

**EL CULTIVO "IN VITRO" COMO INSTRUMENTO PRÁCTICO PARA EL
DIAGNÓSTICO Y AISLAMIENTO PRIMARIO DE LEISHMANIA BRAZILIENSIS
BRAZILIENSIS. 2. Estudios en pacientes de áreas endémicas ***

C. A. CUBA-CUBA, E. M. NETTO, J. L. M. COSTA, A. C. BARRETO & P. D. MARSDEN

R E S U M E N

El cultivo "in vitro" de *Leishmania braziliensis braziliensis* constituye un método útil en el trabajo de campo, para el aislamiento primario de ésta subespecie de *Leishmania*. Cultivos en dos medios difásicos de agar sangre (DAB y EVANS) y dos medios líquidos (SCHNEIDER'S y AR-103) realizados en pacientes con lesiones cutáneas de Leishmaniasis Tegumentaria Americana (LTA) demostraron: 1) Similar sensibilidad de los medios DAB y Schneider's cuando utilizamos el procedimiento de aspiración de las muestras con aguja. 2) Rendimiento sensible y reproducible, con el medio DAB, cuando comparado, en repetidas ocasiones, con el medio EVANS. 3) Incremento significativo en el aislamiento primario de *Leishmania braziliensis braziliensis* mediante la ejecución, en la misma lesión de cada paciente, de tres aspiraciones consecutivas en sitios diferentes de la úlcera activa (50% de positividad, con el medio DAB).

UNITERMOS: Leishmaniose tegumentar — *Leishmania braziliensis braziliensis* — Diagnóstico pelo cultivo in vitro.

I N T R O D U C C I O N

El aislamiento del parásito, en *Leishmania tegumentaria americana* (LTA), es todavía necesario para el diagnóstico y pronóstico de la enfermedad¹⁷. Las nuevas técnicas para la identificación "in situ" de los amastigotes de *Leishmania* usando anticuerpos monoclonales e hibridización del k-DNA^{23,2} no son todavía aplicables en la investigación epidemiológica de campo.

Un método de aislamiento de *Leishmania braziliensis braziliensis* insuficientemente explorado, en investigaciones de terreno, es el del cultivo "in vitro" de los parásitos de infecciones humanas^{4,19}. Observaciones evaluando la sensibilidad de los medios de cultivo recomendados⁹ solamente son posibles de ser realizadas en áreas de reconocida endemicidad de la

L. b. braziliensis, subespecie de difícil aislamiento y cultivo^{11,12,13}.

Este trabajo presenta nuestros progresos alcanzados a lo largo de los últimos 3 años, en el aislamiento de *L. b. braziliensis* de pacientes con lesiones cutáneas de LTA en una área de estudio longitudinal en Bahia, Brasil^{3,6,7}. Los resultados obtenidos sugieren que, el método cultural es efectivo, sensible y práctico en los trabajos epidemiológicos de ésta endemia.

MATERIAL Y MÉTODOS

1) Los pacientes

Fueron comprendidos en éste estudio, 9 series de pacientes investigados en las regiones

* Núcleo de Medicina Tropical e Nutrição, Universidade de Brasília, Caixa Postal 153121, 70.910 Brasília, D.F., Brasil. Trabajo parcialmente financiado por CNPq (Pro. 403682/82) y OMS/TDR-RE (820526)

endémicas de Três Braços, Cravolândia y Corte de Pedra, Valença, Bahia; ésta última localidad proporcionó 96% de los casos investigados. Todos eran pacientes sin tratamiento previo antileishmanial.

2) Procedimientos en la demostración de *Leishmania*

Para la realización de los cultivos en las lesiones de los pacientes, limpiábamos cuidadosamente la superficie del área a ser trabajada mediante la utilización en forma secuencial, de los siguientes elementos: agua oxigenada, agua destilada esteril con detergente, alcohol yodado y finalmente alcohol de 95%. Posteriormente, procedíase a anestesiar por la infiltración de Lidocaine 2%.

La aspiración del material de las lesiones fué hecha por dos procedimientos: 1) Por la utilización de pipeta Pasteur, de punta afilada, unida a una pequeña bombilla de jebe y, 2) Por el uso de una jeringa de 5 ml y aguja de 22g, conteniendo 0.304 de ml de solución fisiológica esteril. La aspiración, en ambos procedimientos, siguió las recomendaciones de HENDRICKS & WRIGHT⁹.

En un primer grupo de 33 pacientes ambos procedimientos descritos fueron empleados comparativamente. Posteriormente y en vista de la ventaja práctica de agujas y jeringas descartables, solamente, la aspiración con éste material fue empleada.

Paralelamente fueron realizados frotices ("improntas") confeccionados con material de biopsia ("punch", 4 mm), o por raspado del margen interno de las lesiones con palito de fósforos²⁰, cuyos resultados no son presentados en ésta comunicación por ser tema de otra publicación.

3) Medios de cultivo utilizados

Los medios empleados en el presente trabajo fueron los mismos descritos en trabajo anterior de ésta serie¹⁶. Citamos el SCHNEIDER'S *Drosophila* Medium¹⁰, el DIFCO Blood Agar Medium²¹, DAB, el AR.103 medio químicamente definido¹ y el medio de EVANS⁸. Todos

los medios contenían Garamicina (Garamycin, Schering, USA, 250 ug/ml de medio), y cuando indicado, 5-Fluorocytosine (SIGMA, USA, 150 ug/ml).

Todos los cultivos fueron incubados a 23°C ± 1°C, y examinados diariamente por 7 días consecutivos y, posteriormente, a los 15 y 30 días pos inóculo. Todas las observaciones fueron hechas en microscopio invertido, como de rutina.

Posteriores estudios de aislamiento primario y diagnóstico fueron efectuados en la localidad de Corte de Pedra, Bahia, empleando comparativamente el Medio DAB y el EVANS. El procedimiento empleado fué el de la aspiración con aguja y jeringa de muestras de tejidos de las úlceras de pacientes cutáneos. Todos los cultivos positivos fueron transferidos para el medio de propagación de Schneider (complementado con 20% de suero bovino fetal) para la preparación de masa de células para identificación taxonómica.

Finalmente en los últimos estudios, inoculamos 3 Tubos de Medio DAB con muestras de tejidos tomadas de tres diferentes sitios de la misma úlcera de cada paciente (2 series de 49 y 15 pacientes con lesiones cutáneas, respectivamente).

4) Identificación del parásito

Los primeros 11 aislados ("stocks") fueron caracterizados e identificados por las técnicas de Anticuerpos monoclonales (IFAT — IgG⁷, por el del padrón isoenzimático en acetato de celulosa y/o el padrón de desarrollo en *Lutzomya whitmani*⁵. Posteriormente nosotros encontramos ser más práctico el uso de los anticuerpos monoclonales, utilizando estos "marcadores" específicos y subespecie específicos para *Leishmania*.

5) Análisis Estadístico

Las siguientes pruebas estadísticas fueron aplicadas en el análisis de los datos: 1) Test χ^2 , ji cuadrada, 2) Test de Cochran, 3) Test "t" Student's.

RESULTADOS

La TABLA I muestra que utilizando el procedimiento del aspirado, con aguja y jeringa, 7 (21%) cepas de *L. b. braziliensis* fueron aisladas en el medio de Schneider y, 5 (15%) crecieron en el medio de agar sangre DIFCO

(DAB). Esos resultados no son significativamente diferentes ($=0.05$). No obtuvimos diferencia significativa cuando comparamos también ambos procedimientos de colecta del material de las lesiones (Pipeta Pasteur x Aspirado, con aguja y jeringa), en el estudio realizado con el medio DAB.

T A B L A I

Aislamiento primario y características de crecimiento de *Leishmania*. Comparación de tres medios de cultivo, dos procedimientos de colecta de las muestras y tiempo de apareamiento de los promastigotes "in vitro"

Paciente n.º	Medio de cultivo/Procedimiento de cultivo			Identificación taxonómica del aislado ***
	D A B*		Schneider	
	Aspiración con pipeta pasteur	Aspiración con aguja	Aspiración con aguja	
1	—	—	—	
2	—	—	—	
3	—	—	—	
4	—	—	—	
5	—	—	—	
6	—	—	—	
7	—	—	—	
8	—	—	—	
9	—	—	—	
10	—	—	+(10)**	L. b. b. (I, MAbs)
11	—	—	+(10)	L. b. b. (I, MAbs)
12	—	—	—	
13	+(2)	+(2)	+(2)	L. b. b. (I, MAbs)
14	—	—	—	
15	—	—	—	
16	+(10)	—	—	L. b. b. (MAbs)
17	+(4)	—	—	L. b. b. (MAbs, S.)
18	+(5)	+(15)	—	L. b. b. (MAbs)
19	—	—	—	
20	—	+(15)	+(15)	L. b. b. (I, MAbs; S)
21	+(4)	+(3)	+(10)	L. b. b. (I, MAbs)
22	+(3)	—	—	L. b. b. (MAbs)
23	—	—	—	
24	—	—	—	
25	+(6)	—	—	L. b. b. (MAbs)
26	+(8)	—	—	L. b. b. (MAbs)
27	—	—	—	
28	—	—	—	
29	—	—	—	
30	—	—	—	
31	—	—	+(29)	
32	—	—	—	
33	—	—	+(23)	
Total (%)	8(24.2) ▲	5(15.3) ▲	7(21.2) ▲	0(0)

* DAB = Agar Sangre Difco. WALTON et al (21); AR-103 Medio químicamente definido AZEVEDO & ROITMAN(1)

** El número entre paréntesis es el tiempo (días) de apareamiento de promastigotes en el respectivo tubo de cultivo

*** L. b. b. = *Leishmania braziliensis braziliensis*; I = Isoenzimas: ALAT, ASAT, G6PD; MAbs = Anticuerpos Monoclonales: 3F4F6 L. b. b. 4B9D10 L.B.; 3E6B11 L.b. 1F9D8 L.m.amaz., S = Sandflies, Lu.whitmani

▲ Proporciones no son significativamente diferentes (Test "t" $p = 0.05$)

Por otro lado, el medio AR-103, falló totalmente en el aislamiento primario de *Leishmania*.

En relación al tiempo de aparición de promastigotes en los tubos de cultivo inoculados, los 5 cultivos fueron positivos, en el medio DAB

entre el 2.º y 15.º día, después de sembrados. En el medio Schneider's los 7 "stocks", se presentaron positivos entre el 2.º y 29.º día. En ésta serie de 33 pacientes obtuvimos aproximadamente 25% de aislamiento primario de *Leishmania* en el medio DAB. Cinco de los "stocks" fueron identificados como *L. b. braziliensis*, por sus padrones electroforéticos con las enzimas ALAT (E.C.2.6.1.2. Alanino Aminotransferasa), ASAT (E.C.2.6.1.1. Aspartato Aminotransferasa) y G6PD (E.C.1.1.1.49 Glucosa-6 Fosfato dehidrogenasa). (TABLA I).

Resultados confirmatorios fueron obtenidos con los anticuerpos monoclonales especie y subespecie específicos a través de la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta (IFAT-MAbs).

El padrón Peripylaria fué comprobado en 2 stocks caracterizados previamente por las técnicas de isoenzimas y serológicas (stocks, 17 y 20).

La TABLA II presenta los resultados de 5 observaciones de campo donde el medio DAB fué comparado con el medio de EVANS, entre Enero de 1983 y Abril de 1984. Hubo gran variación en los resultados entre los diversos grupos. En dos ocasiones poca diferencia pudo ser detectada en la capacidad de ambos medios para aislar *L. b. braziliensis*. En una ocasión el medio EVANS fué superior, y en las dos últimas ocasiones el DAB fué definitivamente superior. Las razones para explicar esas variaciones no son claras.

T A B L A II

Comparación de la sensibilidad de dos medios de cultivo, en condiciones de campo, en 6 ocasiones diferentes en un total de 149 pacientes con lesiones de Leishmaniasis cutánea

Fecha del cultivo	Sensibilidad *				Total de pares de tubos	Positividad		Contaminación	
	D A B (++)	(+-)	Versus Evans (-+)	(--)		N.º DAB	% Evans	N.º DAB	% Evans
Enero 83	1	0	2	17	20	1 (5)	3 (15)	8 (40)	11 (55)
Mayo 83	2	1	1	14	18	3 (17)	3 (17)	6 (33)	7 (39)
Julio 83	1	0	8	9	18	1 (5)	9 (50)	2 (11)	3 (17)
Febrero 84	2	15	0	20	37	17 (45)	2 (5)	4 (11)	1 (3)
Abril 84	2	22	0	32	56	24 (43)	2 (3.6)	21 (37)	9 (16)
Total	8	38	11	92	149	46 (30.8)	19 (12.7)	41 (27.5)	31 (20.8)

* Los símbolos entre paréntesis indican = (++) positividad por ambos medios; (+-) positividad por el primer medio, DAB; (-+) positividad por el segundo medio comparado; (--) negatividad por ambos medios comparados.

Los resultados de las dos últimas observaciones, en 1984, son netamente superiores a los 3 estudios previos. La media de aislamiento para el DAB fué de 30.8% y para el EVANS, sólo de 12.7%.

La contaminación de los medios, en condiciones de campo, es tolerable, a pesar de la adición de antimicrobianos (24% para el DAB y 20% para los cultivos de EVANS).

En la TABLA III son presentados los resultados obtenidos cuando realizamos, en cada paciente, 3 aspiraciones consecutivas en la misma úlcera leishmanial. Esos resultados demuestran un incremento significativo ($p <$

0.005) en el aislamiento primario de *Leishmania*. Los porcentajes pasaron de 20.4%, cuando analizamos un solo aspirado, para 51% después de las 3 aspiraciones inoculadas, individualmente, en un tubo de Medio DAB. Similares resultados fueron obtenidos con otro grupo de 15 pacientes en que conseguimos 26.7% (en el primer aspirado), 33.3% (en el segundo) y 46.7% (con el tercer aspirado), respectivamente (no presentados en la TABLA III).

La TABLA IV demuestra que a pesar que las aspiraciones del material de las lesiones fueron ejecutadas en 3 sitios diferentes de la úlcera, no hubo diferencia significativa (Coch

T A B L A III

Aislamiento primario de *Leishmania* por aspiraciones consecutivas de material de la misma lesión en un grupo de 49 pacientes con lesiones cutáneas

Aspiraciones	Positividad/Total de pacientes acumulada		%	Límite binomial de confianza 95%	
1a. Muestra	10	49	20.4*	10.2	— 34.3
2a. Muestra	18	49	36.7*	23.4	— 51.7
3a. Muestra	25	49	51.0*	36.3	— 65.6

* Diferencia estadística significativa. Test de Cochran, $p < 0.005$

ran $p > 0.1$) entre las tres tasas de aislamiento (10, 13 y 18 tubos positivos, respectivamente) sugiriendo una uniforme distribución de los amastigotes en la lesión.

T A B L A IV

Interrelación entre tres aspiraciones consecutivas en diferentes sitios y en la misma lesión en el aislamiento primario de *Leishmania braziliensis braziliensis*

	Primer	Aspirado	Total		Segundo	Aspirado	Total
	+	—			+	—	
Segundo +	5	8	13*	Tercer +	9	9	18*
Aspirado —	5	31	36	Aspirado —	4	27	31
Total	10*	39	49	Total	13	36	49

* Parecen comportarse con la misma sensibilidad pues no existe diferencia estadística significativa, Test de Cochran $p > 0.1$

1.º y 2.º = $X^2 0.05 < p < 0.1$ (interacción)

2.º y 3.º = $X^2 0.001 < p < 0.025$ (fuerte interacción)

DISCUSION

En los estudios epidemiológicos de Leishmaniasis Tegumentaria Americana las técnicas de diagnóstico generalmente visaron la demostración de los amastigotes de las lesiones. Procedimientos comunmente empleados fueron los frotices, en láminas, histología y la inoculación de hamsteres. Actualmente, aumentó el interés por el aislamiento primario y posterior identificación taxonómica de *Leishmania*, siendo que los métodos disponibles utilizan los promastigotes del parásito. Hubo entonces la necesidad de mejores y eficientes medios y técnicas en el aislamiento primario de *Leishmania*. Se dice que es prioritario identificar los parásitos responsables por las diversas manifestaciones clínicas de la enfermedad¹⁷ especialmente en las infecciones mucocutáneas¹⁸.

En la literatura, han surgido contradicciones relacionadas con la selección del medio más apropiado para el aislamiento primario y mantenimiento "in vitro" de *Leishmania*, especialmente de la subespecie *L. b. braziliensis*^{9,10,4}. En la opinión de algunos investigadores como

MAYRINK et al.¹⁵ los cultivos son de poco valor práctico por su contaminación frecuente y porque los parásitos, que fueron aislados "in vitro", también fueron encontrados en los frotices coloreados.

El crecimiento en cultivos de *L. b. braziliensis* es un problema que ha dificultado, durante mucho tiempo, el progreso de la investigación epidemiológica de leishmaniasis tegumentaria^{11,13}. Sin embargo, parecería que aún entre los propios aislados de *L. b. braziliensis*, existe una variación en su capacidad de adaptación al crecimiento artificial y a su multiplicación en los diversos medios de cultivo. Muy recientemente EVANS et al.¹⁸ cultivaron, según describen, en forma fácil *L. braziliensis* de pacientes que habían contraído la infección en Belize, utilizando los medios difásicos DAB (Blood Agar Difco) y EVANS (Evans Modified, Tobie's Medium). HERRER (comunicación personal) no encuentra dificultades en el cultivo de *L. b. peruviana*, en NNN clásico.

Nuestra experiencia, cultivando *L. b. braziliensis* de lesiones humanas cutáneas y co-

lectando el material en los puestos de salud en las áreas endémicas de Bahía demuestra, que *L. b. braziliensis* es relativamente difícil de aislar y de cultivar (aproximadamente 50% de éxito en su aislamiento primario). Esto se deduce de nuestros resultados obtenidos con el empleo de los medios DAB y EVANS. En relación al crecimiento en masa de los parásitos, los medios TC-199 y Schneider's, suplementados con 20% de suero bovino fetal, han demostrado en nuestro laboratorio resultados satisfactorios¹⁶. En seis oportunidades hemos comprobado que aislados de *L. b. b.* con desarrollo en hamsteres, han fracasado en su crecimiento en medios de cultivo líquidos y de agar sangre (observaciones no publicadas).

Apesar de haber comprobado similar sensibilidad en el aislamiento primario de *L. b. b.* entre los medios DAB y SCHNEIDER's, concordamos con SHAW & LAINSON¹⁹ en señalar que el precio elevado del suero bovino fetal y dificultades en su obtención inviabiliza el empleo del medio líquido monofásico en los estudios de gran escala y de campo, en leishmaniasis.

Posteriormente comparamos la utilidad de los medios difásicos de agar sangre DAB y EVANS, seguramente más económicos y sensibles¹⁶. Los resultados se presentaron parcialmente confundidos por un período de aparente anomalía registrado por el medio de EVANS (Febrero 1983) que inexplicablemente invirtió significativamente su rendimiento. Hemos revisado cuidadosamente la preparación del medio utilizando la propia formulación enviada por el Dr. D. Evans, sin descubrir las razones para dicha variación. El propio EVANS et al.,⁸ utilizó, con mejores resultados, una modificación del Medio EVANS sin comentar, entretanto, el porque de su abandono y modificación.

Una siguiente etapa lógica fué la del empleo único del medio DAB de probada sensibilidad en nuestras manos, y perfeccionamiento del procedimiento de colecta del material a inocular. El raciocinio de realizar 3 aspirados consecutivos en diferentes sitios de la misma lesión del paciente mostró que, las aspiraciones previas no interfirieron en la sensibilidad de las subsecuentes, sugiriendo una probable

asociación entre la positividad del primero y los dos siguientes aspirados (TABLA 4) y además que los parásitos podrían estar distribuidos uniformemente, en las lesiones activas. Podría ser interesante comparar estos resultados con los obtenidos por el empleo de las 3 aspiraciones inoculadas en el mismo tubo.

Por otro lado, teóricamente, aquellas técnicas que utilizan anticuerpos monoclonales e hibridización del k-DNA son las más rápidas y sensibles para el diagnóstico de pacientes de leishmaniasis, porque ellas pueden ser aplicada directamente en los tejidos o en los froctos de células de las lesiones. Ellas tienen el potencial de poder constituirse, en el futuro, útiles en las investigaciones epidemiológicas de leishmaniasis, sin embargo actualmente son técnicas de laboratorio de investigación especializada, WHO²³. Pensamos que, durante un buen tiempo, continuaremos a usar las técnicas de diagnóstico parasitológico tradicionales que objetivan aislar los promastigotes y amastigotes de *Leishmania braziliensis braziliensis*. En éste sentido, éste laboratorio, con la metodología de cultivo descrita, es capaz de identificar un aislado de *Leishmania*, dos semanas después del examen clínico del paciente en la área endémica.

Esto último es obviamente importante para el pronóstico y tratamiento del individuo.

Finalmente, nos encontramos estimulados por haber logrado reducir a 30% el índice de contaminación de nuestros cultivos. Esta figura es tolerable y quizá compensada por nuestro registro, en condiciones de campo, de 50% de aislamiento primario del parásito un porcentaje mayor al registrado por éste laboratorio anteriormente⁷ y al descrito para "Uta" y "espundia", por LLANOS CUENTAS et al.¹⁴.

SUMMARY

The viability of the "in vitro" cultivation procedure as a practical tool for diagnosis and primary isolation of *Leishmania braziliensis braziliensis*. 2. A study of patients from endemic areas.

In vitro cultivation of Lbb is a useful method in the field for primary isolation of

this leishmanial subspecies. Cultures in biphasic blood agar media (DAB and Evans) and liquid media (Schneiders and AR 103) done in patients with cutaneous leishmanias showed.

1. A similar sensibility in DAB and Schneiders medium when needle aspirates were used to seed the cultures;
2. That DAB medium performed well when compared with Evans medium;
3. A rise in isolation of Lbb if 3 aspirations taken from different sites in the same lesion were cultivated (50% positivity with DAB medium).

REFERENCES

1. AZEVEDO, H. P. & ROITMAN, I. — Cultivation of *Trypanosoma cruzi* in defined media. In: MOREL, C. M., ed. — *Genes and antigens parasites. A laboratory manual*. 2nd. ed. Rio de Janeiro, Fundação Oswaldo Cruz, 1984. p. 29-36.
2. BARKER, D. C. & BUTCHER, J. — The use of DNA probes in the identification of leishmanias: discrimination between isolates of the *Leishmania mexicana* and *L. braziliensis* complex. *Trans. roy. Soc. trop. med. Hyg.*, 77: 285-297, 1983.
3. BARRETO, A. C.; CUBA CUBA, C. A.; MARSDEN, P. D.; VEXENAT, J. & BELDER, M. — Características epidemiológicas de Leishmaniose Tegumentar Americana em uma região endêmica do Estado da Bahia, Brasil. 1. Leishmaniose humana. *Bolet. Ofic. sanit. panamer.*, 90: 415-424, 1981.
4. CHANG, K. P. & FISH, W. R. — *Leishmania* In: JENSEN, J. B., ed. — *In vitro cultivation protozoa pathogenic to men and domestic animals*. Boca Raton, Florida, CRC Press, 1981, p. 2-91.
5. CUBA, C. A.; VEXENAT, A. J.; LLANOS, E. A.; MARSDEN, P. D.; BARRETO, A. C. & ROSA, A. C. — Experimental infections of wild caught specimens of *Lutzomyia (N) whitmani* (Diptera, Psychodidae) and their use for *Leishmania* identification. In: REUNIAO ANUAL SOBRE PESQUISA BASICA EM DOENÇA DE CHAGAS. 9., Caxambu, 1982. Programa e resumos. Belo Horizonte, CNPq: FINEP, 1982. p. 149.
6. CUBA CUBA, C. A.; NETTO, M. E.; COSTA, L. J.; ROSA, A. de C.; BARRETO, A. C. & MARSDEN, P. D. — Cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis braziliensis*: Improving diagnosis by primary isolation in culture. In: REUNIAO ANUAL SOBRE PESQUISA BASICA EM DOENÇA DE CHAGAS, 11., Caxambu, 1984. Programa e resumos. Ribeirão Preto, PIDE: CNPq, 1984. p. 129.
7. CUBA CUBA, C. A.; MILES, M. A.; VEXENAT, J. A.; Mc MAHON PRATT, D.; BARKER, D. C.; BUTCHER, J. D.; BARRETO, A. C. & MARSDEN, P. D. — A focus of mucocutaneous leishmaniasis in Três Braços, Bahia, Brazil. Characterization and identification of *Leishmania* stocks isolated from man and dogs. *Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg.*, 79: 500-507, 1985.
8. EVANS, D. A.; LANHAM, S. M.; BALDWIN, C. I. & PETERS, W. — The isolation and isoenzyme characterization of *Leishmania braziliensis* sbsp. from patients with cutaneous leishmaniasis acquired in Belize. *Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg.*, 78: 35-42, 1984.
9. HENDRICKS, L. D. & WRIGHT, N. — Diagnosis of cutaneous leishmaniasis by "in vitro" cultivation of saline aspirate in Schneider's *Drosophila* medium. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 28: 962-964, 1979.
10. HENDRICKS, L. D. & CHILDS, G. E. — Present knowledge of the in vitro cultivation of *Leishmania*. In: *THE IN VITRO CULTIVATION OF THE PATHOGENS OF TROPICAL DISEASES*. Basel, Schwabe & Co. AG, 1980. p. 251-272. (Tropical Diseases Research Series No. 3).
11. LAINSON, R. & SHAW, J. J. — Some problems in studies on parasites of the *Leishmania braziliensis* complex. In: *Ecologie des Leishmanioses. Colloques Internationaux du CNRS, n.º 239*. Montpellier, 1977. p. 83-86.
12. LAINSON, R. & SHAW, J. J. — The role of animals in the epidemiology of South American Leishmaniasis. In: LUMSDEN, W. H. R. & EVANS, D. A., ed. — *Biology of the kinetoplastida*. London, Academic Press, 1979. v. 2, p. 1-116.
13. LAINSON, R. — Our present knowledge of the ecology and control of Leishmaniasis in the Amazon region of Brazil. *Rev. Soc. bras. Med. trop.*, 18: 47-56, 1985.
14. LLANOS CUENTAS, A.; ARANA, M.; MONTOYA, Y.; CAMPOS, M. & ROMERO, G. — Aislamiento primario de *Leishmania* sp. de pacientes en áreas endémicas del Perú. In: REUNIAO ANUAL SOBRE PESQUISA BASICA EM DOENÇA DE CHAGAS, 11., Caxambu, 1984. Programa e resumos. Ribeirão Preto, PIDE: CNPq, 1984. p. 58.
15. MAYRINK, W.; WILLIAMS, P.; COELHO, M. V.; DIAS, M.; VIANNA MARTINS, A.; MAGALHÃES, P. A.; DA COSTA, C. A.; FALCAO, A. R.; MELO, M. N. & FALCAO, A. L. — Epidemiology of dermal leishmaniasis in the Rio Doce Valley State of Minas Gerais, Brazil. *Ann. trop. Med. Parasit.*, 73: 124-137, 1979.
16. NETTO, E. M.; CUBA CUBA, C. A.; MARSDEN, P. D. & BARRETO, A. C. — El método de cultivo "in vitro" como instrumento práctico en el diagnóstico y el aislamiento primario de *Leishmania braziliensis braziliensis* I. Observaciones de Laboratorio. *Rev. Soc. bras. Med. trop.*, 1985 (apresentado para publicación)
17. PETERS, W.; EVANS, D. A. & LANHAM, S. M. — The importance of parasite identification in cases of Leishmaniasis. *J. roy. Soc. Med.*, 76: 540-542, 1983.

18. SARAIVA, N. G.; HOLGUIN, A. F.; Mc MAHON PRATT, D. & D'ALESSANDRO, A. — Mucocutaneous Leishmaniasis in Colombia: *Leishmania braziliensis* subspecies diversity. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 34: 714-720, 1985.
19. SHAW, J. J. & LAINSON, R. — The "in vitro" cultivation of members of the *Leishmania braziliensis* complex. *Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg.*, 75: 127, 1981.
20. URJEL, R.; RECACOECHEA, M.; LA FUENTE, C. & ORELLANA A., H. — Simple method for the collection of material from cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis lesions. *Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg.*, 77: 882-883, 1973.
21. WALTON, B. C.; SHAW, J. J. & LAINSON, R. — Observations on the "in vitro" cultivation of *Leishmania braziliensis*. *J. Parasit.*, 63: 1118-1119, 1977.
22. WORLD HEALTH ORGANIZATION — Report of the Fourth Meeting of the Scientific Working Group on Immunology of Leishmaniasis. UNDP/WORLD/BANK/WHO TDR (4), 1982.
23. WIRTH, D. F. & Mc MAHON PRATT, D. — Rapid identification of *Leishmania* species by specific hybridisation of kinetoplast DNA in cutaneous lesions. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 79: 6999-7003, 1982.

Recebido para publicação em 12/11/1985.