

EPIDEMIOLOGIA DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA NO ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL. II. UTILIZAÇÃO DE ANTÍGENO PARTICULADO DE *LEISHMANIA (VIANNIA) BRAZILIENSIS* EM INQUÉRITO CANINO EM REGIÕES ENDÊMICAS *

José Eduardo TOLEZANO **
Helena Hilomi TANIGUCHI **
Maria de Fátima Lerenó de ARAÚJO **
Márcia da Conceição BISUGO **
Elaine Aparecida CUNHA **
Carlos Roberto ELIAS **
Rui LAROSA **

RIALA 07/841

TOLEZANO, J.E.; TANIGUCHI, H.H.; ARAÚJO, M.F.L.; BISUGO, M.C.; CUNHA, E.A.; ELIAS, C.R. & LAROSA, R. - Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar Americana no Estado de São Paulo, Brasil. II. Utilização de antígeno particulado de *Leishmania (Viannia) braziliensis* em inquérito canino em áreas endêmicas. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 57 (2): 65-71, 1998.

RESUMO: Vários pesquisadores tem questionado sobre o papel que animais domésticos poderiam estar exercendo, particularmente como fontes de infecção para o homem em áreas de transmissão para Leishmaniose Tegumentar Americana nas regiões Sudeste e Sul do Brasil. No Espírito Santo tem sido confirmada a participação de cães como "reservatórios" de *L. (V.) braziliensis* na antiga zona de cobertura de mata atlântica, encontrando taxas de infecção bastante elevadas, em torno de 17% dos cães. No Estado de São Paulo, existe esta mesma preocupação, em relação à fontes de infecção representadas, possivelmente, por cães. Neste estudo foram realizados dois inquéritos para a pesquisa de infecção por *Leishmania* em populações caninas em áreas de transmissão de LTA nos municípios de Itupeva (região de Jundiá) e Eldorado (região do Vale do Ribeira). Pela primeira vez, foi utilizado um teste intradérmico (TIDR) com antígeno particulado de *L. (V.) braziliensis* e, em paralelo reação de imunofluorescência indireta (RIFI) com antígenos de *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) chagasi* e *L. (L.) amazonensis*. Em Itupeva, dos 56 cães inquiridos, 10 (17,86%) foram reativos para, pelo menos, uma das reações, quando admitido qualquer valor de reatividade. Já em Eldorado, 6 (7,8%) dos 77 cães examinados revelaram alguma reatividade, porém com valores inferiores a 5mm ou 1:40, respectivamente para a TIDR e RIFI. Esses resultados indicam como bastante promissora e exequível, em condições de trabalho de campo, a utilização do TIDR para triagem de infecção natural por *Leishmania (V.) braziliensis* em animais domésticos suspeitos de alguma importância como fonte de infecção. Parece, também, ser pouco provável a participação de cães na manutenção do parasita em Eldorado. Todavia os resultados obtidos em Itupeva reforçam a necessidade de esclarecimento do papel dos cães na circulação de *Leishmania*. Tais resultados poderão ser fundamentais para a definição de estratégias de controle.

DESCRITORES: Leishmaniose Tegumentar Americana; *Leishmania (Viannia) braziliensis*; reservatórios naturais; fontes de infecção; antígeno particulado; teste intradérmico; inquérito canino.

INTRODUÇÃO

Sob a denominação de Leishmanioses enquadram-se doenças parasitárias causadas por protozoários do gênero *Leishmania*³³.

Em sua maioria, as Leishmanioses são consideradas zoonoses, sendo as espécies de *Leishmania*, primariamente parasitas de animais silvestres e, menos freqüentemente, de animais domésticos^{18,26,29,33}.

* Apoiado pelo PCDEN/FNS-Ministério da Saúde.

** Seção de Parasitoses Sistemáticas - Instituto Adolfo Lutz.

No Novo Mundo, até o presente momento, pelo menos 14 diferentes espécies de *Leishmania* já foram encontradas infectando o homem¹⁹.

Nas Américas, as formas clínicas tegumentares causadas por tais agentes são referidas como Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA). No Brasil, a LTA adquire grande importância como problema de Saúde Pública, quer pela extensa distribuição geográfica, quer pelo crescente número de novos casos (mais de 280.000 casos nos últimos 15 anos, segundo a Fundação Nacional de Saúde (CCZAP-Coordenação e Controle de Zoonoses e Animais Peçonhentos/CNDS-Coordenação Nacional de Dermatologia Sanitária/CENEPI-Centro de Epidemiologia/ DEOPE-Departamento de Operações), quer pelo acentuado grau de destruição tecidual observado nas lesões cutâneas ou nas mucocutâneas³³.

O Estado de São Paulo convive com a autoctonia da LTA desde, pelo menos, 1895^{32,33}. Logo cedo, em São Paulo, foi reconhecida a necessidade de contato entre o homem e o ambiente florestado para a ocorrência da doença, razão pela qual BRUMPT & PEDROSO, em 1913, propuseram a denominação de "Leishmaniose Americana das Florestas"⁸.

Após a primeira metade deste século, diversos pesquisadores vem chamando a atenção para uma profunda alteração no padrão epidemiológico da LTA, particularmente nas regiões de colonização antiga, onde o ambiente já se encontra extremamente alterado, com drástica redução da cobertura vegetal original^{19,21,34}. Nessas circunstâncias verifica-se a perda do caráter ocupacional atribuído para a LTA nos tempos das populações pioneiras no início do século³⁴.

Tem sido assinalado um total desconhecimento do(s) reservatório(s) silvestre(s) de *Leishmania (Viannia) braziliensis*, o agente etiológico predominante em todas essas regiões de colonização antiga. Não tem sido incomum, todavia, o encontro de animais domésticos infectados pelo parasita, sendo mesmo possível a especulação sobre o papel destes animais como fontes de infecção para o(s) flebotômico(s) vetor(es)^{1,6,9,11,12,21,22,24,28,30,33}. Em algumas regiões endêmicas do Brasil e da Venezuela, as taxas de infecção em cães oscilam entre 3 e 23% e, entre equinos até 30%^{3,7,11,27,30,31}.

Com o desenvolvimento de um "kit" constituído de antígeno particulado de *L. (V.) braziliensis* para a execução de testes intradérmicos em hospedeiros vertebrados não humanos^{3,22}, tornou-se possível, em áreas endêmicas, a utilização de uma importante ferramenta para avaliações epidemiológicas ou mesmo para diagnóstico individual.

Como parte de uma estratégia que pretende conhecer o papel desempenhado por animais domésticos, especialmente cães, como fontes de infecção de *L. (V.) braziliensis*, no presente trabalho foram realizados

inquéritos epidemiológicos em populações caninas de duas regiões endêmicas para LTA no Estado de São Paulo, uma no município de Itupeva (Bairro Guacuri), na região de Jundiá e outra no município de Eldorado (Bairro André Lopes), na região do Vale do Ribeira.

MATERIAL E MÉTODOS

Regiões de Estudo — 1. REGIÃO DE SAÚDE DE JUNDIAÍ — MUNICÍPIO DE ITUPEVA — BAIRRO GUACURI. Área de recente identificação de focos naturais de transmissão de LTA no Estado de São Paulo. A região do planalto paulista apresenta morros com afloramentos rochosos e vegetação natural do tipo floresta mesófila semidecídua e de reflorestamento constituído por pinheiros e eucaliptos. O clima predominante é do tipo mesotérmico seco. O Bairro Guacuri é caracterizado pela predominância de sítios e chácaras com a presença permanente de caseiros e outros trabalhadores com suas respectivas famílias.

2. REGIÃO DE SAÚDE DE REGISTRO — VALE DO RIBEIRA — MUNICÍPIO DE EL Dorado — BAIRRO ANDRÉ LOPES. Área pertencente ao chamado limite sul da expansão da LTA no Estado de São Paulo, com focos naturais de transmissão registrados desde 1956¹⁴. Neste município tem sido registrados alguns dos mais altos coeficientes de incidência da LTA em São Paulo. O clima é quente e úmido, com vegetação natural do tipo floresta tropical úmida de altitude, mata atlântica tipo perenifolia higrófila, sendo que em alguns pontos a luxuriante vegetação foi completamente substituída pelas atividades agrícolas, com destaque para a bananicultura, base econômica de grande parte da região do Vale do Ribeira. A pluviosidade anual é elevada, ultrapassando 1.500 mm. Altitude média de 80 m acima do nível do mar.

Populações caninas estudadas — Uma vez informada a população local sobre os objetivos dos inquéritos propostos, foram inquiridos os animais cujos proprietários concordaram em participar do estudo.

1. Bairro Guacuri — município de Itupeva — Total de 56 cães.

2. Bairro André Lopes — município de Eldorado — Total de 77 cães.

Metodologias utilizadas — Os cães foram inquiridos pela aplicação de teste intradérmico (TIDR) e realização de reação de imunofluorescência indireta (RIFI).

TIDR — Este teste foi realizado pela utilização de antígeno particulado, fração P10000G obtida do fracionamento subcelular de *Leishmania (V.) braziliensis*, cepa

MHOM/BR/75/M2903, preparado segundo metodologia previamente descrita^{5,22,23}. Uma dose deste antígeno P10000 *Leishmania (V.) braziliensis*, com 200µg de proteína em salina mertiolatada 1:10000, foi aplicada por via intradérmica na face interna da pata posterior esquerda em cada animal inquirido. O TIDR foi avaliado 48h após sua aplicação, sendo registrado qualquer valor de reatividade (enduração) igual ou superior a 3 mm, porém foi considerado positivo o teste com reação igual ou superior a 5 mm, tal como proposto por MARZOCHI & BARBOSA-SANTOS²². Controles positivo e negativo foram representados por hamsters experimentalmente infectados por *L. (V.) braziliensis* e sem infecção, respectivamente.

RIFI — Esta reação foi realizada em soro sanguíneo de amostra de sangue colhida simultaneamente com a aplicação do TIDR de cada animal incluído nos inquéritos, sendo investigada a presença de anticorpos anti-*Leishmania* com conjugado anti-IgG de cão, marcados com isotiocianato de fluoresceína. As amostras de soro foram examinadas pela RIFI em quadruplicata, cada reação com uma diferente amostra de *Leishmania*, sendo utilizada como antígeno. Foram preparados antígenos com cepas de *L. (V.) braziliensis* MHOM/BR/75/M2903 e MHOM/BR/93/IAL-ITUPEVA, cepa de DD-8 de *L. (L.) chagasi* e cepa Ph-8 de *L. (L.) amazonensis*. As amostras de soro foram ensaiadas em diluições dobradas a partir de 1:10, sendo registrados quaisquer valores de reatividade, porém considerados positivos aquelas amostras com títulos iguais ou superiores a 1:40. Foram utilizadas sempre amostras controle positivas e negativas.

RESULTADOS

Uma primeira observação a ser registrada é a da ausência de lesões ulceradas que pudessem sugerir Leishmaniose Cutânea nos cães inquiridos por este estudo, apenas manchas hipocrômicas foram verificadas em alguns animais.

Na Tabela estão sumarizados os resultados obtidos ao TIDR e à RIFI para as duas regiões.

Em Itupeva, no Bairro Guacuri, dos 56 cães, 10 (17,9%) foram reativos se considerados todos os valores de reatividade, para qualquer dos testes imunodiagnósticos. Apenas um animal apresentou, simultaneamente, reação de hipersensibilidade tardia (TIDR) com 10 mm e título de anticorpos (RIFI) 1:20 em níveis de positividade. Um outro cão com RIFI 1:80 foi não reativo ao TIDR.

Quando considerados apenas os valores de reatividade iguais ou maiores que 5 mm ao TIDR e 1:40 na RIFI, 4 (7,1%) cães puderam ser reconhecidos como positivos para uma das reações (75%) ou para ambas as reações (25%).

No município de Eldorado, dos 77 cães, apenas 2 (2,6%) foram reativos ao TIDR, ambos com enduração inferior à 5 mm, 4 (5,2%) outros cães apresentaram reatividade à RIFI, porém todos com títulos de anticorpos menor ou igual a 1:20.

Os resultados verificados na RIFI foram 100% concordantes qualquer que tenha sido a espécie de *Leishmania* utilizada como antígeno.

TABELA — RESULTADOS DO TESTE INTRADÉRMICO (TIDR) COM ANTÍGENO PARTICULADO DE *LEISHMANIA (VIANNIA) BRAZILIENSIS* E DA REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (RIFI) OBTIDOS NOS INQUÉRITOS CANINOS REALIZADOS EM ÁREAS DE TRANSMISSÃO DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR, NOS MUNICÍPIOS DE ITUPEVA (REGIÃO DE JUNDIAÍ) E ELDORADO (REGIÃO DO VALE DO RIBEIRA), NO ESTADO DE SÃO PAULO.

MUNICÍPIO	CÃES EXAMINADOS	TESTE INTRADÉRMICO (TIDR)			REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (RIFI)				
		3-4 MM	≥ 5 MM	SUBTOTAL ≥ 3mm	NÃO REATIVOS (sem enduração)	1:80	1:20	1:10	NÃO REAGENTES
ITUPEVA*	56	4(7,1%)	3 (5,4%)	7 (12,5%)	49 (87,5%)	1 (1,8%)	1 (1,8%)	2 (3,6%)	52 (92,8%)
ELDORADO	77	2 (2,6%)	0	2 (2,6%)	75 (97,4%)	0	1 (1,3%)	3 (3,9%)	73 (94,8%)

* Um único cão mostrou reatividade simultânea na RIFI e TIDR.

DISCUSSÃO

É consenso entre os pesquisadores que as Leishmanioses Tegumentares devam ser consideradas, em sua maioria, como zoonose, primariamente de animais silvestres^{18,26,29,30,33}. A primeira comprovação científica, sobre o envolvimento de roedores silvestres na circulação de *Leishmania* em áreas endêmicas para LTA se deu em 1957, no Novo Mundo¹⁷. Hoje, são reconhecidas mais de 40 espécies de mamíferos silvestres, nas Américas, como hospedeiros não humanos e/ou reservatórios naturais de *Leishmania*, em sua grande maioria pequenos roedores, edentados e marsupiais, além de alguns representantes carnívoros e primatas^{13,20}. Todavia, o encontro de animais silvestres naturalmente infectados, muitas vezes, constituem-se em eventos raros, principalmente em áreas de circulação de *L. (V.) braziliensis*. Nessas regiões, quando são isoladas amostras de *Leishmania* de animais silvestres, uma vez caracterizados, são identificados como representantes do subgênero *Leishmania*^{10,35,36}.

Em nosso laboratório, após examinar mais de 350 diferentes mamíferos silvestres, de diferentes regiões endêmicas do Estado de São Paulo, foram isoladas, apenas, duas cepas de *Leishmania*, uma das quais em um roedor (*Akodon* sp)³⁵ capturado no município de Iguape, no Vale do Ribeira e, mais recentemente de *Proechimys iheringi* capturado no município de Ithabela na região do Litoral Norte paulista. Estes isolados pertencem ao subgênero *Leishmania*, não se tratando, portanto, de *L. (V.) braziliensis* (dados não publicados).

Por outro lado, desde o pioneiro trabalho de PEDROSO em 1913²⁸, a LTA vem sendo reconhecida, diagnosticada e identificada a presença de *L. (V.) braziliensis* em cães e, secundariamente em eqüinos em áreas endêmicas caracterizadas por uma paisagem natural bastante alterada em relação a uma primitiva cobertura vegetal, situação esta típica de áreas de colonização antiga no Brasil onde este agente parasitário é o predominate nos casos humanos da parasitose^{6,9,11,12,21,29,33}.

Em relação ao presente estudo, ressaltamos a opção por considerar todos os valores de reatividade destacando mesmo aqueles entre 3-4 mm e não apenas os maiores ou iguais a 5 mm ao TIDR, por entendermos a necessidade de revisão dos parâmetros e condições para a definição e valorização dos resultados obtidos em provas de avaliação de respostas de hipersensibilidade tipo tardia em estudos epidemiológicos, principalmente com hospedeiros não humanos de *L. (V.) braziliensis* ou mesmo, com valores de reatividade na RIFI abaixo de 1:40.

Os resultados obtidos nestes inquéritos indicam que em Itupeva, de um total de 56 cães inquiridos, 10 (17,9%) foram reativos para, pelo menos, um dos testes utilizados, se considerado qualquer nível de reatividade.

Considerada apenas a reação ao TIDR, foram 7 (12,5%) os cães com respostas ao antígeno particulado de *L. (V.) braziliensis*, com variação de 3 até 13 mm de enduração.

Em que pese todas as ressalvas quanto a valorização da reação de imunofluorescência indireta como técnica laboratorial para investigação prospectiva da presença de infecção por *Leishmania* na população canina estudada e, se considerarmos apenas como "positivos" os animais com TIDR \geq 5 mm e/ou RIFI \geq 1:20, ainda assim teríamos 7,1%. Essa taxa de 7,1% deve suscitar e, alimentar as especulações sobre possibilidade desses animais domésticos exercerem algum papel na manutenção de focos de transmissão natural uma vez que, estando permanentemente expostos nesse ambiente endêmico em contato com as populações de flebotomíneos que, por sua vez, podem e, também, devem estar mantendo relacionamento com a população humana, potencializando, talvez, o risco de transmissão da LTA ao homem.

Durante muito tempo, acreditava-se que cães e outros animais domésticos devessem ser considerados, a exemplo do homem, vítimas ou hospedeiros acidentais desses parasitas^{18,20,25}, exceção apenas, no caso da "uta" dos Vales Andinos peruanos onde HERRER¹⁶ encontrou grande número de cães naturalmente infectados. Mais recentemente, em várias localidades brasileiras, altas taxas de infecção, até maiores que as peruanas, vem sendo registradas: 10,5% na Ilha Grande, no Estado do Rio de Janeiro⁴ e 16,9% em Viana, no Espírito Santo (informação pessoal de FALQUETO, 1983 citada em AGUILAR et al²). Ressalta-se ainda, os 7% verificados em Las Rosas, Estado de Cojedes na Venezuela².

Nossos resultados, dependendo dos níveis de reatividade considerados para a TIDR ou para a RIFI, apontam para taxas entre 7,1% e 17,9% de "positividade", para cães inquiridos do Bairro Guacuri, no município de Itupeva, região do planalto em São Paulo. A aparente discordância de resultados, com casos de reatividade ao TIDR e não reagentes à RIFI e vice-versa já foi apontada por MARZOCHI & BARBOSA-SANTOS²², na única experiência anterior de utilização de antígeno particulado de *L. (V.) braziliensis* — P 10000 em inquérito canino.

Os resultados obtidos no inquérito canino realizado em Eldorado na região do Vale do Ribeira, próximo ao nível do mar, revelaram uma situação bastante diferente, uma vez que apenas 2 entre 77 cães (2,6%) foram reativos ao TIDR, ainda assim com valores de 3 e 4 mm e, 1 (1,3%) cão não reativo ao TIDR apresentou RIFI de 1:20.

Se considerarmos que nenhum animal daqueles inquiridos neste estudo, apresentou qualquer lesão ulcerada, sugestiva de LTA, achamos lícito continuar nesta linha de investigação pois, talvez estejam indicando que o parasitismo nesses animais, por *L. (V.) braziliensis*, se dê com uma distribuição dos parasitas mesmo no tegu-

mento aparentemente são, o que vem sendo objeto de estudos ora em andamento.

Acreditamos que se animais domésticos possam ter algum papel na manutenção de *L. (V.) braziliensis* em ambientes endêmicos de regiões de colonização antiga, "a priori", deveremos entendê-los como amplificadores potenciais da disseminação do parasita e não como verdadeiros reservatórios naturais. Mesmo assim, esse padrão, se confirmado, não necessariamente poderá ser generalizado, pois em algumas regiões a impossibilidade de demonstração de taxas significativas de infecção em cães¹⁵ deixa, ainda, a impressão da existência de um verdadeiro reservatório silvestre, "mantenedor perene" de *L. (V.) braziliensis* na natureza, o que misteriosamente

permanece por ser demonstrado.

Acreditamos, finalmente, que na hipótese de confirmação de que cães ou outros animais domésticos possam exercer o papel de fonte de *Leishmania (V.) braziliensis* para infecção de flebotomíneos ao nível do peridomicílio humano, a utilização de procedimentos diagnósticos simples, de baixo custo e de fácil execução em campo, tal como o TIDR desenvolvido por MARZOCHI & BARBOSA-SANTOS²² e, por nós utilizado neste estudo, venha possibilitar condições para o monitoramento da circulação deste parasita em regiões onde animais domésticos possam ser suspeitos de participação na manutenção do protozoário na natureza.

RIALA 07/840

TOLEZANO, J.E.; TANIGUCHI, H.H.; ARAÚJO, M.F.L.; BISUGO, M.C.; CUNHA, E.A.; ELIAS, C.R. & LAROSA, R. — Epidemiology of American Cutaneous Leishmaniasis (ACL) in the State of São Paulo, Brazil. II. Use of particulated antigen of *Leishmania (V.) braziliensis* in canine inquires in different endemic areas. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 57 (2): 65-71, 1998.

ABSTRACT: Many researchers have questioned about the involvement of domestic animals as sources of infection to man in endemic areas of ACL in the Southeast and South region of Brazil. In the State of Espírito Santo, the role of dogs as "reservoirs" of *L. (V.) braziliensis* in the ancient zone covering atlantic forest was confirmed finding high rates of infection among dogs. For the State of São Paulo, we have the same concern in relation to the vertebrate source of infection, probably represented by dogs. In this study we carried out two inquiries in order to investigate the *Leishmania* infection in canine population: in Itupeva (Jundiá region) and Eldorado (Ribeira River Valley region) cities, which are all endemic areas. For the first time it was employed, the skin test (ST) with particulated antigen of *Leishmania (V.) braziliensis* was Employed and, indirected immunofluorescence test (IIT) with antigens of *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) chagasi*, and *L.(L.) amazonensis* used in parallel. In Itupeva, from 56 inquired dogs, 10 (17,9%) were reactive for at least one of the two tests, when accepted any value of reactivity. In Eldorado, only 6 out 77 (7,8%) dogs revealed some reactivity. These results indicate to be promising and very practical the use of ST under field conditions for trial the natural infection of *L. (V.) braziliensis* in animals suspected with any importance as source of infection. By these studies it seems to be minor the participation of dogs in maintenance of parasite in the nature in Eldorado, but the data observed in Itupeva strengthen the necessity of better knowledge about involvement of dogs in the *Leishmania* circulation. Probably dogs play role in different degrees of relationship with *Leishmania* in different regions. We believe that such results would be fundamental for definition of control strategies.

Descriptors: American Cutaneous Leishmaniasis; *Leishmania (Viannia) braziliensis*; natural reservoir; source of infection; particulated antigen; skin test; canine inquiries.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AGUIAR, G.M., VILELA, M.L. & LIMA, R.B.- Ecology of the sandflies of Itaguai, an area of cutaneous leishmaniasis in the State of Rio de Janeiro. Food preferences (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, **82**: 583-584, 1987.
2. AGUILAR, C.M.; FERNANDEZ, R. & DEANE, L.M. — Study of an outbreak of cutaneous leishmaniasis in Venezuela. The role of domestic animals. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, **79**: 181-195, 1984.
3. AGUILAR, C.M.; RANGEL, E.F.; GARCIA, L.; FERNANDES, E.; MOMEM, H.; GRIMALDI Jr., G. & VARGAS, Z. — Zoonotic cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* associated with domestic animals in Venezuela e Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, **84**: 19-28, 1989.

4. ARAÚJO F^o, N.A. — *Epidemiologia da leishmaniose tegumentar americana na Ilha Grande, Rio de Janeiro. Estudos sobre a infecção humana, reservatórios e transmissores*. Tese. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1978, 148p.
5. BARBOSA-SANTOS, E.G.O., MARZOCHI, M.C.A.; SILVA, V.L.; CONCEIÇÃO, N.F.; SILVA, P.C.T. & SANTOS, C. — Elicitation of the delayed hypersensitivity reaction in canine mucocutaneous leishmaniasis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, **81** (suppl.): 146, 1986.
6. BARRETO, A.C.; CUBA, C.C.; VEXENAT, J.A.; ROSA, A.C.; MARSDEN, P.D. & MAGALHÃES, A.V. — Características epidemiológicas da leishmaniose tegumentar americana em uma região endêmica do Estado da Bahia, Brasil. II — Leishmaniose canina. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, **17**: 59-65, 1984.
7. BONFANTE-GARRIDO, R.; MURILO, N. & TORRES, R. — Leishmaniasis cutanea canina en Venezuela. *Bol. Of. Sanit. Panam.*, **91**: 160-165, 1981.
8. BRUMPT, E. & PEDROSO, A. — Pesquisas epidemiológicas sobre a leishmaniose americana das florestas no Estado de São Paulo (Brasil). *Ann. Paul. Med. Cir.*, **1**: 97-136, 1913.
9. DIAS, M.; MAYRINK, L.M.; COSTA, C.A.; MELO, M.N.; BATISTA, S.M.; ARAÚJO, F.G., COELHO, M.V. & WILLIAMS, P. — Epidemiologia da leishmaniose tegumentar americana. I. Estudo de reservatórios em área endêmica no Estado de Minas Gerais. *Rev. Inst. Med. Trop.*, S. Paulo, **19**: 403-410, 1977.
10. FALQUETO, A.; GRIMALDI Jr.; G.; SESSA, P.A.; VAREJÃO, J.B.M. & DEANE, L.M. — *Lutzomyia gasparviannai*, Martins, Godoy & Silva, 1962, probable vector of *Leishmania mexicana* ssp. in Viana municipality, Espírito Santo State, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, **80**: 497, 1985.
11. FALQUETO, A.; COURA, J.R.; BARROS, G.C.; GRIMALDI F^o, G.; SESSA, P.A.; CARIAS, V.R.; JESUS, A.C. & ALENCAR, J.J. — Participação do cão no ciclo de transmissão da leishmaniose tegumentar no município de Viana, Espírito Santo, Brasil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, **85**: 155-163, 1986.
12. FALQUETO, A.; VAREJÃO, J.B.M. & SESSA, P.A. — Cutaneous leishmaniasis in a horse (*Equus caballus*) from endemic area in the State of Espírito Santo, Brasil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, **82**: 443, 1987.
13. FALQUETO, A. — *Especificidade alimentar de flebotômíneos em duas áreas endêmicas de leishmaniose tegumentar no Estado do Espírito Santo*. Tese. Instituto Oswaldo Cruz-Fiocruz, 1995, 84p.
14. FORATTINI, O.P. & OLIVEIRA, O. — Focus of cutaneous leishmaniasis in an area South of State of São Paulo, Brazil. *Arch. Fac. Hig. Saúde Públ.*, São Paulo, **11**: 23-34, 1957.
15. GOMES, A.C.; COUTINHO, S.G.; PAIM, G.V.; OLIVEIRA, S.M.O.; GALATI, E.A.B.; NUNES, M.P.; CAPINZAKI, A.W.; YAMAMOTO, Y.I. & ROTTER, R. — Aspectos ecológicos da leishmaniose tegumentar americana. 8. Avaliação da atividade enzoótica da *Leishmania (Viannia) braziliensis* em ambiente florestal e peridomiciliar, região do Vale do Ribeira, Estado de São Paulo, Brasil, 1980-1989. *Rev. Inst. Med. trop.* São Paulo, **32**: 105-115, 1990.
16. HERRER, A. — Estudio sobre la leishmaniose tegumentaria en el Peru. V. Leishmaniasis natural en perros procedentes de localidades utógenas. *Rev. Med. Exp. (Lima)*, **8**: 87-105, 1949/1951.
17. HERTIG, M.; FAIRCHILD, G.B. & JOHNSON, C.M. — Leishmaniasis transmission — reservoir project. *Ann. Rep. Gorgus Memorial Laboratory*, 1956: 9-11, 1957.
18. LAINSON, R. — The american leishmaniasis: some observations on their ecology and epidemiology. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **77**: 569-596, 1983.
19. LAINSON, R. — On *Leishmania enrietti* and others enigmatic leishmania species of the Neotropics. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, **92**: 377-387, 1997.
20. LAINSON, R. & SHAW, J.J. — Evolution, classification and geographical distribution. In: *The Leishmaniasis in Biology and Medicine* Vol.1. Ed. PETERS, W. & KILLICK-KENDRICKS, R. — Academic Press Inc., London, 1987.
21. MARZOCHI, M.C.A. — Leishmanioses no Brasil. As Leishmanioses Tegumentares. *JBM*, **63**: 82-104, 1992.
22. MARZOCHI, M.C.A. & BARBOSA-SANTOS, E.G.O. — Evaluation of a skin test on the canine mucocutaneous leishmaniasis diagnosis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, **83**: 391-392, 1988.
23. MARZOCHI, M.C.A. & BARBOSA-SANTOS, E.G.O. — Processo de preparação de antígeno particulado de *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Rev. Prop. Industr.*, **1021**: 29, 1990.
24. MARZOCHI, M.C.A.; BARBOSA-SANTOS, E.G.O.; URTADO, W.; QUEIROZ, F.J.; CHICARINO, J.M.C.; SILVA, R.T. & SILVA, A.F. — Forma cutânea e disseminada da infecção natural por *Leishmania (Viannia) braziliensis* em uma égua

- Equus caballus*. II. Aspectos clínicos, imunopatológicos e terapêuticos. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 24 (supl. II): 99, 1991.
25. MAYRINK, W.; WILLIAMS, P.; COELHO, A.N.; MARTINS, A.V.; MAGALHÃES, P.A.; COSTA, C.A., FALCÃO, A.R.; MELO, M.N. & FALCÃO, A.L. — Epidemiology of dermal leishmaniasis in the Rio Doce Valley, State of Minas Gerais, Brazil. *Ann. Trop. Med. Parasit.*, 73: 123-137, 1979.
 26. MELLO, D.A. — Parasitic disease in Brazil and the role of wild mammals: an analysis based on leishmaniasis, Chagas' disease and schistosomiasis mansoni. *Ci. e Cult.*, 43:274-278, 1991.
 27. OLIVEIRA-NETO, M.P.; PIRMEZ, C.; RANGEL, E.F.; SCHUBACH, A. & GRIMALDI Jr., G. — An outbreak of american cutaneous leishmaniasis (*Leishmania braziliensis braziliensis*) in a periurban area of Rio de Janeiro city, Brazil: clinical and epidemiological studies. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 83: 427-435, 1988.
 28. PEDROSO, A.M. — Leishmaniose local de cão. *An. paul. Med. Cirurg.* 1: 33-40, 1913.
 29. PEREIRA, C.F.M. & FONSECA, H.H.R. — Leishmaniose Tegumentar Americana: epidemiologia e controle. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 27 (Supl. III):45-50, 1994.
 30. PIRMEZ, C.; COUTINHO, S.G., MARZOCHI, M.C.A.; NUNES, M.P. & GRIMALDI Jr., G. — Canine american cutaneous leishmaniasis, a clinical and immunological study in dogs naturally infected with *Leishmania* of Rio de Janeiro, Brazil. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.*, 38: 52-58, 1988.
 31. PONS, A.R. & 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.
 32. SILVEIRA, R.C. — Distribuição e frequência da Leishmaniose em São Paulo. Thesis. Fac. Med. Cir. S. Paulo, 1919. 72 p.
 33. TOLEZANO, J. E. — Ecoepidemiological aspects of American Cutaneous Leishmaniasis in the State of São Paulo, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 89:427-433, 1994.
 34. TOLEZANO, J.E.; MACORIS, S.A.G. & DINIZ, J.M.P. — Modificação na epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar no Vale do Ribeira, Estado de São Paulo, Brasil. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 40:49-54, 1980.
 35. TOLEZANO, J.E.; ARAÚJO, M.F.L.; BALANCO, J.M.F.; VALENTIM, A.M. & BARCA, M.L. — *Leishmania* sp isolated from blood heart of *Akodon* sp (Rodentia, Cricetidae) caught in Iguape city, São Paulo, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 83:88, 1988.
 36. YOSHIDA, E.L.A.; CUBA, C.A.C.; PACHECO, R.S.; CUPOLILO, E.; TAVARES, C.C.; MACHADO, G.M.C.; MOMEM, H. & GRIMALDI, G. — Description of *Leishmania (Leishmania) forattinii* sp.n., a new parasite infecting opossum and rodents in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 88: 397-406, 1993.

Recebido para publicação em 03/04/98

