

Correlação entre o diagnóstico parasitológico e sorológico na leishmaniose visceral americana canina

Correlation between parasitological and serological diagnosis in canine american visceral leishmaniasis

Márcia Dalastra Laurenti

Laboratório de Patologia de Moléstias Infecciosas (LIM-50). Departamento de Patologia. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, SP, Brasil

RESUMO

Realizou-se uma minirrevisão sobre os estudos que correlacionam o diagnóstico parasitológico e sorológico para a leishmaniose visceral americana (LVA) canina, correlacionando também os achados diagnósticos com o estado clínico do reservatório doméstico. Além disso, discute-se a sensibilidade e especificidade de cada método e o antígeno utilizado; a aplicabilidade de cada técnica, em especial as sorológicas, para a utilização em programas de vigilância e controle da LVA.

PALAVRAS-CHAVE: diagnóstico laboratorial; leishmaniose visceral americana; reservatório doméstico; sorologia.

ABSTRACT

A brief revision on the studies that correlate parasitic and serologic diagnosis was performed for canine american visceral leishmaniasis (LVA), also correlating diagnostic findings with the clinic state of the domestic reservoir. More than that, the sensitiveness and the specificity of each method is discussed as well as the antigen employed; application of each technique, especially serologic ones, for use in the Surveillance and prevention control program for LVA.

KEY WORDS: laboratory diagnosis ; american visceral leishmaniasis; domestic reservoir; serology.

INTRODUÇÃO

Atualmente, no Brasil, a leishmaniose visceral americana (LVA) apresenta caráter endêmico-epidêmico, com média anual de 3 mil a 4 mil casos novos, distribuídos desde Roraima até o Paraná. Considerada doença predominantemente rural, nas últimas décadas a LVA vem sofrendo processo de urbanização, no qual cidades de médio ou grande porte têm sido acometidas por verdadeiras epidemias, como é o caso de Santarém (PA), São Luiz (MA), Teresina (PI), Natal (RN), Aracajú (SE), Montes Claros e Belo Horizonte (MG) e Corumbá (MS).¹ Essa mudança no padrão de transmissão da doença deve-se principalmente à urbanização do vetor, à participação do cão como reservatório doméstico da *L. (L.) chagasi* e à degradação ambiental, juntamente com o processo migratório da população para os grandes centros urbanos.

No Estado de São Paulo, a presença de *Leishmania sp* em exame parasitológico direto de cães com suspeita clínica de LVA foi detectada, em 1998, no município de Araçatuba, sendo posteriormente identificada como *L. (L.) chagasi*. Esse fato, aliado à presença do inseto transmissor, *Lutzomyia longipalpis*, detectado em 1997, confirmou a autoctonia de LVA em cães em território paulista.² Em 1999, no mesmo município, foi relatado o primeiro caso humano autóctone no Estado.²

Os programas de vigilância e controle de LVA^{3,4} preconizam a realização de inquéritos sorológicos caninos, visando conhecer a situação epidemiológica da doença nas áreas com transmissão ativa ou com potencial de transmissão e, ao mesmo tempo, identificar os cães sorologicamente positivos para posterior eliminação. Entretanto, BRAGA e colaboradores⁵ enfatizam a importância dos parâ-

metros sensibilidade e especificidade dos testes diagnósticos, quando avaliam o impacto da eliminação do cão frente à metodologia empregada.

A correlação entre o estado clínico do cão e sua infectividade para o flebotômídeo também deve ser considerada nas discussões para a adoção de medidas de controle da LVA canina, uma vez que PINELLI e colaboradores⁶ observaram que animais assintomáticos e sintomáticos graves apresentavam respostas imunes, celulares e humorais bastantes distintas, favorecendo ou não a infecção do vetor. De qualquer forma, faz-se importante mencionar o trabalho de BARATA e colaboradores⁷ que demonstraram a infecção do vetor, criado em laboratório, em cães soropositivos, apresentando diferentes formas clínicas da doença.

DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO

O diagnóstico laboratorial da LVA canina baseia-se em métodos parasitológicos e sorológicos. Apesar de discordâncias entre alguns autores^{8,9,10}, o exame parasitológico é considerado, ainda, o teste ouro para o diagnóstico da doença. A observação direta de formas amastigotas do parasito em esfregaços de aspirado de linfonodo, medula óssea, baço, fígado, pele e sangue corados por Giemsa, Leishman ou Panótico[®] é uma forma segura, simples, rápida e pouco traumática para o diagnóstico da enfermidade (Figura 1).

A especificidade desse método é de 100%, mas a sensibilidade depende do grau do parasitismo, do tipo de material biológico coletado, do seu processamento e coloração, além do observador. A sensibilidade pode ser de 50% a 83% em amostras de medula óssea, entre 30% e 85% em amostras de linfonodo e

entre 71% a 91% quando ambos os tecidos estão combinados.^{8,9} Quando o parasitismo é intenso não há problemas para um diagnóstico rápido e seguro; contudo, em muitos casos, especialmente em animais assintomáticos, nos quais apenas poucas formas amastigotas estão presentes nos tecidos, o diagnóstico parasitológico torna-se difícil e duvidoso. Esse problema pode ser solucionado com a utilização de técnicas mais sensíveis para a detecção de parasitos, tais como a imunofluorescência direta (RIFD) e a imunohistoquímica.

MOREIRA e colaboradores¹⁰ compararam a RIFD com a pesquisa direta de parasitos em esfregaço de punção aspirativa de linfonodo poplíteo de cães de área endêmica de LVA. De 60 cães com sinais clínicos da doença, 30 foram positivos no exame direto, 22 suspeitos e 8 negativos; quando submetidos à RIFD, 56 mostraram-se positivos e 4 negativos. Os resultados mostraram que a RIFI apresentou alta sensibilidade quando comparada com a pesquisa direta de parasitos, sendo útil para confirmação dos casos suspeitos (Figura 2).

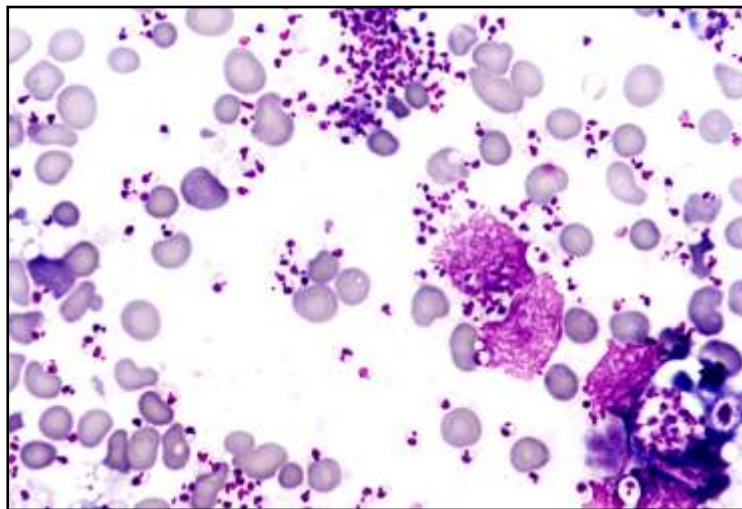


Figura 1. Esfregaço de material colhido por punção aspirativa em linfonodo poplíteo de cão sintomático, naturalmente acometido por leishmaniose visceral, mostrando formas amastigotas de *Leishmania* intracelulares e extracelulares coradas pelo Giemsa.

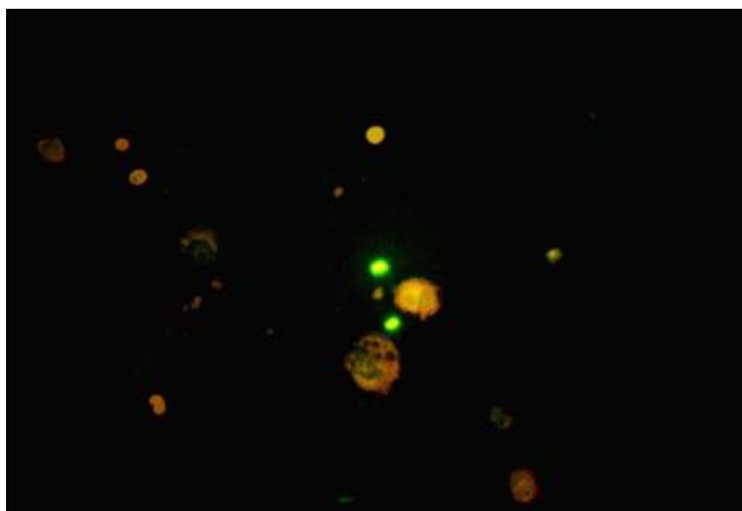


Figura 2. Reação de imunofluorescência direta positiva mostrando formas amastigotas do parasito em esfregaço de aspirado de linfonodo poplíteo de cão naturalmente acometido por leishmaniose visceral, marcadas pelo anticorpo policlonal anti-*Leishmania* conjugado com fluoresceína.

Técnicas de imunohistoquímica ou imunocitoquímica são métodos altamente sensíveis e específicos para a detecção de *Leishmania sp* em tecidos. Para tanto, pode-se utilizar qualquer tecido fixado e processado pelas técnicas usuais de microscopia, sendo que a pele, o fígado e os órgãos linfóides são os mais utilizados.

MOREIRA e colaboradores¹⁰, trabalhando com cães com e sem sinais clínicos da doença e diagnóstico laboratorial positivo para LVA, mostraram que a detecção de parasitos por HE e imunohistoquímica foi mais eficiente em biópsias de linfonodo, quando comparado com os outros órgãos. Posteriormente, os autores, trabalhando com material obtido por meio de punção aspirativa de linfonodo poplíteo,

mostraram que as técnicas de imunomarcção, tais como a imunofluorescência direta e a imunocitoquímica, aumentaram a sensibilidade para a detecção de parasitos e foram eficientes no diagnóstico de cães oligossintomáticos e assintomáticos (Figura 3).

O diagnóstico parasitológico pode também ser estabelecido por meio da detecção do parasito por cultivo em meios específicos. Biópsias ou punções aspirativas de diferentes órgãos ou tecidos são colocadas em meios de cultivo, em geral bifásicos (ágar sangue de coelho com LIT, RPMI ou Shineider), nos quais formas amastigotas do parasito, presentes no material biológico, transformam-se em formas promastigotas, podendo ser observadas em microscopia de contraste de fase (Figura 4).

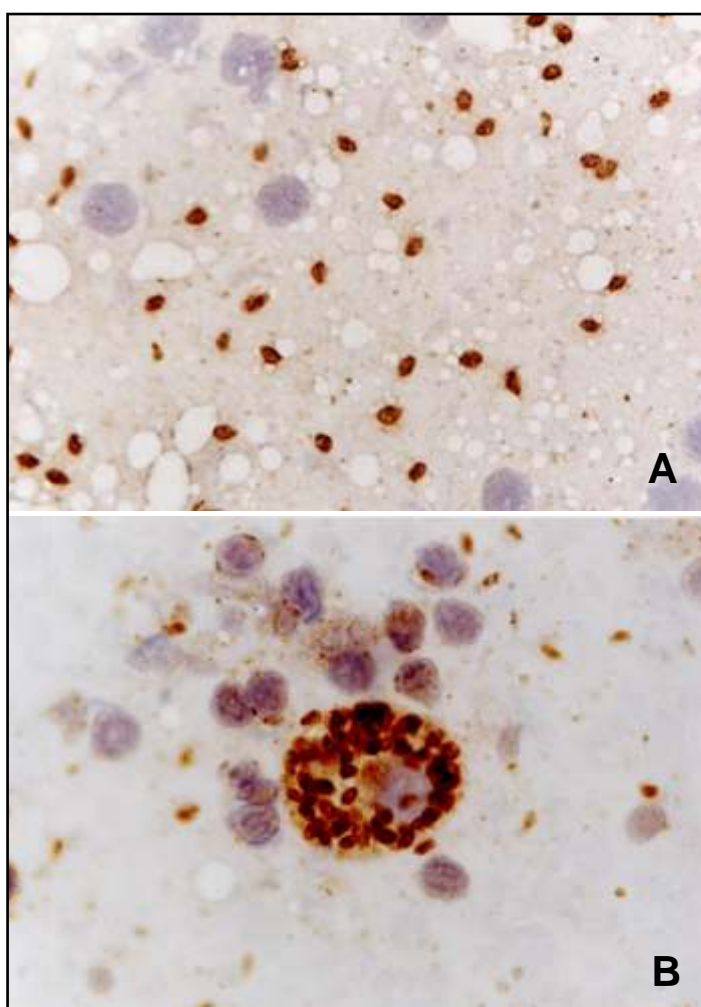


Figura 3. Reação de imunohistoquímica mostrando formas amastigotas de *Leishmania* extracelulares (A) e intracelulares (B) em esfregaço de aspirado de linfonodo poplíteo de cão naturalmente acometido por leishmaniose visceral.



Figura 4. Formas promastigotas de *Leishmania* em meio de cultivo, observadas em contraste de fase.

O crescimento das formas promastigotas leva de 4 a 6 dias. Dessa forma, a leitura da cultura é feita semanalmente, sendo que após a terceira semana de observação o resultado final já é concluído. Como os meios de cultivo são ricos, a falta de adequação na esterilidade durante o processo da coleta de material e sementeira nos meios pode levar ao crescimento de bactérias e fungos que impedem o crescimento de *Leishmania*, diminuindo, assim, a sensibilidade do teste. Embora as culturas sejam úteis para o isolamento e identificação do parasito, são pouco utilizadas na rotina diagnóstica.

DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO

A detecção de anticorpos circulantes anti-*Leishmania* utilizando técnicas sorológicas constitui um instrumento importante no diagnóstico da LVA canina. Animais doentes desenvolvem resposta imune humoral e produzem altos títulos de IgG anti-*Leishmania*.⁸ A soroc conversão ocorre aproximadamente três meses após a infecção.

Entretanto, os testes sorológicos devem ser interpretados com cautela, uma vez que não

são 100% sensíveis e específicos e falham em detectar cães infectados no período pré-patente da doença.¹¹ Animais com menos de 3 meses de idade não devem ser avaliados por meio de métodos sorológicos, pois podem apresentar resultados positivos pela presença de anticorpos maternos.⁵ Existem contradições na literatura quanto à possível correlação entre os títulos de anticorpos e a severidade dos sintomas.

Muitos testes sorológicos podem ser utilizados, tais como: fixação de complemento, aglutinação direta, imunofluorescência indireta (RIFI), imunoenzimático (Elisa) com diferentes modificações e western blot, entre outros.

Os testes sorológicos de RIFI e Elisa representam os principais instrumentos usados no sorodiagnóstico da LVA humana e canina, uma vez que são empregados nos programas nacional e estadual de vigilância e controle da LVA (PVCLVA)^{3,4} para identificação de reservatórios infectados. Entretanto, apesar da doença estar associada, habitualmente, a apenas uma espécie de parasito, *L. (L.) chagasi* – o que, teoricamente, deveria facilitar a

padronização de um antígeno específico para ser usados nesses testes –, ainda hoje não existe um consenso na literatura especializada quanto ao emprego de um antígeno para o uso no sorodiagnóstico da LVA humana e canina.

Dependendo do antígeno empregado e das condições da RIFI, sua sensibilidade pode variar entre 90% e 100% e a especificidade, entre 80% a 100%^{12,13} (Figura 5). A especificidade dessa prova, assim como de outras provas sorológicas, é prejudicada pela ocorrência de reações cruzadas com doenças, principalmente aquelas causadas por tripanosomatídeos, como o agente causador da doença de Chagas. Portanto, seus resultados não devem ser utilizados como indicadores de infecção leishmaniótica específica, particularmente em áreas onde a doença de Chagas é endêmica (Figura 5).

ZANETTE¹⁴, trabalhando com 50 cães parasitologicamente positivos, mostrou sensibilidade de 98% e especificidade de 91% para a RIFI utilizando como antígeno promastigotas de *L. (L.) chagasi*, e ótima concordância com o diagnóstico parasitológico (Kappa=0,893). Com relação à ocorrência de reações cruzadas, o autor mostrou que 42,9% das amostras de

soros de cães chagásicos foram reagentes para RIFI com antígeno de promastigotas de *L. (L.) chagasi*, assim como 50% das amostras de soros de cães com toxoplasmose. Não houve reação cruzada com erliquiose, babesiose e neosporose.

Na tentativa de otimizar os testes sorológicos empregados no programa de controle da leishmaniose visceral, SILVA¹⁵ trabalhou com amostras de soro e papel de filtro colhidas de cães de área endêmica para LVA, com diagnóstico clínico e parasitológico positivo. A RIFI foi avaliada quantitativamente, pelo número de formas promastigotas marcadas, nas diluições de 1/20, 1/40, 1/80 e 1/160, utilizando-se o kit comercial produzindo por Biomanguinhos® e um ensaio *in house* utilizando promastigotas de *L. (L.) chagasi*. O ensaio *in house* com os soros mostrou-se capaz de separar todos os verdadeiros negativos dos verdadeiros positivos e apontou para uma eficiência de 60% a 76% para o kit comercial. Quando comparados os resultados da RIFI do kit comercial empregada em soros e papel de filtro, observou-se que o melhor ponto de corte para o papel de filtro seria a diluição de 1/80, o que seguramente diminuiria o número de falsos positivos.

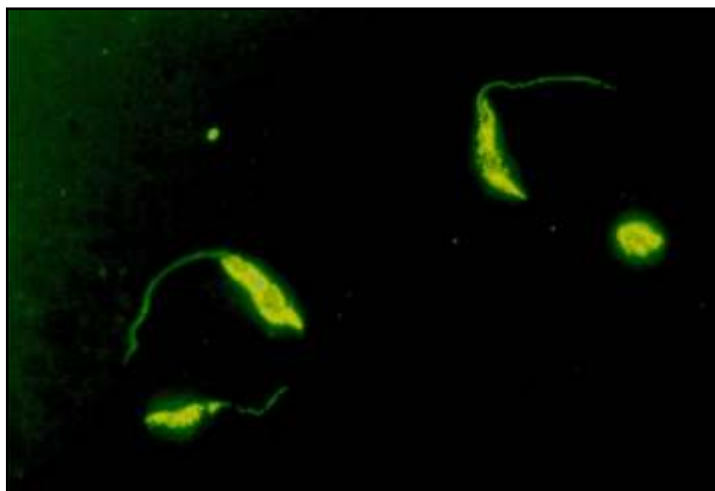


Figura 5. Reação de imunofluorescência indireta (RIFI) positiva mostrando formas promastigotas de *Leishmania* marcadas pela fluoresceína.

A comparação da reatividade entre as técnicas de RIFI e Elisa no sorodiagnóstico da LVA canina no Estado do Pará, utilizando amastigotas de *L. (L.) chagasi* preparadas no Instituto Evandro Chagas, por aposição de fragmentos de baço de hamster infectado cronicamente, e os kits da Biomanguinhos[®] mostrou soropositividade de 8,5% pela RIFI Biomanguinhos[®] e 0% pela RIFI com amastigotas, diferença estatisticamente significativa. O Elisa Biomanguinhos[®] mostrou reação positiva em 4,2% das amostras ($p < 0,05$). Considerando que na área estudada não há relatos da ocorrência de LVA humana e canina, ao contrário da situação da leishmaniose tegumentar americana, a qual tem elevada incidência, concluiu-se que o teste da RIFI utilizando amastigotas de *L. (L.) chagasi* como antígeno foi mais específico, pois não apresentou qualquer resultado falso positivo. É possível que as taxas de 8,5% e 4,2% de soropositividade obtidas com a RIFI e Elisa Biomanguinhos[®], respectivamente, representem reações cruzadas de cães infectados com leishmânias dermatópicas.¹⁶

O teste de Elisa pode apresentar, dependendo também do antígeno empregado, uma sensibilidade que varia entre 80% e 99,5% e uma especificidade entre 81% e 100%.^{12,13} A sensibilidade e especificidade desse método dependem do tipo de antígeno empregado e de mudanças no protocolo. As técnicas que utilizam antígenos totais são limitadas em termos de especificidade, por apresentar reações cruzadas não somente com tripanosomatídeos, mas também com organismos filogeneticamente distantes.¹⁴ A utilização de antígenos recombinantes ou purificados melhora a sensibilidade e a especificidade da técnica.¹⁷

MOREIRA e colaboradores¹⁸, empregando antígeno específico, lisado total de formas promastigotas de *L. (L.) chagasi*, no ensaio de Elisa para o diagnóstico sorológico de cães positivos

parasitologicamente, mostraram sensibilidade de 87,8% para cães sintomático, 68% para cães oligossintomáticos e 95,65% para assintomáticos, e especificidade de 100%. O Elisa mostrou boa correlação com o diagnóstico parasitológico, principalmente quando técnicas de imunomarcção foram utilizadas. Já ZANETTE¹⁴ mostrou sensibilidade de 94% e especificidade de 84,4% para o ensaio de Elisa, utilizando também antígeno específico em cães naturalmente infectados por *L. (L.) chagasi*, com boa concordância com o diagnóstico parasitológico ($Kappa=0,788$). Porém, prováveis reações cruzadas foram observadas com doença de Chagas (64,3%), erliquiose (7,7%) e co-infecção por erliquiose e babesiose (83,3%).

A utilização de antígenos recombinantes tem sido empregada por alguns grupos de pesquisa tanto no diagnóstico da leishmaniose visceral humana como canina. Há poucos estudos que relatam o uso de teste imunocromatográfico rápido anti-rK39 no diagnóstico da LVA canina em inquéritos caninos (Figura 6).

BADARÓ¹⁹ mostrou sensibilidade de 99% com Elisa utilizando antígeno bruto e rK39 em soros de cães com LVA aguda. Em 467 soros coletados em inquérito canino realizado em área endêmica para LVA, somente os animais com rK39 positivo tinham evidência parasitológica de infecção por *Leishmania*. De acordo com os autores, esses resultados indicam que o antígeno rK39 pode ser usado como indicador da presença de LVA canina aguda.

Em estudo²⁰ realizado em Minas Gerais, com 1.798 cães, o desempenho do teste rápido anti-rK39 realizado em campo e no laboratório foi comparado. O TRALd em campo demonstrou sensibilidade de 85% e especificidade de 88%; já em laboratório, a sensibilidade foi de 92% e a especificidade foi de 94%, com aumento de valores preditivos frente ao diagnóstico parasitológico. GENARO e colaboradores²⁰,

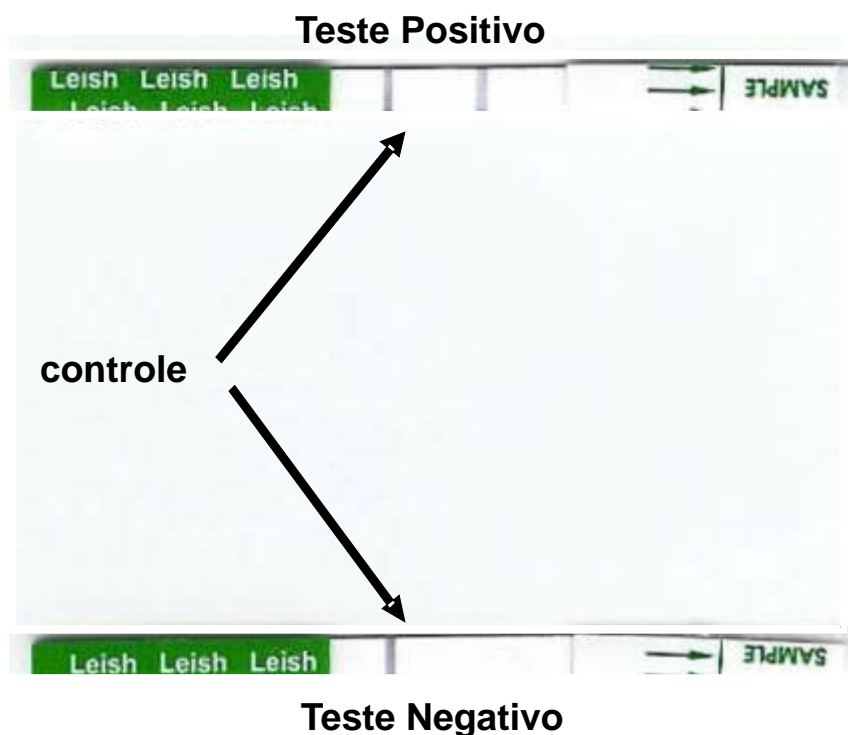


Figura 6. Imunocromatografia (Kalazar Detect Test) mostrando reação positiva e negativa para o antígeno rK39.

utilizando animais experimentalmente e naturalmente infectados por *L. (L.) chagasi*, mostraram que quando um animal é positivo para o TRALd, confirma o diagnóstico de infecção por *L. chagasi*, sendo que a sua utilização poderia gerar uma diminuição dos animais sacrificados que apresentassem outras patologias.

Comparando-se a utilização do TRALd com o Elisa com antígeno bruto, concluiu-se que o teste cromatográfico anti-rK39 é capaz de detectar infecção ativa em cães com diferentes formas clínicas da doença, uma vez que a sensibilidade do TRALd foi de 83% com especificidade de 100%.²¹

ZANETTE¹⁴ trabalhando com amostra de 50 soros de cães naturalmente acometidos por LVA, mostrou sensibilidade de 86% e especificidade de 91,1%. O teste imunocromatográfico apresentou uma boa concordância com o diagnóstico parasitológico (Kappa=0,769). Reações cruzadas foram observa-

das com erliquiose (7,7%), co-infecção por erliquiose e babesiose (50%), toxoplasmose (10%), neosporose (12,5%) e co-infecção toxoplasmose e neosporose (23%).

CONCLUSÃO

Depois de duas décadas de tentativas de controle da LVA no Brasil, o número de casos no País aumentou nitidamente e verifica-se a sua expansão para áreas urbanas.

Os programas brasileiros^{3,4}, iniciados há mais de 40 anos em algumas unidades federadas, são compostos pela integração de três medidas de saúde pública: diagnóstico precoce e tratamento, com a distribuição gratuita do medicamento específico; controle de reservatórios domésticos; e controle vetorial. Como método diagnóstico da LVA canina os programas^{3,4} adotam duas reações: Elisa e RIFI, produzidos por Biomanguinhos®. Estas são

realizadas pelo Laboratório de Saúde Pública, em áreas de transmissão de LVA, a fim de detectar cães infectados, fonte de infecção para o vetor, para a realização da eutanásia e avaliação da prevalência da LVA canina.

Em relação aos métodos sorológicos empregados em inquéritos epidemiológicos, cujo objetivo é conhecer a prevalência da doença em áreas endêmicas ou com potencial de transmissão da LVA, os parâmetros de sensibilidade, especificidade e valores preditivos das

técnicas sorológicas empregadas são de extrema importância para se evitar interpretações errôneas, com resultados falsos positivos ou negativos. Embora a sorologia seja apenas um método indireto de medir a infecção, não definindo o grau de parasitismo, a presença da doença ou ainda o potencial de transmissão que o cão possa ter para o vetor, diminuir o número de resultados falsos positivos e negativos seria muito importante para a eficiência do programa.

REFERÊNCIAS

1. Vieira JBF, Coelho GE. Leishmaniose visceral ou calazar: aspectos epidemiológicos e de controle. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1988;31(II):85-92.
2. Camargo-Neves VLF, Katz G. Ações controle da leishmaniose visceral americana implementadas na região oeste do Estado de São Paulo. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1999;32:63.
3. Camargo-Neves VLF, Glasser CM, Cruz LL, Almeida RG. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral Americana do Estado de São Paulo. São Paulo: Secretaria de Estado da Saúde, 2006; 145p.
4. Ministério da Saúde. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral 2003 [manual na internet]. Brasília: MS [acesso em junho 2006]. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/svs>.
5. Braga MDM, Coelho ICB, Pompeu MML, Evans TG, Macauliffe IT, Teixeira MJ et al. Controle do calazar canino: comparação dos resultados de um programa de eliminação rápida de cães sororreagentes por ensaio imuno-enzimático com outro de eliminação tardia de cães sororreagentes por teste de imunofluorescência indireta de eluato

Resumo de palestra proferida no II Fórum de Discussão da Sociedade Paulista de Parasitologia: "Leishmaniose visceral americana, situação atual e perspectivas futuras". Organizado por Regina M. B. Franco, da Sociedade Paulista de Parasitologia, por Vera L. F. de Camargo-Neves e Cecília Abdalla, da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo (CCD/SES-SP), realizado em 3 de julho de 2007, no auditório Luiz Mussolino/SES-SP.

- de papel filtro. Rev Soc Bras Med Trop. 1998;315 (5): 419-424.
6. Pinelli E, Killick-Kendrick R, Wagenaar J, Bernardina W, Del Real G, Ruitember GJ. Cellular and humoral Immune response in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. Infection and Immunity. 1994;62:229-35.
 7. Barata IR, Lima JA, Soares MG, Brandão JA, Pires RN, Corrêa ZC et al. The infectivity of dogs infected with *Leishmania chagasi* for *Lutzomyia longipalpis* is not related to clinical status or the humoral response of the animals. Third World Congress on Leishmaniasis (Abstract Book), Palermo-Terrasini, Sicily, Italy; 2005, p.110.
 8. Ferrer LM. Clinical aspects of canine leishmaniasis. In: Proceedings of the International Canine Leishmaniasis Forum. Barcelona, Spain. Canine Leishmaniasis: an update. Wiesbaden: Hoeschst Roussel Vet. 1999, p. 6-10.
 9. Koutinas AF, Saridomichelakis MN, Mylonakis ME, Leontides L, Polizopoulou Z, Billinis C et al. A randomised, blinded, placebo-controlled clinical trial with allopurinol in canine leishmaniasis. Veterinary Parasitology. 2001;98:247-61.
 10. Moreira MAB, Luvizotto MCR, Nunes CM, Silva TCC, Laurenti MD, Corbett CEP. Application of direct immunofluorescence technic for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in lymph nodes aspirate. Braz J Vet Res Anim Sci. 2002;39(2):103-6.
 11. Ferrer L, Aisa MJ, Roura X, Portús M. Serological diagnosis and treatment of canine leishmaniasis. Veterinary Record. 1995;136:514-6.
 12. Mancianti F, Falcone ML, Giannelli C, Poli A. Comparison between an enzyme-linked immunosorbent assay using a detergent-soluble *Leishmania infantum* antigen and indirect immunofluorescence for the diagnosis of canine leishmaniasis. Veterinary Parasitology. 1995;59:13-21.
 13. Mancianti F, Pedonese F, Poli A. Evaluation of dot enzyme-linked immunosorbent assay (dot-ELISA) for the serodiagnosis of canine leishmaniasis as compared with indirect immunofluorescence assay. Veterinary Parasitology. 1996;65:1-9.
 14. Zanette MF. Comparação entre os métodos de ELISA, imunofluorescência indireta e imunocromatografia para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina [dissertação de mestrado]. Araçatuba (SP): Faculdade de Odontologia, Curso de Medicina Veterinária da Unesp; 2006.
 15. Silva MR. Estudo comparativo entre os métodos de Elisa e IFI na análise de amostras de sangue de cães provenientes de municípios endêmicos e enzoóticos para LVC [tese de doutorado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2005.
 16. Jesus RCS, Corrêa ZC, Everdosa DR, Martins AP, Eliseu LS, Campos MB et al. Comparação das técnicas de RIFI (Ag.IEC X Ag. Biomanguinhos) e Elisa no sorodiagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC), estado do Pará, Brasil. Rev Soc Bras Med Trop. 2003;36(supl.I):323-4.
 17. Scalone A, De Luna R, Oliva G, Baldi L, Satta G, Vesco G et al. Evaluation of the *Leishmania* recombinant k39 antigen as a diagnostic marker for canine leishmaniasis and validation of a standardized enzyme-linked immunosorbent assay. Veterinary Parasitology. 2002;104:275-85.
 18. Moreira MAB, Luvizotto MCR, Garcia JF, Corbett CEP, Laurenti MD. Comparison of

- parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. *Veterinary Parasitology*. 2007;145(3-4):245-52.
19. Badaró R. Desenvolvimento e utilização de um antígeno recombinante específico de *Leishmania chagasi* (rK39) no diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral [tese de doutorado]. São Paulo: Unifesp; 1996.
20. Genaro O, Costa RT, França Silva JC, Reis AB, Vieira EP, Arias JR. Evaluation of an immunochromatographic assay for the diagnosis for dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania chagasi* in Brazil. *Acta Parasitologica Turcica*. 1997;21(suppl.I): 93.
21. Laurenti MD, Lemos EM, Reis AB, Moreira MAB, Luvizotto MCR, Corbett CEP et al. Evaluation of Kalazar Detect™ Rapid Test for serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil. *Third World Congress on Leishmaniosis (Abstract Book)*, Palermo-Terrasini, Sicily, Italy. 2005, p.160.

Recebido em: 15/03/2009
Aprovado em: 26/07/2009

Correspondência/correspondence to:

Márcia Dalastra Laurenti

Laboratório de Patologia de Moléstias Infecciosas. Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Av. Dr Arnaldo, 455; Cerqueira César CEP: 01246-903, São Paulo, SP, Brasil

Tel: 11- 3061-7426

mdlauren@usp.br