

Prevalência da infecção canina em áreas endêmicas de leishmaniose tegumentar americana, do município de Paracambi, Estado do Rio de Janeiro, no período entre 1992 e 1993

Prevalence of canine infection from endemic areas of American cutaneous leishmaniasis in Paracambi District, Rio de Janeiro State, between 1992 and 1993

Ginelza Peres Lima dos Santos¹, Argemiro Sanavria², Mauro Célio de Almeida Marzochi³, Elizabeth Glória Oliveira Barbosa dos Santos⁴, Valmir Laurentino Silva⁴, Raquel da Silva Pacheco⁵, Eliame Mouta-Confort⁶, Cleber Barreto Espíndola⁷, Marcos Barbosa de Souza⁴, Cesar Santos Ponte⁴, Nilton Francisco da Conceição⁴ e Moacir Vieira de Andrade³

RESUMO

No município de Paracambi, Estado do Rio de Janeiro, foi realizado um inquérito epidemiológico sobre a leishmaniose tegumentar americana na população canina residente em áreas endêmicas rural e semiurbana. Foram cadastrados 179 cães e 138 (77,1%) foram examinados, segundo seus aspectos clínicos e desenvolvimento de hipersensibilidade tardia ao antígeno Imunoleish® e respostas sorológicas à reação de imunofluorescência indireta e ao ensaio imunoenzimático. Dos 9 (6,5%) animais portadores de lesões/cicatrizes suspeitas, 66,7% foram causadas por *Leishmania* sp.; 44,4% produziram infecção em hamsters e apresentaram crescimento em meio de cultura, compatíveis com o comportamento de *Leishmania* do complexo *braziliensis*. A caracterização molecular (análises isoenzimáticas e do perfil de restrição do *KDNA*) identificou 2 amostras como similares à *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*. A prevalência da infecção canina observada através do teste cutâneo, RIFI e ELISA foi, respectivamente, 10,1%, 16,7% e 27,8%. A presença das formas clínica/subclínica da LTA na população canina associada à infecção humana sugere que o cão pode atuar como possível fonte de infecção, assim como na disseminação da doença.

Palavras-chaves: Leishmaniose tegumentar americana. Infecção canina. Pesquisa epidemiológica. *Leishmania* sp. *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*.

ABSTRACT

In the district of Paracambi, State of Rio de Janeiro an epidemiological survey for American tegumentary leishmaniasis in canine population was carried out in endemic localities. A total of 179 dogs was registered and 138 (77.1%) examined for their clinical aspects, development of delayed hypersensitivity (DHS) with Imunoleish® antigen and serological responses by indirect immunofluorescent reaction and enzyme-linked immunosorbent assay. In 9 (6.5%) dogs with active cutaneous lesions or suspect scars, 66.7% were caused by *Leishmania* sp.; 44.4% produced infection in hamsters and showed growth in culture media, which was considered to be compatible with the species of *Leishmania* *braziliensis* complex. The molecular characterization (isozyme and *KDNA* restriction profiles) defined two strains with similar profiles for *L. (Viannia) braziliensis*. The prevalence of canine infection estimated by the cutaneous test, IFR and ELISA was 10.1%, 16.7% and 27.8%, respectively. The presence of clinical/sub-clinical form of ATL in canine population associated with human infections suggested that the dog can act as source of infection as well as for dissemination of the disease.

Key-words: American tegumentary leishmaniasis. Canine infection. Epidemiologic survey. *Leishmania* sp. *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*.

1. Serviço de Zoonoses do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ. 2. Departamento de Saúde Pública do Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 3. Secretaria Municipal de Saúde do Rio de Janeiro, RJ. 4. Departamento de Ciências Biológicas da Escola Nacional de Saúde Pública da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ. 5. Departamento de Biologia e Bioquímica Molecular do Instituto Oswaldo Cruz da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ. 6. Serviço de Parasitologia da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ. 7. Instituto Superior de Tecnologia/FAETEC - Paracambi, RJ.

Endereço para correspondência: Dra. Ginelza P.L. Santos. Rua Panamá 391, Penha, 22020-310 Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Tel: 55 21 2563-8985.

e-mail: ginelza@ipecc.fiocruz.br

Recebido para publicação em 21/3/2002

Aceito em 15/12/2004

A domiciliação da transmissão da leishmaniose tegumentar americana (LTA) no Estado do Rio de Janeiro, vem sendo admitida pela associação observada entre a infecção em indivíduos de ambos os sexos, de diferentes faixas etárias com a de animais domésticos, como cães e equídeos, em ambientes peridomésticos, onde são capturados flebotomíneos, especialmente as espécies antropofílicas e cinofílicas^{1 2 9 15}, com aparente ausência de reservatórios silvestres. Os poucos animais sinantrópicos encontrados naturalmente infectados não justificariam a domiciliação da LTA na Região Sudeste²⁰. Para Falqueto et al⁷, a possibilidade da manutenção do ciclo doméstico de transmissão entre o homem e animais domésticos pode ser independente do ciclo entre animais silvestres e a eventual infecção humana; segundo o mesmo autor, o cão seria o elo essencial para a disseminação dessa zoonose.

No início de 1990, no município de Paracambi, Estado do Rio de Janeiro, constatou-se a presença de 5 casos humanos de LTA e a confirmação de 3 casos antigos. A partir de então, iniciou-se uma investigação para definir a prevalência desta doença na população canina e avaliar a fauna flebotomínea naquele município¹⁶.

MATERIAL E MÉTODOS

Localização. O município de Paracambi localiza-se entre as coordenadas de 22° 35' 22" de latitude sul e de 43° 40' 43" de longitude oeste, na face ocidental e no limite noroeste da Região Metropolitana da capital do Estado do Rio de Janeiro; situa-se na Serra de Paracambi, com uma superfície de 197km² (Figura 1); apresenta um clima tropical úmido, com expressiva pluviosidade, acumulando, em média, 1.400mm por ano e uma temperatura média anual de 24°C com máxima 27°C¹³. Em 1991 apresentava uma população de 52.000 habitantes (informação da Secretaria de Saúde do município).

A pesquisa foi realizada em duas áreas onde ocorreram casos humanos: a) uma área semi-urbanizada (SU), localizada na Cascata, onde o processo de urbanização estava em desenvolvimento que contava na ocasião do estudo com uma população aproximada de 650 indivíduos e b) uma área rural (R), denominada Praça

Verde com o assentamento de uma pequena parte da população na vertente de uma serra, estando a grande maioria dos habitantes situada na baixada, ao sopé desta serra, contando com uma população em torno de 265 pessoas¹⁶.

População do estudo. Entre 1992 e 1993, foi realizado um inquérito canino com o auxílio de uma ficha que continha informações sobre o animal, destacando-se a procedência: nascidos no domicílio (ND) e nascidos na área (NA), oriundos de área endêmica (AE), de área não endêmica (ANE) e de área indeterminada (AD); o tempo na casa e na área, o estado físico⁸ e o deslocamento dos animais nas áreas, classificando-se em: a) restritos: cães que circulavam no ambiente intra/peridomiciliar e b) dispersos: cães que freqüentavam o intra/peridomicílio e eventualmente as áreas adjacentes.

Exame clínico e diagnóstico parasitológico. No exame clínico observou-se a presença de lesões cutâneas e/ou mucosas e cicatrizes suspeitas; quando, então foi realizada biópsia das lesões. Os fragmentos coletados destas lesões foram separados para a impressão em lâmina de vidro e para o isolamento parasitário *in vitro* e *in vivo*. O cultivo foi realizado em meio de NNN/BHI (DIFCO), suplementado com 10% de soro fetal bovino (WL-Imunoquímica) e mantido a 26°C, com observações semanais até o período de 30 dias. O isolamento em animais foi feito a partir da maceração de um fragmento tecidual em solução salina com antibióticos (penicilina e estreptomicina) e inoculado, via subcutânea, no coxim plantar da pata posterior de dois hamsters (*Mesocricetus auratus*), com acompanhamento por 6 meses. A partir do desenvolvimento de lesão local, os animais foram sacrificados e necropsiados para a coleta de fragmentos de lesão plantar, fígado e baço, para posterior cultivo.

Na identificação bioquímica das amostras caninas, foram empregados os métodos de análise isoenzimática e do perfil do DNA do cinetoplasto^{12 14}, utilizando-se como controle, as cepas *L. (Viannia) braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903) e *L. (Leishmania) chagasi* (MHOM/BR/74/PP75).

Testes sorológicos. Para a sorologia foram analisadas 138 amostras de sangue por RIFI, considerando-se como positiva

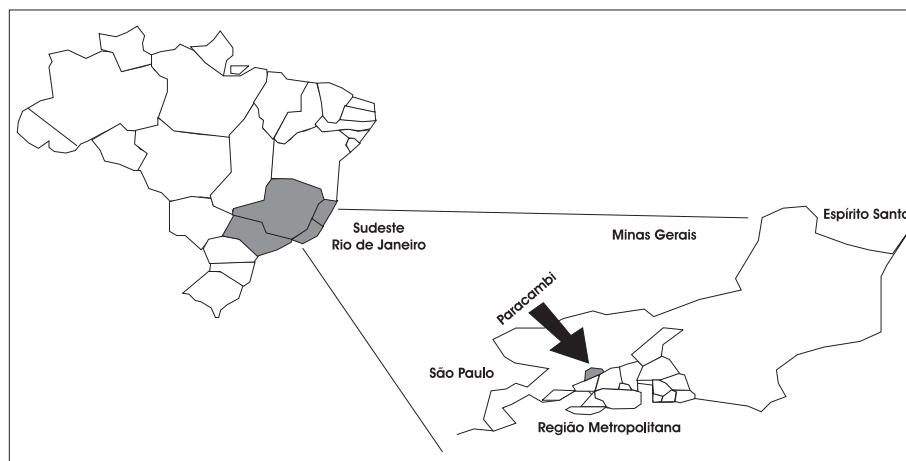


Figura 1 - Estado do Rio de Janeiro, Região Metropolitana e localização do Município de Paracambi.

as titulações maiores ou iguais a 1:40⁶; no ELISA, as reações foram consideradas positivas quando as absorbâncias dos soros testes foram superiores à média das absorbâncias dos soros controles, mais dois desvios padrão¹⁸.

Intradermorreação. A reação intradérmica tardia foi realizada com o antígeno Imunoleish[®] e a leitura procedida após 48 horas, de acordo com o método de Sokal¹⁷; foi considerada positiva a enduração igual ou superior a 5 x 5mm de diâmetro e suspeita, entre 3 e 4,9mm.

RESULTADOS

Foram cadastrados 222 domicílios habitados, 174 em SU e 48 em R, dos quais 50,9% possuíam cães. Foram recenseados 179 cães, 109 (60,9%) machos e 70 (39,1%) fêmeas, sendo examinados 138 (77,1%) cães, 98 (71%) em SU e 40 (29%) em R.

Entre os examinados, na área SU foram detectados 70,4% de machos, 64,3% com idade entre 1 mês e 5 anos, 73,5% nasceram em ND/NA, 43,9% estavam entre 0 e 200m de distância da mata e 71,4% tinham deslocamento restrito (Tabelas 1 e 2). Foram positivos ou suspeitos 18 (18,4%) cães, com prevalência maior entre os animais que estavam nas distâncias da mata entre 200-500m (21,1%) e acima de 500m (22,2%), assim como entre os procedentes de AE/AI (33,3%) e entre os nascidos em ND/NA (18,1%) (Tabelas 1 e 2); estes animais apresentaram a seguinte distribuição em relação às técnicas: IR (10,2%), RIFI (8,2%) e ELISA (11,2%) (Tabela 3).

Na área R, foram encontrados 55% de machos, 82,5% com idade entre 1 mês e 5 anos, 77,5% nascidos no domicílio ou área, 50% dos animais encontravam-se entre 0 e 200m de distância e acima de 500m da mata remanescente e 65% tinham deslocamento restrito (Tabelas 1 e 2). Foram positivos ou suspeitos 25 (62,5%) animais, observando-se maior percentual entre os residentes no trecho entre 0 - 200m (80%) que entre os situados acima de 500m (45%) e entre os oriundos de AE/AI (66,7%) e os nascidos em ND/NA 58,1% (Tabelas 1 e 2); a distribuição destes cães, em relação às técnicas, foi a seguinte: IR (25%), RIFI (39,5%) e ELISA (47,4%) (Tabela 3).

Seis cães possuíam lesão mucocutânea/cicatriz sugestiva de leishmaniose tegumentar e foram reatores simultaneamente

para as análises imunológicas (IR, RIFI, ELISA), 4 de SU e 2 de R (Tabelas 4). O exame direto da impressão em lâmina, de biópsia da lesão de 2 cães, um proveniente da área SU e outro da área R, revelou a presença de formas de amastigotas de *Leishmania sp.*

Das 9 amostras de biópsia de lesão ou cicatriz, semeadas em meio de cultura e inoculadas em animais experimentais, foram isoladas 6 (66,7%), cujo crescimento parasitário mostrou-se pobre, lento e de difícil manutenção, compatível com *Leishmania (Viannia)*. A análise bioquímica de dois isolados in vivo, provenientes de ambas as áreas, foram identificadas como pertencentes à espécie *L. (Viannia) braziliensis* (Tabelas 3 e 4).

DISCUSSÃO

No inquérito realizado para a detecção da LTA canina nas duas localidades, Cascata (SU) e Praça Verde (R), do município de Paracambi, foi avaliada a prevalência da infecção nestes animais de 13% na área SU e de 18,1% na área R. Foram utilizados como parâmetros a presença de lesão tegumentar e/ou positividade para as reações intradérmica e sorológicas. No exame clínico foi detectada uma taxa de 6,5% de animais com lesões cutâneas, como encontrado em alguns trabalhos desenvolvidos em áreas com características epidemiológicas semelhantes^{3 4 5 10 19}, dos quais em 66,7% foi isolada *Leishmania sp.*

A presença de lesão/cicatriz cutânea nos animais esteve sempre associada aos resultados positivos evidenciados nas três reações imunológicas. Ainda não está disponível um marcador de infecção eficiente, embora a ELISA tenha se mostrado como o teste mais sensível, com 70% de positividade, confirmando a atividade da transmissão da leishmaniose tegumentar em ambas as áreas.

Em ambas áreas de estudo pode-se observar que o deslocamento dos cães por um perímetro além do peridomicílio, em direção às áreas adjacentes, ocorreu em 100% dos casos confirmados de leishmaniose tegumentar; segundo seus donos, estes animais tinham por hábito a participação em caçadas noturnas.

Tabela 1 - Distribuição dos animais positivos às reações imunológicas e/ou análise clínica, nas áreas da Cascata (SU) e Praça Verde (R), em relação à distância das residências e da mata adjacente.

Área	0 - 200m			200 - 500m			> 500m			Total/n°
	+/S/%	N/%	subtotal	+/S/%	N/%	subtotal	+/S/%	N/%	subtotal	
SU	6/13,9	37/86,1	43/43,9	4/21,1	15/78,9	19/19,4	8/22,2	28/77,8	36/36,7	98
R	16/80,0	4/20,0	20/50,0	0/0,0	0/0,0	0/0,0	9/45,0	11/55,0	20/50,0	40
Total	22/34,9	41/65,1	63/45,6	4/21,1	15/78,9	19/13,8	17/30,4	39/69,6	56/40,6	138/100,0

+ = positivo N = negativo S = suspeito. SU= Semi-urbanizada. R= Rural.

Tabela 2 - Distribuição dos animais positivos às reações imunológicas e/ou análise clínica, nas áreas da Cascata e Praça Verde, de acordo com a sua procedência.

Área	ND/NA			ANE			AE/AI			Total/n°
	+/S/%	N/%	subtotal	+/S/%	N/%	subtotal	+/S/%	N/%	subtotal	
SU	13/18,1	59/81,9	72/73,5	1/7,1	13/92,9	14/14,3	4/33,3	8/66,7	12/12,2	98
R	18/58,1	13/41,9	31/77,5	3/100,0	0/0,0	3/7,5	4/66,7	2/33,3	6/15,0	40
Total	31/30,1	72/69,9	103/74,6	4/23,5	13/76,5	17/12,3	8/44,4	10/55,6	18/13,1	138/100,0

+ = positivo N = negativo S = suspeito. ND= Nascidos no domicílio. NA= Nascidos na Área. ANE= Área não endêmica. AE= Área endêmica. AI= Área indeterminada.

Tabela 3 - Distribuição dos cães positivos ou suspeitos, segundo sexo e idade, avaliados quanto aos parâmetros de procedência, proximidade da floresta e deslocamento, na área Cascata, 1992.

n ^o	Identificação			PR	PF (m)	D	IR	RIFI	ELISA	AC	IP		IB
	sexo	idade (anos)									C	H	
1	F	3	ND	200	d	5x6	1:80	+	f/u	+	+	<i>L (V)b</i>	
2	M	3	ND	200	d	8x9	1:40	+	b/u	+	-	<i>Leishmania sp</i>	
3	M	7	ND	>500	d	0x11	1:80	+	b/u	+	-	<i>Leishmania sp</i>	
4	M	3	AE	200	r	5x5	1:40	+	f/ci	-	-		
5	M	4	ANE	>500	d	NR	1:80	+					
6	F	12	ND	>500	r	NR	1:40	+					
7	F	2	ND	200	d	NR	1:40	+					
8	F	5	AE	200-500	d	NR	-	+					
9	M	5	ND	200-500	r	NR	-	+					
10	F	3	ND	200	r	NR	-	+					
11	M	15	ND	>500	r	NR	-	+					
12	F	2	ND	200-500	r	NR	1:40	-					
13	M	2	NA	>500	r	5X5	-	-					
14	M	3	AE	200	d	5X5	-	-					
15	F	2	AE	>500	r	5X6	-	-					
16	F	3	ND	200-500	r	5X6	-	-					
17	F	1	ND	>500	r	*	-	-					
18	M	7me.	ND	>500	r	*	-	-					

PR = procedência PF = proximidade da floresta D = deslocamento AC = alteração cutânea. IP = identificação parasitária IB = identificação bioquímica M = macho F = fêmea. ND/NA = nascido no domicílio/área ANE = área não endêmica AE = área endêmica. D = disperso r = restrito * = IR (3x3mm) NR = não reator + = positivo - = negativo. F = focinho b = bolsa escrotal u = úlcera ci = cicatriz C = cultura H = hamster

Tabela 4 - Distribuição dos cães positivos ou suspeitos, segundo sexo e idade, avaliados quanto aos parâmetros de procedência, proximidade da floresta e deslocamento, na área Praça Verde, 1993.

n ^o	Identificação			PR	PF (m)	D	IR	RIFI	ELISA	AC	IP		IB
	sexo	idade (anos)									C	H	
1	M	4	ANE	200	d	5x6	1:40	+	f/u	+	+	<i>L (V)b</i>	
2	M	2	ND	200	d	5x6	1:40	+	f/u	+	-	<i>Leishmania sp</i>	
3	M	8	NA	200	d	5x5	1:80	+					
4	F	6me	ND	200	d	NR	1:40	+					
5	M	4	ND	200	d	NR	1:320	+					
6	M	3	ND	>500	r	NR	1:320	+					
7	F	3	ND	200	d	NR	1:160	+	p/ci				
8	F	3	ND	200	r	NR	1:80	+					
9	F	1	ND	200	d	NR	1:80	+					
10	F	2	AE	200	d	NR	1:40	+					
11	M	7	AE	200	r	NR	1:40	+					
12	M	10	ND	>500	r	NR	1:40	+					
13	F	3	ND	200	d	5X5	-	+					
14	M	4	ND	>500	r	NR	1:160	-					
15	M	1	ND	>500	r	NR	1:40	-					
16	M	4	ANE	200	r	NR	1:40	-					
17	M	1	ND	>500	r	NR	-	+	p/ci				
18	M	1	ND	>500	r	NR	-	+					
19	F	1	ND	>500	r	NR	-	+					
20	M	2	ANE	>500	r	NR	-	-					
21	M	6me	ND	200	d	5x5	-	-	f/u	+	-	<i>Leishmania sp</i>	
22	M	4	ND	200	d	*	-	+					
23	M	3	NA	>500	r	*	-	-					
24	F	1	AE	200	d	*	-	+					
25	F	3	NA	200	r	*	-	-					

PR = procedência PF = proximidade da floresta D = deslocamento AC = alteração cutânea. IP = identificação parasitária IB = identificação bioquímica M = macho F = fêmea. ND/NA = nascido no domicílio/área ANE = área não endêmica AE = área endêmica. D = disperso r = restrito * = IR (3x3mm) NR = não reator + = positivo - = negativo. F = focinho b = bolsa escrotal u = úlcera ci = cicatriz C = cultura H = hamster

Entretanto, foi detectada uma superioridade na prevalência de *Lutzomyia intermedia*, no ambiente intradomiciliar (53,1%) na área semi-urbana, ao contrário do encontrado na área rural, na qual a captura do vetor foi maior no peridomicílio e no bananal (63,3%), em relação ao domicílio (8,4%)¹⁶. Esses dados sugerem a possibilidade da ocorrência simultânea da transmissão silvestre e peridomiciliar entre a população canina, corroborando as observações de Falqueto et al⁷ e Maywald et al¹¹ que suspeitaram que o cão também poderia contrair a infecção em ambiente com vegetação remanescente, trazendo o parasita para o ambiente doméstico, onde existiriam condições propícias para sua disseminação, embora não tenha sido realizada pesquisa envolvendo animais silvestres.

Quanto à proximidade das residências em relação à floresta, na Cascata (SU), o trecho além de 500m de distância apresentou o maior percentual de animais positivos ou suspeitos (22,2%), provavelmente devido às características ecológicas e topográficas do local; pois a distribuição dos domicílios destes animais predominou na área mais estreita do vale, em cujas vertentes encontravam-se os peridomicílios. Nestes, a presença de vegetação abundante, grande umidade, fornecida por um pequeno curso de água, e a diversidade de animais domésticos e sinantrópicos estariam propiciando excelentes condições bióticas à presença da fauna flebotomínica que, por sua vez, estaria se encarregando de disseminar os agentes etiológicos desta doença. Na Praça Verde (R), o percentual de positividade de cães, cujos domicílios situavam em até 200m da mata, foi de 84,2%; sendo este índice o dobro em relação aos cães do trecho superior a 500m (42,9%). Este fato pode ter se dado em decorrência da maioria dos cães positivos e suspeitos residir em grandes sítios, onde eram encontrados vegetação abundante, muitas árvores frutíferas, animais domésticos e maior frequência de animais sinantrópicos e silvestres. A maioria dos peridomicílios era entremeada por extensos bananais, que se estendiam até a margem da mata, alcançando o topo do morro. Contudo, as características topográficas e ecológicas, favorecidas por um curso de água e a presença de flebotomíneos estariam também propiciando a propagação da LTA, nesta área.

Quanto à procedência dos cães, verificou-se em ambas as áreas que 74,6% eram nascidos no domicílio ou na área e nenhum dos demais veio de área suspeita ou endêmica para LTA que se pudesse suspeitar de aloctonia.

Dado o perfil epidemiológico da LTA observado, pode-se inferir que o seu estabelecimento encontrava-se em posição intermediária, entre recente e antiga, na área semi-urbanizada e recente, na área rural.

Durante o estudo, foram encontrados 6 casos humanos, um recente e um antigo, na área semi-urbana e 3 recentes e um antigo na área rural¹⁶. Apesar da controvérsia entre os pesquisadores sobre a importância do cão na LTA, a constatação da leishmaniose tegumentar canina sob as formas sintomática e subclínica vista em ambas as áreas, onde ocorreram também casos humanos, sugere que o cão pode representar algum papel na cadeia de transmissão da LTA em Paracambi.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao apoio logístico inicial do Secretário de Saúde de Paracambi, Dr. Adalberto da Graça *in memoriam*; ao diretor do Hospital da Cascata, Dr. Durval M. Luz, pelo incentivo e facilidades na execução do levantamento da fauna flebotomínica em áreas florestadas deste hospital e, especialmente à colaboração dos então agentes de saúde do Distrito de Nova Iguaçu da Fundação Nacional de Saúde, Rio de Janeiro: Sr. Amarildo A. Ramiro, Sr. Alcides da Silva, e Sr. Rogério R.O. Ravaglia, pelo carinho e incansável persistência na realização desta pesquisa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aguiar, GM, Medeiros, WM, Santos, TG, Klein, AFL, Ferreira, VA. Ecology of sandflies in a recent focus of cutaneous Leishmaniasis in Paraty, littoral of Rio de Janeiro state (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). Memória Instituto Oswaldo Cruz 88: 339-340, 1993.
2. Araújo-Filho, NA, Couts JR, Reis VLZ. Leishmaniose Tegumentar Americana na Ilha Grande, Rio de Janeiro. IV Reservatórios domésticos. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 11: 4: 6, 1978.
3. Barbosa GMS, Marzochi MCA, Massard CL, Lima GPL, Confort EM. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose tegumentar americana em cães, no Município de Paraty, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. Cadernos de Saúde Pública 15 (supl III): 741-646, 1999.
4. Barbosa-Santos EGO, Marzochi MCA, Conceição NE, Brito C M M, Pacheco R S. Epidemiological survey on canine population with the use of Immunoleish test in endemic areas of human American cutaneous leishmaniasis in the states of Rio de Janeiro, Brazil. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 39 (supl I): 42-47, 1997.
5. Bocaranda PGFJG. Estudo da prevalência da infecção canina na leishmaniose tegumentar americana em áreas de transmissão por *Lutzomyia intermedia* na região Sudeste do Brasil. Tese de Mestrado, Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.
6. Chiari, CA, Mayrink, W, Magalhães, PA. Indirect immunofluorescent reaction in the control and treatment of American cutaneous leishmaniasis. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 15: 298-303, 1973.
7. Falqueto A, Coura JR, Barros GC, Grimaldi-Filho G, Sessa PA, Carias VRD, Jesus AC, Alencar JTA. Participação do cão no ciclo de transmissão de leishmaniose tegumentar no município de Vianna, estado do Espírito Santo, Brasil. Memórias Instituto Oswaldo Cruz 31 (supl II):155-163, 1986.
8. Marzochi MCA, Barbosa-Santos EGO. Evaluation of skin test on the diagnosis of canine cutaneous leishmaniasis. Memórias Instituto Oswaldo Cruz 83: 391-392, 1988.
9. Marzochi MCA, Coutinho SG, Sabroza PC, Souza WJS. Reação de imunofluorescência indireta e intradermorreação para leishmaniose tegumentar americana em moradores na área de Jacarepaguá (Rio de Janeiro). Estudo comparativo dos resultados observados em 1974 e 1978. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 22:149-155, 1980.
10. Marzochi MCA, Marzochi KBE, Vivorio, K, Souza M, Oliveira A, Carvalho R, Conceição N, Santos E, Campos V, Silva PT, Silva V, Mendonça D, Moreira J, Momen H, Pacheco R, Gama H. Leishmaniose tegumentar americana por *Leishmania (Viannia) braziliensis* em município da região serrana do Estado do Rio de Janeiro. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 24 (supl II): 100, 1991.
11. Maywald PG, Machado MI, Costa Cruz, JM, Gonçalves Pires, MRE. Leishmaniose tegumentar e visceral e doença de Chagas caninas em Municípios do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba, Minas Gerais, Brasil. Cadernos de Saúde Pública 12: 321-328, 1996.
12. Momem H, Grimaldi-Jr G, Pacheco RS, Jaffe CLL, McMahon-Pratt, D, Marzochi MCA. Brazilian *Leishmania* stocks phenotypically similar to

- Leishmania major*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 34: 1076-1084, 1985.
13. Natal CRN, Natal G. História de Paracambi de 1800 a 1987. Guavira Editores, Rio de Janeiro, 1987.
 14. Pacheco RS, Lopes UG, Morel CM, Grimaldi Jr G, Momen H. Schizodeme analysis of *Leishmania* isolates and comparison with some phenotypic techniques. In: Rioux JA (ed) *Leishmania* Taxonomie et Phylogénèse. Application éco-épidémiologiques. (Coll. Int. CNRs/INSERM). IMEEE, Montpellier, p. 57-65, 1984.
 15. Rangel EF, Souza NA, Wermelinge ED, Azevedo ACR, Barbosa AE, Andrade CA. Flebotomos de Vargem Grande, foco de Leishmaniose tegumentar no Estado do Rio de Janeiro. Memórias Instituto Oswaldo Cruz 81:347-349, 1986.
 16. Santos GPL. Estudo da população canina e da fauna flebotomínea em áreas de Leishmaniose tegumentar no município de Paracambi, Estado do Rio de Janeiro. Uma abordagem epidemiológica. Tese de Mestrado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 1998.
 17. Sokal JE. Ball-point pen technique for measuring the induration of skin-test reactions. New England Journal of Medicine 293: 501-502, 1975.
 18. Voller A, Bortlett A, Batwell DE. Enzyme immunoassays for parasite diseases. Transaction of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 70: 58-106, 1976.
 19. Yoshida ELA, Correa FMA, Marques SA, Stolf HO, Dillon NL, Momen H, Grimaldi-Jr G. Human, canine and equine (*Equus caballus*) leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis* (= *Leishmania braziliensis braziliensis*) in the south-west region of São Paulo, Brazil. Memórias Instituto Oswaldo Cruz 85: 133-134, 1990.
 20. World Health Organization. Control of the Leishmaniasis. Report of a WHO Expert Committee. Technical Report Series No. 793. WHO, Geneva, Switzerland, 1990.