



**INSTITUTO
BOLIVIANO DE
BIOLOGIA
DE LA ALTURA**

**ANUARIO
1983 - 1984**

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
MINISTERIO DE PREVISIÓN SOCIAL Y
SALUD PÚBLICA
COOPERACIÓN TÉCNICA DE FRANCIA

EN HOMENAJE AL SESQUICENTENARIO DE LA FACULTAD DE MEDICINA UMSA

Las leishmania de Bolivia

II: *Leishmania chagasi* s. l., primeros aislamientos en los "Yungas" del Departamento de La Paz, comparación isoenzimática de las cepas aisladas de un caso humano autóctono, de perros y del flebótomo *Lutzomyia longipalpis*.

P. Desjeux* F. Le Pont** S. Mollinedo*** y M. Tibayrenc.**

* Institut Pasteur Paris, IBBA, C/o Embajada de Francia, Casilla 824, La Paz, Bolivia.

** ORTOM, IBBA, C/o Embajada de Francia, Casilla 824, La Paz, Bolivia.

*** IBBA, Casilla 641, La Paz, Bolivia.

SUMMARY

LEISHMANIA OF BOLIVIA. II: First isolation in the "Yungas" of La Paz Department. An isozymic comparison of stocks from a human case, dogs and *Lutzomyia longipalpis* sandflies.

A focus of visceral leishmaniasis was revealed in the "Yungas" region in the Department of La Paz. The first human autochthonous case was diagnosed in this focus in 1982. Cutaneous and visceral leishmaniasis in dogs were discovered. Finally, in the same focus, *Lutzomyia longipalpis* specimens were found with spontaneous infections (0.8 to 4.2 % according to the place of capture). Isoenzyme characterization on cellulose acetate of stocks from a human case, 3 dogs and 5 specimens of *L. longipalpis*, compared with reference strains from Brazil and Morocco, showed they were related to the *L. donovani* s.l. complex. Their similarity for 13 enzymes confirms the reservoir role of the domestic dog and the role of *L. longipalpis* as a vector in this focus of Bolivia. The geographic and evolutive origins of strains of *L. donovani* s.l. complex, and specially those from Bolivia, are discussed.

RESUMEN

Un foco de leishmaniasis visceral ha sido descubierto en los Yungas del Departamento de La Paz. El primer caso humano autóctono ha podido detectarse en 1982 en dicha zona. La infección cutánea y visceral del perro ha sido demostrada. Y finalmente, en este foco, *Lutzomyia longipalpis* ha sido encontrado espontáneamente infectado (0.8 a 4.2 % de los especímenes disectados, según lugar de captura). La tipificación isoenzimática en acetato de celulosa de las cepas procedentes del caso humano, de perros (3) y de *L. longipalpis* (5), comparativamente con cepas de referencia del Brasil y de las costas mediterráneas, ha permitido ligarlas al complejo *L. donovani* s.l. Su similitud, que fué apreciada en 13 enzimas, llevó a afirmar el papel de reservorio doméstico del perro, así como el papel de vector de *L. longipalpis* en este foco de leishmaniasis visceral. Se discuten los orígenes

evolutivos y geográficos de las cepas del complejo *L. donovani* s.l., y particularmente las de Bolivia.

INTRODUCCION

La leishmaniasis visceral humana era prácticamente desconocida en Bolivia hasta una fecha reciente; solamente 3 casos habían sido reportados por Gatti y col. (1939), Monteiro de Barros y Rosenfeld (1942), y Arruda y col. (1949).

En América del Sur, los principales estudios epidemiológicos sobre esta enfermedad han sido efectuados en el Brasil, especialmente en el Noreste donde el flebótomo *Lutzomyia longipalpis* se consideraba desde mucho tiempo el vector de la leishmaniasis visceral sobre la base de numerosos argumentos indirectos (Deane y Deane, 1954b; Lainson y col.; 1977a; Lainson y Shaw, 1979; Lainson y col., 1983). Pocas infecciones naturales de *L. longipalpis* fueron encontradas (Deane y Deane, 1954a; Lopes, 1956; Sherlock y Pessoa, 1966;

Sherlock y Guitton, 1969), y ninguna caracterización isoenzimática había sido efectuada.

En Bolivia, Velasco, al realizar en 1973 un inventario de la fauna flebotómica de los Yungas, había notado por primera vez la presencia y la frecuencia de *L. longipalpis* en áreas peridomésticas (65 % de las capturas).

En cuanto a los estudios sobre los reservorios animales de la leishmaniasis visceral en América del Sur, se hicieron mayormente en el Brasil donde la infección del perro ha sido encontrada hace bastante tiempo (Chagas y col., 1937) y descrita luego por numerosos autores (Deane y Deane, 1954a; Alencar, 1962; Marzochi y col., 1983). Simultáneamente, se identificaron ciertos reservorios selváticos: el zorro salvaje *Lycalopex vetulus* (Deane, 1956, 1962), otro zorro *Cerdocyon thous* (Lainson y col. 1969; Lainson y Shaw, 1971; Lainson y col., 1983).

En Bolivia, la existencia de leishmaniasis visceral canina ha sido revelada recientemente (Angles y col., 1982) en los Yungas del Departamento de La Paz, sugiriendo la presencia de casos humanos autóctonos de kala-azar. Hasta la fecha, ninguna cepa de leishmaniasis visceral había sido aislada en Bolivia.

MATERIAL Y METODOS

A) Búsqueda de casos humanos de kala-azar y aislamiento de cepas:

Mediante búsqueda pasiva y frente a una sospecha clínica de leishmaniasis visceral, el estudio inmunológico del paciente fué efectuado por intradermoreacción a la leishmanina, inmunofluorescencia indirecta e inmunoelectroforesis. En cuanto al estudio parasitológico, consistió en una punción de la cresta iliaca, un frotis, la coloración y el cultivo en medio bifásico NNN modificado (Decker-Jackson y Honiberg, 1978); en caso de aislamiento positivo, los cultivos eran replicados cada semana.

B) Captura de flebotomos; zona de estudio, aislamiento de cepas:

La encuesta fué realizada en los "Yungas" del Departamento de La Paz, a una altura variando de 900 a 1400 metros. Los flebotomos eran identificados por su genitalia; las hembras eran disectadas, y en caso de infección espontánea, el tubo digestivo era extraído y sembrado en 2 tubos de medio NNN modificado, con control semanal.

C) Búsqueda de perros infectados, aislamientos de cepas:

Los perros clínicamente sospechosos eran estudiados serológicamente; una vez efectuada la autopsia, las muestras de hígado, bazo y médula ósea eran sistemáticamente sembrados en medio de cultivo.

D) Cultivos masivos, preparación del material para la electroforesis:

La multiplicación de los cultivos a partir de tubos de 10 ml fué obtenida por siembra de frascos de 200 ml. Después de cosechar, los cultivos eran centrifugados a 40 a 2500 rpm durante 10 minutos, luego lavados 3 veces. Los sedimentos eran guardados a -80°.

Un poco antes de la electroforesis, se añadió un volumen igual de estabilizador hipotónico de enzimas (Godfrey & Kilgour, 1976). La lisis de los promastigotes fué obtenida por congelación/descongelación efectuadas 3 veces seguidas.

E) Electroforesis:

Los métodos de electroforesis en acetato de celulosa fueron los de Tibayrenc y Le Ray (1984) adaptados de Lanham y col. (1981). La glutamato oxaloacetato transaminasa (GOT) fué revelada según el método de Kreutzer y col. (1983), utilizando como tampón de migración el buffer HR Helena (fuerza iónica 0.75).

Se usaron las siguientes enzimas para la caracterización bioquímica:

ENZIMA	No.	ABREVIACION
Malato dehidrogenasa	E.C.1.1.1.37.	MDH
Enzima malica	E.C.1.1.1.40.	ME
Isocitrato dehidrogenasa	E.C.1.1.1.42.	ICD
6 fosfogluconato dehidrogenasa	E.C.1.1.1.44.	6PGDH
Glucosa 6 fosfato dehidrogenasa	E.C.1.1.1.49.	G6PDH
Glutamato dehidrogenasa (Nad+)	E.C.1.1.1.2.	GDH Nad+
Glutamato dehidrogenasa (Nadp+)	E.C.1.4.1.2.	GDH Nadp+
Glutamato oxaloacetato transaminasa	E.C.2.6.1.1.	GOT
Fosfoglucomutasa	E.C.2.7.5.1.	PGM
Peptidasa (substrato L-leucyl-leucyl-leucina)	E.C.3.4.11.	PEP
Aconitata hidrolasa	E.C.4.2.1.3.	ACON
Manosa fosfata isomerasa	E.C.5.3.1.8.	MPI
Fosfoglucomutasa	E.C.5.3.1.9.	PGI

Seis cepas de referencia fueron utilizadas:

TAXON	HUESPED	ORIGEN GEOGRAFICO	CODIGO INTERNACIONAL
<i>L. infantum</i> s.st.	Hombre	Marruecos	MHOM/MA/67/ITMAP-263
<i>L. chagasi</i> s.l.	Hombre	Bahia, Brasil	MHOM/BR/74/M-2682
<i>L. donovani</i> s.st.	Hombre	India	MHOM/IN/?/HS-70
<i>L. braziliensis braziliensis</i>	Hombre	Pará, Brasil	MHOM/BR/75/M-2904
<i>L. mexicana amazonensis</i>	<i>Lutzomyia flaviscutellata</i>	Pará, Brasil	IFLA/BR/67/PH-8
<i>L. hertigi deanei</i>	<i>Coendou prehensilis</i>	Pará, Brasil	MCOE/BR/78/M-5088

RESULTADOS

A) Primer caso humano autóctono de los Yungas del Departamento de La Paz:

En un niño de 2 años y 2 meses, el cuadro clínico muy característico hizo evocar el diagnóstico de kala-azar, lo cual fué confirmado serológicamente. La punción de la cresta iliaca, con frotis positivo, fué sembrada en cultivo y permitió aislar una cepa al cuarto día (Desjeux y col., 1983).

B) Captura, tasa de infección de *L. longipalpis*:

L. longipalpis representó 96 % del conjunto de los flebótomos capturados en zonas peridomésticas. 2,578 hembras fueron disectadas. La tasa de infección natural en 3 pueblos diferentes varía de 0.8 a 4.2 % (Le Pont y Desjeux, 1984). La localización suprapilórica y el tamaño grande de los parásitos sugerían su pertenencia al complejo *L. donovani* s.l. (Lainson y col., 1977b).

C) Aislamiento de leishmanias de los especímenes de *L. longipalpis*:

Cinco cepas fueron aisladas de hembras de *L. longipalpis*, luego mantenidas en cultivo en medio bifásico NNN modificado, con replicados semanales.

D) Búsqueda de perros infectados, aislamiento de cepas:

Cinco perros sospechosos, con confirmación serológica, fueron sometidos a autopsia. Muestras de hígado, bazo y médula osea fueron puestas en cultivo. Cinco cepas fueron aisladas, dos se contaminaron y tres pudieron ser mantenidas en cultivo.

E) Características de las cepas:

En resumen, 9 cepas autóctonas fueron tipificadas: 5 procedentes de hembras de *L. longipalpis*, 3 de perros, y una de un caso humano.

F) Caracterización isoenzimática de las cepas:

1) Cepas autóctonas: (Ver diagramas)

Los resultados electroforéticos mostraron, para las 13 enzimas estudiadas, un perfil isoenzimático idéntico

común a las 9 cepas, demostrando así su completa similitud. Por otra parte, esas 9 cepas eran totalmente similares a las dos cepas de referencia M-2682 (*L. chagasi* s.l.) del Brazil y ITMAP-263 (*L. infantum*) de Marruecos. Al contrario, eran diferentes de HS-70 (*L. donovani*) de la India, con 7 enzimas sobre 13 discriminativas (6PGDH, ICD, MDH, G6PDH, GPI, GOT, MPI).

Las cepas de referencia representativas de otros complejos: *L. mexicana amazonensis* (PH-8), *L. braziliensis braziliensis* (M-2904 y *L. hertigi deanei* (M-5088), se mostraron bien diferentes.

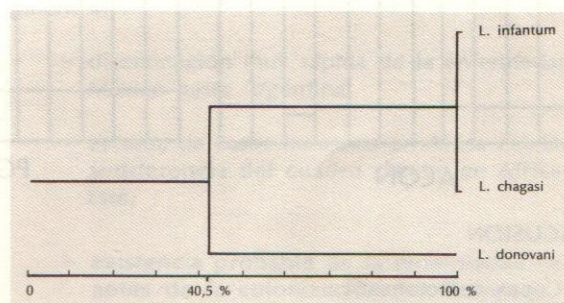
2) Cepas de referencia: (Ver diagramas)

El estudio del grado de similitud proteica entre las cepas de referencia de complejo *donovani* s.l. (porcentaje de bandas comunes) era del 100 % entre *L. chagasi* s.l. (M-2682) y *L. infantum* (ITMAP-263); mientras era solamente del 40.5 % entre *L. donovani* (HS-70) y las dos otras *L. infantum* y *L. chagasi* s.l. (ver Tablas 1 y 2).

TABLA 1: GRADO DE SIMILITUD PROTEICA ENTRE SUBESPECIES DEL COMPLEJO DONOVANI
% de bandas comunes en electroforesis de izoenzimas en acetato de celulosa.

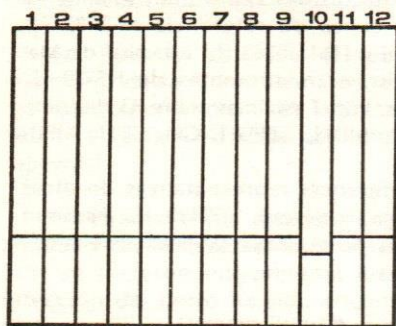
	<i>L. infantum</i>	<i>L. chagasi</i>
<i>L. chagasi</i>	13/13 100 %	—
<i>L. donovani</i>	6/13 40,5 %	6/13 40,5 %

TABLA 2:
RELACION FILOGENICA SUPUESTA ENTRE SUBESPECIES DEL COMPLEJO DONOVANI BASADA SOBRE EL GRADO DE SIMILITUD PROTEICA (% de bandas comunes)

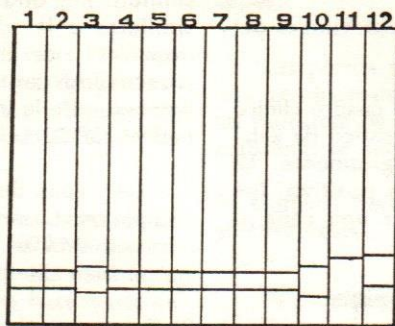


No. DE CEPA	HUESPED	ORIGEN	ORGANO INFECTADO
ILON/BO/83/LPZ-391	<i>L. longipalpis</i>	Nor-Yungas	Tubo digestivo
ILON/BO/83/LPZ-392	<i>L. longipalpis</i>	Santa Bárbara	(suprapilórico)
ILON/BO/83/LPZ-422	<i>L. longipalpis</i>	" "	" "
ILON/BO/83/LPZ-443	<i>L. longipalpis</i>	" "	" "
ILON/BO/83/LPZ-597	<i>L. longipalpis</i>	" "	" "
MCAN/BO/81/LPZ-06	Perro	Sud-Yungas	Médula ósea, hígado, bazo
MCAN/BO/81/LPZ-08	Perro	Sud-Yungas	" " " "
MCAN/83/83/LPZ-225	Perro	Nor-Yungas	" " " "
MHOM/82/82/LPZ-18	Hombre	Sud-Yungas	Médula ósea

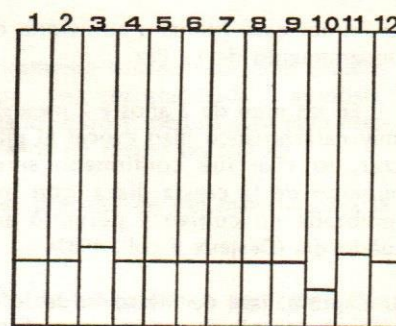
diagramas de los perfiles enzimaticos



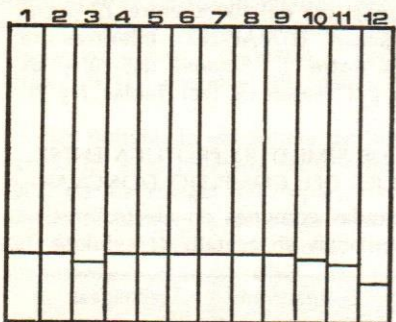
ME



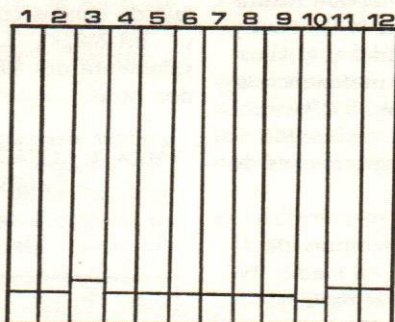
MDH



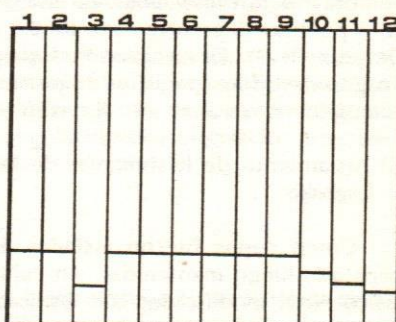
6PGDH



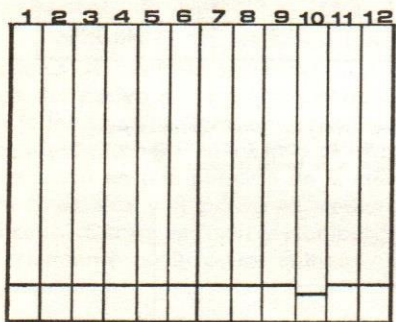
G6PDH



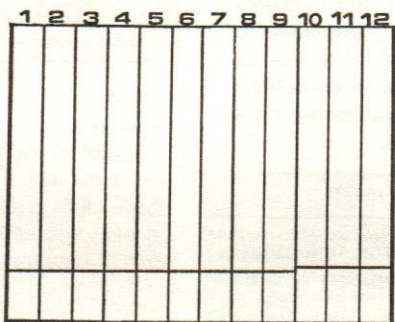
ICD



GPI



ACON



PGM

leyenda

- 1. MHOM/MA/67/ITMAP-263
- 2. MHOM/BR/74/M-2682
- 3. MHOM/IN/?/HS-70
- 4. MHOM/BR/74/M-2682
- 5. MHOM/BO/82/LPZ-18
- 6. MCAN/BO/83/LPZ-225
- 7. ILON/BO/83/LPZ-392
- 8. ILON/BO/83/LPZ-443
- 9. ILON/BO/83/LPZ-597
- 10. MHOM/BR/75/M-2904
- 11. IFLA/BR/67/PH-8
- 12. MCOE/BR/78/M-5088

DISCUSION

A) Cepas autóctonas:

Este estudio representa la primera caracterización de cepas del complejo *L. donovani* s.l. en Bolivia. El mismo precisa las características epidemiológicas del foco de leishmaniasis visceral humana y canina de los Yungas del Departamento de La Paz, y plantea el problema del origen autóctono o importado de esas cepas.

1) Cepas de *L. longipalpis*:

La identificación de las cepas aisladas de *L. longipalpis* como ligadas al complejo *L. donovani* s.l., junto con otros argumentos como la localización suprapilórica de las infecciones espontáneas en el tubo

digestivo de *L. longipalpis*, el tamaño grande de los promastigotes y sobre todo su similitud con cepas aisladas en la misma región de un caso humano y de perros, todos esos datos permitieron concluir formalmente al rol de vector de *L. longipalpis* en el foco estudiado. Hasta la fecha, en América del Sur, la presunción del rol de vector de *L. longipalpis* estaba basada solamente sobre argumentos indirectos (Lainson y Shaw, 1979).

Simultáneamente con nuestro estudio, Ryan y col. (1984) reportaron la infección espontánea suprapilórica masiva en 0.5 % de los flebótomos *L. longipalpis* en la isla de Marajo (Estado de Pará, Brazil); una cepa se reveló totalmente semejante, por sus caracteres biológicos y bioquímicos, a *L. chagasi* aislada de casos humanos y de zorros de la misma región.

Finalmente, en 1984, Lainson y col. encontraron en el foco de Santarem (Pará, Brasil) 7.14 % de *L. longipalpis* infectados y el parásito fue transmitido al hamster por picadura de flebotomos salvajes.

2) Cepas caninas:

Los resultados isoenzimáticos permitieron determinar el rol de reservorio doméstico del perro en este foco de los Yungas, donde la infección canina (tanto cutánea como visceral) es muy difundida. Sin embargo, la evolución rápida de la infección hasta la muerte del perro hace suponer la existencia paralela de un otro reservorio doméstico para dicha enfermedad.

B) Cepas de referencia del Antiguo Mundo: individualización de *L. donovani* y *L. infantum*.

Al principio, numerosos autores han clasificado los agentes etiológicos de la leishmaniasis visceral humana en diferentes especies y subespecies, basándose en argumentos morfológicos, biogeográficos y epidemiológicos (Nicoli, 1963; Garnham, 1971; Lainson y Shaw, 1972; Bray, 1974; Hommel, 1978). Más tarde, los caracteres intrínsecos, y particularmente la movilidad electroforética de los isoenzimas, se impusieron como criterios mayores de clasificación (Schnur y col., 1972; Ebert, 1973; Chance y col., 1977a; Gardener y col., 1974; Kilgour y col., 1974; Schnur y Zuckerman, 1977; Brazil, 1978; Al Taqui y Evans, 1978; Chance, 1979; Lainson y Shaw, 1979; Rioux y col. 1980).

Recientemente, unas cepas procedentes de zonas geográficas muy diferentes (América del Sur, Mediterráneo, Africa, India), fueron estudiadas según diversos métodos: gradiente de densidad de flotación del DNA, factor excretado, electroforesis de isoenzimas. Schnur y col. (1981) compararon de esta manera en 7 sistemas enzimáticos diferentes, 84 cepas, incluyendo cepas del Nuevo Mundo procedentes de Honduras y del Brasil. 76 de ellas eran similares o a veces con un enzima variante; los autores concluyeron en la gran homogeneidad de las cepas en contraste con la diversidad de su origen geográfico.

Simultáneamente, Peters y col. (1981) estudiaron en 4 sistemas enzimáticos la movilidad electroforética de cepas procedentes de casos de kala-azar de diferentes regiones de la India. Demostraron entre las cepas del Nor-Bihar la prevalencia de *L. donovani*, diferente de *L. infantum* del Mediterráneo, destacando la existencia de *L. infantum* en la región de Calcutta. Igualmente, Lanotte y col. (1981) estudiaron 146 cepas del Antiguo Mundo por electroforesis en gel de almidón, con 8 enzimas. Individualizaron por taxonomía numérica diferentes complejos, entre ellos el complejo *L. donovani*. Dentro de ese último, describieron 2 grupos distintos: el uno oriental, *L. donovani*, el otro occidental, *L. infantum*, demostrando una importante heterogeneidad.

Finalmente, Lainson y col. (1981) separaron unas cepas de *L. donovani* s.l. de la India, del Kenya y de la

Etiopia, de una cepa *L. infantum* de Francia, mediante un sistema enzimático (ASAT) en gel de almidón.

Nuestros propios resultados, aunque logrados sobre solamente dos cepas de referencia (HS-70 e ITMAP-263), han confirmado netamente las diferencias existentes entre *L. donovani* y *L. infantum*, ya que 7 sistemas enzimáticos han permitido separarlas.

C) Origen de las cepas de leishmaniasis viscerales del Nuevo Mundo:

Los resultados de nuestro estudio, total similitud (100 %) entre la cepa de referencia *L. chagasi* s.l. (M-2682) del Brasil y *L. infantum* (ITMAP-263) de Marruecos, se inscriben en el cuadro de un gran debate referido al origen autóctono o importado de las cepas de las leishmaniasis viscerales del Nuevo Mundo.

Diversas hipótesis se emitieron sucesivamente:

1) Adler (1957, 1964) se opuso a la hipótesis de una importación de las cepas viscerales del Nuevo Mundo, basándose en la improbable adaptación de *L. d. infantum* al vector del Nuevo Mundo *L. longipalpis*.

2) Gardener (1977), Chance (1979), Schnur y col. (1981) sugieron la posibilidad de una importación por los colonos o los esclavos, en razón de la similitud observada en electroforesis de isoenzimas, de las cepas del Nuevo y del Antiguo Mundo.

3) Al contrario, Lainson y Shaw (1979), aunque no hayan podido diferenciar cepas del Brasil y de Honduras con cepas del Mediterráneo, opinaron sobre el origen autóctono basándose en los argumentos siguientes:

- diseminación muy rápida de la enfermedad de México hasta Argentina,
- escasez de casos humanos en Africa del Oeste, y diferencia del cuadro clínico en Africa del Este,
- existencia probable de la enfermedad canina antes de la colonización por Europeos, por encontrarse extensamente difundida,
- finalmente, gran estabilidad de la epidemiología de la leishmaniasis visceral mediterránea, y particularmente la gran especificidad vectorial del *Phlebotomus*.

4) Sin embargo, Killick-Kendrick y col. obtuvieron en 1980 el desarrollo de *L. d. infantum* en el intestino medio de *L. longipalpis*, demostrando la posibilidad de transmisión de las cepas del Antiguo Mundo por flebotomos neotropicales, argumentos que llevaba a la importación de ciertas cepas por los perros de los colonos.

5) Finalmente, Lainson (1982a y 1983) sugirió la posibilidad de una multiplicidad de los parásitos agentes de la leishmaniasis visceral americana, unos siendo autóctonos, otros importados, la dificultad de cultivo de ciertas cepas provocando tal vez una falsa selección.

Nuestros resultados (similitud entre las cepas de referencia *L. chagasi* y *L. infantum* estudiadas) parecen inducir la importación reciente de las cepas del Nuevo Mundo, pero para poder concluir definitivamente, numerosas cepas procedentes de América del Sur y América Central deberán ser tipificadas. Además la estandarización de las técnicas y el uso de cepas de referencia comunes, son indispensables para proceder al estudio comparativo de los resultados de diferentes laboratorios. Y finalmente, otras técnicas, como el estudio del ADN kinetoplástico o el logro de anticuer-

pos monoclonales, deben utilizarse en paralelo con los estudios isoenzimáticos para hacer una comparación global.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a los Doctores R. LAINSON y J.J. SHAW, del Instituto Evandro Chagas de Bélem (Pará, Brasil), así como al Dr. D. Le RAY, del Instituto de Medicina Tropical de Amberes (Bélgica), por la donación de las cepas de referencia de *Leishmania* utilizadas en el presente trabajo.

Este estudio fué efectuado gracias a fondos del Ministerio francés de la Cooperación (Servicio STD) y una subvención del Programa Especial para la Investigación y la Formación en Enfermedades Tropicales del PNUD/Banco Mundial/OMS.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- ADLER S.: *Leishmania*. In: *Advances in Parasitology*, Ed. B. DAWES, Academic Press, New-York/London, 1964, 2, 35-96.
- 2.- ADLER S., THEODOR, O.: Transmission of disease agents by phlebotomine sandflies. *Annual Review of Entomology*, 1957, 2, 203-226.
- 3.- ALENCAR J.E., PESSOA E.P. COSTA O.R.: Calazar em Santarem, Estado do Para. *Rev. Bras. Malariol. Doencas Trop. pic.*, 1962, 14, 371-377.
- 4.- AL TAQUI M., EVANS D.A.: Characterization of *Leishmania* spp. from Kuwait by isoenzyme electrophoresis. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1978, 72, 56-65.
- 5.- ANGLES R., LE PONT F., DESJEUX P.: Visceral canine leishmaniasis in Bolivia. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1982, 76, 704.
- 6.- ARRUDA W., DA COSTA F.C., NAHAS S., ROSENFELD G.: Leishmaniose visceral americana. Constatacao de dois casos. *Brasil Medical*, 1949, 8-9, 63-65.
- 7.- BRAZIL R.P.: Electrophoretic variation of the enzyme phosphoglucomutase in different strains of *Leishmania*. *Ann. Trop. Med. Parasit.*, 1978, 72, 289-291.
- 8.- BRAY R.S.: *Leishmania*. *Annual Rev. Microbiol.*, 1974, 28, 189-217.
- 9.- CHAGAS E., CUNHA A.M., CASTRO G.O., FERREIRA L.C., ROMANA C.: Leishmaniose visceral americana. Relatório dos trabalhos realizados pela Comissão encarregada dos estudos da leishmaniose visceral americana em 1936. *Mem. do Instituto Oswaldo Cruz*, 1937, 32, 321-385.
- 10.- CHANCE M.L.: The identification of *Leishmania*. In: *Problems in identification of parasites and their vectors*. Eds. TAYLOR A.E.R. & MULLER R., Blackwell Scientific Publications, 1979, 55-74.
- 11.- CHANCE M.L., GARDENER P.J., PETERS W.: The biochemical taxonomy of *Leishmania* as an ecological tool. *Colloques internationaux du CNRS No. 239: Ecologie des leishmanioses*, 1977, 53-62.
- 12.- DEANE L.M.: Leishmaniose visceral no Brasil. *Servico Nacional de Educaçao sanitaria*, Rio de Janeiro, Brasil, 1956.
- 13.- DEANE M.M., DEANE L.M.: Infecçao experimental do *Phlebotomus longipalpis* em caso humano de leishmaniose visceral. *Hospital (Rio de Janeiro)*, 1954a, 46, 487-489.
- 14.- DEANE M.P., DEANE L.M.: Infecçao experimental do *Phlebotomus longipalpis* em raposa (*Lycalopex vetulus*) naturalmente parasitada pela *Leishmania donovani*. *Hospital (Rio de Janeiro)*, 1954 b., 46, 651-653.
- 15.- DEANE L.M., DEANE M.P.: Visceral leishmaniasis in Brazil: geographic distribution and transmission. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, 1962, 4, 198-212.
- 16.- DECKER-JACKSON J.E., HONIBERG B.M.: Glycoproteins released by *leishmania donovani*: immunologic relationship with host and bacterial antigens and preliminary biochemical analysis. *J. Protozool.*, 1978, 25, 514-525.
- 17.- DESJEUX P., ARANDA E., ALIAGA O., MOLLINEDO S.: Human visceral leishmaniasis in Bolivia: first proven autochthonous case from "Los Yungas". *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1983, 77, 851-852.
- 18.- EBERT F.: Charakterisierung von *Leishmania donovani*. Stammen mit der elektrophorese. *Tropenmed. Parasit.*, 1973, 24, 514-524.
- 19.- GARDENER P.J.: Taxonomy of the Genus *Leishmania*: a Review of Nomenclature and Classification. *Trop. Dis. Bull.*, 1977, 74, 1069-1088.
- 20.- GARDENER P.J., CHANCE M.L., PETERS W.: Biochemical taxonomy of *Leishmania*. II. Electrophoretic variation of

- malate dehydrogenase. *Ann. Trop. Med. Parasit.*, 1974, 68, 317-325.
- 21.- GARNHAM P.C.C.: The genus *Leishmania*. *Bull. OMS.*, 1971, 44, 477-489.
 - 22.- GATTI G., BOGGINO J., PRIETO C.: Un nouveau foyer de leishmaniose viscérale en Amérique du Sud. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 1939, 32, 602-605.
 - 23.- GODFREY D.G., KILGOUR V.: Enzyme electrophoresis in characterizing the causative organism of Gambian trypanosomiasis. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1976, 70 219-224.
 - 24.- HOMMEL M.: The genus *Leishmania*: Biology of the parasite and clinical aspects. *Bull. Inst. Pasteur, Paris*, 1978, 75, 5-102.
 - 25.- KILGOUR V., GARDENER P.J., GODFREY D.G., PETERS W.: Demonstration of electrophoretic variation of two aminotransferases in *Leishmania*. *Ann. Trop. Med. Parasit.*, 1974 68, 245-246.
 - 26.- KILLICK-KENDRICK R., MOLYNEUX D.H., RIOUX J.A., LEANEY A.J.: Possible origins of *Leishmania chagasi*. *Ann. Trop. Med. Parasit.*, 1980, 74, 563-565.
 - 27.- KREUTZER R.D., SEMKO M.E., HENDRICKS L.D., WRIGHT N.: Identification of *Leishmania* spp. by multiple isozyme analysis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1983, 32 (4), 703-715.
 - 28.- LAINSON R.: Leishmanial parasites of mammals in relation to human disease. In: *Animal disease in relation to animal conservation*. Eds. EDWARDS & DONNEL, Symposium of the Zoological Society of London, 1982a, 50, 137-179.
 - 29.- LAINSON R.: The American leishmaniasis: some observations on their ecology and epidemiology. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1983, 77, 569-596.
 - 30.- LAINSON R., MILES M.A., SHAW J.J.: On the identification of viscerotropic leishmaniasis. *Ann. Trop. Med. Parasit.*, 1981, 75, 251-253.
 - 31.- LAINSON R., SHAW J.J.: Epidemiological considerations of the leishmaniasis, with particular reference to the New World. In: *Ecology and physiology of Parasites*, Ed. A.M. FALLIS, University of Toronto Press, Canada, 1971, 21-57.
 - 32.- LAINSON R., SHAW J.J.: Leishmaniasis of the New World: taxonomic problems. *British Med. Bull.*, 1972, 28, 44-48.
 - 33.- LAINSON R.R., SHAW J.J.: The role of animals in the epidemiology of South-american leishmaniasis. In: *Biology of the Kinetoplastida*, Eds. LUMSDEN & EVANS, London/New-York, Academic Press, 1979, vol. II, 1-116.
 - 34.- LAINSON R., SHAW J.J., LINS Z.C.: Leishmaniasis in Brazil. IV: The fox *Cercopithecus thous* (L) as a reservoir of leishmaniasis donovani in Para State, Brazil. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1969, 63, 741-745.
 - 35.- LAINSON R., SHAW J.J., RYAN L., RIBEIRO R.S.M., SILVEIRA F.T.: Leishmaniasis in Brazil. XXI. Visceral leishmaniasis in the Amazon region and further observations on the role of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva 1912) as the vector. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1984, in press.
 - 36.- LAINSON R., SHAW J.J., SILVEIRA F.T., FRAIHA H.: Leishmaniasis in Brazil XIX: Visceral leishmaniasis in the Amazon region, and the presence of *Lutzomyia longipalpis* on the island of Marajo, Para State. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1983, 77, 323-330.
 - 37.- LAINSON R., WARD R.D., SHAW J.J.: Experimental transmission of *Leishmania chagasi*, causative agent of neotropical visceral leishmaniasis, by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Nature*, 1977a, 266 (5603), 628-630.
 - 38.- LAINSON R., WARD R.D., SHAW J.J.: *Leishmania* in phlebotomid sandflies. VI. Importance of hindgut development in distinguishing parasites of the *Leishmania mexicana* and *L. braziliensis* complexes. *Proc. Roy. Soc. (B)*, 1977b, 199, 309-320.
 - 39.- LANHAM S.M., GRENDRON J.M., MILES M.A., POVOA M., DE SOUZA A.A.: A comparison of electrophoretic methods for isoenzyme characterization of *Trypanosoma cruzi*. I. Standard stocks of *Trypanosoma cruzi* zymodemes from northeast Brazil. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1981, 75 (5), 742-750.
 - 40.- LANOTTE G., RIOUX J.A., MAAZOUN R., PASTEUR N., PRATLONG F., LEPART J.: Application de la méthode numérique à la taxonomie du genre *Leishmania* Ross 1903. A propos de 146 souches originaires de l'Ancien Monde. Utilisation des allozymes. Corollaires épidémiologiques et phylétiques. *Ann. Parasit. hum. comp.*, 1981, 56, 575-592.
 - 41.- LE PONT F., DESJEUX P.: Leishmaniasis in Bolivia. I. *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva 1912) as the vector of visceral leishmaniasis in "Los Yungas". *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1984, sous presse.
 - 42.- LOPES J.A.S.: *Phlebotomus longipalpis* naturalmente infectados com formas em leptomonas na cidade de Jacobina, Estado da Bahia. *Rev. Med. do Parana*, 1956, 25, 57-58.
 - 43.- MARZOCHI M.C.A., TOLEDO L.M., MARZOCHI K.B.F., COUTINHO S.G., TRAMONTANO N.C.: Leishmaniose visceral no Rio de Janeiro. Aspectos epidemiológicos. XIX Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina tropical, 1983, Abstracts, p. 60.
 - 44.- MONTEIRO DE BARROS O., ROSENFELD G.: Leishmaniose visceral americana. Um caso da Bolívia. *Rev. clinica Sao Paulo*, 1942, 4, 91-99.
 - 45.- NICOLI R.M.: Le genre *Leishmania* R. Ross 1903. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 1963, 56, 408-416.
 - 46.- PETERS W., CHANCE M.L., CHOWDHURY A.B., GHOSH DASTIVAR B., NANDY A., KALRA J.L., SANYAL R.K., SHARMA M.I.D., SRIVASTAVA L., SCHNUR L.F.: The identity of some stocks of *Leishmania* isolated in India. *Ann. Trop. Med. Parasit.*, 1981, 75 (2), 247-249.

- 47.- RIOUX J.A., LANOTTE G., MAAZOUN R., PERELLO R., PRATLONG F.: *Leishmania infantum* Nicolle 1908, agent du bouton d'Orient autochtone. A propos de l'identification biochimique de deux souches isolées dans les Pyrénées-orientales. C.R. Acad. Sci. Paris, 1980, 291 (D), 701-703.
- 48.- RYAN L., SILVEIRA F.T., LAINSON R., SHAW J.J.: Leishmanial infections in *Lutzomyia longipalpis* and *Lu. antunesi* (Diptera: Psychodidae) on the island of Marajo, Para State, Brazil. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 1984, 78, sous presse.
- 49.- SCHNUR L.F., CHANCE M.L., EBERT F., THOMAS S.C., PETERS W.: The biochemical and serological taxonomy of visceralizing *Leishmania*. Ann. Trop. Med. Hyg., 1981 75, 131-144.
- 50.- SCHNUR L.F., ZUCHERMAN A.: Leishmanial excreted factor (EF) serotypes in Sudan, Kenya and Ethiopia. Ann. Trop. Med. Parasit., 1977, 71, 273-294.
- 51.- SCHNUR L.F., ZUCHERMAN A., GREENBLATT C.L.: Leishmanial serotypes as distinguished by the gel diffusion of factors excreted in vitro and in vivo. Israel J. Med. Sci., 1972, 8, 932-942.
- 52.- SHERLOCK I.A., GUITTON N.: Observações sobre calazar em Jacobina, Bahia. III. Alguns dados sobre o *Phlebotomus longipalpis*, o principal transmissor. Rev. Bras. Malariol. Doencas Tropicais, 1969, 21, 541-548.
- 53.- SHERLOCK I.A., PESSOA S.B.: *Leptomonas* infectando naturalmente *Phlebotomus* em Salvador (Bahia, Brasil). Rev. Latino-am. Microbiol. Parasit., 1966, 8, 47-50.
- 54.- TIBAYRENC M., LE RAY D.: A preliminary general classification of the isoenzymic strains of *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* based on the study of the main laboratory reference stocks. Electrophoretic comparison with *T. (S.) cruzi marinkellei* and *T. (Herpetosoma) rangeli*. Ann. Soc. belge Méd. Trop., 1984, sous presse.
- 55.- VELASCO J.E.: The phlebotomine sandflies of the Los Yungas region of Bolivia. M.S. Thesis, Louisiana State Univ., Dep. Trop. Med. and Med. Parasit., 1973, 204 p.