

Les *Leishmania* de Bolivie II. *Leishmania chagasi* Cunha et Chagas, 1937

Premiers isollements dans les « Yungas » du Département de La Paz

Comparaison isoenzymatique de souches de l'Homme, du Chien et du Phlébotome *Lutzomyia longipalpis* (Lutz et Neiva, 1912)

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

RÉSUMÉ — Un foyer de leishmaniose viscérale a été mis en évidence dans les Yungas du Département de La Paz. Le premier cas humain autochtone a pu être diagnostiqué en 1982 dans cette région. L'infection cutanée et viscérale du Chien a été démontrée. Enfin, dans ce même foyer, *Lutzomyia longipalpis* a été trouvé spontanément infecté (0,8 à 4,2 % des spécimens disséqués, selon le lieu de capture). Le typage isoenzymatique, en acétate de cellulose des stocks provenant du cas humain, de Chiens (3) et de spécimens de *Lu. longipalpis* (5), comparativement à des souches de référence du Brésil et du pourtour méditerranéen, a permis de les rattacher à *Leishmania chagasi*. Leur similitude, appréciée sur 13 enzymes, a permis de confirmer le rôle du réservoir domestique du Chien, ainsi que le rôle vecteur de *Lu. longipalpis* dans ce même foyer viscéral. Les origines évolutive et géographique des souches du complexe *L. donovani* s.l., et plus particulièrement celles de Bolivie, sont discutées.

MOTS-CLÉS — *Leishmania chagasi* — *Lutzomyia longipalpis* — Bolivie — Taxonomie biochimique — Isoenzymes — Biogéographie.

INTRODUCTION

La leishmaniose viscérale humaine était pratiquement méconnue en Bolivie jusqu'à une date récente; seuls trois cas avaient été décrits [6, 22, 44]. De fait, en Amérique du Sud, les principales études épidémiologiques ont été menées au Brésil, spécialement dans le nord-est où le Phlébotome *Lutzomyia longipalpis* était depuis longtemps présumé être le vecteur de l'affection sur la base de nombreux arguments indirects [14, 33, 36, 42]. Toutefois, peu d'infections naturelles avaient été mises en évidence [13, 42, 52, 53] et aucune caractérisation isoenzymatique n'avait été réalisée. En Bolivie, Velasco [55], réalisant en 1973 un inventaire de la faune phlébotomienne des Yungas, avait noté pour la première fois la fréquence en milieu péri-domestique de *Lu. longipalpis* (65 % des captures). Quant aux études concernant les réservoirs animaux, elles avaient été principalement réalisées au Brésil où l'infection du Chien avait été précocement mise en évidence [9] et retrouvée par la suite par de nombreux auteurs [3, 13, 43]. Parallèlement, certains réservoirs selvatiques étaient identifiés : les Renards, *Lycalopex vetulus* [12, 15] et *Cerdocyon thous* [31, 34, 36].

* Institut Pasteur, Paris, France/Instituto Boliviano de Biología de Altura, La Paz, Bolivia.

** ORSTOM, Paris, France/Instituto Boliviano de Biología de Altura, La Paz, Bolivia.

*** Instituto Boliviano de Biología de Altura, La Paz, Bolivia.

30 OCT. 1989

ORSTOM Fonds Documentaire

N° : 27.016 ex 1

Cote : B M

29

P1521

En Bolivie, la présence de leishmaniose viscérale canine avait été signalée dans les Yungas du Département de La Paz [5], suggérant l'existence de cas humains autochtones. Cependant, jusqu'ici, aucune souche de leishmaniose viscérale n'avait été isolée.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

DÉPISTAGE DES CAS HUMAINS DE LEISHMANIOSE VISCÉRALE ET ISOLEMENT DE STOCKS

A la suite du dépistage clinique, l'étude immunologique a été réalisée par intradermoréaction à la leishmanine, immunofluorescence indirecte et immunoélectrophorèse. L'étude parasitologique a consisté à procéder à une ponction de la crête iliaque, aux fins de pratiquer frottis, coloration et culture (NNN modifié) [16] ; en cas d'isolement positif, les cultures étaient repiquées chaque semaine.

CAPTURE DE PHLÉBOTOMES, ISOLEMENT DES STOCKS

L'enquête a été menée dans les Yungas du Département de La Paz, à une altitude allant de 900 à 1 400 mètres. Les Phlébotomes récoltés étaient identifiés par les genitalia ; les femelles étaient disséquées. En cas d'infection, le tube digestif était prélevé et deux tubes de milieu NNN modifié étaient ensemencés. Par la suite, un contrôle hebdomadaire était effectué.

DÉPISTAGE DES CHIENS INFECTÉS, ISOLEMENT DE STOCKS

Les Chiens cliniquement suspects étaient étudiés sérologiquement ; après autopsie, des prélèvements de foie, rate et moelle osseuse étaient systématiquement ensemencés sur milieu de culture.

CULTURES DE MASSE, PRÉPARATION DU MATÉRIEL POUR ÉLECTROPHORÈSE

La multiplication du parasite à partir de tubes de 10 ml a été obtenue par ensemencement de flacons de 200 ml. Après récolte, les cultures ont été centrifugées à 2 500 t/mn (4°C) pendant 10 minutes, puis lavées trois fois. Les culots ont été stockés à - 80°C. Avant l'électrophorèse, un stabilisateur hypotonique d'enzymes a été ajouté, à volume égal [23]. La lyse des promastigotes a été obtenue par congélation/décongélation trois fois consécutives.

CARACTÉRISATION ISOENZYMATIQUE

Les électrophorèses en acétate de cellulose ont été réalisées selon la technique de Tibayrenc et Le Ray [54], adaptée de Lanham et coll. [39]. Toutefois, la glutamate-oxaloacétate transaminase (GOT) a été révélée selon la méthode de Kreutzer et coll. [27], en utilisant comme tampon de migration le tampon HR Helena (force ionique 0,75).

Les 13 systèmes enzymatiques suivants ont été employés : malate déshydrogénase (MDH) EC 1.1.1.37, enzyme malique (ME) EC 1.1.1.40, isocitrate déshydrogénase (ICD) EC 1.1.1.42, 6 phosphogluconate déshydrogénase (PGD) EC 1.1.1.44, glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD) EC 1.1.1.49, glutamate déshydrogénase Nad⁺ (GDH Nad⁺) EC 1.2.1.2, glutamate déshydrogénase Nadp⁺ (GDH Nadp⁺) EC 1.4.1.2, glutamate-oxaloacétate transaminase (GOT) EC 2.6.1.1, phosphoglucomutase (PGM) EC 2.7.5.1, peptidase : substrat L-leucyl-leucyl-leucine (PEP) EC 3.4.11, aconitate hydrolase (ACON) EC 4.2.1.3, mannose phosphate isomérase (MPI) EC 5.3.1.8, glucose phosphate isomérase (GPI) EC 5.3.1.9.

Six souches de référence ont été utilisées lors de cette étude (tableau I).

TABLEAU I
Souches de référence utilisées.

<i>Leishmania</i>	Hôte	Origine géographique	Code international
<i>L. infantum</i> Nicolle, 1908	Homme	Maroc	MHOM/MA/67/ITMAP 263
<i>L. chagasi</i> Cunha et Chagas, 1937	Homme	Etat de Bahia, Brésil	MHOM/BR/74/M2682
<i>L. donovani</i> (Laveran et Mesnil, 1903)	Homme	Inde	MHOM/IN/00/HS70
<i>L. braziliensis</i> Vianna, 1911	Homme	Etat du Pará, Brésil	MHOM/BR/75/M2904
<i>L. amazonensis</i> Lainson et Shaw, 1972	<i>Lutzomyia flaviscutellata</i>	Etat du Pará, Brésil	IFLA/BR/67/PH8
<i>L. deaneii</i> Lainson et Shaw, 1977	<i>Coendou prehensilis</i>	Etat du Pará, Brésil	MCOE/BR/78/M5088

RÉSULTATS

DÉPISTAGE DU PREMIER CAS HUMAIN

Chez un enfant de 2 ans et 2 mois, le tableau clinique très caractéristique a fait évoquer le diagnostic de leishmaniose viscérale, diagnostic qui fut confirmé sérologiquement. Les frottis ont été positifs à l'examen direct. La culture a permis l'isolement d'une souche au 4^e jour [17].

INFESTATION DE LU. LONGIPALPIS

Lu. longipalpis a représenté 96 % de l'ensemble des Phlébotomes capturés en situation péri-domestique. 2 578 femelles ont été disséquées. Le taux d'infestation naturelle dans trois localités différentes variait de 0,8 % à 4,2 % [41]. La localisation suprapylorique et la grande taille des parasites suggéraient leur appartenance au complexe *Leishmania donovani* [38]. Cinq souches ont été isolées.

INFESTATION CANINE

Cinq Chiens suspects, confirmés sérologiquement, ont été autopsiés. Des fragments de foie, rate et moelle osseuse ont été mis en culture. Sur les cinq souches isolées, trois ont pu être maintenues en culture.

CARACTÉRISATION ISOENZYMATIQUE DES SOUCHES

Au total, neuf souches ont été identifiées : cinq provenant de femelles de *Lu. longipalpis*, trois de Chiens, et une du cas humain (tableau II).

TABLEAU II
Provenance des souches leishmaniennes étudiées.

No. du stock	Organe infecté	Origine	Hôte
ILON/BO/83/LPZ-391	Tube digestif (supra-pylorique)	Nord-Yungas	<i>Lu. longipalpis</i>
ILON/BO/83/LPZ-392	»	»	<i>Lu. longipalpis</i>
ILON/BO/83/LPZ-422	»	»	<i>Lu. longipalpis</i>
ILON/BO/83/LPZ-443	»	»	<i>Lu. longipalpis</i>
ILON/BO/83/LPZ-597	»	»	<i>Lu. longipalpis</i>
MCAN/BO/81/LPZ-06	Moelle osseuse, foie, rate	Sud-Yungas	Chien
MCAN/BO/81/LPZ-08	»	Sud-Yungas	Chien
MCAN/BO/83/LPZ-225	»	Nord-Yungas	Chien
MHOM/BO/82/LPZ-18	Moelle osseuse	Sud-Yungas	Homme

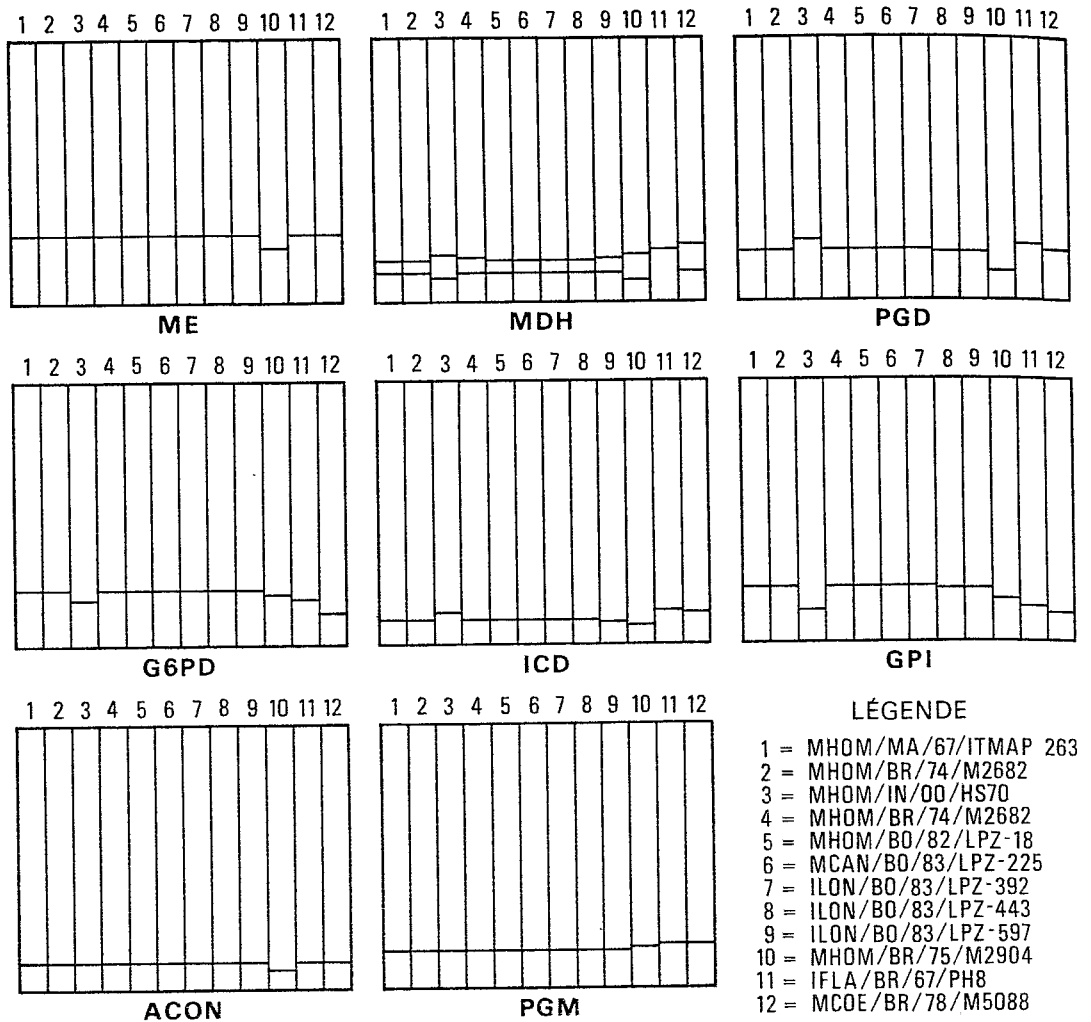


Figure 1 — Souches leishmaniennes de Bolivie.
Diagramme des résultats électrophorétiques.

Pour les 13 enzymes et les neuf souches étudiées, l'électrophorèse a montré un profil isoenzymatique monomorphe (fig. 1). Par ailleurs, ces souches se sont avérées semblables aux deux souches de référence M2682 (*L. chagasi*) du Brésil et ITMAP 263 (*L. infantum*) du Maroc. A l'opposé, elle se sont différenciées de HS70 (*L. donovani*) de l'Inde, pour sept enzymes sur 13 : G6PD, ICD, MDH, PGD, GPI, GOT, MPI (degré de similitude protéique 40,5%).

TABLEAU III

Degré de similitude protéique entre espèces du complexe *Leishmania donovani* (% de bandes communes en électrophorèse d'isoenzymes en acétate de cellulose).

	<i>L. infantum</i>	<i>L. chagasi</i>
<i>L. chagasi</i>	13/13 100 %	—
<i>L. donovani</i>	6/13 40,5 %	6/13 40,5 %

Par ailleurs, les souches de référence des complexes *L. amazonensis* (PH8), *L. braziliensis* (M2904) et *L. deanei* (M5088) sont apparues différentes.

L'étude du degré de similitude protéique entre les souches de référence (exprimé en pourcentage d'électromorphes) a montré une similitude complète entre *L. chagasi* (M2682) et *L. infantum* (ITMAP 263); il s'est avéré être seulement de 40,5 % entre *L. donovani* (HS70) d'une part, *L. infantum* ou *L. chagasi* d'autre part (tableau III et fig. 2).

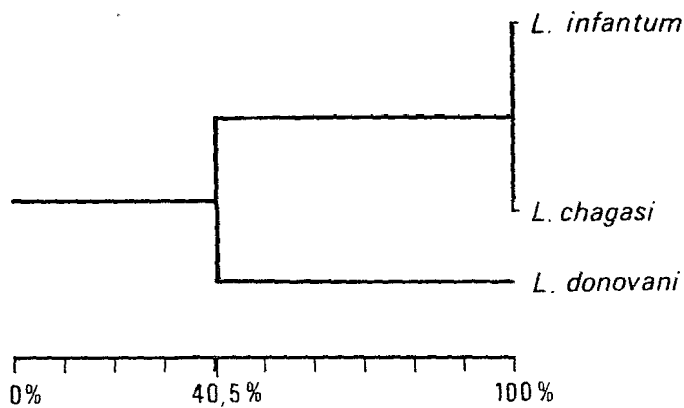


Figure 2 — Relation phylogénique supposée entre espèces du complexe *Leishmania donovani*, basée sur le degré de similitude protéique (% de bandes communes).

DISCUSSION

Cette étude concerne la première mention en Bolivie de souches dûment identifiées de *L. chagasi*. Elle précise les caractéristiques épidémiologiques du foyer de leishmaniose viscérale humaine et canine des Yungas du Département de La Paz, et pose le problème de l'origine autochtone ou importée de l'affection correspondante.

L'identification à *L. chagasi* des souches isolées de *Lu. longipalpis*, associée à d'autres arguments tels que la localisation suprapylorique des infections spontanées dans le tube digestif de *Lu. longipalpis*, accessoirement la grande taille des promastigotes et surtout leur similitude avec les souches isolées dans la même région de cas humains et canins, ont permis de conclure au rôle vecteur de *Lu. longipalpis* dans ce foyer. Jusqu'ici, en Amérique du Sud, la présomption de ce rôle ne reposait que sur des arguments indirects [33].

Mentionnons cependant que Ryan et coll. [48] avaient observé l'infection spontanée suprapylorique massive de 0,5 % de spécimens de *Lu. longipalpis* dans l'île de Marajo (État du Pará, Brésil); un isolat s'est avéré être en tous points semblable (caractères biologiques et biochimiques) à *L. chagasi* isolé de cas humains et de Renards de la même région. De même, en 1984, Lainson et coll. [35] ont trouvé dans le foyer de Santarem (État du Pará, Brésil) 7,14 % de *Lu. longipalpis* infectés et le parasite a été transmis au Hamster par piqûre de Phlébotomes sauvages.

Les résultats des analyses isoenzymatiques ont également permis de conclure au rôle de réservoir domestique du Chien dans le foyer des Yungas, où l'infection canine (cutanée et viscérale) est extrêmement commune. Toutefois, l'évolution rapide de la leishmaniose viscérale du Chien vers la mort fait supposer l'existence parallèle d'un autre réservoir domestique pour cette affection.

A l'origine, de nombreux auteurs ont, sur la base d'arguments morphologiques, biogéographiques et épidémiologiques, classé les agents étiologiques de la leishmaniose viscérale humaine en différentes espèces [8, 21, 24, 32, 45]. Par la suite, les caractères intrinsèques, et tout spécialement la mobilité électrophorétique des isoenzymes, se sont imposés comme critères majeurs de classification [4, 7, 10, 11, 18, 20, 25, 33, 47, 50, 51].

Plus récemment, des souches provenant de zones géographiques fort diverses (telles que Amérique du Sud, région Méditerranéenne, Afrique, Inde), ont été étudiées selon différentes méthodes : gradient de densité de flottation de l'ADN, facteur excrété, électrophorèse des isoenzymes. Sur la base de sept systèmes enzymatiques différents, Schnur et coll. [51] ont ainsi comparé 84 stocks, incluant des souches du Nouveau Monde (provenant du Honduras et du Brésil); 76 d'entre eux se sont avérés similaires ou avec parfois un enzyme variant. Les auteurs en ont conclu à l'étonnante homogénéité des souches contrastant avec la diversité de leur origine géographique.

Parallèlement, Peters et coll. [46] ont étudié dans quatre systèmes enzymatiques la mobilité électrophorétique de stocks provenant de cas de kala-azar de différentes régions de l'Inde. Ils ont démontré parmi les stocks de la région du Nord-Bihar la prédominance de *L. donovani*, différent de *L. infantum* du pourtour méditerranéen, tout en notant l'existence de *L. infantum* dans la région de Calcutta. De même, Lanotte et coll. [40] ont étudié 146 stocks de l'Ancien Monde par électrophorèse en gel d'amidon avec huit enzymes ; par taxonomie numérique, ils ont individualisé deux complexes, l'un oriental (*L. donovani*), l'autre occidental (*L. infantum*), notant pour chacun d'eux une importante hétérogénéité. Enfin, Lainson et coll. [30] ont distingué les stocks de *L. donovani* de l'Inde, du Kenya et de l'Ethiopie, d'un stock de *L. infantum* de France, par un système enzymatique (GOT) en gel d'amidon.

Nos résultats, bien que portant seulement sur deux souches de référence (HS70 et IT-MAP 263), ont clairement confirmé les différences existant entre *L. donovani* et *L. infantum*, puisque sept systèmes enzymatiques ont permis de les distinguer.

Les résultats de cette étude : similitude totale entre la souche de référence de *L. chagasi* (M2682) du Brésil et celle de *L. infantum* (ITMAP 263) du Maroc, viennent s'inscrire dans le cadre d'un vaste débat concernant l'origine autochtone ou importée des souches de leishmanioses viscérales du Nouveau Monde.

Différentes hypothèses ont successivement été émises :

I. Adler [1] s'est opposé à l'hypothèse d'une importation des souches viscérotropes du Nouveau Monde, en raison du problème de l'adaptation, fort improbable selon lui, de *L. infantum* au vecteur du Nouveau Monde, *Lu. longipalpis*.

II. Gardener [19], Chancé [10], Lanotte et coll. [40], Schnur et coll. [49], ont évoqué la possibilité d'une importation par les colons ou les esclaves, en raison de la similitude observée en électrophorèse d'isoenzymes, des stocks du Nouveau et de l'Ancien Monde.

III. Par contre, Lainson et Shaw [33], bien que n'ayant pu différencier des stocks du Brésil, du Honduras et du pourtour méditerranéen, se sont prononcés en faveur d'une origine autochtone sur les arguments suivants :

- dissémination extrêmement rapide de la maladie du Mexique à l'Argentine,
- rareté des cas humains en Afrique de l'Ouest, et différence du tableau clinique en Afrique de l'Est,
- existence très vraisemblable de la maladie canine avant la colonisation par les Européens, en raison de sa très grande distribution géographique,
- extrême stabilité des foyers de leishmaniose viscérale en zone méditerranéenne, en particulier spécificité vis-à-vis du sous-genre *Larrousius*.

IV. Toutefois, Killick-Kendrick et coll. [26] ont obtenu en 1980 le développement de *L. infantum* dans l'intestin moyen de *Lu. longipalpis*, démontrant la possibilité de transmission des souches de l'Ancien Monde par des Phlébotomes néotropicaux, argument qui plaide en faveur de l'importation de certains stocks par les Chiens importés.

V. Enfin, Lainson [28, 29] a évoqué la possibilité d'une multiplicité des parasites agents de la leishmaniose viscérale américaine (certains seraient autochtones, d'autres importés) et la difficulté à cultiver certains stocks, opérant peut-être une contre-sélection.

Nos résultats (similitude entre les souches de référence *L. chagasi* et *L. infantum* étudiées) sont en faveur d'une importation récente des souches au Nouveau Monde, mais pour pouvoir conclure définitivement, de nombreux stocks provenant tant d'Amérique du Sud que d'Amérique Centrale devront être examinés. La standardisation des techniques, de même que l'usage de souches de référence communes, s'avèrent indispensables pour l'étude comparative des résultats provenant de différents laboratoires. Enfin, d'autres techniques, telles que l'étude de l'ADN kinétoplastique ou l'obtention d'anticorps monoclonaux, doivent être utilisées en parallèle des études isoenzymatiques pour faire une comparaison globale.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient les Drs R. Lainson et J.-J. Shaw, de l'Institut Evandro Chagas de Belém (Pará, Brésil), ainsi que le Dr D. Le Ray, de l'Institut de Médecine Tropicale d'Anvers (Belgique), qui leur ont fourni les souches de référence de *Leishmania*.

Cette étude a été réalisée grâce à des fonds du Ministère français de la Coopération (Service STD) et à une subvention du Programme Spécial pour la Recherche et la Formation concernant les Maladies Tropicales du PNUD/Banque Mondiale/OMS.

Leishmania of BoliviaII. *Leishmania chagasi* Cunha and Chagas, 1937

First isolation in the « Yungas » of La Paz Department

An isozymic comparison of stocks from a human case, dogs and
Lutzomyia longipalpis (Lutz et Neiva, 1912)

SUMMARY — A focus of visceral leishmaniasis was revealed in the « Yungas » region in the Department of La Paz. The first human autochthonous case was diagnosed in this focus in 1982. Cutaneous and visceral leishmaniases in dogs were discovered. Finally, in the same focus, specimens of *Lutzomyia longipalpis*, compared with reference strains from Brazil and Morocco, showed that they were similar to *Leishmania chagasi*. Their similarity for 13 enzymes confirms the reservoir role of the domestic dog and the role of *L. longipalpis* as a vector in this focus of Bolivia. The geographical and evolutionary origins of strains of the *L. donovani* complex, especially those from Bolivia, are discussed.

KEY-WORDS — *Leishmania chagasi* — *Lutzomyia longipalpis* — Bolivia — Biochemical taxonomy — Isoenzymes — Biogeography.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Adler S. — *Leishmania*. In : Advances in parasitology. Dawes B., ed. Academic Press, New York/London, 1964, 2, 35-96.
- [2] Adler S., Theodor O. — Transmission of disease agents by phlebotomine sandflies. *Ann. Rev. Entomol.*, 1957, 2, 203-226.
- [3] Alencar J.E., Pessoa E.P., Costa O.R. — Calazar em Santarem, Estado do Pará. *Revta bras. Malar. Doenças trop.*, 1962, 14, 371-377.
- [4] Al Taqi M., Evans D.A. — Characterization of *Leishmania* spp. from Kuwait by isoenzyme electrophoresis. *Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg.*, 1978, 72, 56-65.
- [5] Angles R., Le Pont F., Desjeux P. — Visceral canine leishmaniasis in Bolivia. *Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg.*, 1982, 76, 704.
- [6] Arruda W., da Costa F.C., Nahas S., Rosenfeld G. — Leishmaniose visceral americana. Constatação de dois casos. *Bras. méd.*, 1949, 8/9, 63-65.
- [7] Brazil R.P. — Electrophoretic variation of the enzyme phosphoglucomutase in different strains of *Leishmania*. *Ann. trop. Med. Parasit.*, 1978, 72, 289-291.
- [8] Bray R.S. — *Leishmania*. *Ann. Rev. Microbiol.*, 1974, 28, 189-217.
- [9] Chagas E., Cunha A.M., Castro G.O., Ferreira L.C., Romana C. — Leishmaniose visceral americana. Relatório dos trabalhos realizados pela Comissão encarregada dos estudos da leishmaniose visceral americana em 1936. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, RJ., 1937, 32, 321-385.
- [10] Chance M.L. — The identification of *Leishmania*. In : Problems in identification of parasites and their vectors. Taylor A.E.R., Muller R., eds. Symp. Brit. Soc. Parasit. *Blackwell Scientific Publ.*, Oxford, 1979, 55-74.

- [11] Chance M.L., Gardener P.J., Peters W. — The biochemical taxonomy of *Leishmania* as an ecological tool. In: *Ecologie des leishmanioses. Coll. int. CNRS, n° 239, Montpellier (18-24 août 1974)*, 1977, 53-62.
- [12] Deane L.M. — Leishmaniose visceral no Brasil. *Serviço Nacional de Educação sanitaria*, Rio de Janeiro, RJ., Brasil, 1956.
- [13] Deane M.P., Deane L.M. — Infecção experimental do *Phlebotomus longipalpis* em caso humano de leishmaniose visceral. *Hospital*, Rio de Janeiro, RJ., 1954, 46, 487-489.
- [14] Deane M.P., Deane L.M. — Infecção experimental do *Phlebotomus longipalpis* em raposa (*Lycalopex vetulus*), naturalmente parasitada pela *Leishmania donovani*. *Hospital*, Rio de Janeiro, RJ., 1954, 46, 651-653.
- [15] Deane L.M., Deane M.P. — Visceral leishmaniasis in Brazil: geographic distribution and transmission. *Rev. Inst. Méd. trop. São Paulo*, 1962, 4, 198-212.
- [16] Decker-Jackson J.E., Honiberg B.M. — Glycoproteins released by *Leishmania donovani*: immunologic relationship with host and bacterial antigens and preliminary biochemical analysis. *J. Protozool.*, 1978, 25, 514-525.
- [17] Desjeux P., Aranda E., Aliaga O., Mollinedo S. — Human visceral leishmaniasis in Bolivia: first proven autochthonous case from « Los Yungas ». *Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg.*, 1983, 77, 851-852.
- [18] Ebert F. — Charakterisierung von *Leishmania donovani*. Stammen mit der Elektrophorese. *Z. Tropen-med. Parasit.*, 1973, 24, 517-524.
- [19] Gardener P.J. — Taxonomy of the genus *Leishmania*: a review of nomenclature and classification. *Trop. Dis. Bull.*, 1977, 74, 1069-1088.
- [20] Gardener P.J., Chance M.L., Peters W. — Biochemical taxonomy of *Leishmania*. II. Electrophoretic variation of malate dehydrogenase. *Ann. trop. Med. Parasit.*, 1974, 68, 317-325.
- [21] Garnham P.C.C. — The genus *Leishmania*. *Bull. Wld Hlth Org.*, 1971, 44, 477-489.
- [22] Gatti G., Boggino J., Prieto C. — Un nouveau foyer de leishmaniose viscérale en Amérique du Sud. *Bull. Soc. Path. exot.*, 1939, 32, 602-605.
- [23] Godfrey D.G., Kilgour V. — Enzyme electrophoresis in characterizing the causative organism of Gambian trypanosomiasis. *Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg.*, 1976, 70, 219-224.
- [24] Hommel M. — The genus *Leishmania*: biology of the parasite and clinical aspects. *Bull. Inst. Pasteur, Paris*, 1978, 75, 5-102.
- [25] Kilgour V., Gardener P.J., Godfrey D.G., Peters W. — Demonstration of electrophoretic variation of two aminotransferases in *Leishmania*. *Ann. trop. Med. Parasit.*, 1974, 68, 245-246.
- [26] Killick-Kendrick R., Molyneux D.H., Rioux J.A., Leaney A.J. — Possible origins of *Leishmania chagasi*. *Ann. trop. Med. Parasit.*, 1980, 74, 563-565.
- [27] Kreuzer R.D., Semko M.E., Hendricks L.D., Wright N. — Identification of *Leishmania* spp. by multiple isozyme analysis. *Am. J. trop. Med. Hyg.*, 1983, 32, 703-715.
- [28] Lainson R. — Leishmanial parasites of mammals in relation to human disease. In: *Animal disease in relation to animal conservation*. Edwards, Donnel, eds. *Symp. zool. Soc. Lond.*, 1982, 50, 137-179.
- [29] Lainson R. — The American leishmaniasis: some observations on their ecology and epidemiology. *Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg.*, 1983, 77, 569-596.
- [30] Lainson R., Miles M.A., Shaw J.J. — On the identification of viscerotropic leishmanias. *Ann. trop. Med. Parasit.*, 1981, 75, 251-253.
- [31] Lainson R., Shaw J.J. — Epidemiological considerations of the leishmanias, with particular reference to the New World. In: *Ecology and physiology of parasites*. Fallis A.M., ed. *University of Toronto Press*, Toronto, Canada, 1971, 21-57.
- [32] Lainson R., Shaw J.J. — Leishmaniasis of the New World: taxonomic problems. *Br. med. Bull.*, 1972, 28, 44-48.
- [33] Lainson R., Shaw J.J. — The role of animals in the epidemiology of South-American leishmaniasis. In: *Biology of the Kinetoplastida. vol. 2*. Lumsden W.H.R., Evans D.A., eds. *Academic Press*, London/New York, 1979, 1-116.
- [34] Lainson R., Shaw J.J., Lins Z.C. — Leishmaniasis in Brazil. IV. The fox *Cerdocyon thous* (L.) as a reservoir of *Leishmania donovani* in Pará State, Brazil. *Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg.*, 1969, 63, 741-745.
- [35] Lainson R., Shaw J.J., Ryan L., Ribeiro R.S.M., Silveira F.T. — Leishmaniasis in Brazil. XXI. Visceral leishmaniasis in the Amazon region and further observations on the role of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva, 1912) as the vector. *Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg.*, 1984, 1985, 79, 223-226.
- [36] Lainson R., Shaw J.J., Silveira F.T., Fraiha H. — Leishmaniasis in Brazil. XIX. Visceral leishmaniasis in the Amazon region, and the presence of *Lutzomyia longipalpis* on the island of Marajo, Pará State. *Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg.*, 1983, 77, 323-330.
- [37] Lainson R., Ward R.D., Shaw J.J. — Experimental transmission of *Leishmania chagasi*, causative agent of neotropical visceral leishmaniasis, by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Nature*, London, 1977, 266, 628-630.

- [38] Lainson R., Ward R.D., Shaw J.J. — *Leishmania* in phlebotomid sandflies. VI. Importance of hindgut development in distinguishing parasites of the *Leishmania mexicana* and *L. braziliensis* complexes. *Proc. R. Soc.*, London, ser. B, 1977, 199, 309-320.
- [39] Lanham S.M., Grendon J.M., Miles M.A., Póvoa M., de Souza A.A. — A comparison of electrophoretic methods for isoenzyme characterization of *Trypanosoma cruzi*. I. Standard stocks of *Trypanosoma cruzi* zymodemes from north-east Brazil. *Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg.*, 1981, 75, 742-750.
- [40] Lanotte G., Rioux J.A., Maazoun R., Pasteur N., Pratlong F., Lepart J. — Application de la méthode numérique à la taxonomie du genre *Leishmania* Ross, 1903. A propos de 146 souches originaires de l'Ancien Monde. Utilisation des allozymes. Corollaires épidémiologiques et phylétiques. *Annls Parasit. hum. comp.*, 1981, 56, 575-592.
- [41] Le Pont F., Desjeux P. — Leishmaniasis in Bolivia. I. *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva, 1912) as the vector of visceral leishmaniasis in « Los Yungas ». *Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg.*, 1985, 79, 227-231.
- [42] Lopes J.A.S. — *Phlebotomus longipalpis* naturalmente infectados com formas em leptomonas na cidade de Jacobina, Estado da Bahia. *Revta méd. Parana*, 1956, 25, 57-58.
- [43] Marzochi M.C.A., Toledo L.M., Marzochi K.B.F., Coutinho S.G., Tramontano N.C. — Leishmaniose visceral no Rio de Janeiro. Aspectos epidemiológicos. 19e Congr. Soc. bras. Med. trop., 1983. Abstracts, 60.
- [44] Monteiro de Barros O., Rosenfeld G. — Leishmaniose visceral americana. Um caso da Bolivia. *Revta clín. São Paulo*, 1942, 4, 91-99.
- [45] Nicoli R.M. — Le genre *Leishmania* R. Ross, 1903. *Bull. Soc. Path. exot.*, 1963, 56, 408-416.
- [46] Peters W., Chance M.L., Chowdhury A.B., Ghosh-Dastivar B., Nandy A., Kalra J.L., Sanyal R.K., Sharma M.I.D., Srivastava L., Schnur L.F. — The identity of some stocks of *Leishmania* isolated in India. *Ann. trop. Med. Parasit.*, 1981, 75, 247-249.
- [47] Rioux J.A., Lanotte G., Maazoun R., Perello R., Pratlong F. — *Leishmania infantum* Nicolle, 1908, agent du bouton d'Orient autochtone. A propos de l'indentification biochimique de deux souches isolées dans les Pyrénées-Orientales. *C. r. Acad. Sci.*, Paris, 1980, 291, sér. D, 701-703.
- [48] Ryan L., Silveira F.T., Lainson R., Shaw J.J. — Leishmanial infections in *Lutzomyia longipalpis* and *Lu. antunesi* (Diptera, Psychodidae) on the island of Marajo, Pará State, Brazil. *Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg.*, 1984, 78, 547-548.
- [49] Schnur L.F., Chance M.L., Ebert F., Thomas S.C., Peters W. — The biochemical and serological taxonomy of visceralizing *Leishmania*. *Ann. trop. Med. Hyg.*, 1981, 75, 131-144.
- [50] Schnur L.F., Zuckerman A. — Leishmanial excreted factor (EF) serotypes in Sudan, Kenya and Ethiopia. *Ann. trop. Med. Parasit.*, 1977, 71, 273-294.
- [51] Schnur L.F., Zuckerman A., Greenblatt C.L. — Leishmanial serotypes as distinguished by the gel diffusion of factors excreted *in vitro* and *in vivo*. *Isr. J. med. Sci.*, 1972, 8, 932-942.
- [52] Sherlock I.A., Guitton N. — Observações sobre calazar em Jacobina, Bahia. III. Alguns dados sobre o *Phlebotomus longipalpis*, o principal transmissor. *Revta bras. Malar. Doenças trop.*, 1969, 21, 541-548.
- [53] Sherlock I.A., Pessoa S.B. — *Leptomonas* infectando naturalmente *Phlebotomus* em Salvador (Bahia, Brasil). *Revta lat.-am. Microbiol. Parasit.*, 1966, 8, 47-50.
- [54] Tibayrenc M., Le Ray D. — A preliminary general classification of the isoenzymic strains of *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* based on the study of the main laboratory reference stocks. Electrophoretic comparison with *T. (S.) cruzi marinkellei* and *T. (Herpetosoma) rangeli*. *Annls Soc. belge Méd. trop.*, 1984 64, 239-248.
- [55] Velasco J.E. — The phlebotomine sandflies of the Los Yungas region of Bolivia. *M.S. Thesis, Louisiana State Univ., Dep. Trop. Med. med. Parasit.*, 1973, 204 p.