

Aspectos epidemiológicos da leishmaniose tegumentar americana em cães, no Município de Paraty, Estado do Rio de Janeiro, Brasil

Epidemiological aspects of canine american tegumentary leishmaniasis in the Municipality of Paraty, State of Rio de Janeiro, Brazil

Gilda Maria Sales Barbosa ^{1,2}
 Mauro Célio de Almeida Marzochi ¹
 Carlos Luis Massard ²
 Ginelza Pires Santos Lima ¹
 Eliame Mouta Confort ¹

¹ Departamento de Ciências Biológicas, Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, Rua Leopoldo Bulhões 1480, Rio de Janeiro, RJ 21041-210, Brasil.
 gildabar@abeunet.com.br

² Departamento de Parasitologia Veterinária, Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural do Estado do Rio de Janeiro, Antiga rodovia Rio-São Paulo, Km 47, Seropédica, RJ 23851-970, Brasil.

Abstract American tegumentary leishmaniasis (ATL) is endemic in the State of Rio de Janeiro, with the highest incidence observed in the municipalities along the Southern coast. A total of 169 human cases were reported from 1993 to 1995 in the municipality of Paraty, representing 15% of all case reports in the State of Rio de Janeiro during that period. From March to December, 1996, a survey was conducted in endemic american tegumentary leishmaniasis (ATL) areas (Praia Grande, Taquari, Várzea do Machado, and Graúna) in Paraty. 326 households with 215 pet dogs were surveyed. The initial study consisted of taking venous blood samples to perform Rifi and Elisa tests. The canine skin test was performed during the same visit and was positive in 8.8% of dogs. Of the 215 dogs, 5 presented lesions suspected of ATL; biopsies and the vacuum aspiration technique were performed on these cases. Correlating the study areas with the results obtained, some dogs presented sub-clinical infection, highly relevant to studies on canine ATL infection in the State of Rio de Janeiro.

Key words Cutaneous Leishmaniasis; Leishmaniasis; Serodiagnosis; Dogs; Epidemiology

Resumo A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é de ocorrência endêmica no Estado do Rio de Janeiro, sendo a maior incidência observada nos municípios do litoral sul. No período de 1993 a 1995, foram registrados, no Município de Paraty, extremo sul do Estado, 169 casos humanos, o que corresponde a 15% das notificações no estado. Neste trabalho, realizou-se estudo em áreas endêmicas (Praia Grande, Taquari, Várzea do Machado e Graúna) de LTA, com cães residentes no Município de Paraty, entre março e dezembro de 1996. Foram visitadas 315 residências, compreendendo uma população de 1.282 habitantes, com 215 cães estudados. O trabalho inicial consistiu na coleta de sangue venoso, para realização das técnicas sorológicas: Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA). O resultado da sorologia foi de 3,2% de positividade para a técnica de Rifi e 10,2% para a de Elisa. A prova intradérmica canina foi realizada na mesma ocasião da coleta de sangue e sua positividade foi de 8,8%. Dos 215 cães, cinco deles apresentaram lesões suspeitas, nos quais realizou-se biópsia e técnica de aspirado a vácuo.

Palavras-chave Leishmaniose Cutânea; Leishmaniose; Sorodiagnóstico; Cães; Epidemiologia

Introdução

As leishmanioses do Velho e do Novo Mundo compreendem variadas manifestações clínicas, acometendo em sua diversidade uma significativa parte da população mundial, incluindo adultos e crianças, além de várias espécies de animais silvestres e domésticos (WHO, 1990).

A intensificação das investigações sobre a leishmaniose tegumentar americana (LTA) atualmente, principalmente no que se refere a *Leishmania (Vianna) braziliensis* na Região Sudeste, vem identificando um padrão epidemiológico diferente do já conhecido. Essa enfermidade tem apresentado perfis epidemiológicos periurbanos e urbanos bem caracterizados pela positividade de casos humanos em áreas de colonizações antigas, sugerindo uma antropozoonose entre os animais domésticos, como o cão, ou mesmo uma antroponose (Marzochi & Marzochi, 1994).

Segundo Falqueto et al. (1986), a ocorrência de LTA no Espírito Santo mostrou nítida relação entre a presença de cães infectados e o surgimento de novos casos humanos da doença.

O objetivo deste trabalho é: avaliar o possível papel dos cães na cadeia de transmissão da leishmaniose tegumentar americana em quatro áreas endêmicas com características fisiográficas diversas, pertencentes ao Município de Paraty, Rio de Janeiro; determinar a prevalência da infecção canina nas áreas estudadas, mediante teste intradérmico, com antígeno específico proposto por Barbosa-Santos & Marzochi (1988), reações sorológicas e isolamento do parasito; contribuir para o conhecimento da epidemiologia da leishmaniose canina em uma área semi-silvestre, do sul do Estado do Rio de Janeiro, área de risco de infecção, onde, até o momento, está concentrada a maior incidência de casos humanos de LTA no Estado, segundo a Fundação Nacional de Saúde (FNS) em 1996.

Material e métodos

Descrição das áreas estudadas

Paraty localiza-se no extremo sul do Estado do Rio de Janeiro, na região turística da Costa Verde, ocupando área de 917 km². Apresenta uma população estimada em 32.000, segundo a Secretaria de Planejamento de Paraty, em 1996, tendo que se considerar a população de temporada, já que um dos suportes financeiros de Paraty é o turismo. O clima é quente úmido, sem estação seca na base da serra, e subtropical úmido nas regiões serranas. Sua flora é bas-

tante variada, encontrando-se madeiras de lei, como cedros, jacarandás, perobas etc. A fauna é rica em animais silvestres, como tamanduás, capivaras, veados, lontras, raposas, pacas, quatis, entre outros.

O Município de Paraty tem grande importância para a economia estadual, sendo a agricultura, a pesca e o turismo os representantes da base de seus suportes financeiros (Rodrigues, 1995).

Das quatro áreas estudadas, três são formadas por regiões de relevo (Graúna, Várzea do Machado e Taquari), todas situadas na encosta da Serra do Mar recoberta pela Mata Atlântica; uma delas situa-se na faixa litorânea (Praia Grande). Nessas áreas citadas, estudaram-se o universo populacional humano e o canino, sendo estes devidamente cadastrados.

A população encontrada no momento da pesquisa foi de 1.282 indivíduos, tendo sido cadastradas 315 residências, que se distribuíam da seguinte forma: 240 localizadas nas regiões com relevo, e 75 na faixa litorânea. Dentre estas, 170 coabitavam com cães.

Biópsia das lesões

Realizou-se biópsia cirúrgica em cinco cães que apresentaram lesões ulceradas sugestivas de LTA. Após assepsia local e introdução de xilocaína a 1%, foi feita uma incisão profunda de 2 mm a 6 mm nas bordas das lesões, utilizando-se bisturi cirúrgico para obtenção de vários fragmentos. Desses fragmentos, tentaram-se dois tipos de isolamento do parasito: o isolamento primário, através de cultivo em meio de cultura bifásico (NNN + BHI), e o isolamento secundário, por meio da inoculação de 0,1 ml da suspensão em salina com antibiótico do macerado de fragmentos nas patas posteriores de um a dois hamsters (*Mesocricetus auratus*) para cada amostra, totalizando seis destes animais.

Concomitantemente à biópsia, foi realizada a técnica de punção aspirativa a vácuo proposta por Marzochi et al. (1993). Os isolamentos foram realizados no Laboratório de Protozoologia do Departamento de Ciências Biológicas, Escola Nacional de Saúde Pública, Fiocruz. O laboratório faz parte da Coordenação Nacional de Laboratório de Saúde Pública (COLAB/FNS/MS), para leishmaniose tegumentar americana (LTA) e leishmaniose visceral americana (LVA).

Os fragmentos para histopatologia foram fixados em formol tamponado a 10% e enviados para análise no Laboratório de Anatomia Patológica, do Hospital Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz.

Seis hamsters foram utilizados para inoculação do parasito. O isolamento secundário procedeu-se através do inóculo de macerado da biópsia de cinco cães com lesões suspeitas, provenientes de todas as áreas trabalhadas. Os hamsters que não apresentaram alterações cutâneas foram sacrificados e necropsiados para averiguação de presença do parasita em órgãos como fígado e baço, por meio de isolamento em cultura e microscopia ótica da impressão em lâmina, de fragmentos de vísceras.

As suspensões de promastigotas obtidas pelo isolamento primário foram preservadas em nitrogênio líquido a -196°C em tubos de criopreservação, segundo Chance (1982), aguardando caracterização taxonômica.

Técnicas sorológicas

Utilizaram-se como antígeno amostras do gênero *Leishmania*, identificadas como *Leishmania major-like* (MHOM/BR/76/JOF). Da cultura, obtiveram-se promastigotas íntegras (particulados) para a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e solúveis para o teste imunoenzimático (ELISA), conforme procedimentos adotados pelo Laboratório de Imunodiagnósticos do DCB/ENSP/Fiocruz, que também faz parte do Laboratório de Referência Nacional para LTA e LVA no Brasil.

Para o teste cutâneo canino, foram inoculados 0,1 ml do antígeno Imunolesh®, contendo 2,0 mg de proteínas totais por ml, nas faces internas das coxas de 215 cães cadastrados, com idade acima de seis meses, conforme o proposto por Barbosa-Santos & Marzochi (1988).

O local do inóculo foi devidamente demarcado e a leitura realizada após 48 horas, considerando-se positiva a área edemacida com presença de eritema com diâmetro igual ou superior a 5 mm.

Resultados

Dentre as 315 residências visitadas, 170 (54%) possuíam cães residentes, totalizando 215 animais, sendo 150 (69%) machos e 65 (30,2%) fêmeas. Os animais estavam assim distribuídos nas áreas estudadas: 66 (30,9%) machos e 30 (13,9%) fêmeas em Taquari; 32 (14,8%) machos e 30 (13,9%) fêmeas em Praia Grande; 42 (19,5%) machos e 11 (5,1%) fêmeas em Graúna; dez (4,6%) machos e quatro (1,8%) fêmeas em Várzea do Machado. Das 317 residências, 87 (28%) localizavam-se área litorânea e 228 (72%) na encosta da Serra do Mar recoberta pela Mata Atlântica.

As casas, em sua maioria, são construções feitas de alvenaria, perfazendo um total de 236 (74,9%), encontrando-se 25,1% de construções de estuque. Quanto à iluminação elétrica, 90,8% das residências possuem, havendo apenas 29 (9,2%) casas que não têm esse recurso.

A presença de animais silvestres no peridomicílio foi observada e relatada por moradores de 111 (35,2%) residências, predominando a presença das ordens Marsupialia e Rodentia, como gambá (*Didelphis marsupialis*) e roedores diversos.

Alguns cães acompanham os seus respectivos donos na atividade de pesca na região, e o percentual de cães que transitam no interior da mata foi muito baixo.

O cultivo de árvores frutíferas próximo às moradias foi observado, com destaque especial para a bananeira. Em relação à proteção contra a picada de insetos, 178 (56%) de residências possuíam telas nas janelas e proteção química.

Foram encontrados cinco cães, com idades variando entre um a dez anos, portadores de lesões sugestivas de leishmaniose, sendo duas fêmeas e um macho, na região de Taquari, e dois machos, na região de Graúna; contudo, nenhum deles estava coabitando com casos humanos presentes ou passados de LTA. Foram consideradas como suspeitas lesões ulceradas em qualquer parte do corpo, bem como nódulos cutâneos em áreas de pouco pêlo, porém esse último não foi encontrado. As lesões sugestivas localizavam-se no pavilhão auricular (dois casos), focinho (um caso), bolsa escrotal (dois casos). Todas as lesões eram ulceradas, únicas e úmidas, compatíveis com as características descritas para as lesões causadas por parasitos pertencentes ao complexo *Leishmania braziliensis* (Pirmez et al., 1988b).

Dos cinco cães que apresentaram lesões sugestivas de LTA, obtivemos isolamento primário de formas promastigotas de *Leishmania* sp. de dois deles e isolamento secundário de três, sendo um positivo em ambos. Dentre os cães dos quais obtivemos isolamento primário, um deles apresentou lesão no pavilhão auricular e outro, na bolsa escrotal; os animais tinham oito e dez anos de idade respectivamente e foram ambos encontrados na região de Graúna.

Dos seis hamsters inoculados com o macerado obtido de biópsia, foi possível isolamento secundário de três destes, que haviam recebido o inóculo do material de cães procedentes das regiões de Taquari e Graúna. De um cão procedente da região de Graúna, com idade de dez anos, obteve-se isolamento *in vivo* e *in vitro*, através de lesão de bolsa escrotal.

Dois desses cães, com três anos de idade, apresentaram lesões na bolsa escrotal, e um, de cinco anos, apresentou lesão na fossa nasal (Taquari).

Nos exames parasitológicos diretos (impressão por aposição, histopatologia e aspirado a vácuo), não foram observadas formas parasitárias.

Dos cinco cães que tinham lesões sugestivas, apenas dois apresentaram positividade ao teste cutâneo.

O teste cutâneo de hipersensibilidade retardada, adaptado para cão, revelou positividade em 19 cães, sendo positivos (≥ 5 mm) oito na região de Praia Grande; seis em Taquari; quatro em Graúna e um em Várzea do Machado.

As 215 amostras séricas foram analisadas por meio da técnica de RIFI, constatando-se uma soropositividade em 3,2% do total. A distribuição dessa soropositividade por área foi a seguinte: Praia Grande (1:40 e 1:160), Graúna (1:40, 1:40 e 1:80), Taquari (1:40 e 1:80). Em Várzea do Machado, não houve positividade constatada pela RIFI.

A soropositividade revelada pela técnica de ELISA foi de (10,2%). A distribuição dos resultados por área foi: Praia Grande (0,9%), Graúna (6,5%), Taquari (2,3%) e Várzea do Machado (0,4%).

O ponto de corte ficou estabelecido em 0,23. As leituras que ultrapassassem esse valor eram consideradas positivas e as que ficassem abaixo eram consideradas negativas. A copositividade entre RIFI e ELISA foi de 1,3%.

Discussão e conclusões

Desde a primeira evidência da participação do cão doméstico em ciclos de transmissão da LTA no Brasil, assinalada por Pedroso (1913), somente a partir da década de 80 intensificaram-se estudos para melhores esclarecimentos.

O diagnóstico para a detecção da infecção em cães é normalmente realizado mediante exames clínicos, demonstração do parasita e identificação de anticorpos específicos (através de testes sorológicos como RIFI e ELISA, sendo estes considerados os de melhor especificidade e de maior sensibilidade, respectivamente).

Em Paraty, Estado do Rio de Janeiro, o presente estudo evidenciou o encontro de 51 cães infectados, representando 23,7 % dos 215 examinados. Os isolamentos dos parasitos em cães obtidos *in vivo* e *in vitro* indicam que a identificação da espécie encontrada é compatível com o complexo *braziliensis*, *Leishmania* (*Vianna*) *braziliensis*.

Consideraram-se como cães infectados aqueles que foram reagentes exclusivamente a pelo menos uma das técnicas sorológicas (de ELISA e de RIFI); também foram considerados infectados aqueles positivos ao isolamento primário (*in vitro*), secundário (*in vivo*), bem como os que apresentaram positividade ao teste cutâneo. Do total de cães infectados, obtivemos uma proporção de 7,8% de isolamento do parasito nas quatro áreas trabalhadas. Do universo de cães estudados, cinco (2,3%) eram portadores de lesões sugestivas para leishmaniose tegumentar; desses, conseguiu-se isolamento primário de dois (40%) e secundário de três (60%), sendo um cão positivo em ambos os isolamentos. A magnitude da transmissão do parasito na região estudada evidenciada pelos indicadores estudados sugere uma situação epidemiológica intermediária ou de transição entre a alta e a baixa transmissibilidade.

A inexistência de lesões suspeitas em cães de áreas endêmicas de LTA humana não significa, segundo Cardoso et al. (1989), que a doença canina não esteja presente. O autor considera a soropositividade na RIFI como bom indicativo de infecção canina.

Examinando 98 cães, no Estado da Bahia, Barreto (1984) verificou que 13 eram portadores de lesões e, entre esses, nove (69,2%) estavam comprovadamente infectados. No Rio de Janeiro, de 35 cães com alterações tegumentares compatíveis com a LTA, Pirmez et al. (1988a) conseguiram o isolamento do parasita em 28 (80%) dos cães.

Ao teste intradérmico canino realizado em 215 cães das áreas trabalhadas encontrou-se uma positividade de 8,8%, em 12 (63%) machos e em sete (36%) fêmeas.

Segundo Barbosa-Santos et al. (1988, 1998), a positividade canina ao teste cutâneo em área periurbana endêmica da região metropolitana no Rio de Janeiro pode ter uma variação de até 42%.

A positividade do teste de RIFI e ELISA em Paraty foi de 13%, com uma concentração maior de positividade em Graúna, pertencente a uma região com características tipicamente rurais. A soropositividade canina para leishmaniose tegumentar nas áreas estudadas indica que a transmissão é ativa.

Maywald et al. (1993), estudando regiões endêmicas de LTA em Minas Gerais, comparou os achados caninos de uma área rural estudada e de uma área urbana e constatou que, de 429 cães, apenas 1% mostrou-se reagente na RIFI na área rural, enquanto 10,6% foram reagentes na mesma técnica na área urbana. O número de casos de LTA humana, fornecidos

pela Fundação Nacional de Saúde entre 1994 e 1996, foi de 51, estando assim distribuídos nas quatro áreas trabalhadas: nove casos em Taquari, 25 em Praia Grande, sete em Graúna e dez em Várzea do Machado. Dessas quatro regiões estudadas, Praia Grande é uma região de característica semi-urbana, enquanto as outras possuem características rurais.

O ciclo de transmissão de leishmaniose tegumentar apresenta características peculiares a cada região endêmica, o que nem sempre permite extrapolar dados de uma região para outra. Por outro lado, muitas áreas endêmicas apresentam características ambientais semelhantes, coincidindo detalhes do ciclo de transmissão, tais como: a presença das mesmas espécies de parasitos, mamíferos silvestres e insetos vetores (Falqueto, 1995). Este autor ainda se refere às duas áreas endêmicas de LTA por ele estudadas na Região Sudeste do Brasil, onde a *Lutzomyia migonei* foi a espécie que apresentou maior afinidade pelo cão. Aguiar et al. (1993), realizando pesquisas também no Sudeste, no litoral sul do Estado do Rio de Janeiro, no Município de Paraty, já havia observado preferência alimentar da espécie *Lutzomyia migonei* por cães.

Segundo Carvalho et al. (1995), da fauna flebotômica encontrada na Ilha do Araújo, em Paraty, houve predomínio de duas espécies

nas áreas de estudo: *Lutzomyia intermedia* e *Lutzomyia migonei*. Essas espécies foram encontradas em domicílio, peridomicílio e mata. O perfil epidemiológico evidenciado – semelhante proporção de positividade para sorologia e teste cutâneo – sugere que, nas áreas estudadas, a infecção canina se encontra em uma situação intermediária entre um processo de transmissão recente (maior proporção de sorologia positiva) e um processo de transmissão antiga (maior proporção do teste cutâneo positivo).

No Brasil, estudos têm demonstrado ser relativamente comum a presença de cães infectados em áreas endêmicas de leishmaniose tegumentar, especialmente na Região Sudeste do Brasil, em ambientes domiciliares (Falqueto, 1995); no entanto, em nenhuma das localidades pesquisadas, observou-se ausência da infecção canina. Isso é um alerta quanto à presença, embora baixa, de possíveis fontes de infecção, necessitando de medidas de controle da doença, como, por exemplo, uma tentativa de interrupção do ciclo domiciliar e peridomiciliar, de forma adequada.

Os achados em relação à presença de humanos e cães infectados em área de colonização antiga é fato, mas não podemos esquecer que ainda precisamos diversificar áreas de pesquisa.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Dra. Elizabete Glória Barbosa dos Santos (Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz), que gentilmente cedeu o antígeno inoculado nos cães. Agradecem também a Gilberto Santos Martins (Fundação Nacional de Saúde), a Raquel Guerra do Nascimento, Nilton Francisco da Conceição e César Pontes (Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz), pela fundamental participação no desenvolvimento do trabalho de campo e laboratorial.

Referências

- AGUIAR, G. M.; MEDEIROS, W. M.; SANTOS, T. G.; KLEIN, A. F. L. & FERREIRA, V., 1993. Ecology of sandflies in a recent focus of cutaneous Leishmaniasis in Paraty, litoral of Rio de Janeiro state (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 88:339-340.
- BARBOSA-SANTOS, E. G. O. & MARZOCHI, M. C. A., 1988. Evaluation of a skin test on the canine mucocutaneous Leishmaniasis diagnosis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 83:391-392.
- BARBOSA-SANTOS, E. G. O.; MARZOCHI, M. C. A.; CONCEIÇÃO, N. F.; BRITO, C. M. M. & PACHECO, R. S., 1998. Epidemiological survey on canine population with the use of immunoleish skin test in endemic areas of human american cutaneous Leishmaniasis in the State of the Rio de Janeiro, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 40:41-47.

- BARRETO, A. C.; CUBA-CUBA, C.; VEXENAT, J. A.; ROSA, A. C.; MARSDEN, P. D. & MAGALHÃES, A. V., 1984. Características epidemiológicas da leishmaniose tegumentar americana em uma região endêmica do Estado da Bahia. II – Leishmaniose canina. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 17:59-65.
- CARDOSO, S. R. A.; MACHADO, M. F.; CRUZ, J. M. C.; GONÇALVES, M. R. F. & STUTZ, W. H., 1989. Leishmaniose tegumentar canina no município de Uberlândia, Minas Gerais: Diagnóstico clínico e sorológico de cães naturalmente infectados. *Revista Centenária Científica Biomédica. Universidade Federal de Uberlândia*, 5:14-21.
- CARVALHO, W. R.; FREIRE, S. M. & SOUZA, B. M., 1995. Sandfly fauna of Ilha do Araújo, Paraty municipality, Rio de Janeiro state. 1 – Species diversity and behavior. *Parasitología al Día*, 19:104-112.
- CHANCE, M., 1982. International reference material. Biochemical characterization of *Leishmania*. In: *Workshops Held at Panamerican Health Organization, 9*, Washington: World Bank/World Health Organization.
- FALQUETO, A., 1995. *Especificidade Alimentar de Flebotomíneos em Duas Áreas Endêmicas de Leishmaniose Tegumentar no Estado do Espírito Santo*. Tese de Doutorado, Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz.
- FALQUETO, A.; COURA, J. R.; BARROS, G. C.; GRIMALDI-FILHO, G.; SASSA, P. A.; CONIAS, V. R. D.; JESUS, A. C. & ALENCAR, J. T. A., 1986. Participação do cão no ciclo de transmissão de leishmaniose tegumentar no município de Vianna, Estado do Espírito Santo, Brasil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 31:155-163.
- MARZOCHI, M. C. A.; TEIXEIRA, P. C.; MARZOCHI, K. B. F.; CONCEIÇÃO, N. F.; COUTINHO, W. & BRITO, D. B., 1993. Vacuum aspiratory puncture system for *Leishmania* culturing, isolation and transport. Preliminary report. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 35:301-303.
- MARZOCHI, M. C. A. & MARZOCHI, K. B. F., 1994. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil – Emerging antropozoonosis and possibilities for their control. *Cadernos de Saúde Pública*, 10:359-375.
- MAYWALD, P. G.; MACHADO, M. I.; CRUZ, J. M. C.; OLIVEIRA, M. C. & PIRES, M. R. F. G., 1993. Leishmaniose tegumentar canina: Inquérito sorológico em áreas rural e urbana no Município de Uberlândia, Minas Gerais. *Brazilian Journal of Veterinary and Research in Animal Science*, 30:25.
- PEDROSO, A. M., 1913. Leishmaniose local do cão. *Anais Paulistas de Medicina e Cirurgia*, 1:33-39.
- PIRMEZ, C.; COUTINHO, S. G.; MARZOCHI, M. C. A.; NUNES, M. P. & GRIMALDI, G., 1988a. Canine american cutaneous leishmaniasis: A clinical and immunological study in dogs naturally infected with *Leishmania braziliensis braziliensis* in an endemic area of Rio de Janeiro, Brazil. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 38:52-58.
- PIRMEZ, C.; MARZOCHI, M. C. A. & COUTINHO, S. G., 1988b. Experimental canine mucocutaneous leishmaniasis (*Leishmania braziliensis braziliensis*). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 83:145-151.
- RODRIGUES, A. A., 1995. *Paraty, Três Séculos de História*. Paraty: Secretaria de Turismo e Cultura, Prefeitura Municipal de Paraty.
- WHO (World Health Organization), 1990. *Control of the Leishmaniasis*. WHO Technical Report Series. Geneva: WHO.