

## Aspectos sorológicos e epidemiológicos da leishmaniose tegumentar americana canina em Maricá, Rio de Janeiro, Brasil

Serological and epidemiological aspects of canine american tegumentary leishmaniasis from Maricá, Rio de Janeiro, Brazil

Claudia Maria Antunes Uchôa<sup>1</sup>, Cathia Maria Barrientos Serra<sup>2</sup>, Rosemere Duarte<sup>4</sup>,  
Ciléia M. Magalhães<sup>5</sup>, Roger Macedo da Silva<sup>3</sup>, Frederico Theophilo<sup>4</sup>,  
Leticia P. Figliuolo<sup>2</sup>, Fabiano T. Horta e Maria de Fátima Madeira<sup>3</sup>

**Resumo** Foram estudados 261 cães (134 moradias) do Município de Maricá, RJ, Brasil, visando avaliar a resposta sorológica e infecção ativa para leishmaniose tegumentar americana (LTA). Oito cães apresentaram lesões sugestivas, sendo o isolamento positivo em 3. Pelo ELISA, 24,5% (64/261) apresentaram reatividade (sensibilidade = 66% e especificidade = 76%), estando associado ao isolamento em 2 e 0,4% (1/261) pela imunofluorescência indireta (RIFI) sem associação com isolamento. Para a redução de reações inespecíficas no ELISA, utilizou-se um segundo critério para obtenção do cutoff (sensibilidade = 33% e especificidade = 93%), obtendo positividade de 6,9% (18/261) associando-se ao isolamento em um animal. Sete pessoas apresentaram cicatrizes de LTA e uma lesão ativa em tratamento. A não associação da infecção ativa dos cães à sorologia pela IFI e o grande número de resultados inespecíficos encontrado pelo ELISA, restringe o uso isolado destas no diagnóstico precoce da LTA. O encontro de lesões ativas confirma a circulação recente da Leishmania em Maricá, indicando a necessidade de estudos nesta região.

**Palavras-chaves:** Leishmaniose tegumentar. Cães. Sorologia. Diagnóstico. Epidemiologia.

**Abstract** A sample of 261 dogs from 134 households located in a periurban area of Maricá, Rio de Janeiro, Brazil, was studied to evaluate serologic reactions and active infection of american tegumentary leishmaniasis (ATL). Eight dogs presented lesions suggestive of ATL, but this was isolated in only three. Using ELISA, 24.5% (64/261) of the dogs studied were positive (sensitivity = 66% and specificity = 76%), associated with isolation in 2 animals and 0.4% (1/261) by indirect immunofluorescence assay (IIF) with no association with isolation. In order to reduce the unspecific reactions to ELISA, a second criterion was used to obtain the cutoff (sensitivity = 33% and specificity = 93%), resulting in a reactivity of 6.9% (18/261) associated to isolation in a single animal. As observed in this study, serologic results by IIF were not associated with active infection and ELISA showed high unspecific reactions, indicating that the serologic reactions alone are not recommended for ATL diagnosis. ATL scars were been observed in 7 persons in the region and active lesion, under treatment, was observed in one patient. The finding of active lesions, either in dogs or humans, confirmed the existence of active tegumentary leishmaniasis in Maricá, indicating the need for further studies to evaluate the importance of this infection in the municipality.

**Key-words:** Leishmaniasis. Dogs. Serology. Diagnosis. Epidemiology.

1. Universidade Federal Fluminense, Instituto Biomédico, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Disciplina de Parasitologia; 2. Universidade Federal Fluminense, Faculdade de Veterinária, Departamento de Patologia e Clínica Veterinária, Disciplina de Zoonoses; 3. FIOCRUZ - Escola Nacional de Saúde Pública - Departamento de Ciências Biológicas - Laboratório de Protozoologia; 4. FIOCRUZ - Escola Nacional de Saúde Pública - Departamento de Ciências Biológicas - Laboratório de Imunodiagnóstico 5. Universidade Federal Fluminense, Faculdade de Veterinária, Departamento de Patologia e Clínica Veterinária, Disciplina de Ornitopatologia.

Endereço para correspondência: Dra. Claudia Maria Antunes Uchôa. CMB/MIP/Parasitologia/UFF. R. Professor Hernani de Mello 101 3º andar, São Domingos, 24210-130 Niterói, RJ.

Tel: 55 21 2620-0623, Fax: 55 21 2620-5666

e-mail: uchoa@radnet.com.br.

Recebido para publicação em 28/3/2000.

No Município de Maricá, RJ - Brasil, os relatos de casos humanos de leishmaniose tegumentar americana (LTA) datam do início do século<sup>5</sup>. No entanto, nenhum estudo sobre a ocorrência da infecção na região foi realizado. Nos últimos anos, tem sido observado no Município um aumento da população humana associado a uma ocupação desordenada, principalmente próximo a encostas e ou matas, acarretando desequilíbrios ambientais que favorecem a instalação do ciclo extraflorestal da LTA.

A LTA, em diversas regiões do sudeste, apresenta caráter de transmissão peridomiciliar, principalmente

pela adaptação de algumas espécies do inseto vetor aos ambientes naturais modificados, possibilitando desta forma o envolvimento de animais domésticos<sup>11</sup>. O freqüente encontro de cães com altas taxas de infecção associado a doença humana sinaliza e reforça o envolvimento deste animal no ciclo de transmissão<sup>9</sup>.

Baseado nestes dados, este trabalho teve como objetivo o estudo da LTA no Município de Maricá através da busca ativa de casos em humanos e animais, nas localidades de Espraiado, Inoã e Itaipuaçu, bem como estudo sorológico dos cães das localidades estudadas.

## MATERIAL E MÉTODOS

As localidades de Espraiado, Inoã e Itaipuaçu compreendem respectivamente aos 2º, 3º e 4º Distritos do Município de Maricá, Região Metropolitana (Estado) do Rio de Janeiro. A escolha da localidade deveu-se ao registro prévio pela Secretaria Municipal de Saúde da ocorrência de casos humanos. Os núcleos familiares foram escolhidos aleatoriamente, vinculados à presença de cães. Na abordagem de cada casa foi realizado esclarecimento verbal sobre a LTA, sendo investigado a presença de lesões sugestivas e/ou cicatrizes nas pessoas e preenchido um questionário epidemiológico sobre a residência, os moradores, bem como as condições clínicas dos cães.

Foi colhido dos cães, mediante autorização prévia do proprietário, 3 a 5ml de sangue por punção venosa, utilizando preferencialmente a veia braquio-céfálica. Após retração do coágulo, o material foi centrifugado a 90g por 10 minutos para separação do soro. O soro foi estocado a -20°C objetivando a pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania*. Os animais que apresentaram lesões cutâneas sugestivas de leishmaniose, segundo o critério de Falqueto et al<sup>6</sup>, foram submetidos a biópsia visando o isolamento *in vitro*. A biópsia foi realizada na borda da lesão, retirando-se um pequeno fragmento. Este foi imerso em solução salina 0,9% contendo 1000UI de penicilina G potássica (SIGMA), 100µg de estreptomina (SIGMA) e 50µg de 5-fluorocytosine (SIGMA) por mililitro.

**Isolamento.** Após 24 horas a 4°C, os fragmentos foram seccionados e semeados em meio bifásico NNN (Novy, MacNeal e Nicolle) / Schneider's Insect Medium (SIGMA) contendo 10% de soro fetal bovino. O material foi incubado a 28°C por um mês sendo realizados exames semanais a partir do 5º dia.

**Sorologia. RIFI:** a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para pesquisa de IgG foi realizada segundo a descrição do kit de RIFI para diagnóstico da leishmaniose canina (Biomanguinhos/FIOCRUZ/MS). Considerou-se como positivas amostras que apresentaram fluorescência em diluições iguais ou maiores que 1/40.

**ELISA:** o teste ELISA para pesquisa de anticorpos séricos antileishmania teve como princípio a metodologia indireta<sup>8</sup> na qual o conjugado IgG de coelho/peroxidase busca identificar e ligar-se a IgG/IgM/IgA de cão específica para antígenos de *Leishmania* previamente fixados à placa de poliestireno. Para

realização do método, foi utilizado antígeno de promastigotas (cepa JOF) mantidos em meio LIT. Entre o quarto e quinto dias de crescimento, os parasitas foram lavados 4 vezes em Solução Salina tamponada com fosfatos – 0,01M pH 7,2 (PBS 0,01M – 7,2) para retirada de resíduos de meio. A seguir, a membrana dos parasitas foi rompida por ultra-som (35 kHz/60 min) e a suspensão foi centrifugada a 10.000g/10 min a 4°C. Deste modo utiliza-se no método, antígeno parcialmente solúvel. A seguir foi feita a dosagem de proteínas totais do antígeno através do método de Lowry<sup>10</sup>. A concentração do antígeno a ser utilizada é definida após verificação da atividade antigênica frente a soros verdadeiros positivos e verdadeiros negativos. Placas de poliestireno cristalino de 96 poços e fundo plano (Alfesa – São Paulo/ Brasil) foram sensibilizadas com 100µl do antígeno em concentração adequada, diluído em tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6 (TCB pH 9,6) mantidas em estufa a 37°C em câmara úmida durante 2 horas. A seguir foram realizadas 4 lavagens com PBS 0,01M – 7,2/Tween 20 0,05%. As amostras foram diluídas a 1:20 em PBS 0,01M – 7,2/ Tween 20 0,05% acrescido de leite desnatado a 1% e 100µl foram colocados na placa em duplicata. Foi feita uma incubação de 45 minutos a 37°C sob umidade. Após este período, foram feitas 4 lavagens como descritas anteriormente. A seguir, foi acrescentado o conjugado IgG de coelho/peroxidase anti-Ig total de cão diluído de acordo com titulação prévia em PBS 0,01M – 7,2/ Tween 20 0,05%/leite 1%. Nova incubação sob as mesmas condições e nova lavagem. A visualização dos resultados foi feita utilizando 100µl de revelador que constitui-se de substrato da peroxidase (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) - 10µl, orthophenilenediamino (OPD) como cromógeno - 10 mg, diluídos em tampão citrato-fosfato pH 5,0 - 25ml. Permitiu-se que a revelação ocorresse por 15 minutos e após este período utilizou-se 50µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N como solução *stop*. A leitura foi feita em leitor de microplacas EIA Microplate Reader no modo absorvância utilizando-se 492 nm como filtro principal e 650nm como filtro de referência. Em todas as placas foi utilizado um poço para o *branco*, 2 poços para soros controle positivo e três para soros controle negativo. Esta técnica apresenta sensibilidade de 965 e especificidade de 89%.

**Determinação do cut off.** Foram consideradas positivas amostras que apresentaram absorvância

superior ao *cut off*. Para determinação do *cut off* foi considerada a média das absorbâncias dos controles negativos somadas a 2 desvios padrão (critério 1), conferindo ao teste ótima sensibilidade. Visando a redução de reações cruzadas e conseqüente aumento de especificidade, foi

utilizado um segundo critério para interpretação dos resultados, que correspondeu a razão da densidade óptica do soro dividido pelo *cut off* obtido pelo critério 1. Considerou-se como positivos os resultados das razões que apresentaram valores iguais ou maiores a 2 (critério 2).

## RESULTADOS

Foram estudados 261 cães das localidades de Espraiado (130), Inoã (108) e Itaipuaçu (23) do Município de Maricá, Estado do Rio de Janeiro, eqüivalendo a 134 núcleos familiares. Destes núcleos, 67 localizavam-se em área de encosta e 67 em área

de baixada. A presença de criações como galinheiro, chiqueiro, curral e baía de forma isolada ou associadas, foi observada em 79 residências. Dos cães estudados, 155 eram machos e 106 eram fêmeas (Tabela 1).

Tabela 1 - Aspectos epidemiológicos observados nos 135 núcleos familiares visitados nas localidades de Espraiado, Inoã e Itaipuaçu, Município de Maricá, Estado do Rio de Janeiro, Brasil.

Localidade	Cães		Número de cães/casa			Domicílio		Criações*	
	macho	fêmea	1	2	≥3	encosta	baixada	presença	ausência
Espraiado	78	52	35	18	20	25	48	59	14
Inoã	62	46	10	25	15	35	15	16	34
Itaipuaçu	15	8	2	3	6	7	4	4	7
Total	155	106	47	46	41	67	67	79	55

\* criações - galinheiro, chiqueiro, curral, baía isolados ou associados.

Em 8 cães encontrou-se a presença de lesões sugestivas, sendo o isolamento positivo em 3 amostras. Dos 3 animais com isolamento positivo, 2 residiam na localidade de Inoã e 1 na de Itaipuaçu, sendo dois em área de encosta e um na baixada. Nenhum destes animais

apresentou soro reatividade pela RIFI. Estes casos foram notificados a Secretaria Municipal de Saúde de Maricá.

Na Tabela 2 são apresentados os dados relativos as qualidades fixas e variáveis do ELISA frente as amostras analisadas.

Tabela 2 - Resultado da análise dos 261 soros pelo ELISA e avaliação das qualidades fixas e variáveis da técnica empregada frente aos dois critérios de *cut off*.

ELISA	Critério 1		Critério 2	
	com isolamento	sem isolamento	com isolamento	sem isolamento
Positivo	2	62	1	17
Negativo	1	199	2	244
	Sensibilidade = 66		Sensibilidade = 33	
	Especificidade = 76		Especificidade = 93	
	VPP=31		VPP = 5,5	
	VPN = 99		VPN = 99	

VPP - valor de predição de positividade      VPN - Valor de predição de negatividade

Critério 1 = Média da densidade óptica dos soros controle negativo + dois desvios padrão

Critério 2 = densidade óptica do soro / *cut off* obtido no critério 1 ≥ 2.

Os soros dos 261 cães foram estudados através da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e do ELISA. Através da RIFI apenas 1 soro apresentou-se reagente, sem associação com lesão sugestiva. Em relação ao ELISA, utilizando-se um *cut off* baseado no critério 1, obteve-se uma reatividade em 24,5% (64/261) dos soros estando associada a presença de lesão sugestiva com isolamento em apenas dois animais. Quando

utilizou-se o critério 2, para determinar soros reagentes objetivando uma redução de reações cruzadas, observou-se positividade em 6,9% (18/261) das amostras estando associada a presença de lesão sugestiva com isolamento em apenas um animal (Tabela 3).

Na localidade de Espraiado encontrou-se 4 pessoas com cicatrizes de leishmaniose tegumentar com relato de infecção de pelo menos

*Tabela 3 - Resultado obtido através da análise dos 261 soros de cães, pelas técnicas de imunofluorescência indireta e ELISA, considerando o cut off critério 1 (média de soros padrão-negativo acrescido de dois desvios-padrão) e o cut off critério 2 (razão Densidade Óptica / cut off critério 1  $\geq$  2) para aumento de especificidade, das localidades de Espraiado, Inoã e Itaipuaçu, Município de Maricá, Estado do Rio de Janeiro, Brasil.*

Localidade/Técnica	Reagente		Não reagente		Total	
	nº	%	nº	%	nº	%
<b>Espraiado</b>						
RIFI	0	0,0	130	100,0	-	-
ELISA - critério 1	49	37,7	81	62,3	130	100,0
ELISA - critério 2	13	10,0	117	90,0	-	-
<b>Inoã</b>						
RIFI	1	0,9	107	99,1	-	-
ELISA - critério 1	15	13,9	93	86,1	108	100,0
ELISA - critério 2	5	4,6	103	95,4	-	-
<b>Itaipuaçu</b>						
RIFI	0	0,0	23	100,0	-	-
ELISA - critério 1	0	0,0	23	100,0	23	100,0
ELISA - critério 2	0	0,0	23	100,0	-	-

2 anos atrás e um animal com cicatriz de origem indeterminada. Nesta área não encontrou-se cães ou pessoas com lesões ativas.

Em Itaipuaçu encontrou-se 3 pessoas com cicatrizes de leishmaniose tegumentar e uma pessoa com lesão ativa em tratamento.

## DISCUSSÃO

A resposta humoral na leishmaniose tegumentar americana é muito fraca. Em infecções humanas foi descrito que a resposta imune é predominantemente celular. A resposta CD4+ do tipo 1 promove a produção de INF $\gamma$ , o que determina resistência a infecção por *Leishmania* e baixa resposta humoral, sendo observada em pacientes em cura ou recém infectados<sup>1</sup>. A resposta tipo 2 gera aumento de IL4, que estimula a diferenciação de linfócitos B, ocasionado aumento na produção de anticorpos. Este padrão encontra-se associado comumente a pacientes com doença severa<sup>1</sup>. A utilização da resposta humoral no diagnóstico da infecção tegumentar, portanto, permanece controverso pela baixa quantidade de anticorpos séricos detectáveis pelos métodos tradicionais e pela infinidade de reações cruzadas observadas principalmente nas técnicas imunoenzimáticas devido a sua sensibilidade acentuada. Bray<sup>3</sup> relata que grandes quantidades de anticorpos específicos são produzidas apenas na leishmaniose visceral, em lesões múltiplas na leishmaniose cutânea (metástases) em fases mais tardias da infecção e em lesões cutâneas simples com envolvimento da drenagem linfática e possivelmente do linfonodo.

Sanches et al<sup>14</sup> observaram baixas sensibilidade (67%) e especificidade (65%) da reação de Imunofluorescência para detecção de IgG, ao estudarem um surto de LTA em Porto Rico, sugerindo que a reação de Imunofluorescência deve ser utilizada apenas na avaliação do curso terapêutico, não sendo válida para o diagnóstico inicial da infecção.

Neste estudo pela RIFI apenas 0,4% (1/261) das amostras apresentaram reatividade, sem presença de lesão sugestiva. Passos et al<sup>13</sup> realizaram um inquérito em cães no Município de Sabará, Belo Horizonte,

obtendo soro prevalência para leishmaniose igual a 3,2% (20/617) pela RIFI, sendo que nenhum destes animais apresentou lesão sugestiva para LTA.

O teste ELISA utilizado neste estudo foi padronizado para o rotina do laboratório e avaliado frente a um painel de 30 amostras (10 positivas com títulos variados e 20 negativas) mantidas e reservadas no laboratório para este objetivo. Utilizando-se como linha de corte a média da densidade óptica dos controles negativos somados a dois desvios padrão (critério 1), o teste apresenta índices médios de sensibilidade de 96% e especificidade de 89% o que o torna uma ferramenta de análise bastante confiável, principalmente se considerarmos que este resultado nunca é avaliado isoladamente e sim junto com resultados de outros testes sorológicos e parasitológicos além da indicação clínica e histórico do animal. Entretanto, ao analisar as amostras deste estudo e utilizando o mesmo critério, o teste apresentou índices de sensibilidade e especificidade de 66% e 76% respectivamente, determinando uma positividade de 24,5% dos cães com presença de isolamento em dois animais. Guimarães et al<sup>7</sup>, ao avaliarem diversas técnicas sorológicas, verificaram que o ELISA IgG foi a única técnica que apresentou valor diagnóstico na leishmaniose mucocutânea humana, devendo ser utilizada como uma ferramenta auxiliar.

Como tentativa de melhorar a especificidade, utilizou-se como linha de corte a razão densidade óptica sobre *cut off*  $\geq$  2 (critério 2), observando-se a mudança dos valores de sensibilidade para 33% e especificidade para 93 %, resultando em 6,9% de positividade nas amostras com presença de lesão sugestiva em apenas um animal . Este nível de sensibilidade tornaria a sua aplicação inviável em uma rotina.

Durante a realização das análises sorológicas para LTA na rotina laboratorial, vários fatores contribuem para a perda da sensibilidade e especificidade dos testes. Além do fato de que a concentração de anticorpos circulantes é com raras exceções, muito baixa, os testes utilizados até o momento falham por vários motivos. O antígeno utilizado na reação de ELISA no presente estudo, e em vários que se utilizam deste mesmo teste, é o lisado parasitário total ou parcial. Um antígeno desta natureza pode por si só levar ao aparecimento de reações cruzadas devido a presença de epítomos homólogos presentes em outros parasitas. É notório a carência existente de um bom antígeno que seja bastante específico e permita a sua utilização no diagnóstico da LTA, os bons antígenos originários de espécies de leishmanias utilizados até o momento com grande especificidade prestam-se ao diagnóstico do calazar<sup>2 4 12</sup>. Optou-se pela utilização de conjugado anti-Ig total (IgA, IgM, IgG) na tentativa de obter-se não só maior sensibilidade mas também precocidade na observação dos possíveis casos de soroconversão (IgM), bem como lesões mucosas ou cicatrizações (IgA). Esta opção, no entanto, parece poder levar ao aparecimento também de casos falso positivos. Outro fato também observado é a possibilidade de reação cruzada oriunda de outras infecções permanentes ou transitórias como erlichiose, babesiose, filariose, leptospirose ou até mesmo imunizações recentes ou prenhez, onde os animais não apresentam lesões sugestivas de leishmaniose e sim sintomas clínicos destas outras patologias e em vários casos com o diagnóstico confirmado (dados não publicados Dr<sup>a</sup> Rosemere Duarte - ENSP/FIOCRUZ).

Como todas amostras destes estudo são oriundas de animais de área reconhecidamente endêmica, o conceito de verdadeiro positivo e verdadeiro negativo fica bastante comprometido uma vez que os antígenos do parasita podem estar circulando nesta população sem provocar casos sintomáticos mas induzindo a sensibilização e o aparecimento de resposta imunológica em alguns animais. Entre os casos pertencentes ao estudo, somente três animais podem ser considerados verdadeiros positivos pois foram os únicos a apresentar isolamento parasitário, e por outro lado sabemos que a *janela imunológica* da leishmaniose é bastante ampla em alguns casos levando meses para que a soroconversão seja observada. Pode-se erroneamente estar classificando-se um teste como pouco sensível e na verdade estamos diante

de uma característica marcante e bastante conhecida desta infecção.

A discordância dos resultados não só entre a doença e a soropositividade, mas também entre os diferentes métodos sorológicos existentes, leva ao questionamento sobre a validade da sorologia nos inquéritos epidemiológicos para LTA. Os resultados sorológicos só permitem a análise com maior facilidade quando são utilizados no diagnóstico diferencial juntamente com outros parâmetros ou no acompanhamento terapêutico<sup>14</sup>. Ao que parece, falta na sorologia para LTA, a utilização de um antígeno específico a exemplo do que já pode ser feito no calazar<sup>2 4 12</sup>.

Em relação às áreas estudadas, a localidade de Espirado parece ser uma região de ocupação mais antiga com população fixa e poucos sítios de veraneio. As áreas de Itaipuaçu e Inoã apresentam-se ainda em processo de ocupação por diferentes segmentos populacionais, sendo observado desde a construção de sítios de veraneio até a ocupação de áreas de encosta, bem próximas a matas residuais, com pouca infra-estrutura básica, o que provavelmente propiciou o aparecimento de infecção ativa em cães e no homem.

As condições do domicílio considerando a localização em encosta ou baixada, bem como a presença de criações (Tabela 1) parecem não apresentar nenhuma relevância na ocorrência dos casos de leishmaniose encontrados, nem com a sorologia positiva dos animais.

O encontro de lesões ativas, tanto em animais como em pessoas, confirma a circulação ativa e recente da *Leishmania* nas áreas de Inoã e Itaipuaçu no Município de Maricá, indicando a necessidade de maiores estudos para avaliar a circulação da leishmaniose nesta região.

Como os resultados sorológicos apresentam discordâncias em relação aos achados clínicos e parasitológicos, e até mesmo entre si quando se utilizam duas técnicas diferentes, considera-se que a sorologia deve continuar sendo utilizada no acompanhamento das infecções e nos levantamentos epidemiológicos sendo também adequado que junto com a colheita da amostra seja preenchida a ficha epidemiológica do animal com dados que irão auxiliar no diagnóstico. Deve-se continuar a busca da melhoria dos métodos existentes, seja pela determinação de novos critérios de positividade/negatividade ou pela utilização de reagentes imunobiológicos que irão otimizar os métodos já descritos.

#### AGRADECIMENTOS

A Pró Reitoria de Extensão (PROEX) da Universidade Federal Fluminense e a Escola Nacional de Saúde Pública da FIOCRUZ pelo apoio na realização dos trabalhos de campo e laboratorial. A Secretaria Municipal de Saúde de Maricá.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ajdary S, Alimohammadian MH, Eslami MB, Kemp K, Kharazmi A. Comparison of the immune profile of nonhealing cutaneous leishmaniasis patients with those with active lesions and those who have recovered from infection. *Infection and Immunity* 68:1760-1764, 2000.
2. Badaró R, Benson D, Eulálio MC, Freire M, Cunha S, Netto EM, Prdral-Sampaio D, Madureira C, Burns JM, Houghton RL, Reed JR.

- rK39: a cloned antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral Leishmaniasis. *Journal of Infectious Disease* 173:758-761, 1996.
3. Bray RS. Immunodiagnosis of leishmaniasis. *In: Chang KP, Bray RS (eds) Leishmaniasis. Elsevier Science Publishers B.V. Biomedicine Division p.177-182, 1985.*
  4. Cabrera GP, Da Silva VO, Da Costa RT, Reis AB, Mayrink W, Genaro O, Palatinik-de-Souza CB. The fucose-mannose ligand-ELISA in the diagnosis and prognosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil. *American Journal of Tropical Medical Hygiene* 61:296-301, 1999.
  5. Dutra-e-Silva O. Sobre a leishmaniose tegumentar e seu tratamento. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 7: 213-141, 1915.
  6. Falqueto A, Coura JR, Barros GC, Grimaldi GF, Sessa PA, Carias VRD, Jesus AC, Alencar JTA. Participação do cão no ciclo de transmissão da leishmaniose tegumentar no Município de Viana, Estado do Espírito Santo, Brasil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 81: 155-163, 1985.
  7. Guimarães MCS, Celeste BJ, Franca EL, Cicé LC, Belda Jr W. Evaluation of serological diagnostic indices for mucocutaneous leishmaniasis: immunofluorescence tests and enzyme linked immunoassays for IgG, IgM and IgA antibodies. *Bulletin of the World Health Organization* 67: 643-648, 1989.
  8. Guimarães MC, Coutinho SG, Antunes CMF. Normas para a sorologia de moléstias infecciosas e parasitárias. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 20:55-58, 1987.
  9. Lopes UG, Momen H, Grimaldi Jr G, Marzochi MCA, Pacheco RS, Morel CM. Schizodeme and zimodeme characterization of *Leishmania* in the investigation of foci visceral and cutaneous leishmaniasis. *Journal of Parasitology* 70: 89-98, 1994.
  10. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193:265-275, 1951.
  11. 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.
  12. Palatinik-de-Souza CB, Gomes EM, Paraguai-de-Souza E, Palatinik M, Luz K, borojevic R. *Leishmania donovani*: titration of antibodies to the fucose-mannose ligand as an aid in diagnosis and prognosis of visceral leishmaniasis. *Transaction Royal Society of Tropical and Medical Hygiene*, 89:390-393 1995.
  13. Passos VMA, Andrade AC, Silva ES, Figueiredo EM, Falcão AL. Inquérito canino em foco recente de leishmaniose tegumentar no município de Sabará, Região Metropolitana de Belo Horizonte. *Revista de Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 29: 323-329, 1996.
  14. Sanchez JL, Diniegar BM, Small JW, Miller RN, Andrejar JM, Weiner PJ, Lawyer PG, Ballon WR, Lovelace JK. Epidemiologic investigation of an outbreak of cutaneous leishmaniasis in a defined geographic focus of transmission. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 47: 47-54, 1992.