

Leishmaniose tegumentar americana causada por *Leishmania (Viannia) braziliensis*, em área de treinamento militar na Zona da Mata de Pernambuco

American tegumentary leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in military training area of Zona da Mata in Pernambuco

Maria S. Andrade^{1,2}, Maria E. F. Brito¹, Salomão Thomaz da Silva², Bruna S. Lima¹, Éricka L. Almeida¹, Elisângela L. Albuquerque¹, José F. Marinho Júnior¹, Edna Ishikawa³, Elisa Cupulillo⁴ e Sinval P. Brandão-Filho¹

RESUMO

Este estudo tem como objetivo geral caracterizar a epidemiologia da leishmaniose tegumentar americana em unidade de treinamento militar, localizada no Estado de Pernambuco. Entre 2002 e 2003, vinte e três casos foram diagnosticados através de exame clínico, detecção do parasita e teste de intradermoarreação de Montenegro. Sete amostras de Leishmania (Viannia) braziliensis foram isoladas destes pacientes, identificadas através de reações com anticorpos monoclonais específicos e perfil eletroforético com isoenzimas. Um inquérito epidemiológico de prevalência da infecção por IDRM foi realizado na população que realizou treinamento neste período, no qual foi identificada uma prevalência de 25,3% de infecção. Os dados obtidos, associados com achados prévios nesta área, apresentam evidências da manutenção de um ciclo enzoótico, com a ocorrência de surtos periódicos de leishmaniose tegumentar americana posteriormente à realização de treinamentos nas áreas de floresta Atlântica remanescente.

Palavras-chaves: *Leishmaniose tegumentar americana. Leishmania (Viannia) braziliensis. Epidemiologia. Teste de intradermorreação de Montenegro. Mata Atlântica.*

ABSTRACT

The aim of work was to study the epidemiology of American tegumentary leishmaniasis in a military training unit situated in Zona da Mata region of Pernambuco State. Between 2002 and 2003 twenty-three cases were notified by clinical exam, detection and/or isolation of parasite and Montenegro skin test. Seven stocks of Leishmania (Viannia) braziliensis were obtained from patients, identified by a panel of specific monoclonal antibodies and isoenzymatic electrophoresis profiles. An epidemiologic survey on prevalence of infection was carried out by Montenegro skin test in the population that underwent training activities during the same period, out of which 25.3% were identified as positive. These results in association with previous data from this area, shows the maintenance of a primary transmission cycle and the occurrence of periodical outbreaks after training activities in local areas of remnant Atlantic rain forest.

Key-words: *American tegumentary leishmaniasis. Leishmania (Viannia) braziliensis. Epidemiology. Montenegro skin test.*

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) incide em todas as regiões do Estado de Pernambuco, com predominância (mais de 60% dos casos) na região correspondente a Zona da Mata Atlântica, sendo a quase totalidade na forma cutânea localizada⁵. Amostras de *Leishmania (Viannia) braziliensis* foram isoladas

de pacientes procedentes desta região, caracterizadas e identificadas através de anticorpos monoclonais e eletroforese com isoenzimas^{2,7}. Um estudo sobre a infecção natural em animais silvestres e domésticos nesta região apresentou alguns roedores sinantrópicos e silvestres infectados por *L. (V.) braziliensis*,

1. Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães da Fundação Oswaldo Cruz. 2. Hospital Geral do Exército Brasileiro em Recife, Recife, PE. 3. Instituto Evandro Chagas, Belém, PA. 4. Instituto Oswaldo Cruz da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ.

Apoio financeiro: FACEPE. Aprovado pela CEP do CPqAM/FIOCRUZ, processo no 70/02.

Endereço para correspondência: Dr. Sinval Pinto Brandão Filho. CPqAM/FIOCRUZ. Av. Moraes rego s/n, Campus UFPE, 50670-420 Recife, PE, Brasil.

Tel: 81-2101-2562, Fax: 81-3453-2449.

e-mail: sinval@cpqam.fiocruz.br

Recebido em 15/6/2004

Aceito em 5/3/2005

dos quais amostras foram isoladas em *Bolomys lasiurus* e *Rattus rattus*, caracterizadas através dos mesmos métodos³. *Lutzomyia whitmani* é a espécie principal envolvida na transmissão, com mais de 98% de predominância na fauna de flebotomíneos identificada⁸. A distribuição da infecção e doença na população foi caracterizada em estudo prospectivo e retrospectivo, demonstrando o aumento da força da infecção nesta região⁵.

Na região Nordeste, a LTA apresenta características ecoepidemiológicas diversas, embora com alguma similaridade intra-regional¹⁸. Em 1996, um surto de LTA foi verificado no Centro de Instrução Militar Marechal Newton Cavalcanti (CIMNC), localizado no município de Paudalho, Zona da Mata norte do Estado de Pernambuco, com o registro de 26 casos autóctones em militares que realizaram treinamentos. Um inquérito epidemiológico, através da aplicação do teste de intradermoreação de Montenegro (IDRM), e levantamento entomológico foram realizados na localidade e no efetivo militar em seguida ao período em que ocorreram os casos, no qual foi identificada uma prevalência de 24,1% de infecção na população de militares que realizou treinamento. *Lutzomyia choti* apresentou predominância de 89,9% dos flebotomíneos identificados⁴.

Entre agosto de 1996 e outubro de 2003, um total de 132 casos humanos autóctones confirmados de LTA foi registrado no CIMNC. No presente estudo, apresentamos novos achados obtidos da extensão do inquérito epidemiológico preliminar realizado em 1997, visando caracterizar aspectos da epidemiologia da LTA nesta área da Zona da Mata, norte de Pernambuco.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo. O estudo foi realizado no CIMNC, localizado no município Paudalho, a cerca de 40km do Recife (Figura 1). Fundado pelo Exército em 1944, com a finalidade de servir como centro de instrução militar, ocupa área com 6.280 hectares. A vegetação predominante é constituída de matas secundárias e dispersos resquícios de Mata Atlântica primitiva.

Diagnóstico parasitológico. Pesquisa direta de formas amastigotas de material obtido através de escarificação e biópsia da borda da lesão, em esfregaços e *imprints* fixados com metanol, corados com Giemsa, e visualizados através de microscopia óptica com aumento de 100x. Material aspirado da borda da lesão, utilizando seringa de 5ml com 0,3ml de solução salina estéril e agulha de 25x7mm, foi inoculado em meio de cultivo Agar Sangue Base (Difco)²⁵ e em hamster (*Mesocricetus auratus*). Biópsias de lesões foram realizadas na borda da lesão ulcerada, utilizando punch de 4mm, após assepsia com polivinil pirrolidona iodo a 1% e anestesia local com cloridrato de lidocaina a 2%. Fragmento da biópsia foi macerado em solução salina com antibiótico e inoculado em meio Agar sangue base e hamster. As culturas foram examinadas a cada cinco dias, visando confirmar o isolamento do parasita¹².

Identificação do parasita. A tipagem de *Leishmania* foi realizada através de imunofluorescência indireta²¹, utilizando painel de vinte e três anticorpos monoclonais específicos (B2, B5, B11, B12, B13, B18, B19, CO1, CO2, CO3, D13, L1, LA2, M2, N2, N3, V1, WA2, W1, W2, WH1, WIC, T3). As séries B e N reagem com espécies do subgênero *Viannia*; M2, T3, D13, M11, M12, WIC, WA2 e V1 reagem com espécies do subgênero *Leishmania*; CO1, CO2, CO3 e L1 são grupo específicos e reagem com espécies de ambos subgêneros, *Endotrypanum* e algumas espécies de *Trypanosoma*. Análise do perfil de mobilidade eletroforética com isoenzimas, utilizando dez sistemas enzimáticos: acid phosphotase (ACP, E.C.3.1.3.2.), glucose-phosphate isomerase (GPI, E.C.5.3.1.9), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD, E.C.1.1.1.49), isocitrate dehydrogenase com NADP (IDHNADP E.C.1.1.1.40), malate dehydrogenase (MDH, E.C.1.1.1.37), malic enzyme (ME, E.C.3.4.11.1), nucleoside hydrolase (NH, 3.2.2.1), peptidase (PEPD, 3.4.13.9), phosphoglucomutase (PGM, E.C.1.4.1.9) e 6-phospho-gluconate dehydrogenase (6PGDH, E.C.1.1.1.43). Cada amostra foi comparada com cepas de referência da Organização Mundial de Saúde. A preparação das amostras para a caracterização isoenzimática e as condições de eletroforese e revelação foram processadas de acordo com metodologia descrita por Cupolillo et al¹.

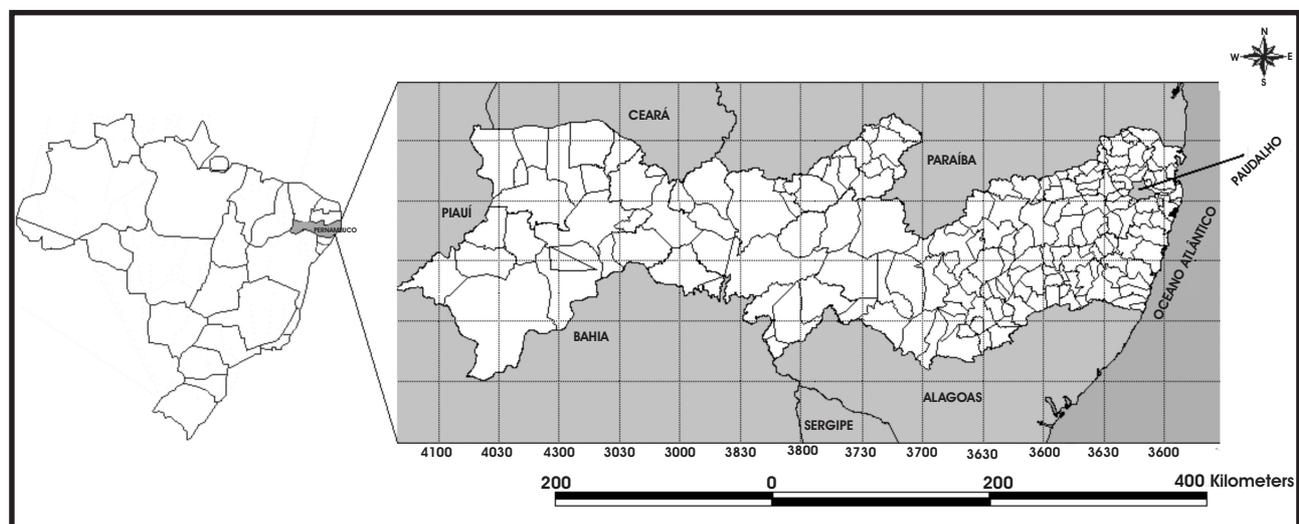


Figura 1- Localização geográfica da área de estudo. Município de Paudalho, Pernambuco, Brasil.

Intradermoreação de Montenegro. A IDRM foi realizada através da inoculação intradérmica de 0,1ml do antígeno (leishmanina) produzido e padronizado por Biomanguinhos/FIOCRUZ, na face anterior do antebraço. A leitura foi realizada entre 48 e 72 horas após a inoculação através do método da caneta esferográfica²³. A reação foi considerada positiva, quando o diâmetro da enduração resultante foi igual ou superior a 5mm.

Inquérito epidemiológico. O inquérito epidemiológico de prevalência foi realizado em 370 dos 1.467 militares efetivos que participaram do treinamento militar no período de julho de 2002 a junho de 2003. A amostra foi selecionada por sorteio. A pesquisa foi autorizada pelo Comitê de Ética em pesquisa envolvendo seres humanos do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife. Após a assinatura do termo de consentimento, os indivíduos foram submetidos à aplicação de um questionário e a IDRM. Na definição do tamanho da amostra, foram empregadas margem de erro de 5%, confiabilidade de 99% e prevalência esperada de 24%, tendo por base achados prévios. O critério de exclusão considerado foi procedência de indivíduos de área endêmica de ITA.

Análise dos dados. A análise e processamento estatístico dos dados obtidos foi realizada através do programa EPI-INFO, versão 6.0.

RESULTADOS

Pacientes. Vinte e dois pacientes com clínica de ITA foram atendidos no ambulatório do Hospital Geral do Recife/7^a, Região do Exército, durante este período do estudo. Todos foram IDRM positiva e apenas um foi negativo para a pesquisa direta de amastigotas. Amostras de *Leishmania* foram isoladas em meio de cultura em sete dos pacientes (Tabela 1). Quase todos os casos diagnosticados foram da forma cutânea com lesão única, apenas um apresentou lesões múltiplas em número de quatro. A localização das lesões ocorreu em mãos, pernas e face. O período médio entre a realização do treinamento e início da lesão foi de 20,5 dias. Os pacientes foram tratados com antimoniató de N-metil glucamina (Glucantime®), seguindo esquema de baixa dose²⁰ (uma ampola ao dia), via intramuscular profunda, durante 20 dias seguidos. Todos pacientes apresentaram completa cicatrização após a conclusão da primeira série de tratamento.

Isolamento e identificação de *Leishmania spp.* Sete amostras foram isoladas a partir de punções por aspiração e biópsias em lesões. As amostras foram identificadas como *Leishmania (V) braziliensis* através de perfil de reconhecimento antigênico similar em relação aos anticorpos monoclonais utilizados e foram agrupadas no sorodemo 01. Na tipagem com isoenzimas, a amostra MHOM/BR/2003/JHC.CIMNC apresentou perfil eletroforético de variante em relação à cepa de referência de *L. (V) braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903) e foi agrupada no zimodemo IOC-105.

Inquérito epidemiológico. Dos 370 militares avaliados, 18 foram excluídos (17 por faltarem na leitura da IDRM e 1 por ter antecedente de ITA). A idade média foi de 21 anos. Quanto

Tabela 1- Comparação de resultados dos métodos utilizados para o diagnóstico de leishmaniose tegumentar americana.

Pacientes	Pesquisa de amastigotas	IDRM	Isolamento em cultura
AJO	+	+	+
ASAS	+	+	+
EFS	+	+	+
GCL	+	+	+
HLCS	+	+	-
JCS	+	+	+
RCM	+	+	-
VVD	+	+	-
BRSP	+	+	-
FASS	+	+	-
JPSJ	+	+	-
MNO	+	+	-
OCL	+	+	+
SAS	+	+	-
JFS	+	+	-
FMA	+	+	-
EMP	+	+	-
CAS	+	+	+
AFCM	+	+	-
IGS	+	+	-
PCS	-	+	-
FAMCL	+	+	-

às suas funções, 44% eram soldados, 42,3% alunos do Centro Preparatório de Oficiais da Reserva (CPOR) que tinham participado de treinamento na prestação inicial do serviço militar, e 13,7% eram militares que prestaram apoio ou ministraram instrução durante os períodos de treinamento. A IDRM foi positiva em 89 militares, com prevalência de infecção de 25,3%. O resultado conforme o tamanho da reação é apresentado na Tabela 2. Os indivíduos com antecedente clínico de ITA tiveram resposta mais intensa a IDRM, com média de enduração de 15,6mm. Em relação à adoção de medidas de proteção individual, 97,4% responderam que utilizaram algum método, sendo predominante o uso de mangas compridas e/ou a utilização de repelentes.

Tabela 2- Distribuição de freqüências do teste de intradermoreação de Montenegro, de acordo com o tamanho de enduração.

IDRM (em mm)	Número	Porcentagem (%)
0 a 4	263	74,7
5 a 9	71	20,2
10 a 14	10	2,9
15 a 19	4	1,1
≥ 20	4	1,1
Total	335	100,0

DISCUSSÃO

A leishmaniose tegumentar americana é considerada uma doença em expansão no Brasil e representa importante causa de morbidade para a população residente em áreas endêmicas. *L. (V) braziliensis* é o agente etiológico de maior prevalência, com distribuição geográfica em todas as regiões do país, cujas características ecoepidemiológicas e o modo de transmissão se

expressam de acordo com as particularidades de cada região¹⁶. Apesar da importância da *L. (V.) braziliensis*, aspectos envolvidos em seu ciclo de transmissão ainda não estão totalmente caracterizados. A ecoepidemiologia da LTA associada a esta espécie apresenta características bastante diversas conforme a área geográfica, tornando-se um grande desafio para os programas de controle da doença¹⁶⁻¹⁸. Os resultados deste trabalho permitem, em linhas gerais, contribuir para a identificação do padrão de transmissão envolvido na manutenção da LTA no CIMNC, área de colonização antiga localizada na região correspondente à cobertura da Mata Atlântica no Nordeste do Brasil. No Estado de Pernambuco, verifica-se um crescimento no número de casos humanos notificados de LTA^{2-5, 6, 13}, com predominância na região da Zona da Mata, com mais de 60% do total notificado anualmente.

O diagnóstico do surto de LTA nos pacientes dessa localidade em 1996 foi baseado apenas em critérios clínicos e epidemiológicos, entretanto, os presentes resultados confirmam as observações anteriormente verificadas⁴. O diagnóstico dos casos oriundos do CIMNC no período de 2001 a 2003 foi confirmado pela realização da pesquisa direta e isolamento do parasito na maioria dos casos, em associação com a IDRМ positiva. O período médio de 20,5 dias transcorrido entre o treinamento e o início dos sintomas foi semelhante ao observado por Guerra *et al*⁴, em estudo realizado com militares que participaram de treinamento em Manaus, Amazonas. O acompanhamento médico contínuo dos militares, após as atividades de treinamento, contribuiu para o diagnóstico precoce da doença, seguido do início do tratamento. Assim, o início imediato do tratamento certamente contribuiu para uma resposta satisfatória, com a aplicação de apenas uma série de N-metil glucamina (Glucantime®).

Quanto às formas clínicas da LTA associada à *L. (V.) braziliensis*, os resultados encontrados estão de acordo com os obtidos por outros autores em Estados como Bahia^{9, 15} São Paulo²⁴ e na Zona da Mata, sul de Pernambuco⁵, nos quais observa-se a maior ocorrência da forma cutânea da doença. Entretanto, não foi verificada ocorrência de casos da forma mucosa da doença, observados em Amaraji, Zona da Mata em Pernambuco⁵ e em Três Braços, Bahia^{15, 17}.

Apesar do ciclo zoonótico ser predominante na ecoepidemiologia da LTA, ocorrendo em áreas desmatadas ou de colonização antiga e envolvendo vetores de hábitos peridomiciliares, a transmissão no CIMNC apresenta evidências do envolvimento exclusivo de um ciclo silvestre. Isso se confirma pela presença de surtos periódicos de LTA posteriores à realização de treinamentos nas áreas de Mata Atlântica remanescente e vegetação secundária, considerando que a doença ocorre apenas nos indivíduos participantes desses treinamentos. Além disso, o surgimento dos casos de LTA coincide com o período de maior densidade na fauna de flebotomíneos (dados não publicados). Com efeito, nossos resultados corroboram a tese de que esta espécie é autóctone da região da Mata Atlântica, ao contrário da hipótese levantada por Marzochi & Marzochi¹⁹, na qual esta espécie seria autóctone apenas da Amazônia, tendo sido posteriormente introduzida na região da Mata Atlântica através de processos migratórios.

O índice de 25,3% obtido no inquérito epidemiológico de prevalência da infecção foi semelhante ao obtido previamente na mesma região⁴, quando foi verificada prevalência de 24,2%. No inquérito anterior, a aplicação da IDRМ foi realizada em dois contingentes militares que participaram de treinamento em agosto de 1996, quando foram registrados vinte e seis casos da doença. A prevalência encontrada neste estudo, associada a achados prévios encontrados nesta localidade, confirma a importante força de infecção e transmissão da LTA nesta área. Nos indivíduos com história pregressa de LTA foram verificadas respostas ao IDRМ mais intensas. Estes achados assemelham-se aos resultados obtidos por Barreto *et al*¹ e Silveira *et al*², nos quais foram verificados respectivamente 90,8% e 82,4%.

Amostras identificadas como *L. (V.) braziliensis* obtidas de 7 pacientes, representam um índice bastante significativo, dado que são conhecidos a dificuldade de cultivo, isolamento e manutenção desta espécie do parasita¹⁰. Os achados desta área reforçam as observações verificadas na Zona da Mata de Pernambuco, na qual foi verificada a incidência exclusiva de *L. (V.) braziliensis*, apresentando perfil de variante, com a identificação de cinco diferentes zimodemos^{2, 3}. Estudos adicionais serão necessários para identificar os reservatórios primários envolvidos na manutenção do ciclo silvestre e incriminar o (s) vetor (es) envolvido (s).

AGRADECIMENTOS

A Cristiane Vasconcelos de Oliveira pelo auxílio em biopsias de pacientes, Carlos Feitosa Luna e Wayner Vieira de Souza pelo auxílio na análise estatística e elaboração de mapa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Barreto AC, Cuba-Cuba CA, Marsden PD, Vexenat JA, Belder MD. Características epidemiológicas da leishmaniose tegumentar americana em uma região endêmica do Estado da Bahia, Brasil. Boletim da Oficina Sanitária Panamericana 90: 415-424, 1981.
2. Brandão-Filho SP. Eco-epidemiologia da leishmaniose tegumentar americana associada à *Leishmania (Viannia) braziliensis* na Zona da Mata Atlântica do Estado de Pernambuco, Brasil. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2001.
3. Brandão-Filho, SP, Brito MEF, Carvalho FG, Ishikawa EA, Floetter-Winter LM Shaw JJ. Wild and synanthropic hosts of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco State, Brasil. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 97: 291-296, 2003.
4. Brandão-Filho SP, Brito MEF, Martins CAP, Sommer IB, Valença HF, Almeida FA, Gomes J. Leishmaniose tegumentar americana em centro de treinamento militar localizado na Zona da Mata de Pernambuco, Brasil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 31: 575-578, 1998.
5. Brandão-Filho SP, Campbell-Lendrum, DH, Brito, MEF, Shaw JJ, Davies CR. Epidemiological Surveys confirm an increasing burden of cutaneous leishmaniasis in north-east Brazil. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 93: 488-494, 1999.
6. Brandão-Filho SP, Carvalho FG, Brito MEF, Almeida FA, Nascimento LA. American cutaneous leishmaniasis in Pernambuco, Brazil: Eco-epidemiological aspects in "Zona da Mata" region. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 89: 445-449, 1994.

7. Brito MEF, Brandão-Filho SP, Salles NR, Cupolillo E, Grimaldi Jr G, Momen H. Human cutaneous leishmaniasis due to a new enzymatic variant of *Leishmania (Viannia) braziliensis* occurring in Pernambuco, Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 88: 633-634, 1993.
8. Campbell-Lendrum DH, Pinto MC, Brandão-Filho SP, Souza AA, Ready PD, Davies CR. Experimental comparison of anthropophily between geographically dispersed populations of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Pychodidae). Medical and Veterinary Entomology 13: 299-309, 1999.
9. Costa JML, BalbyITA, Rocha EJSR, Silva AR, Rebelo JMM, Ferreira LA. Estudo comparativo da leishmaniose tegumentar americana em crianças e adolescentes procedentes das áreas endêmicas de Buriticupu (Maranhão) e Corte de Pedra (Bahia), Brasil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 31: 279-288, 1998.
10. Cuba-Cuba CA, Marsden PD, Barreto AC, Rocha R, Sampaio RR, Patzlaff L. Parasitologic and immunologic diagnosis of American mucocutaneous leishmaniasis. Bulletin of the Panamerican Health Organization 15: 249-259, 1981.
11. Cupolillo E, Grimaldi Jr G, Momen H. A general classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 50: 296-311, 1994.
12. Evans D. Handbook on isolation characterization and cryopreservation of *Leishmania*. World Health Organization, Geneva, 1989.
13. Fundação Nacional de Saúde. Situação da Prevenção e Controle das Doenças Transmissíveis no Brasil. Relatório técnico, Ministério da Saúde, Brasília, 2002.
14. Guerra JAO, Talhari S, Paes MG, Garrido M, Talhari JM. Aspectos clínicos e diagnósticos da leishmaniose tegumentar americana em militares simultaneamente expostos à infecção na Amazônia. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 36: 587-590, 2003.
15. Jones TC, Johnson Jr WD, Barreto AC, Lago E, Badaró R, Cerf B, Reed SG, Netto EM, Tada MS, França F, Wiese K, Golightly L, Fikrig E, Costa JML, Cuba CC, Marsden PD. Epidemiology of American cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis braziliensis*. Journal of Infectious Diseases 156: 73-83, 1987.
16. Lainson R, Shaw JJ. New World leishmaniasis. The neotropical *Leishmania* species. In: Collier L, Balows A, Sussman M (eds) Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infectious Diseases 9th Edition, Arnold, London, Volume 5, p. 241-266, 1998.
17. Marsden PD. Personal experience with diagnostic and therapeutic aspects of human *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Tres Braços. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 89: 485-487, 1994.
18. Marzochi MCA. Leishmanioses no Brasil: as leishmanioses tegumentares. Jornal Brasileiro de Medicina 63: 82-104, 1992.
19. Marzochi MCA, Marzochi KBF. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil. Emerging anthroponosis and possibilities for their control. Cadernos de Saúde Pública 10: 359-375, 1994.
20. Oliveira-Neto MP, Schubach A, Mattos M, Gonçalves-Costa SC, Pirmez C. A low-dose antimony treatment in 159 patients with American cutaneous leishmaniasis: extensive follow-up studies (up to 10 years). American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 57: 651-655, 1997.
21. Shaw JJ, Ishikawa EA, Lainson R. A rapid and sensitive method for the identification of *Leishmania* with monoclonal antibodies using fluorescein-labeled avidin. Transactions of the Royal Society Tropical Medicine Hygiene 83: 783-784, 1989.
22. Silveira TGV, Teodoro V, Lonardon MVC, Guilherme ALE, Toledo MJO, Ramos M, Arraes SMAA, Bertolini DA, Spinoza RP, Barbosa OC. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose tegumentar em área endêmica do Estado do Pará, Brasil. Cadernos de Saúde Pública 12: 141-147, 1996.
23. Sokal JE. Measurement of delayed skin-test responses. New England Journal of Medicine 293: 501-502, 1975.
24. Tolezano JE. Ecoepidemiologia da leishmaniose tegumentar americana (LTA). Perpetuação da LTA no Estado de São Paulo, região endêmica de colonização antiga. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2000.
25. Walton BC, Shaw JJ, Lainson R. Observations on the *in vitro* cultivation of *Leishmania braziliensis*. Journal of Parasitology 63: 1118-1119, 1977.