpos monoclonais testados pela imunofluorescência indireta.

Código do Clone*	Especificidade	Amostras de <i>Leishmania</i>									
		CTB-17	CTB-25	CTB-31	CTB-39	CTB-49	CTB-142	CTB-147	LTB-363**	L-3***	
VI	4B9D10 <i>L. braziliensis</i>	++	++	+++	+	+++	+++	+	++	-	
XIII	3F4F6 <i>L. b. braziliensis</i>	+	+	+	++	++	+++	++	++	-	
XIII	3E6B11 <i>L. b. braziliensis</i>	+++	++	+++	++	+++	++	+++	+++	-	
XIII	2A5A10 <i>L. b. braziliensis</i>	+++	++	++	++	+++	+++	+++	++	-	
IX	1F9D8 <i>L. m. amazonensis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	
LXVII	1D7B8 <i>L. m. mexicana</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	
LXVIII	4E12D8 <i>L. m. mexicana</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

* Ver McMahon Prat e David²³.

** Controle: amostra humana de *L. b. braziliensis*

*** Controle: amostra humana de *L. m. amazonensis* (Josefa).

Seis dos isolados que produziram infecção em hamster tiveram comportamento tipo peripilário em *Lu. longipalpis*, isto é: os flagelados cresceram no triângulo posterior do tubo digestivo do inseto. Um dos isolados não infectou os insetos e em dois essa pesquisa não foi realizada (Tabela 1).

O quadro histopatológico das lesões de cães consistiu basicamente de infiltrados histolinfoplasmocitários com ausência de amastigotas, semelhante ao que ocorre em lesões de pacientes da área de estudo.

O padrão isoenzimático de seis amostras foi indistinguível da amostra padrão M2904 (*L. b. braziliensis*) (Tabela 1).

As amostras CTB-17, CTB-25, CTB-31, CTB-39, CTB-52, CTB-142 e CTB-147 isoladas de cães e a amostra LTB-363 (*L. b. braziliensis*), de origem humana, usada como controle, reagiram positivamente aos anticorpos monoclonais espécie e subespecíficos de *L. braziliensis*, não cruzando com aqueles de *L. mexicana*. A amostra L.3 (*L. m. amazonensis*), de origem humana, também usada como controle, teve um procedimento inverso. Um dos anticorpos monoclonais de *L. m. mexicana* falhou em reagir com qualquer amostra (Tabela 2).

DISCUSSÃO

Todas as amostras isoladas de lesões ativas de cães da região de Três Braços tiveram o mesmo comportamento biológico, bioquímico e imunológico. O crescimento pobre em meio de cultura NNN e a evolução lenta das lesões cutâneas, sem a formação de

histiocitomas, sugeriram a identificação do parasito como pertencente ao complexo *L. braziliensis*. A visceralização de todas as amostras em hamsters foi uma constante, semelhante ao que ocorre com amostras de origem humana da área (Cuba⁵ e Cuba e cols⁴). Este fato foi também assinalado por Dias e col.⁶, com *Leishmania* isolada de cães da área de Caratinga e não foi mencionado por Lainson e Shaw^{13 15} nos seus estudos sobre *L. braziliensis braziliensis* de origem humana.

O desenvolvimento tipo peripilário das amostras no tubo digestivo de *Lu. longipalpis* confirmou a identificação desse flagelado como pertencente ao Complexo *L. braziliensis*. Essa técnica, demonstrou ser de grande valia na separação dos complexos *L. mexicana* e *L. braziliensis*.

O estudo bioquímico de seis amostras definiu a identificação do parasito como sendo *L. b. braziliensis*, semelhante ao parasito isolado de lesões cutâneas e mucosas do homem da região^{4 5}. O padrão isoenzimático mostrou-se indistinguível da amostra M2904 (*L. b. braziliensis*). O estudo eletroforético das amostras em placas de acetato de celulose, utilizando-se apenas quatro enzimas (De Sá e col.⁷), parece satisfatório para distinção dos complexos *L. braziliensis* e *L. mexicana* (ALAT e ASAT) e para a separação das subespécies *L. b. braziliensis* e *L. b. guyanensis* (G6PD) e *L. m. amazonensis* e *L. m. mexicana* (ACP).

O emprego de anticorpos monoclonais para a caracterização de *Leishmania* isolada de cães foi realizada anteriormente por Cuba⁵. O autor utilizou a técnica de radioimunoensaio e de imunofluorescên-

cia e identificaram a amostra C-25 (=CTB - 25) de Três Braços, como *L. b. braziliensis*. Também Marzochi e col.¹⁸, recentemente, identificaram como *L. b. braziliensis* um parasito isolado de gânglio linfático de um cão que não apresentava lesão cutânea, proveniente de uma área endêmica de leishmaniose visceral e tegumentar. As sete amostras, isoladas de lesões cutâneas de cães da região de Três Braços, Bahia, foram confirmadas como *L. b. braziliensis*, empregando-se uma bateria de anticorpos monoclonais espécie e subespécie específicos de *L. braziliensis* e *L. mexicana*, como reagentes da técnica de imunofluorescência indireta (Tabela 2).

Na região de Três Braços, Bahia, Brasil, endêmica de leishmaniose tegumentar americana, cujas principais características foram publicadas anteriormente², o parasito altamente predominante no homem é a *L. b. braziliensis*, de acordo com os estudos biológicos, bioquímicos e de imunotaxonomia^{4,5}. Em mais de 300 casos de leishmaniose humana verificados na região nestes últimos oito anos de trabalhos ininterruptos, nenhum paciente de calazar foi observado. Reservatórios primários de *L. braziliensis* na região ainda não foram identificados a despeito de mais de 600 animais silvestres terem sido examinados. Apenas três roedores (*Proechymis inhering denigratus*) foram encontrados infectados com *L. mexicana sp* (dados não publicados). O cão é encontrado com lesões cutâneas, às vezes extensas, principalmente nas orelhas e focinho, sendo RFC' negativa para calazar. A histopatologia das lesões é compatível com aquela observada em lesões humanas produzidas por *L. b. braziliensis*. O inquérito canino realizado na área mostrou uma prevalência baixa de cães infectados (3,0%), mas quando uma amostra de animais, portadores de lesões, foi selecionada, o índice de positividade foi bastante elevado, semelhante ao que ocorreu em Caratinga⁶. Na região de Três Braços, o cão é utilizado na caça, principalmente de pacas e tatus e, em uma mesma residência, o cão e o homem, inclusive crianças que não freqüentam a mata, podem ser encontrados com lesões leishmanióticas.

Para alguns autores^{16,22}, o cão é apenas um hospedeiro circunstancial, ou vítima tal qual o homem. Na realidade, se por um lado ainda não existem dados concretos para incriminar esse animal como um reservatório secundário de *L. b. braziliensis*, provas que permitam descartar o seu papel na epidemiologia da doença também ainda não foram conseguidas.

Acreditamos, entretanto, de acordo com os conhecimentos atuais, que o cão possa ter alguma

importância como reservatório secundário de *L. b. braziliensis* em Três Braços. As evidências são: 1) o parasito circulando no homem e no cão na região se comportam como *L. b. braziliensis*; 2) crianças que não freqüentam a mata adquirem a doença, aparentemente, em suas casas; 3) animais que freqüentam o peridomicílio (*Rattus rattus*, *Didelphis*) não têm sido encontrados infectados; 4) *Lu. whitmani*, altamente predominante no domicílio e seus arredores, é antropofílico, sendo também atraído pelo cão; 5) essa espécie de flebotomíneo, oriundo da região e criado em laboratório, infecta-se experimentalmente em lesões de cães parasitados com *L. b. braziliensis* de origem canina, também da região.

SUMMARY

During a survey of domestic and hunting dogs conducted in the Três Braços region, State of Bahia, 3,0% of 98 dogs had amastigotes in skin lesions. Parasites were not found in normal ear skin. In a nonrandomly selected sample of 13 dogs with active cutaneous lesions, infection was confirmed in nine (69,2%). Tissue biopsies from seven dog lesions produced infection in hamsters. The biological behaviour of the parasite (rate of growth in culture media, evolution of lesions in hamsters and development in the gut of Lutzomyia longipalpis) identified it to the Leishmania braziliensis complex. Characterization by biochemical means (electrophoretic mobility of enzymes in cellulose acetate plates) and immunotaxonomic studies (monoclonal antibodies) defined the strains as L. braziliensis braziliensis.

The role of dogs as a possible reservoir host of L. b. braziliensis in Três Braços region is discussed.

Key words: Canine Leishmaniasis. *L. braziliensis braziliensis*. Strain Characterization. Epidemiology.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aguillar CM, Momen H, Grimaldi G, Deane LM. *Leishmania braziliensis braziliensis* in donkeys (*Equus asinus*) in central Venezuela. In: Resumos da IX Reunião Anual Pesquisa básica em doenças de Chagas, (comunicação 129), Caxambu, Minas Gerais, p. 106, 1982.
2. Barretto AC, Cuba Cuba C, 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. Boletim de la Oficina Sanitária Panamericana 90: 415-424, 1982.
- Barretto AC, Cuba C, Marsden PD, Vexenat JA, Magalhães AV. Identificação de *Leishmania braziliensis braziliensis* em cães naturalmente infectados em uma região endêmica de leishmaniose cutânea-mucosa. In: Resumos da IX Reunião Anual Pesquisa básica em doença de Chagas, (comunicação 135), Caxambu, Minas Gerais, p. 109, 1982.
 - Cuba CAC, Miles M, Vexenat JA, Marsden PD, Barretto AC, Jones AC. Biological and isoenzyme identification of *Leishmania* stocks from patients and dogs with American Mucocutaneous leishmaniasis. In: Resumos da IX Reunião Anual Pesquisa básica em doença de Chagas, (comunicação nº 97), Caxambu, Minas Gerais, p. 89, 1982.
 - Cuba CAC. Leishmaniose tegumentar em área endêmica do Estado da Bahia, Brasil. Caracterização e classificação de *Leishmania* do homem e do cão doméstico e aspectos comportamentais de *L. braziliensis braziliensis*. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1983.
 - Dias M, Mayrink W, Deane LM, Costa CA, Magalhães P, Melo MN, Batista SM, Araújo FG, Coelho MV, Williams P. Epidemiologia da leishmaniose tegumentar americana I. Estudo de reservatórios em área endêmica no Estado de Minas Gerais. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 19: 403-410, 1977.
 - De Sá MHP, Lima LMP, Roitman I. The identification of *Leishmania* by isoenzymes In: Resumos da IX Reunião Anual Pesquisa básica em doenças de Chagas (comunicação nº 99), Caxambu, Minas Gerais, p. 90, 1982.
 - Herrer A. Nota preliminar sobre leishmaniasis natural en perros. Revista de Medicina Experimental (Lima) 7: 62-69, 1948.
 - Herrer A. Estudios sobre leishmaniasis tegumentaria en el Peru. V Leishmaniasis natural en perros procedentes de localidades utógenas. Revista de Medicina Experimental (Lima) 8: 87-118, 1949/51.
 - Herrer A, Christensen HA. Natural cutaneous leishmaniasis among dogs in Panamá. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 25: 59-63, 1976.
 - Kreutzer RD, Christensen HA. Characterization of *Leishmania sp.*, by isoenzyme electrophoresis. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 29: 199-208, 1980.
 - Lainson R, Shaw JJ. Leishmania and leishmaniasis of the New World: taxonomic problems. British Medical Bulletin 28: 44-48, 1972.
 - Lainson R, Shaw JJ. Leishmania and leishmaniasis of the New World with particular reference to Brazil. Bulletin of the Pan American Health Organization 7: 1-19, 1973.
 - Lainson R, Ward RD, Shaw JJ. Leishmania in flebotomid sandflies. VI. Importance of hindgut development in distinguishing between parasites of the *Leishmania mexicana* and *L. braziliensis* complexes. Proceedings of the Royal Society, London. 199: 309-320, 1977.
 - Lainson R, Shaw JJ. The role of animals in epidemiology of South America Leishmaniasis. In: Lumsden, WHR & Evans, DA (eds) Biology of the Kinetoplastida. VII. London and New York. Academic Press pp. 1-116, 1979.
 - Lainson R. Leishmanial parasites of mammals in relation to human disease. Symposium Zoology, London 50: 137-179, 1982.
 - Marzochi MCA, Souza WJS, Coutinho SG, Toledo LM, Grimaldi G, Momen H. Evaluation of diagnostic criteria in human and canine mucocutaneous leishmaniasis in a Rio de Janeiro district where *Leishmania braziliensis* occurs. In: Resumos da IX Reunião Anual Pesquisa básica em doença de Chagas, (comunicação nº 46) Caxambu, Minas Gerais, p. 63, 1982.
 - Marzochi MCA, Grimaldi Jr G, Momen H, McMahon Pratt D. Visceral *Leishmania braziliensis braziliensis* in a dog in Rio de Janeiro (Brazil) In: Resumos da X Reunião Anual Pesquisa básica em doença de Chagas, (comunicação BI 30) Caxambu, Minas Gerais, pp. 3-15, 1983.
 - Mazza S. Existencia de la leishmaniasis cutanea en el perro en la Republica Argentina. Boletim del Instituto de Clinica y Quirurgia (Buenos Aires) 2: 147-149, 1926.
 - Mazza S. Leishmaniasis tegumentaria visceral. Boletim del Instituto de Clinica y Quirurgia (Buenos Aires) 2: 209-216, 1926.
 - Mazza S. Leishmaniasis cutanea en el caballo y nueva observación de la misma en el perro. Boletim del Instituto de Clinica y Quirurgia (Buenos Aires) 3: 462-464, 1927.
 - Mayrink W, Williams P, Coelho MV, Dias M, Vianna Martins SA, Magalhães P, Costa CA, Falcão AR, Melo MN, Falcão AL. Epidemiology of dermal leishmaniasis in the Rio Doce Valley, State of Minas Gerais, Brazil. Annals of Tropical Medicine and Parasitology 73: 123-137, 1979.

Barreto AC, Cuba CC, Vexenat JA, Rosa AC, Marsden PD, Magalhães AV. Características epidemiológicas da leishmaniose tegumentar americana em uma região endêmica do estado da Bahia. II Leishmaniose canina. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 17: 59-65, Abr-Jun, 1984

23. McMahon Pratt D, David JR. Monoclonal antibodies that distinguish between New World species of *Leishmania*. *Nature* 291: 581-583, 1981.
24. Miles MA, Povoá M, Souza AA, Lainson R, Shaw JJ. Some methods for enzymic characterization of Latin American *Leishmania*, with particular reference to *Leishmania mexicana amazonensis* and sub-species of *Leishmania hertigi*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 74: 243-252, 1980.
25. Miles MA, Lainson R, Shaw JJ, Povoá M, Souza AA. Leishmaniasis in Brazil. XV. Biochemical distinction of *Leishmania mexicana amazonensis*, *L. braziliensis braziliensis* and *L. braziliensis guyanensis* aetiological agents of cutaneous leishmaniasis in the Amazon Basin of Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 75: 524-529, 1981.
26. Pedroso AM. Leishmania local de cão. *Anais Paulistas de Medicina e Cirurgia* 1: 33-40, 1913.
27. Pedroso AM. Infecção de cão pela *Leishmania tropical*. *Revista de Medicina de São Paulo* 23: 42-45, 1923.
28. Pifano F. La leishmaniasis tegumentaria en el estado Yaracuy, Venezuela. *Revista Policlinica (Caracas)* 9: 3639-3658, 1940.
29. Pons AR, Londres H. Leishmaniasis tegumentaria americana en el asentamiento campesino de Zipayare. Aspectos epidemiológicos, clínicos e inmunológicos. Su importancia en la Reforma Agraria. *Kasmera* 3: 5-59, 1968.
30. Romaña C, Najera LM, Conejos M, Abalos JWI. Leishmaniasis tegumentaria en perros de Tucuman. II. Foco doméstico de leishmaniasis. *Anales del Instituto de Medicina Regional (Tucuman)* 2: 283-292, 1949.
31. Sherlock I, Almeida SP. Notas sobre leishmaniose canina no Estado da Bahia. *Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais* 21: 535-539, 1969.
32. Vexenat JA, Cuba CC, Llanos EA, Rosa AC, Barreto AC, Marsden PD. Descrição de um dispositivo para coleta, infecção experimental e manutenção de flebotômicos adultos (*Lutzomyia*, Diptera, Psychodidae) In: Resumos da IX Reunião Anual Pesquisa básica em doença de Chagas, (comunicação nº 230), Caxambu, Minas Gerais, p. 157, 1982.
33. Walton BC, Shaw JJ, Lainson R. Observations on in vitro cultivation of *Leishmania braziliensis*. *Journal of Parasitology* 63: 1118-1119, 1977.