



**INSTITUTO
BOLIVIANO DE
BIOLOGIA
DE LA ALTURA**

**ANUARIO
1983 - 1984**

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES
MINISTERIO DE PREVISION SOCIAL Y
SALUD PUBLICA
COOPERACION TECNICA DE FRANCIA

EN HOMENAJE AL SESQUICENTENARIO DE LA FACULTAD DE MEDICINA UMSA

Las leishmania de Bolivia

I: *Leishmania braziliensis braziliensis* en los Departamentos de La Paz y Beni.
Primeros aislamientos de cepas humanas y su caracterización enzimática.

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

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

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

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

SUMMARY

LEISHMANIA OF BOLIVIA. I: *Leishmania braziliensis braziliensis* in the La Paz and Béni Departments. First isolations and enzymic characterization

Fifteen *Leishmania* stocks were isolated during a clinical, serological and parasitological survey of human cutaneous leishmaniasis in the La Paz and Béni Departments, Bolivia. Isozyme typing (13 enzymes) by electrophoresis on cellulose acetate plates of 10 of the isolates enabled the authors to link them to the subspecies *Leishmania braziliensis braziliensis* complex. The diversity of the geographical origins of the stocks, in contrast with their isozymic homogeneity, is discussed.

RESUMEN

Los autores efectuaron el estudio clínico, serológico y parasitológico en pacientes procedentes de diferentes zonas donde existe leishmaniasis cutánea y cutáneo-mucosa humana de los Departamentos de La Paz y del Beni. Quince cepas fueron aisladas; la tipificación isoenzimática de diez de ellas (13 enzimas) mediante electroforesis en acetato de celulosa, permitió identificarlas como *Leishmania braziliensis braziliensis*. Diez enzimas eran discriminadas para el diagnóstico de subespecie dentro del complejo *L. braziliensis*. La diversidad del origen geográfico de las cepas, en contraste con su homogeneidad isoenzimática, es discutida.

INTRODUCCION

Si bien la leishmaniasis cutánea y cutáneo-mucosa es difundida y reportada desde hacen años en "Los Yungas" del Departamento de La Paz (Veintemillas, 1928; Balcazar, 1946; Walton y col., 1973; Desjeux, 1974; Desjeux y col., 1974; Walton y Chinel, 1979), en el Alto Beni, zona que prolonga los Yungas hacia el norte y reúne el piemonte andino con la cuenca del

Amazonas, la enfermedad fué reportada recientemente, habiéndose convertido en un problema de salud pública, debido a la creación de zonas de colonización, la extensión de la prospección aurífera y petrolera, la apertura de nuevos ejes de comunicación, etc....

Un estudio clínico, serológico y posteriormente parasitológico de casos humanos procedentes de estas dos regiones endémicas, nos permitió aislar 15 cepas y proceder a la caracterización enzimática de diez de ellas; se pudo así identificarlas como *L. braziliensis braziliensis*, por primera vez en Bolivia.

MATERIAL Y METODOS

A) Aislamiento de los parásitos, cultivo:

Todas las cepas que tenemos fueron aisladas a partir de biopsias de lesiones cutáneas de pacientes procedentes de los dos focos estudiados, con prueba serológica positiva (IFI). Cada biopsia fué triturada en solución PBSS, luego sembrada en medio bifásico NNN modificado (Decker-Jackson y Honiberg, 1978).

Los tubos, incubados a 23^o, eran examinados cada semana, y descartados después de un mes si eran negativos. En caso de aislamiento positivo, los cultivos eran replicados cada semana. Las características de su desarrollo en cultivo eran registradas en cada replicaje (crecimiento, adaptación).

B) Cultivos masivos, preparación del material de electroforesis:

La multiplicación de los cultivos a partir de tubos de 10 ml fué obtenida por la siembra en frascos de 200 ml. Después de cosechar, los cultivos eran centrifugados a 4^o a 2500 rpm durante 10 minutos, luego lavados 3 veces. Los sedimentos obtenidos eran guardados a -80^o.

Un poco antes de la electroforesis, fué añadido un volumen equivalente de estabilizador hipotónico de enzimas (Codfrey y Kilgour, 1976). La lisis de los promastigotes fué obtenida por congelación/descongelación tres veces.

C) Electroforesis:

Los métodos de electroforesis en acetato de celulosa fueron los de Tibayrenc y Le Ray (1984) adaptadas de Lanham y col. (1981). Una de las enzimas, la glutamato oxaloacetato transaminasa (GOT) fué revelada según el método de Kreutzer y col. (1980), utilizando como tampón de migración el buffer Helena HR (fuerza iónica 0.75).

Las enzimas siguientes fueron utilizadas para la caracterización bioquímica:

ENZIMA	No.	ABREVIACION
Malato dehidrogenasa	E.C.1.1.1.37	MDH
Enzima málica	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.1.2.1.2.	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 fosfato isomerasa	E.C.5.3.1.8.	MPI
Fosfoglucosa isomerasa	E.C.5.3.1.9.	PGI

Se utilizaron seis cepas de referencia representativas de la clasificación de Lainson y Shaw (1979) para las leishmanias del Nuevo Mundo: (Ver cuadro 1)

D) Anticuerpos monoclonales:

En el Instituto Evandro Chagas de Bélem, Brasil (Dr. J.J. Shaw), cuatro de las cepas fueron probadas en inmunofluorescencia frente a los anticuerpos monoclonales siguientes:

CODIGO	CLONO	ESPECIFICIDAD IF
B2	VI-4B9-D10	L. braziliensis
B5	VII-2C5-C5	L. b. braziliensis
B11	VI-5G3-F3	L. b. panamensis
B12	XIII-3H6-F9	L. braziliensis
B13	XLIV-5H2-E9	L. braziliensis
B18	XLV-2A5-A10	L. b. braziliensis
B19	XLIV-5A2-H2	L. b. guyanensis

E) Inoculación al hamster:

Cada cepa fué sistemáticamente inoculada a 2 hamsters, por vía subcutánea (patas, nariz). Se hizo un control semanal de los animales.

RESULTADOS:

A) Aislamiento de las cepas:

Quince cepas humanas fueron aisladas, todas procedentes de lesiones cutáneas; cinco fueron pérdidas. Las diez restantes fueron mantenidas en laboratorio y estudiadas bajo los aspectos parasitológico, bioquímico e inmunológico. Los enfermos presentaban las características siguientes: (Ver cuadro 2)

Es interesante destacar la diversidad del origen geográfico de esas cepas, procedentes de tres biotipos sumamente diferentes: Yungas, Alto Beni, Beni (Ver Mapa):

1) Los Yungas (5 casos), que se dividen en Nor-Yungas y Sud-Yungas según la orientación, son valles

C U A D R O 1

TAXON	HUESPED	ORIGEN GEOGRAFICO	CODIGO INTERNACIONAL
L. braziliensis braziliensis	Hombre	Para, Brasil	MHOM/BR/75/M-2904
L. braziliensis guyanensis	Hombre	Pará, Brasil	MHOM/BR/75/M-4147
L. braziliensis panamensis	Hombre	Panamá	MHOM/PA/75/M-4037
L. mexicana amazonensis	Lutzomyia flaviscutellata	Pará, Brasil	IFLA/BR/67/PH-8
L. mexicana mexicana	Nyctomys sumichrasti	Belize	MNYC/BZ/62/M-379
L. mexicana pifanoi	Hombre	Venezuela	MHOM/VE/77/L-20

CUADRO 2

No. CEPA	EDAD	SEXO	PROFESION	TIPO DE LESION*	LOCALIZACION CORPORAL	LUGAR DE CONTAMINACION
MHOM/81/LPZ-04	6	M	Agricultor	CM (4)	Cabeza M. sup. M. inf.	Sud - Yungas
MHOM/BO/82/LPZ-13	11	M	Agricultor	CM (10)	Cabeza Tórax M. inf.	Nor-Yungas
MHOM/BO/82/LPZ-14	33	M	Agricultor	CM (2)	Cabeza	Sud-Yungas
MHOM/BO/82/LPZ-16	11	M	Agricultor	CM (2)	M. sup. M. inf.	Nor-Yungas
MHOM/BO/82/LPZ-17	26	M	Agricultor	CU	M. sup.	Alto Béni
MHOM/BO/83/LPZ-155	18	M	Agricultor	CU	M. inf.	Beni
MHOM/BO/83/LPZ-264	68	M	Agricultor	CM (7)	Cabeza Tórax M. sup. M. inf.	Nor-Yungas
MHOM/BO/83/LPZ-355	30	M	Prospección petrolera	CU	M. sup.	Alto Beni
MHOM/BO/84/LPZ-399	37	M	Agricultor	CM (2)	M. inf.	Alto Beni
MHOM/BO/84/LPZ/464	52	M	Agricultor	CU	M. sup.	Alto Beni

* Tipo de lesión: CU = cutánea única
CM = cutánea múltiple; () = número de lesiones.

bordeados por los cerros de la Cordillera oriental, entre la cuenca amazónica y el Altiplano; los 5 casos estudiados provienen de la zona de baja altura (900 a 2000 metros), con clima subtropical húmedo;

2) El Alto Beni (4 casos) encierra los últimos cerros de la Cordillera (altura 250 a 900 metros), con un clima tropical húmedo;

3) El Beni (1 caso) es una zona de bajas planicies tropicales (altura inferior a los 200 metros), con sábanas y galerías forestales a lo largo de los ríos; esta región prolonga los Yungas hacia el Norte-Noreste.

Todas las cepas fueron difíciles de mantener en medio bifásico después de su aislamiento, y presentaban un crecimiento lento; su adaptación en medio semi-sintético (GLSH + 15 % SVF) fué también delicada; esas características se observaron constantemente.

B) Caracterización isoenzimática de las cepas:

Los resultados electroforéticos mostraron, para 11 enzimas sobre 13, un perfil isoenzimático monomorfo común a las 10 cepas estudiadas, y similar al de la cepa de referencia *L. b. braziliensis* (M-2904). Se observaron variantes en 2 sistemas enzimáticos (MDH y ICD). Ver diagramas.

a) Estudio de las enzimas discriminativas: (Ver Tabla 1).

Las 13 enzimas se mostraron discriminativas para diferenciar los complejos *mexicana* y *braziliensis*, y

permitieron identificar el conjunto de las cepas como siendo del complejo *braziliensis*. Diez de las 13 enzimas estudiadas fueron discriminativas para separar las subespecies del complejo *braziliensis*. (*L. b. braziliensis*, *L. b. guyanensis*, *L. b. panamensis*); entre ellas, 7 enzimas son discriminativas para cada una de las 3 subespecies frente a las dos otras (G6PD, GDH Nad+, GDH Nadp+, MDH, MPI, PEP, PGM). Tres otras enzimas son discriminativas para dos subespecies frente a una otra (ME, GPI, 6PGDH) (Ver Tabla 1). Esas 10 enzimas permiten afirmar que las 10 cepas humanas estudiadas son muy parecidas a *L. b. braziliensis*; en efecto, entre las cepas de referencia, es la cepa M-2904 (*L. b. braziliensis*) que presenta la mayor cantidad de similitudes isoenzimáticas con nuestras cepas humanas.

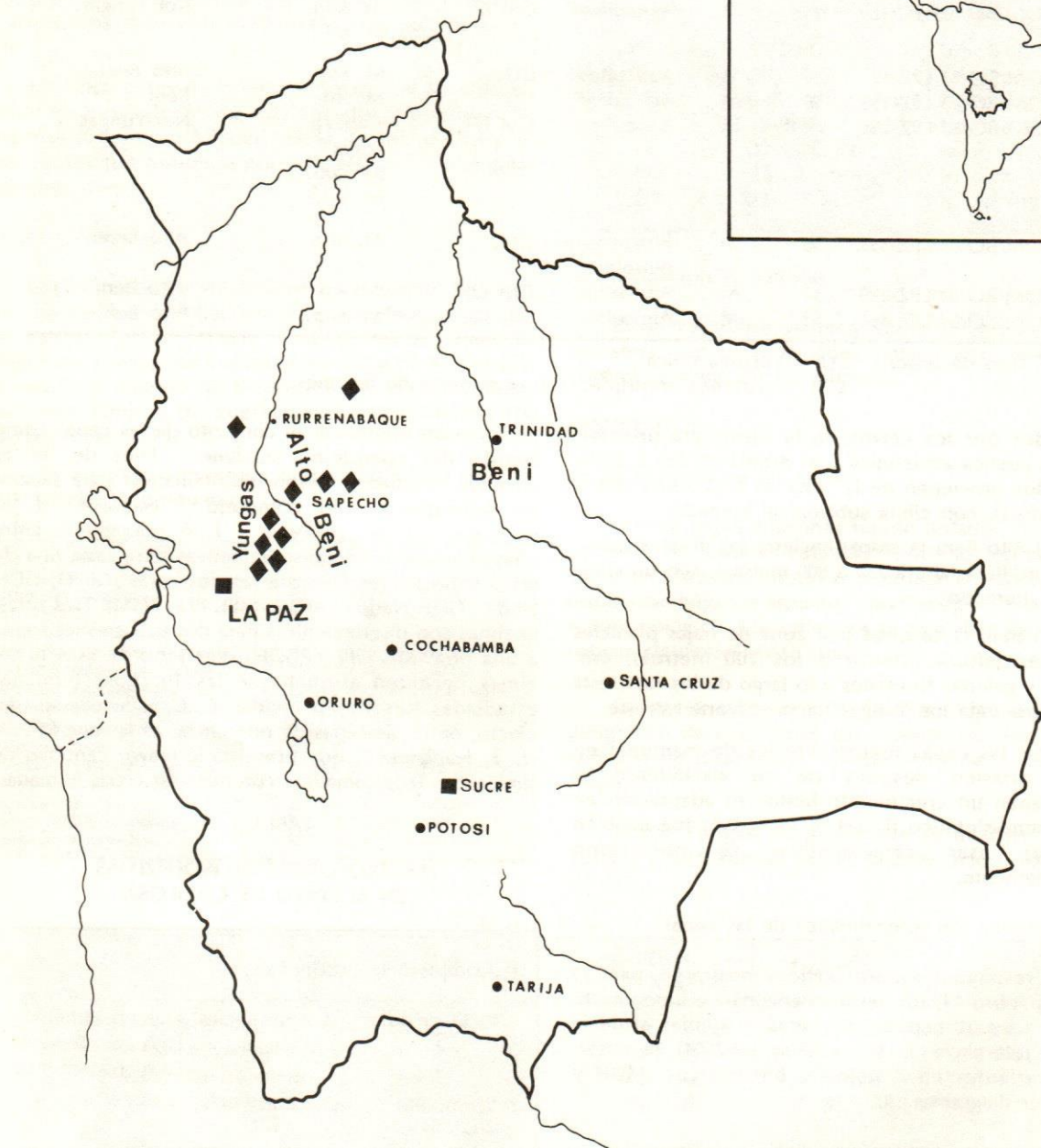
TABLA 1

ELECTROFORESIS DE ISOENZIMAS EN ACETATO DE CELULOSA

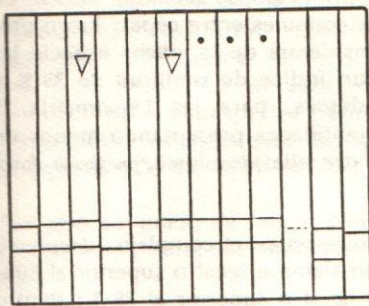
1) Complejo <i>L. braziliensis</i> :
10/13 enzimas / 3 subespecies: <i>L. b. braziliensis</i> <i>L. b. guyanensis</i> <i>L. b. panamensis</i>
2) Complejo <i>L. mexicana</i> :
13/13 enzimas / 3 subespecies: <i>L. m. mexicana</i> <i>L. m. amazonensis</i> <i>L. m. pifanoi</i>

MAPA: BOLIVIA, origen geográfico de las cepas estudiadas.

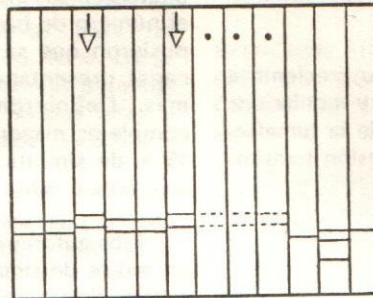
◆ Casos humanos.



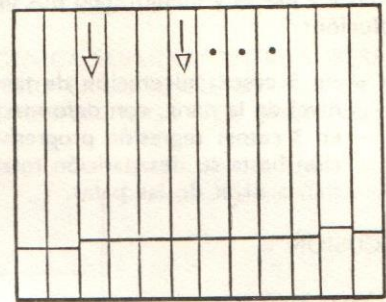
DIAGRAMAS DE LOS PERFILES ENZIMATICOS



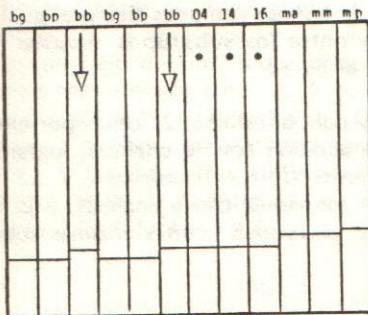
GDH Nad+



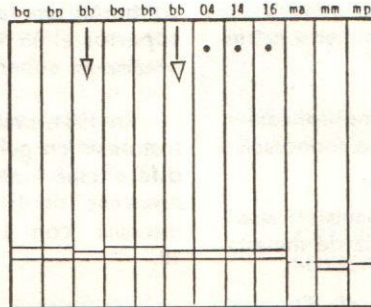
GDH Nadp+



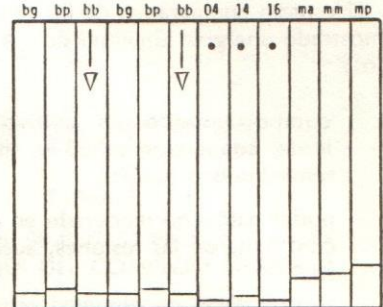
PGM



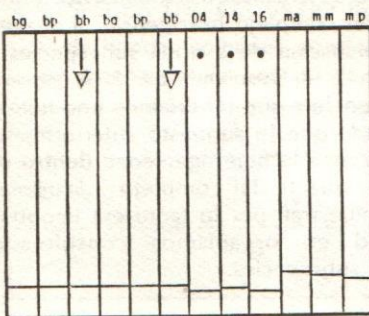
MPI



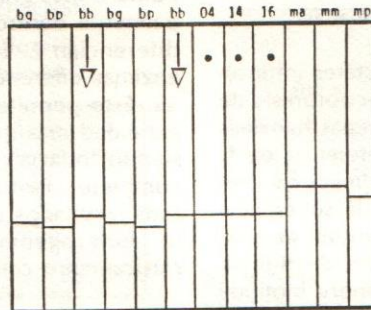
GOT



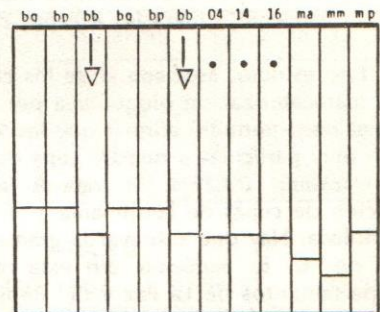
MDH



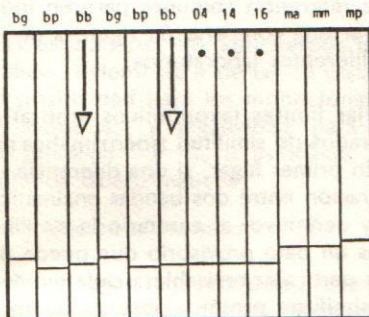
ICD



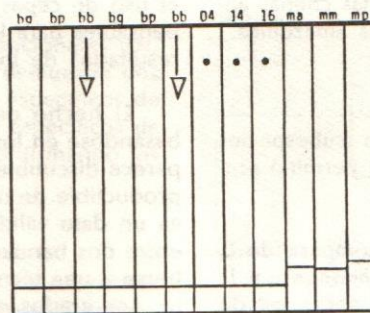
ME



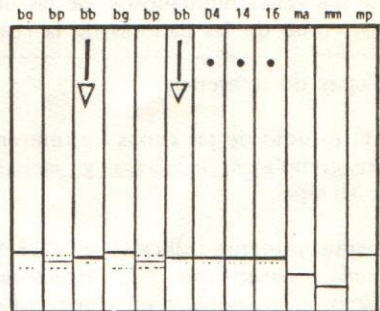
PEP



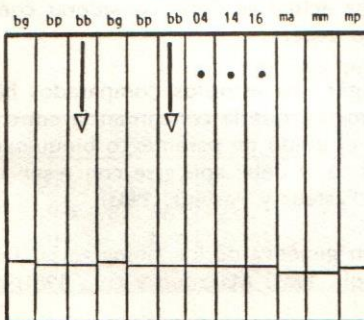
6PGDH



ACON



GPI



G6PD

LEYENDA

Cepas de referencia:

- bg - L. braziliensis guyanensis
- bp - L. braziliensis panamensis
- bb - L. braziliensis braziliensis
- ma - L. mexicana amazonensis
- mm - L. mexicana mexicana
- mp - L. mexicana pifanoi

Cepas autóctonas: 04 - 14 - 16.

medio a 2 meses y medio), con dos tipos diferentes de evolución:

- en 5 casos: ulceración de tamaño creciente a nivel de la nariz, con deformación y mutilación;
- en 3 casos: regresión progresiva de la tumefacción hasta su desaparición total (lesión transitoria), a nivel de las patas.

DISCUSION

A) Cepas autóctonas:

El estudio comparativo de las 10 cepas humanas ha demostrado una gran similitud de sus caracteres extrínsecos:

- comportamiento en cultivo: multiplicación lenta, adaptación difícil en medio monofásico semi-sintético (GLSH);
- poder patógeno moderado en el hamster: aparición lenta de las lesiones, ausencia de metástasis;
- positividad en inmunofluorescencia frente a los anticuerpos monoclonales específicos de *L. b. braziliensis* (para las 4 cepas estudiadas).

Este estudio, asociado al de los caracteres intrínsecos (caracterización bioquímica por electroforesis de isoenzimas) permitió afirmar que las 10 cepas humanas eran muy parecidas a nuestra cepa de referencia de *L. b. braziliensis* (M-2904). Se trata de la primera caracterización de cepas de *Leishmania* a nivel de subespecie en Bolivia. Hay que subrayar la gran extensión geográfica de *L. b. braziliensis* en esta región de Bolivia (Departamentos de La Paz y del Beni), sobre biotipos radicalmente diferentes: nuestras cepas provienen tanto de los valles montañosos, de las últimas colinas andinas, como de las llanuras de la cuenca amazónica.

B) Cepas de referencia:

El estudio de las cepas de referencia (subespecies de los complejos *braziliensis* y *mexicana*) permitió precisar su tipo.

Anteriormente, Miles y col. (1981), comparando *L. mexicana amazonensis*, *L. braziliensis braziliensis* y *L. braziliensis guyanensis* en electroforesis sobre gel de almidón con 14 enzimas, habían notado la fácil diferenciación de *L. m. amazonensis* con *L. b. braziliensis* o *L. b. guyanensis* (5 enzimas discriminativas), confirmando su identidad de especies diferentes. Al contrario, destacaban la dificultad que encontraron en diferenciar *L. b. braziliensis* con *L. b. guyanensis* (4 enzimas con pocas diferencias), y la imposibilidad de separar *L. b. guyanensis* de *L. b. panamensis* con 10 enzimas.

Kreutzer y col. (1983), estudiando 44 cepas con 25 enzimas en electroforesis sobre acetato de celulosa,

definieron un índice promedio de similitud, basado en el número de bandas comunes entre cepas; luego propusieron que se considerará de la misma especie las cepas presentando un índice de similitud de 75 % y más. Definieron además, para las *Leishmania*, 5 complejos mayores (entidades presentando menos de 15 % de similitud entre ellas) *braziliensis*, *mexicana*, *dono vani*, *tropica*, *hertigi*.

Esos autores obtuvieron en el complejo *braziliensis* un índice de similitud siempre igual o superior al 50%, y para ciertas cepas igual o superior al 75 %; dentro del complejo *mexicana*, aunque más heterógeno, encontraron una tasa de bandas comunes siempre igual o superior al 35 %, y entre los subgrupos *mexicana* y *amazonensis*, superior al 65 %.

En 1984, Evans y col., al estudiar 22 cepas por electroforesis en gel de almidón con 10 enzimas, lograron diferenciar netamente (*L. b. braziliensis* s y *L. b. guyanensis* o *L. b. panamensis* con 6 enzimas, y *L. m. mexicana* con *L. m. amazonensis* con 9 enzimas sobre 10.

Nuestros resultados permitieron individualizar un número más grande de enzimas discriminativas, principalmente dentro del complejo *braziliensis*: 9 enzimas diferencian *L. b. braziliensis* de 2 otras subespecies, 6 enzimas diferencian *L. b. panamensis* de *L. b. guyanensis*. Esto permite concluir que tendríamos una heterogeneidad más grande que lo supuesto anteriormente, siendo todavía más neta la heterogeneidad dentro del complejo *mexicana* que la del complejo *braziliensis*. Esos resultados demuestran por lo tanto esa importante heterogeneidad en organismos considerados clásicamente como subespecies.

La estandarización de las técnicas isoenzimáticas y el uso de cepas de referencia comunes parecen indispensables para lograr una comparación rigurosa de los resultados de los diferentes laboratorios.

El hecho de fijar límites taxonómicos arbitrarios basándose en los grados de similitud isoenzimática nos parece discutible. En primer lugar, si una diferencia reproductible de migración entre dos bandas enzimáticas es un dato válido y definitivo, al contrario la similitud entre dos bandas es un dato provisorio que puede deberse a una técnica particular revisable a cada momento. Los grados de similitud proteica observados en el presente estudio podrán ser modificados posteriormente, y la terminología actual se debe considerar como una terminología de espera.

En segundo lugar, los estudios comparados han mostrado definitivamente que la concordancia entre el nivel taxonómico y el grado de parentesco bioquímico no era sino estadístico, y debe aplicarse con reserva a un caso particular (Pasteur y Pasteur, 1983).

La interpretación genética de los zimogramas (Tait, 1980; Tibayrenc y col., 1981; Maazoun y col., 1981) no

Dentro del complejo mexicana, las 13 enzimas estudiadas se mostraron discriminativas para las diferentes subespecies (*L. m. mexicana*, *L. m. amazonensis*, *L. m. pifanoi*). Entre esas, 9 enzimas permiten diferenciar las 3 subespecies frente a las dos otras, y las 4 enzimas restantes para dos subespecies frente a una otra (G6PD, ME, MPI, 6PGDH)

b) Estudio del grado de similitud protéica (tasa de bandas comunes) entre las subespecies del complejo *L. braziliensis*:

Este estudio permitió obtener los resultados siguientes: entre *L. b. braziliensis* y las dos otras subespecies (*L. b. guyanensis* y *L. b. panamensis*), existe un grado bajo de similitud protéica (31 %), mientras aparece más elevado entre *L. b. panamensis* y *L. b. guyanensis* (62 %) (Ver Tablas 2 y 3). Dentro del complejo mexicana, el grado de similitud protéica entre *L. m. pifanoi* y las dos otras subespecies es nulo (0 %), mientras es de 31 % entre *L. m. amazonensis* y *L. m. mexicana* (Ver Tablas 4 y 5).

TABLA 2:

GRADO DE SIMILITUD PROTEICA ENTRE SUBESPECIES DEL COMPLEJO BRAZILIENSIS

(% de bandas comunes en electroforesis de isoenzimas en acetato de celulosa)

	L. b. b.	L. b. g.
L. b. g.	4/13 31 %	-
L. b. p.	4/13 31 %	7/13 62 %

C) Anticuerpos monoclonales:

El estudio por los anticuerpos monoclonales (Dr. J.J. Shaw, Bélem) de 4 de las 10 cepas, demuestra una neta positividad para los monoclonales específicos de *L. b. braziliensis*, y negatividad para los específicos de *L. b. guyanensis* y *L. b. panamensis*, confirmando los resultados isoenzimáticos:

D) Inoculación al hamster:

Ocho cepas han producido lesiones características en el hamster (patas, nariz); tumefacción local progresiva sin metastasis, dentro de lapsos variables (1 mes y

TABLA 3:

RELACION FILOGENICA SUPUESTA ENTRE SUBESPECIES DEL COMPLEJO BRAZILIENSIS BASADA EN EL GRADO DE SIMILITUD PROTEICA (De bandas comunes)

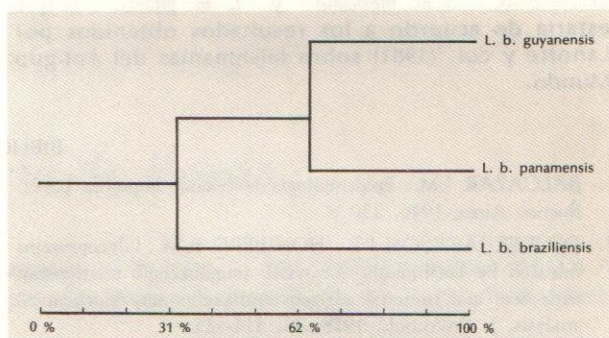


TABLA 4:

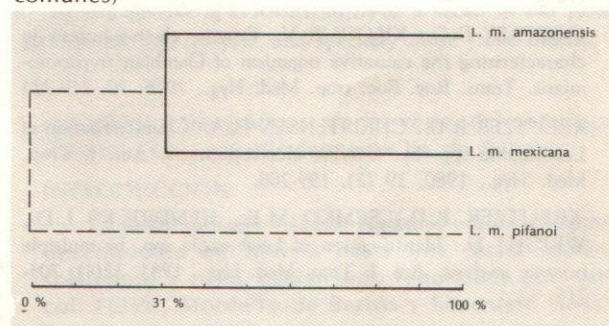
GRADO DE SIMILITUD PROTEICA ENTRE SUBESPECIES DEL COMPLEJO MEXICANA

(% de bandas comunes en electroforesis de isoenzimas en acetato de celulosa)

	L. m. m.	L. m. a.
L. m. a.	4/13 31 %	-
L. m. p.	0/13 0 %	0/13 0 %

TABLA 5:

RELACION FILOGENICA SUPUESTA ENTRE SUBESPECIES DEL COMPLEJO MEXICANA BASADA EN EL GRADO DE SIMILITUD PROTEICA (% de bandas comunes)



PRUEBA POR LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES (IFI)

CEPA No.	IDENTIFICACION	B2	B12	B13	B11	B18	B19	B5
MHOM/BO/82/LPZ-13	L.b.b.	2+	4+	n	-	4+	-	3+
MHOM/BO/82/LPZ-17	L.b.b.	1+	4+	n	-	4+	-	2+
MHOM/BO/83/LPZ-155	L.b.b.	1+	4+	n	-	4+	-	2+
MHOM/BO/83/LPZ-344	L.b.b.	1+	4+	n	-	4+	-	3+

ha sido aplicada a nuestros resultados, porque ciertos perfiles complejos plantean problemas. Se puede sin embargo prever, a partir de los grados de divergencia observados, que las distancias genéticas (Nei, 1972) son superiores a 1 entre el grupo *L. b. guyanensis* / *L. b. panamensis* y *L. b. braziliensis*, y entre el grupo *L. m. amazonensis*, *L. m. mexicana* y *L. m. pifanoi*, lo que estaría de acuerdo a los resultados obtenidos por Lanotte y col. (1981) sobre leishmanias del Antiguo Mundo.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a los Doctores R. LAINSON y J.J. SHAW, del Instituto Evandro Chagas de Bélem (Pará, Brasil), por la donación de las cepas de referencia de *Leishmania*.

Este estudio fué llevado a cabo 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 UNDP/Banco Mundial/OMS.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- BALCAZAR J.M.: Epidemiologia boliviana. Imprenta Lopez, Buenos Aires, 1946, 250 p.
- 2.- 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.
- 3.- DE MUYNCK A., ORELLANA H., RIBERA B., MELGAR B., SILVA DE LAGRAVA M.: Estudio epidemiológico y clínico de la leishmaniasis mucocutanea en Yapacani (Oriente boliviano). *Bol. Inf. CENETROP*, 1978, 4, 155-167.
- 4.- DESJEUX P.: Leishmaniose cutanéé et cutanéé-muqueuse américaine. Etude de 113 cas observés en Bolivie. These Doctorat Médecine, Paris, 1974, 132 p.
- 5.- DESJEUX P.: Relations leishmaniose et altitude. Formes cliniques, données épidémiologiques. Colloque INSERM "Anthropologie et biologie des populations andines", Toulouse, Editions INSERM, 1976, 247-256.
- 6.- DESJEUX P., QUILICI M., LAPIERRE J.: A propos de 113 cas de leishmaniose cutanéé et cutanéé-muqueuse observés en Bolivie. Etude séro-immunologique de 71 cas. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 1974, 67, 387-395.
- 7.- EVANS D.A., LANHAM S.M., BALDWIN C.I., PETERS W.: The isolation and isoenzyme characterization of *Leishmania braziliensis* subsp. from patients with cutaneous leishmaniasis acquired in Belize. *Trans. Roy. Soc. trop. Med. Hyg.*, 1984, 78, 35-42.
- 8.- 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.
- 9.- KREUTZER R.D., CHRISTENSEN H.A.: Characterization of *Leishmania* spp. by isozyme electrophoresis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1980, 29 (2), 199-208.
- 10.- 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.
- 11.- LAINSON R., SHAW J.J.: The role of animals in the epidemiology of South-American leishmaniasis. *The Kinetoplastida 2*, Editors Academic Press, London, 1979, 115 p.
- 12.- LANOTTE G., RIOUX J.A., MAAZOUN R., PASTEUR N., PRATLONG F., LEPART J.: Application de la méthode numérique a 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.
- 13.- LANHAM S.M., GRENDON 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.
- 14.- MAAZOUN R., LANOTTE G., RIOUX J.A., PASTEUR N., KILLICK-KENDRICK R., PRATLONG F.: Signification du polymorphisme enzymatique chez les leishmanias. A propos de trois souches hétérozygotes de *leishmania infantum* Nicolle 1908, *Leishmania cf. tarentolae* Wenyon 1921 et *Leishmania aethiopica* Bray, Ashford et Bray, 1973. *Ann. Parasit. hum. comp.*, 1981, 56, 467-475.
- 15.- MILES M.A., LAINSON R., SHAW J.J., POVOA M., DE SOUZA A.A.: 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. *Trans. Roy. Soc. trop. Med. Hyg.*, 1981, 75(4), 524-529.
- 16.- NEI M.: Genetic distances between populations. *Amer. Natural.*, 1972, 106, 283-292.
- 17.- PASTEUR G., PASTEUR N.: les critères biochimiques et l'espece animale. In: Les problemes de l'espece dans le regne animal. *Mem. Soc. Zool. Fr.*, 1980, 40, 99-150.
- 18.- RECACOECHEA M.: Ulceras cutáneas en nuestro medio, especial énfasis en leishmaniasis cutáneo-mucosa. *Bol. Inf. CENETROP*, 1980, 6, 24-30.
- 19.- TAIT A.: Evidence for mating and diploidy in *Trypanosomes*. *Nature*, 1980, 287, 536-537.
- 20.- TIBAYRENC M., CARIU M.L., SOLINGNAC M.: Interpretation génétique des zymogrammes de flagellés des genres *Trypanosoma* et *Leishmania*. *C.R. Acad. Sci. Paris*, 1981, 292, 623-625.
- 21.- 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 *Trypanosoma* (*Herpetosoma*) *rangeli*. *Ann. Soc. belge med. trop.* 1984 (sous presse).
- 22.- VEINTEMILLAS A.: Cité sans référence par Balcazar, 1946.
- 23.- WALTON B.C., CHINEL L.V.: Racial differences in *espondia*. *Ann. Trop. Med. Parasit.*, 1979, 73, 23-29.
- 24.- WALTON B.C., CHINEL L.V., EGUIA O.E.: Onset of *espondia* after many years of occult infection with *Leishmania braziliensis*. *Am. J. trop. Med. Hyg.*, 1973, 22, 696-698.