VIVIANA VANESSA PINEDO CANCINO

Avaliação imunodiagnóstica de antígenos excretados-secretados de *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) chagasi* na Leishmaniose visceral humana e canina

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título do Mestre em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Parasitologia

Orientador: Prof. Dra. Eufrosina Setsu Umezawa

São Paulo
2009

RESUMO

PINEDO-CANCINO, V. **Avaliação imunodiagnóstica de antígenos excretados-secretados de *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) chagasi* na Leishmaniose visceral humana e canina.** 127 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

As leishmanioses são doenças tropicais endêmicas prevalentes em vários países, inclusive no Brasil. Dentre estas se destaca a leishmaniose visceral (LV) ou kalazar que é a forma de maior letalidade. No Estado de São Paulo o problema é alarmante e afeta tanto o homem como o cão. Leishmanias liberam no meio de crescimento moléculas de sua membrana e vários estudos mostram sua importância na indução da imunidade mediada pelas células T e B incluindo a produção de altos níveis de imunoglobulinas G-anti-leishmania. Este trabalho aborda a avaliação dos exoantígenos de *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) chagasi*, comparados ao antígeno total, no diagnóstico da leishmaniose visceral humana e canina, por ELISA e Immunoblotting. A sensibilidade de 100% foi obtida tanto para os exoantígenos como para os antígenos totais, independente da espécie de *Leishmania* empregada, no ELISA. A melhor especificidade foi apresentada pelo ELISA que utilizou exoantígenos tanto no diagnóstico da LV humana como canina, sendo que a melhor especificidade e maiores títulos foram apresentados pela espécie *L. (L.) chagasi*. Sensibilidade e especificidade de 100% foram apresentados pelo Immunoblotting que utilizou exoantígenos de *L. (L.) chagasi* (IBleish), no diagnóstico da LV canina, sem reatividade cruzada com cães infectados com *T. cruzi*. Os dados obtidos no IBleish-*L. (L.) chagasi* nos conduzem a pensar que esta metodologia poderia ser utilizada como um teste diagnóstico confirmatório na Leishmaniose canina, uma vez que em humanos este teste reage cruzadamente com uma pequena porcentagem de pacientes com leishmaniose tegumentar.

Palavras-chave: Leishmaniose visceral. Exoantígenos. *Leishmania (L.) chagasi*. ELISA. Immunoblotting. Diagnóstico sorológico.

ABSTRACT

PINEDO-CANCINO, V. **Evaluation of excreted-secreted antigens of *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* and *L. (L.) chagasi* in imunodiagnosis of human and dog Visceral leishmaniasis.** 127 p. Dissertation (Master) – Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2009.

Leishmaniasis are endemic tropical diseases prevalent in several countries, including Brazil. Among them, visceral leishmaniasis (VL) or Kala-azar, is the form with the greatest potential for mortality, it is a new problem that grows in São Paulo State, affecting men and dogs. The molecules released from *Leishmania* membrane are excreted-secreted (exoantigens) into culture medium, have been showing that are important in the induction of T and B cells immunity, stimulating high production of IgG antibodies. Our work was carried out with exoantigens of *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* and *L. (L.) chagasi* by ELISA and Immunoblotting and the results were compared with total parasites extract applied in the diagnosis of canine and human visceral leishmaniasis. A sensitivity of 100% was reached by all antigens independent of the specie of *Leishmania* employed. Exoantigens showed the best index of specificity for VL diagnosis of humans and dogs, but exoantigens from *L. (L.) chagasi* showed the best specificity with high titres. The Immunoblotting that used the exoantigens of *L. (L.) chagasi* (IBleish) showed 100% sensitivity and specificity in the canine VL. The IBleish-*L. (L.) chagasi* did not showed cross-reactivity with dogs infected with *T. cruzi*. These data led us to think that it could be a reliable method for confirmatory diagnostic and epidemiological assays, especially to help the diagnosis of Canine leishmaniasis.

Keywords: Visceral leishmaniasis. Exoantigens. *Leishmania (L.) chagasi*. ELISA. Immunoblotting. Serodiagnosis

1 INTRODUÇÃO

1.1 Etiologia e Epidemiologia das Leishmanioses

O grupo de doenças conhecidas como “Leishmanioses” são causadas por protozoários intracelulares heteroxenos da Ordem *Kinetoplastida*, família *Trypanosomatidae*, gênero *Leishmania*. De acordo com a evolução dos parasitas no trato digestivo do inseto o gênero *Leishmania* foi dividido em dois subgêneros *Leishmania* e *Viannia*. Enquanto o subgênero *Leishmania* apresenta o seu desenvolvimento restrito à porção anterior e média, o subgênero *Viannia* apresenta o seu desenvolvimento desde o intestino posterior até a porção anterior do tubo digestivo (LAINSON E SHAW, 1987).

Aproximadamente 20 espécies de *Leishmania* são patogênicas para o homem (LAINSON e SHAW, 1987). Os insetos do gênero *Phlebotomus* são os responsáveis pela transmissão natural do parasita no Velho Mundo e os do gênero *Lutzomyia* no Novo Mundo (SUNDAR e RAI, 2002).

A “Leishmaniose” pode apresentar diferentes formas clínicas como: cutânea (LC), mucocutânea (LMC) e visceral (LV) ou Calazar (da expressão indiana “kala-azar”), sendo que no pós tratamento da LV podemos encontrar uma manifestação cutânea conhecida como “pós-kala-azar” ou leishmaniose dérmica (LDPK) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, doravante citada como WHO, 2009).

Atualmente a leishmaniose é considerada, pela Organização Mundial de Saúde, a segunda doença tropical mais importante depois da malária, por apresentar altos índices de morbidade e mortalidade (WHO, 2001).

A doença é prevalente em 88 países e endêmica em 65 deles, de acordo com dados da WHO (Figura 1). Cerca de 90% dos casos notificados ocorrem na Índia, Sudão, Bangladesh, Nepal e Brasil com uma incidência anual de 500.000 (DESJEUX, 2004a; WHO, 2009).

Figura 1- Distribuição das diferentes formas de Leishmaniose no Mundo, 2001.

Fonte: <http://www.wehi.edu.au/research/divisions/inf/labs/handman/leishmaniasis.html>

1.1.1 Leishmaniose visceral

A Leishmaniose visceral (LV) é uma doença crônica, debilitante caracterizada pela infecção do sistema fagocítico mononuclear. Três espécies de *Leishmania* pertencentes ao complexo *Leishmania donovani* são causadoras da doença visceral no mundo, a *Leishmania (Leishmania) chagasi* nas Américas; a *Leishmania (Leishmania) donovani* na Ásia e África e a *Leishmania (Leishmania) infantum* na Ásia, Europa e África (LAINSON e SHAW, 1987).

Clinicamente a Leishmaniose visceral humana (LVH) pode ser classificada em: 1) assintomática ou inaparente; 2) forma oligossintomática ou subclínica e 3) forma sintomática ou clássica, podendo variar desde manifestações discretas até graves, que sem tratamento podem ocasionar a óbito (MINISTÉRIO DA SAÚDE, doravante citada como MS, 2008).

Nos países onde a doença se comporta como uma zoonose, o cão é considerado o principal reservatório doméstico, sendo que a Leishmaniose visceral canina (LVC) já foi registrada em 50 dos 65 países onde é endêmica ao homem (LVH) (FERREIRA et al., 2007). Os cães infectados podem ser classificados em: assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos. Os assintomáticos representam 57% dos infectados nas áreas endêmicas,

sendo aparentemente cães sadios (GENARO, 2003; GONTIJO e MELO, 2004). A Leishmaniose visceral além de afetar milhões de cães em diferentes áreas da Europa, Ásia, África do Norte e América do Sul vem sendo considerada como emergente na América do Norte (ROSY PAL et al., 2003).

Na América Latina, a LV é endêmica ou fator de risco em várias áreas da Argentina, Bolívia, Brasil, Colômbia, Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras, México, Nicarágua e Venezuela. No Brasil, não obstante a presença de um programa de controle e vigilância a LV é um problema de saúde pública e encontra-se em franca expansão geográfica atingindo 20 estados, com aproximadamente 3.000 casos/ano e letalidade média de 8% (MS, 2008). Além disso, o país aparece nas Américas, como a região onde se registra a maioria dos casos de acordo à Organização Panamericana da Saúde (PAHO, 2005).

Em meados dos anos 80 observou-se uma transformação drástica na distribuição geográfica desta zoonose. Inicialmente era considerada de transmissão silvestre e restrita às regiões norte e nordeste com características de ambientes rurais (GONTIJO e MELO, 2004; ALVES e BEVILACQUA, 2004). Nesta época a raposa era tida como o principal reservatório da *L. (L.) chagasi*.

Atualmente, a LV está em expansão para as áreas periurbanas e urbanas, alcançando inclusive a periferia de grandes centros urbanos como São Paulo (GONTIJO e MELO, 2004). A principal espécie transmissora é a *Lutzomia longipalpus* (DEANE e DEANE, 1954), e o cão doméstico (*Canis familiaris*) o principal reservatório nas áreas urbanas e rurais (PARANHOS-SILVA et al., 1996; RAMIRO et al., 2003). A este fato deve-se o grande número de casos da doença em cães e o intenso parasitismo cutâneo observado nestes animais (COSTA et al., 1999), tornando-os as principais fontes de infecção para os vetores (SLAPPENDEL e TESKE, 1999; GENARO, 2003).

No Estado de São Paulo a LV, até 1998 era conhecida pela detecção de casos oriundos de outras regiões endêmicas do país. A partir de então, registrou-se a enzootia canina no Município de Araçatuba, região oeste do Estado de São Paulo, na qual se identificou a *L. (L.) chagasi* por meio de técnicas moleculares. Posteriormente, em 1999, registrou-se o primeiro caso humano de LV no estado e desde então a doença vem ocorrendo em municípios situados na região do planalto ocidental paulista, nos quais a transmissão tem feição exclusivamente urbana (GALIMBERTTI et al., 1999; CAMARGO-NEVES e KATZ, 1999). Até o mês de fevereiro de 2008, segundo a situação epidemiológica para a LV,

dos 645 municípios paulistas, 63 (9,8%) registraram transmissão da LV (humana/e ou canina) (Figura 2). No entanto, não se verificou expansão para novas regiões do Estado (SÃO PAULO, 2008).

A Leishmaniose visceral já foi identificada em canídeos domésticos e silvestres, marsupiais, roedores e também em gatos domésticos (BANETH, 2006). Não se tem prestado muita atenção na doença em gatos pela dificuldade de seu diagnóstico, podendo os felinos ter maior resistência à doença (ZANELLA, 2007). Nos últimos anos as pesquisas têm dado ênfase à doença em cães, pois seu diagnóstico ajuda a traçar a rota de expansão da doença (MOLINA et al., 1994; ZANELLA, 2007).

Figura 2- Distribuição dos municípios do Estado de São Paulo segundo a classificação epidemiológica para leishmaniose visceral, em fevereiro /2008.

Fonte: GEL/Sucen/CCD. VLFCN/ fevereiro, 2008.

1.2 Aspectos de imunidade e controle da Leishmaniose visceral

A saliva do vetor exerce relevante papel, tanto de caráter biológico quanto parasitológico. Do ponto de vista parasitológico, a saliva veicula as formas infectantes (promastigotas metacíclicas). Em relação aos aspectos biológicos destacam-se os componentes neuropeptídeos de ação vasodilatadora e imunossupressora, que facilitam a introdução do aparelho bucal e estimulam o aporte sanguíneo, facilitando assim a hematofagia, bem como, a inibição da resposta imunológica e conseqüentemente, o estabelecimento do parasita no hospedeiro (GENARO, 2003). Um dos componentes da saliva, o maxidilan, além de vasodilatador e imunossupressor, parece inibir a apresentação de antígenos pelos macrófagos. A saliva é responsável também pelo prurido verificado logo após a picada (NEVES, 2003).

Após a picada, se inicia a resposta imune juntamente com um processo inflamatório inespecífico. Os mecanismos imunológicos que regulam a susceptibilidade ou resistência ao parasitismo por *Leishmania* spp permanecem obscuros. Com base em estudos experimentais de camundongos infectados com *L. major*, sabe-se que macrófagos apresentam antígenos aos Linfócitos TCD₄+, ocasionando a polarização da resposta imune e formando a base para o paradigma, Th1/Th2, com clara associação à proteção gerada pela resposta Th1 e susceptibilidade pela resposta Th2. Paralelamente a sobrevivência da *Leishmania* depende da evasão ao sistema imune do hospedeiro, sendo esse parasita altamente adaptado ao escape da imunidade humoral e celular (ZAMBRANO-VILLA et al., 2002).

Camundongos geneticamente suscetíveis desenvolvem lesões cutâneas no sítio de inoculação e falham no desenvolvimento de resposta imune ao parasita mediada por células; já os camundongos resistentes parecem curar-se rapidamente, graças a uma forte resposta imune celular, com resistência a novas infecções (AWASTHI et al., 2004). Assim, em camundongos experimentalmente infectados, cães naturalmente infectados ou seres humanos, a proteção ou resistência está associada com a resposta polarizada para células Th1. Enquanto a resposta Th2 está associada à susceptibilidade ou gravidade da doença (sintomáticos) (DAY, 2007).

No entanto, esse modelo imunológico não pode ser integralmente aplicado a Leishmaniose visceral humana, nem às infecções experimentais em camundongos e cães por *L. infantum*. Nestas últimas situações, uma mistura de resposta Th1-Th2 ou de outros subgrupos de células T estão provavelmente envolvidas (SOLANO-GALLEGO et al., 2001b). Todavia a resposta celular do hospedeiro é importante para o desenvolvimento da resistência e autocura, enquanto o desenvolvimento de anticorpos específicos tem pouco ou nenhum papel na proteção contra a doença (BOGDAN e ROLLINGHOFF, 1998; LOUIS et al., 1998).

A LV induz imunidade caracterizada por elevação nos níveis de imunoglobulinas séricas, principalmente IgG, e fraca resposta imune celular. Esta exacerbação dos níveis de IgG acarreta hipergamaglobulinemia que aumenta gradativamente e não se traduz em regressão da doença (NEVES, 2003).

Em conclusão, a resposta humoral não é considerada útil em conferir resistência à infecção, e sim em caracterizar humanos e animais sensíveis, na maioria das vezes sintomáticos (PINELLI et al., 1994).

Atualmente, o Ministério da Saúde por intermédio da Fundação Nacional de Saúde (FUNASA) e de Secretarias Estaduais e Municípios de Saúde, realiza o programa de Controle da LV centrado nas seguintes medidas: diminuir a densidade populacional do vetor, detecção e eliminação dos cães soropositivos, identificação e tratamento dos doentes (BRASIL, 2003).

A medida de controle para o reservatório canino acarreta profundo impacto com indignação dos proprietários, uma vez que o cão ocupa papel de “membro da família”, tornando-se medida difícil de ser adotada pelas autoridades de saúde pública (FEIJÃO et al., 2001). O mais grave, porém, são os resultados obtidos com a eliminação dos animais, questionáveis em relação ao controle da doença (DIETZE et al., 1997; COUTERNAY et al., 2002).

A descoberta de vacinas para humanos e cães seria a mais eficiente medida de controle para a LV (DYE, 1996). A existência de uma vacina eficaz para a doença canina poderá ter um impacto na diminuição da prevalência da infecção canina e, conseqüentemente, da humana (MARZOCHI et al., 1985; HOMMEL et al., 1995).

Recentemente, vacina baseada no ligante de fucose-mannose (FML) foi registrada pelo Ministério da Agricultura para uso veterinário no Brasil, e animais vacinados

apresentaram forte resposta imune humoral logo após o protocolo de vacinação. No entanto, a utilização desta vacina criou problema específico para levantamentos soropidemiológicos e por consequência nas campanhas de erradicação, já que, os testes sorológicos baseiam-se na detecção de IgG total, ficando impossível distinguir animais infectados de vacinados. Devido a essa problemática, muitos estudos atualmente estão sendo conduzidos para o desenvolvimento de um teste sorológico específico e discriminatório de subclasses de IgG, que poderia fornecer informações sobre a imunopatogênese natural do hospedeiro (humano e canino) (OLIVEIRA et al., 2009).

Frente a tais problemas o Ministério da Saúde determinou em nota técnica a proibição do uso da vacina e que os animais soroconvertidos em virtude deste uso, são passíveis de eutanásia, conforme o programa de controle de Leishmaniose visceral de 2003 (MS, 2003).

1.3 Diagnóstico da Leishmaniose visceral

O diagnóstico definitivo da LV no homem baseia-se nos exames clínicos, aliados a dados epidemiológicos e exames laboratoriais. Muitas doenças podem ser confundidas com a LV no hospedeiro humano, destacando-se a enterobacteriose de curso prolongado (associação de esquistossomose com salmonela ou outra enterobactéria), cujas manifestações clínicas se superpõem, perfeitamente, ao quadro da Leishmaniose visceral (MS, 2008).

Em muitas situações, esse diagnóstico diferencial só pode ser concluído por meio de provas laboratoriais, já que, as áreas endêmicas de outras doenças como malária, brucelose, febre tifóide, esquistossomose hepatoesplênica, doença de Chagas aguda, linfoma, mieloma múltiplo, anemia falciforme entre outras, se superpõem em grandes faixas do território brasileiro (MS, 2008). Segundo o Ministério da Saúde (2008) um caso humano de LV é definido como:

- a) suspeito: todo indivíduo proveniente de área onde existe transmissão, apresentando febre e esplenomegalia, ou todo indivíduo de área sem ocorrência de transmissão com febre e esplenomegalia, desde que descartados outros diagnósticos mais frequentes na região.

- b) confirmado: os casos suspeitos devem ser confirmados pelo critério clínico-epidemiológico ou laboratorial. O critério clínico-epidemiológico é estabelecido naqueles pacientes sem confirmação laboratorial, porém que são provenientes de área com transmissão de LV e com resposta favorável ao teste terapêutico. O critério laboratorial baseia-se no encontro do parasita pelo exame direto, cultura ou imunofluorescência com título acima de 1:80.

Na LV o diagnóstico laboratorial precoce é necessário para que os casos humanos recebam atendimento rápido, visando tratamento adequado e acompanhamento. Para os cães, eutanásia é recomendada em todos animais sororreagentes em imunofluorescência, ou seja, títulos a partir de 1:40 e/ou com exame parasitológico positivo (MS, 2008).

1.3.1 Diagnóstico parasitológico

Os exames parasitológicos são considerados métodos de referência no diagnóstico da LV. São simples, baratos e necessitam de pessoal bem treinado para a detecção do parasito. Existe variação de sensibilidade entre 50% a 98% no método parasitológico de acordo com o tecido pesquisado, podendo ocorrer resultados falsos negativos (MACHADO DE ASSIS et al., 2008). Além disso, uma desvantagem desses métodos baseia-se em alguns casos, na necessidade de procedimentos invasivos para coleta e obtenção das amostras, como aspirados de medula óssea e baço. (DA SILVA et al., 2004). A detecção dos parasitas pelo exame microscópico (método direto) é dependente da presença abundante dos mesmos na amostra, (IKEDA, 2004) de sua distribuição heterogênea (SCHALLIG, et al., 2002), da fase evolutiva da doença, técnica utilizada e pesquisador (FERREIRA e AVILA, 2001). Métodos que empregam o cultivo do parasita apresentam melhor sensibilidade, como por exemplo, cultivo de aspirado medular aumenta a positividade e a segurança do diagnóstico (GENARO, 2003). O crescimento se dá dependendo tanto da espécie do parasito quanto do meio de cultura utilizado (NAVIN et al., 1990). Apesar da melhora na sensibilidade, a demora para a obtenção dos resultados dificulta o diagnóstico precoce e o início do tratamento (GUERIN et al., 2002).

1.3.1.1 Métodos moleculares na detecção do parasito

A partir de 1980, várias técnicas de biologia molecular foram desenvolvidas com o objetivo de detectar e identificar DNA dos parasitas do gênero *Leishmania* (GONTIJO e MELO, 2004). Atualmente, para este fim, existem diversos sistemas baseados na utilização da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR - polymerase chain reaction) (SILVA et al., 2001; DEBORGGRAEVE et al., 2008), incluindo o teste quantitativo transcriptase reversa (RT-PCR, quantitative reverse transcriptase - polymerase chain reaction) (PAIVA et al., 2004; QUARESMA et al., 2009). O melhor alvo para PCR e sondas de DNA tem sido amostras de minicírculo de kDNA da região conservada ou amplificação do minicírculo completo (GONTIJO e MELO, 2004). Diferentes tipos de amostras biológicas, tais como, aspirados esplênicos, de medula óssea, de linfonodos, sangue total, camada leucocitária, cultura e sangue coletado em papel filtro, podem ser utilizados como fonte de material para as reações (TAVARES et al., 2003).

A PCR tem apresentado maior sensibilidade quando comparada á métodos parasitológicos ou até mesmo sorológicos clássicos, sem necessidade de isolamento do parasito em cultura. Na maioria das publicações, o método apresenta elevada sensibilidade (acima de 90%) e especificidade diagnóstica de até 100% (WU et al., 1997; DISCH et al., 2003). Entretanto deve ser considerado com cuidado, principalmente nos pacientes provenientes de áreas endêmicas, com alta exposição antigênica (RAVEL et al., 1995). Além disso, esses altos índices podem também ser obtidos com amostras de cães e raposas (CABRAL, 2006). De fato a PCR detém a vantagem de poder ser utilizada, por exemplo, em estudos epidemiológicos com cães assintomáticos em áreas endêmicas (BRASIL, 2003; GENARO, 2003). A eficácia da PCR pode depender de algumas variações e fatores inerentes a técnica, como, por exemplo, a utilização de diferentes métodos de extração de DNA (BRASIL, 2003), iniciadores ou genes alvo de diferentes espécies de *Leishmania* (LACHAUD et al., 2002; ALVES e BEVILACQUE, 2004), amostras (LACHAUD et al., 2001) e protocolos e/ou material biológico coletado (ALVAR et al., 2004; BANETH e AROCH, 2008).

Dificuldades encontradas para a padronização da PCR estão principalmente relacionadas à seleção dos genes alvo e posteriormente iniciadores (primers), fato que influencia diretamente na sensibilidade e especificidade. Além disso, também reações falsas negativas podem ocorrer quando a quantidade de DNA está abaixo da sensibilidade de detecção do teste (MANSUR, 2009).

Enquanto o diagnóstico molecular da LV em humanos pode ser considerado eficiente (LACHAUD et al., 2000), alguns problemas ainda persistem no diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC), como por exemplo, as dificuldades encontradas na preparação do DNA ou a alta frequência de inibidores de PCR em sangue de cães (LACHAUD et al., 2002).

Conforme já citado, apesar de ser um método sensível para a detecção de *Leishmania* em uma variedade de materiais clínicos de humanos e cães, a PCR vem sendo mais utilizada em estudos epidemiológicos ou em nível de pesquisas que avaliam a sua aplicabilidade no diagnóstico de rotina (SOLANO-GALLEGU et al., 2001a, GONTIJO e MELO, 2004). Ainda assim, sua realização é complexa (disponibilidade de reagentes e equipamentos) e apresenta custo elevado, limitação para uso em larga escala e pouca adaptabilidade ao campo (MACHADO DE ASSIS et al., 2008).

1.3.2 Diagnóstico Sorológico

Os testes sorológicos são de extrema importância no contexto do diagnóstico da LV. Atualmente são as ferramentas mais adequadas e alternativa mais realista no auxílio ao controle da LVH, já que, são também muito utilizados em inquéritos epidemiológicos (GONTIJO e MELO, 2004).

O diagnóstico sorológico é favorecido pela expressiva resposta imune humoral que caracteriza a doença. A pesquisa de anticorpos, entretanto, deixa a desejar no que concerne à especificidade (MACHADO DE ASSIS et al., 2008). A escolha do antígeno é de suma importância tanto para o diagnóstico individual da LV, como também para estudos epidemiológicos (BADARÓ et al., 1986). Os antígenos utilizados nos testes diagnósticos são quase sempre derivados de promastigotas de cultura, parasitos intactos ou moléculas solúveis e apresentam reações cruzadas com outras espécies da família *Trypanosomatidae* [*L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis*], mesmo filogeneticamente distantes (*T. cruzi*). Por

tanto, no diagnóstico sorológico da LV é necessário considerar o diagnóstico diferencial com outras doenças (GONTIJO e MELO, 2004).

O emprego de antígenos de espécies de leishmanias diferentes daquelas que não causam a doença têm sido utilizadas no imunodiagnóstico da LV em humanos (BADARÓ et al., 1983; BARBOSA DE DEUS et al., 2002), justificando-se tal uso pela elevada imunorreatividade cruzada entre diferentes espécies do parasita.

Na rotina laboratorial, a técnica mais utilizada para diagnóstico das Leishmanioses é a reação de imunofluorescência indireta (IFI, em inglês Immunofluorescence Antibody Test-IFAT). O teste atualmente é considerado como o “padrão ouro” do diagnóstico sorológico, sendo de fácil execução (MS, 2004). Sua sensibilidade varia de 82 a 95% e especificidade de 78 a 92%, dependendo muito da espécie de promastigotas de *Leishmania* empregada como antígeno (GENARO, 2003; TÁVORA et al., 2007).

A especificidade do IFI é prejudicada pela presença de reações cruzadas com doenças principalmente causadas por outros tripanossomatídeos. De fato apresenta cerca de 85% de reações cruzadas freqüentemente com soros de pacientes chagásicos e leishmaniose tegumentar, o que de certa forma prejudica o seu uso em regiões onde estas doenças se sobrepõe (GENARO, 2003; GONTIJO e MELO, 2004). Observaram-se também reações cruzadas, porém menos freqüentes com outras doenças como: tuberculose pulmonar, hanseníase (MS, 2004), malária e esquistossomose (SUNDAR e RAI, 2002). Com o objetivo de melhorar os índices imunodiagnósticos da IFI, Fernández-Pérez et al. (1999) utilizaram as formas amastigotas de *L. (L.) donovani* como antígeno e encontraram aumento significativo de especificidade, sem perda de sensibilidade. A cultura das formas amastigotas, entretanto, é complicada e de custo elevado, não sendo possível em laboratórios sem recursos técnicos ou financeiros.

Outra técnica muito utilizada é o ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), um teste rápido, sensível, de fácil execução e leitura, tendo se tornado importante para sorodiagnóstico desde o seu desenvolvimento em 1972 por Engvall e Perlmann (1971), e suas aplicações para o diagnóstico de doenças tropicais em 1977 por Völler e colaboradores, e para LV em 1978 por Hommel e colaboradores.

Muitos estudos avaliando e aprimorando o ELISA-padrão, assim como suas diversas variações: Dot-ELISA, fucose manose ligant-ELISA (FML-ELISA), bovine submaxillary mucin-ELISA (BSM-ELISA), Fast-ELISA, micro ELISA, entre outras, foram desenvolvidas e adaptadas

para uso com vários tipos de antígenos. Os principais antígenos utilizados são extratos de parasita total, antígenos purificados, peptídeos sintéticos, e até proteínas recombinantes, todos com a finalidade de melhorar o diagnóstico da Leishmaniose visceral humana (HOMMEL et al., 1978; PAPPAS et al., 1983; PAPPAS et al., 1985; CABRERA et al., 1999).

O ELISA, porém, que, utiliza extratos de formas promastigotas do parasita como antígeno é limitado quanto aos índices de sensibilidade e especificidade, principalmente devido à ocorrência das reações cruzadas com indivíduos com doença de Chagas e leishmaniose tegumentar (BADARÓ et al., 1986; REED et al., 1987; VEXENAT et al., 1996; SUNDAR e RAI, 2002).

Buscando aumentar a sensibilidade e principalmente a especificidade dos testes de diagnósticos para LVH, muitas moléculas foram purificadas para obtenção de proteínas recombinantes específicas do gênero *Leishmania* como, por exemplo, as glicoproteínas de membranas (gp63, gp72, gp70) e: rk39, SLA, rGBP, H2A, H2B, rLACK, rP20, rPSA-2 e A2; (HO et al., 1983; SHREFFLER et al., 1993; BADARÓ et al., 1996; JENSEN et al., 1999; CARVALHO et al., 2002; MAALEJ et al., 2003). Algumas destas proteínas recombinantes diminuíram a reatividade cruzada, mas também a sensibilidade do teste (GONTIJO e MELO, 2004).

No entanto, o uso de proteínas recombinantes não aboliu as reações cruzadas com *T. cruzi*. (MOHAMMED et al., 1986; JAFFE et al., 1988; BADARÓ et al., 1996; OZENZÖY, 1998). Também, obtenção das proteínas recombinantes é limitada aos laboratórios de estudo, e ainda sua comercialização nos países endêmicos é pouco acessível (UMEZAWA et al., 1996a).

Baleeiro e colaboradores (2006) demonstraram que variação na espécie de *Leishmania* para a preparação do antígeno pode influenciar significativamente no resultado do ELISA. Eles mostraram que a utilização de antígenos preparados a partir de *L. (L.) amazonensis* ou *L. (V.) braziliensis*, em vez de *L. (L.) chagasi* resultou em diminuição da reatividade com soros de cães, resultado que poderia refletir na detecção de anticorpos anti-leishmania nos humanos.

Muitos pesquisadores baseados na elevada homologia genética das espécies de *Leishmania* e alta reatividade cruzada, acreditam, ser motivos suficientes para empregar diferentes espécies de *Leishmania* no diagnóstico da LV humana e canina (BARBOSA DE DEUS et al., 2002; LIRA et al., 2006).

Outra técnica muito utilizada para o diagnóstico da LV é o Immunoblotting (IB). Com sensibilidade reconhecidamente mais elevada do que a IFI e o ELISA, permite diagnóstico

precoce da LV, e poderia ser utilizada como preditivo da doença e do parasitismo no cão e humanos (EVANS et al., 1989; MARY et al., 1992; MARTY et al., 1995; CARDEÑOSA et al., 1995; AISA et al., 1998; SANTOS-GOMES et al., 2000; KUMAR et al., 2002; DE PAULA et al., 2003; NOGUEIRA et al., 2007).

O immunoblotting (IB) permitiu identificar algumas das diferentes proteínas presentes no gênero *Leishmania* durante o ciclo de vida, o que vem sendo motivo de estudo, visto que, muitas delas são de importância na relação parasita hospedeiro, estando implicadas em diversas funções como virulência, patogênese, replicação, nutrição, evasão imune entre outras (CHAUDHURI e CHANG, 1988; MEDINA ACOSTA et al., 1989; HEY et al., 1994; CIBRELUS et al., 1999; McGWIRE et al., 2003).

Estudos com os antígenos totais de *L. donovani infantum* mostraram a existência de bandas reconhecidas por anticorpos, de peso molecular que variam de 12 a 120 kDa. Entretanto apenas as proteínas de 14, 16, 18, 21, 23, 31, 65, 70 e 94 kDa se mostraram específicas e, portanto, importantes para o diagnóstico tanto da LVH quanto da LVC (MARY et al., 1992; MARTY et al., 1995; ROLLAND et al., 1995; AISA et al., 1998; SALOTRA et al., 1999; KUMAR et al., 2002; DE PAULA et al., 2003; NOGUEIRA et al., 2007). Até agora o potencial interesse do immunoblotting para diagnóstico da LV continua sendo discutido, visto que, ainda não há um consenso geral de um padrão definido correlacionado com a infecção e doença ativa (DA COSTA et al., 1996; MAIA e CAMPINO, 2008).

1.4 Situação do diagnóstico da Leishmaniose visceral no cão

A identificação de cães infectados (soropositivos) e sua eliminação (eutanásia) é uma das medidas de controle preconizadas pelo Ministério da Saúde, para reduzir a infecção humana, já que, casos de calazar canino precedem os humanos em áreas urbanas do Brasil (PARANHOS-SILVA et al., 1996; GALIMBERTTI et al., 1999).

Vários estudos têm considerado o papel do cão doméstico na transmissão da Leishmaniose visceral humana (LVH), o mais importante achado que surgiu de tais investigações é que cães infectados com LVC parecem estar em perfeita saúde (assintomáticos), ou alternativamente, eles podem apresentar sintomas leves, moderados ou graves (MANCIANTI e MECIANI, 1988).

O êxito no diagnóstico da LV em cães é difícil, uma vez que os sinais clínicos da doença são variados e não-específicos (ALVAR, et al., 1994; MOLINA, et al., 1994). Parte das dificuldades com as medidas de controle diz respeito à sensibilidade e especificidade dos atuais testes sorológicos utilizados na rotina laboratorial (IFI e ELISA) para caracterizar infecção e doença. A sensibilidade desses testes é bastante discutível, não havendo concordância entre testes parasitológicos, imunohistológicos com os sorológicos. Atribui-se essa discordância à incapacidade dos testes sorológicos detectarem em anticorpos nas várias fases da doença. Tal fato apresenta sérias conseqüências, pois implica na morte de animais (CABRERA et al., 2003).

No Brasil, os inquéritos sorológicos para identificação de cães infectados com LVC são realizados com testes comerciais. Os mais utilizados são os testes de IFI e ou ELISA produzidos pelo Instituto Bio-Manguinhos, Fundação Oswaldo Cruz-RJ, que utilizam como antígeno, respectivamente promastigotas e extrato total de *Leishmania major-like* (espécie que causa Leishmaniose cutânea). Estes testes são amplamente empregados pelo Ministério da Saúde e, baseiam-se exclusivamente na detecção de anticorpos anti-leishmania, não avaliando a carga parasitaria. Podem, portanto, apresentar as dificuldades já citados anteriormente, com a presença de falso-negativos e falso-positivos (MANSUR, 2009). Todavia a melhor forma de aumentar a sensibilidade e especificidade do diagnóstico é a realização combinada dos dois testes (ELISA e IFI), em vez de realizar apenas IFI (2004).

Em animais com resultados discordantes entre as metodologias, o mais indicado é considerar o quadro clínico do animal e repetir o exame após um mês. Pode-se, ainda, realizar o exame parasitológico direto e ou PCR. É importante ressaltar que resultados negativos nestas metodologias não devem ser usados como confirmatórios (ALVAR et al., 2004; BANETH e AROCH, 2008).

Por outro lado, a utilização da sorologia é questionável, animais saudáveis podem ser soropositivos, e animais infectados ocasionalmente se tornam soronegativos, dificultando o uso destas técnicas. A sorologia mostra que animais infectados desenvolvem uma resposta específica de anticorpos, e a proporção de soroconversão entre animais com infecção clínica ou subclínica é desconhecida (CABRAL, 2006).

Alguns autores têm relatado aumento na sensibilidade dos testes imunológicos anti-*Leishmania* usando cepas do mesmo parasita (BADARÓ et al., 1986) ou da espécie (REED et al., 1986) associada à infecção, como fontes de antígenos.

Na rotina diagnóstica, porém, diferentes espécies de *Leishmania* daquelas implicadas na gênese da doença são utilizadas como fonte de antígenos (PARANHOS-SILVA et al., 2001; ZIJLSTRA et al., 2001; EL-SAFI et al., 2002; BORGES et al., 2003).

Recentemente, para o diagnóstico da LVC, ELISA com “pool” de exoantígenos de formas promastigotas de diferentes espécies mostrou melhor sensibilidade e especificidade quando comparado ao emprego individual da cada antígeno (RAJASEKARIAH et al., 2008).

Por outro lado, estudos recentes sugeriram o emprego de Immunoblotting (IB) para melhorar a sensibilidade, sugerindo a possibilidade da sua utilização como preditora da doença e do parasitismo no cão. Provavelmente os cães positivos para o IB e negativos para o IFI ou ELISA, sejam animais resistentes que apresentam baixos níveis de anticorpos (DE PAULA et al., 2003; DA SILVA et al., 2005). Com relação ao estudo do reconhecimento antigênico a técnica de IB, mostrou maior sensibilidade em comparação à IFI; 26% dos cães que estavam negativos para IFI, apresentavam para IB reatividade para frações antigênicas (29 e 32 kDa), até 8 meses antes da soroconversão, sendo que alguns permaneceram negativos até o fim do acompanhamento (DA SILVA et al., 2005).

Outra questão que deve ser considerada no hospedeiro canino é também a intensa reatividade cruzada com outros agentes infecciosos, principalmente *T. cruzi*, *Ehrlichia canis* e *Babesia canis* (FERREIRA et al., 2007), resultando em testes com baixa especificidade. Além disso, sobretudo no hospedeiro canino, animais infectados assintomáticos podem apresentar resultado falso-negativos devido a baixa sensibilidade dos testes (SALOTRA et al., 2002; MAIA e CAMPINO, 2008). De fato a prevalência da infecção em áreas endêmicas, muitas vezes é subestimada, quando animais assintomáticos não são incluídos nos grupos de estudo para serem considerados nas medidas de controle.

1.5 Moléculas excretadas-secretadas pelas leishmanias

Durante o ciclo de vida, as espécies de *Leishmania* secretam vários antígenos, que poderiam estar diretamente implicados em muitas alterações imunológicas ou bioquímicas da célula hospedeira (CIBRELUS et al., 1999).

Substâncias antigênicas solúveis secretadas por amastigotas de *L. donovani* foram detectadas pela primeira vez por Nattan-Larrier e Grimard-Richard em 1933, em soro de cachorros infetados com LV.

Mais trabalhos apareceram durante a década de sessenta; caso de Adler e Gunders (1964) que demonstraram a liberação de "exoantígenos" por *L. tropica* e *L. mexicana* (amastigotas e promastigotas) o que foi em seguida confirmado por Sergeiev e Shuikina (1969) para *L. tropica*.

Mais tarde, em 1972 Schnur, Zuckerman e Greenblatt, demonstraram que as formas promastigotas da *L. donovani* e de outras espécies do gênero *Leishmania*, secretam no meio de cultura os chamados fatores de excreção (EF – excreted factor), durante e logo após a fase logarítmica do seu crescimento "*in vitro*". As formas amastigotas também produzem os EFs. Estes EFs comportam-se como haptenos, pois, quando inoculados em coelhos não levam à produção de anticorpos.

De acordo com Schnur e Zuckerman (1976) os EFs são capazes de precipitar "*in vitro*", anticorpos anti-promastigota produzidos em coelhos, e mostraram-se espécie específicos, servindo como base para a "sorotipagem" de amostras das espécies do gênero *Leishmania*.

El-On em 1979 realizou uma análise bioquímica do EF e encontrou riqueza em carboidratos associado a outro componente do parasita que podem precipitar anticorpos anti-promastigota produzido em coelhos.

Em 1981 Semprevivo e MacLeod conseguiram demonstrar que os EFs excretados pelas formas promastigotas de *L. donovani* em meio de cultura são moléculas complexas, que têm em sua constituição carboidratos, peptídeos, fósforo, lipídeos e esfingosina. Referiram-se ao fato de que moléculas de constituição semelhante são encontradas na membrana plasmática de *T. cruzi*, *Acanthamoeba castellani* e plantas.

Posteriormente ficou demonstrado que os parasitas do gênero *Leishmania* apresentam na membrana plasmática um denso glicocálix composto de: lipofosfoglicana (LPG – "lipophosglycan"), glicosilinositolfosfolípidos (GIPLs – "glycosylinositolphospholipids"), glicoproteínas e fosfatases ácidas secretadas conservadas (SACPs – "secreted acid phosphatase") (FERGUSON, 1997,1999; TURCO, 2003).

A LPG é uma das mais abundantes moléculas da superfície celular do parasita inteiro (promastigota e amastigota), incluindo o flagelo. Esta molécula encontra-se em todas as espécies do gênero *Leishmania* que infectam humanos (McCONVILLE e FERGUSON, 1993),

com exceção de *L. major* que no estágio de amastigota expressa pouco ou nenhum LPG (MOODY et al., 1993).

A LPG tem diferentes funções nos hospedeiros vertebrados, por exemplo, alguns experimentos "*in vitro*" mostraram que esta molécula confere proteção aos promastigotas de *Leishmania* contra lise mediada por complemento e atua como receptor mediando a endocitose por macrófagos. Além disso, dentro do macrófago a LPG atua inibindo o "burst" oxidativo e a fusão endosoma-fagossoma. Desta forma foi relacionada como um fator de virulência principalmente na interação com o hospedeiro vetor (TURCO e DESCOTEAUX, 1992; TURCO, 2003).

Os GIPLs expressos abundantemente no estágio de promastigotas são uma grande família de glicolipídeos de baixo peso molecular, sintetizada por o gênero *Leishmania* que formam camadas densas na superfície do parasita, acima do qual se projetam outras moléculas ancoradas por glicofosfolipídeos (GPI – "glycophospholipids") (FERGUSON, 1997, 1999; TURCO, 2003). Ainda não é muito conhecido o papel desempenhado por esses glicolipídeos na interação parasita-hospedeiro, porém o uso de receptor de manose para ligação da *Leishmania* a macrófagos sugere que os GIPLs ricos em manose possam ter papel importante na invasão celular (TURCO, 2003). Os GIPLs estão também presentes em outras espécies de tripanosomatídeos como, por exemplo: *Leptomonas samueli* (PREVIATO et al., 1992) *Endotrypanum schaudinni*, *Herpetomonas samuelpessoai* (ROUTIER et al., 1995) e *Crithidia fasciculata* (SCHENEIDER et al., 1996), com estrutura semelhante aos de *Leishmania* spp e *T. cruzi* (TURCO, 2003). Essa estrutura corresponde a um motivo comum definido como Man alpha 1-4GlcN alpha 1-6-myo-inositol-1-HPO₄-lipídio (FERGUSON, 1997), molécula que poderia ser a responsável pela reatividade cruzada encontrada entre estes tripanossomatídeos proximamente relacionados.

Outra molécula, importante presente na membrana das leishmanias é a gp63 ou leishmanolisina (do inglês Leishmanolysin) é uma glicoproteína enzimática do tipo metaloprotease conservada nas diferentes espécies (ETGES, BOUVIER e BOURDIER, 1986; MEDINA-ACOSTA et al., 1989). É expressa em amastigota e mais abundantemente em promastigota, podendo ser excretada-secretada nos ambientes extracelulares (MEDINA-ACOSTA et al., 1989; McGWIRE et al., 2002; JAFFE e DWYER, 2003). Esta molécula está presa à membrana por âncoras de GPI (DESCOTEAUX e TURCO, 1999), e sua função não é clara, mas está relacionada à virulência do parasita e resistência lise mediada por complemento

(BRITTINGHAM et al., 1995). Recentemente alguns estudos com metaloproteases, como a gp63 tem demonstrado o potencial das mesmas como alvos para agentes quimioterápicos (CHENIK et al., 2006) ou na elaboração de vacinas (BEVERLEY et al., 2005, CHENIK et al., 2006).

As fosfatases ácidas secretadas conservadas (SACPs) são outras proteasas sintetizadas e liberadas por varias espécies de *Leishmania* presentes em abundância nas formas promastigotas (GOTTLIED e DWYER, 1982; BATES e DWYER, 1987), com exceção de *L. major* (DOYLE e DWYER, 1993). Ellis e colaboradores em 1998 nos seus experimentos com soros de pacientes com Leishmaniose cutânea infectados com *L. tropica*, *L. major*, *L. mexicana* e *L. braziliensis* mostraram que todos possuíam anticorpos anti-SACPs. Os autores também concluíram que os amastigotas destas espécies produzem SACPs, e indicaram a conservação estrutural desta enzima entre estas espécies de *Leishmania*. A presença de SACPs nas diversas espécies de *Leishmania* leva a hipótese de que estas moléculas desempenham um importante papel na sobrevivência da parasita dentro do hospedeiro humano (ELLIS, SHAKARIAN e DWYER, 1998).

Outra protease existente na superfície de membrana no estágio de amastigota das leishmanias é uma cisteíno proteinase de 30 kDa (p30) que está associada à resposta imuno celular das células Th1 encontrada em *L. (L) chagasi*. Esta protease permitiu proteção parcial em ratos BALB/c infectados com *L. (L) chagasi* (PINTO et al., 2000). A p30 da *L. (L) chagasi* apresenta similaridade ao antígeno de 30 kDa de amastigotas *L. (L) amazonensis* na resposta protetora em camundongos (BEYRODT et al., 1997). A cisteíno proteinase de 30 kDa já foi descritas também em amastigotas de *L. (L) pifanoi* e outras espécies de leishmanias do complexo *L. mexicana* (COOMBS, 1982; PUPKIS e COOMBS, 1984; ALFIERI et al., 1989).

1.5.1 Diagnóstico com os metabólitos excretados-secretados de *Leishmania*

Como abordado anteriormente diversas técnicas podem ser utilizadas para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana e canina. Apesar dos muitos avanços que ocorreram nos últimos anos e a despeito do grande número de testes disponíveis para o diagnóstico, nenhum apresenta sensibilidade e especificidade desejáveis (GONTIJO e MELO, 2004).

O fraco desempenho dos testes sorológicos utilizados na rotina laboratorial para o diagnóstico da LVH e da LVC pode estar diretamente limitado ao antígeno. Como visto anteriormente, Isso pode ter relação direta com a espécie que se utiliza como antígeno, que muitas vezes é diferente da que infecta o hospedeiro submetido ao teste.

Ao longo dos anos, várias moléculas envolvidas na biologia do parasito ou alvo para anticorpos específicos do hospedeiro como resposta celular foram identificados (FERGUSON, 1999; TURCO, 2003).

Alguns estudos têm demonstrado em doença de Chagas a importância da utilização de antígenos solúveis excretados-secretados designados freqüentemente de exoantígenos ou antígenos “shedados”, que são eliminados para o meio onde o parasita cresce. Estes exoantígenos são principalmente moléculas de superfície da membrana plasmática do parasito, e são importantes na patogenia da doença (UMEZAWA et al., 1996a, 2001). Por exemplo, o uso dos metabólitos excretados-secretados pelas formas tripomastigotas de *T. cruzi* no immunoblotting resultou em teste que pode ser considerado confirmatório para a doença (UMEZAWA et al., 1996a).

Outros estudos mostraram que as moléculas excretadas-secretadas de patógenos intracelulares, como por exemplo, *Mycobacterium tuberculosis* e *Toxoplasma gondii*, contem antígenos altamente imunogênicos e protetores em modelos de vacina (PRIGIONE et al., 2000; SHAMS et al., 2004).

Entre os primeiros trabalhos que mostraram a importância da utilização dos exoantígenos para o diagnóstico da LV, estão os trabalhos de Sergeiev e Shikuna (1969); Schnur e colaboradores (1972), que reportaram que os produtos metabólicos dos promastigotas excretadas ao meio de cultura são imunogênicos ao hospedeiro. Estas moléculas também produzem uma reação de hipersensibilidade na pele sensibilizada de cobaias e humanos (CLINTON et al., 1972).

Mas recentemente, Ellis et al. (1998) usando as fosfatases ácidas secretadas conservadas do meio de cultura de promastigotas de *L. donovani*, precipitaram anticorpos específicos de um pool de soros de pacientes com LV, coletados durante a fase aguda da doença. Isso indicou que usar os componentes presentes no meio de cultura das formas promastigotas poderia servir como uma fonte de antígenos para o imunodiagnóstico da leishmaniose.

Martin e colaboradores (1998) foram os primeiros a avaliar os exoantígenos da cultura de promastigotas de *L. donovani* por ELISA, com elevada sensibilidade e especificidade na detecção de anti IgG de *Leishmania*. Nenhuma reatividade cruzada foi encontrada com soros de pacientes com malária, filarioses, tripanossomíases africana e equinococoses.

Em 2002, Ryan e colaboradores, mostraram também por ELISA que os exoantígenos de *L. donovani* só podiam reagir com anticorpos de pacientes com LV. A reatividade com anticorpos de pacientes com leishmaniose cutânea só foi evidenciada quando uso-se exoantígenos de *L. mexicana*. Mostrando a especificidade diferenciada das moléculas excretadas-secretadas.

Conforme já abordado anteriormente, Rajasekariah et al. (2008) desenvolveram ELISA, para o diagnóstico da LVC com “pool” de exoantígenos preparado a partir de três espécies de *Leishmania* (*L. infatum*, *L. donovani* e *L. major*). Os resultados mostraram correlação de 100% com a sintomatologia clínica e muitos soros de cães assintomáticos foram reativos.

São escassos, ainda, os estudos epidemiológicos da avaliação de exoantígenos liberados pelas formas promastigotas de [*L. (L.) chagasi*] no sorodiagnóstico da LV no hospedeiro humano ou canino.

Os pesquisadores vêm mostrando que estas moléculas liberadas parecem ter propriedades únicas, apresentando epitopos específicos diferentes daquelas encontradas nos extratos totais, e que os mesmos poderiam ser capazes de eliminar as reações cruzadas, e conferir uma alta especificidade para o diagnóstico da LVH e LVC.

Uma vantagem do uso dessas moléculas liberadas espontaneamente no meio de cultura decorre do fato de serem obtidas facilmente sem necessidade de técnicas sofisticadas ou mesmo de purificação (GONÇALVES et al., 1991; UMEZAWA et al., 1996a, 2001; ROMERO et al., 2004). Além disso, a cultura de promastigotas de *Leishmania* é uma fonte de antígenos barata para o imunodiagnóstico da leishmaniose visceral (MARTIN et al., 1998).

6 CONCLUSÕES

6.1 HOSPEDEIRO HUMANO

- 1- O diagnóstico da leishmaniose visceral humana pode ser efetuado pelo ELISA que utiliza tanto antígenos preparados com parasitas homólogos como heterólogos, não há uma reação espécie-específica. A sensibilidade obtida pelo ELISA foi de 100% obtida com todas as espécies de leishmanias utilizadas, incluindo os diferentes preparados antigênicos.
- 2- O ELISA que utilizou exoantígenos da *L. (L.) chagasi* apresentou os mais altos títulos.
- 3- O ELISA que utilizou exoantígenos (ES), independente da espécie de *Leishmania*, apresentaram melhores índices de especificidade quando comparados com os antígenos totais (AT).
- 4- A maior reatividade cruzada foi obtida com os ELISAs que utilizaram antígenos totais, independente da espécie de *Leishmania*.
- 5- Não houve discriminação entre indivíduos com Leishmaniose cutânea (LC) dos com Leishmaniose mucocutânea (LMC), quando se utilizou o ELISA com as diferentes espécies de leishmanias.
- 6- O ELISA que utilizou exoantígenos apresentou baixa reatividade cruzada com pacientes chagásicos, independente da espécie de *Leishmania*.
- 7- Pacientes com LV apresentaram reatividade com três bandas protéicas no Immunoblotting preparado com exoantígenos, independente da espécie de *Leishmania* utilizada.
- 8- O IB preparada com exoantígenos de *L. (L.) chagasi* (IBleish) não mostrou reatividade cruzada com os pacientes chagásicos, ao contrário da *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) braziliensis*.

- 9- O IBleish-*L. (L.) chagasi* não distinguiu entre pacientes com Leishmaniose tegumentar dos com a visceral, as três espécies reagiram com o perfil de reatividade similar àquela encontrada com os pacientes com LV.

6.2 HOSPEDEIRO CANINO

- 1- ELISAs preparados com antígeno total ou exoantígenos, independente da espécie de *Leishmania* e independente da clínica dos cães (sintomáticos ou assintomáticos) apresentaram sensibilidades de 100%.
- 2- ELISAs preparados com exoantígenos da *L. (L.) chagasi* apresentaram altos títulos em cães com LVC-sintomático e assintomático do que as apresentada pelas às duas outras espécies de leishmanias.
- 3- Os exoantígenos independente da espécie de *Leishmania* apresentaram índices mais específicos do que os antígenos totais. A maior especificidade do ELISA foi obtida com os exoantígenos espécie-específica *L. (L.) chagasi* (94,9%).
- 4- Menor reatividade cruzada foi observada com os exoantígenos, independente da espécie de *Leishmania* utilizada.
- 5- Animais com LCV reconheceram três bandas protéicas no IB preparado com exoantígenos de *L. (L.) chagasi*.
- 6- O IB preparado com exoantígenos de *L. (L.) chagasi* apresentou 100% de sensibilidade e especificidade, por outro lado o IBleish-ES das *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) braziliensis* apresentaram reatividade cruzada com cães infectados com *T. cruzi*.
- 7- O dados de IBleish-*L. (L.) chagasi* sugerem que este poderia ser utilizado como metodologia confirmatória no diagnóstico sorológico de cães afetados pela Leishmaniose canina.
- 8- O perfil de reatividade correspondente a três bandas imunodominantes (27, 28 e 31 kDa) apresentadas por hospedeiros humano e canino, afetados pela LV é semelhante.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ABRAMO, C.; FONTES, C. J.; KRETTLI, A. U. Cross-reactivity between antibodies in the sera of individuals with leishmaniasis, toxoplasmosis, and Chagas' disease and antigens of the blood-stage forms of *Plasmodium falciparum* determined by indirect immunofluorescence. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 53, n. 2, p. 202-5, 1995.

ADLER, S.; GUNDERS, A. E. Secretion of antigen in cultures of leptomnads and hamster spleen infected with *Leishmania*. **J. Protozool.**, v. 11, p. 42, 1964.

AISA, M. J.; CASTILLEJO, S.; GALLEGU, M.; FISA, R. C.; RIERA, C. M.; DE COLMENARES, M.; TORRAS, S.; ROURA, X.; SENTIS, J.; PORTUS, M. Diagnostic potential of western blot analysis of sera from dogs with leishmaniasis in endemic areas and significance of the pattern. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 58, n. 2, p. 154-159, 1998.

AJDARY, S.; ALIMOHAMMADIAN, M. H.; ESLAMI, M. B.; 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. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 1760-1764, 2000.

ALFIERI, S. C.; SHAW, E.; ZILBERTFARD, V.; RABINOVITH, M. *Leishmania amazonensis*: involvement of cysteine proteinases in the killing of isolated amastigotes by L-leucine methyl ester. **Exp. Parasitol.**, v. 68, n. 4, p. 423-31, 1989.

ALMEIDA, M. A. O.; JESUS, E. E. V.; SOUSA-ATTA, M. L. B.; ALVES, L. C.; BERNE, M. E. A.; ATTA, A. M. Antileishmanial antibody profile in dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 106, p. 151-158, 2005.

ALVAR, J.; MOLINA, R.; SAN ANDRES, M.; TESOURO, M.; NIETO, J.; VITUTIA, M.; GONZALES, F.; SAN ANDRES, M. D.; BOGGIO, J.; RODRIGUEZ, F. Canine leishmaniasis: clinical, parasitological and entomological follow up after chemotherapy. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 88, p. 371-378, 1994.

ALVAR, J.; CANAVETE, C.; MOLINA, R.; MORENO, J.; NIETO, J. Canine leishmaniasis. **Adv. Parasitol.**, v. 57, p. 1-87, 2004.

ALVES, W. A.; BEVILACQUA, P. D. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. **Cad. Saúde Pública**, v. 20, p. 259-265, 2004.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

AMATO-NEVES, V. Leishmaniose visceral com período de incubação de, pelo menos, quatro anos. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 20, n. 5, p. 312-314, 1978.

ANAM, K.; AFRIN, F.; BANERIEE, D.; PRAMANIK, N.; GUHA, S. K.; GOSWAMI, R. P.; GUPTA, P. N.; SAHA, S. K.; ALI, N. Immunoglobulin subclass distribution and diagnostic value of *Leishmania donovani* antigen-specific immunoglobulin G3 in Indian Kala-azar patients. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 6, n. 2, p. 231-5, 1999a.

ANAM, K.; AFRIN, F.; BANERIEE, D.; PRAMANIK, N.; GUHA, S. K.; GOSWAMI, R. P.; SAHA, S. K.; ALI, N. Differential decline in *Leishmania* membrane antigen-specific immunoglobulin G (IgG), IgM, IgE, and IgG subclass antibodies in Indian Kala-azar patients after chemotherapy. **Infect Immun.**, v. 67, n. 12, p. 6663-9, 1999b.

ANDRADE, T. M.; TEIXEIRA, R.; ANDRADE, J. A. F.; PEREIRA C.; CARVALHO, E. M. Hipersensibilidade de tipo retardado na leishmaniose visceral. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 24, p. 298-302, 1982.

ANTHONY, R. L.; CHRISTENSEN, H. A.; JOHNSON, C. M. Micro enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the serodiagnosis of New World leishmaniasis. **Am J. Trop. Med Hyg.**, v. 29, n. 2, p. 194-4, 1980.

ASHFORD, R.W. The Leishmaniasis. In: PALMER, S.R.; SOULSBY, L.; SIMPSON, D.I.H. **Zoonoses Biology, Clinical Practice, and Public Health Control**. Oxford: University Press, 1998. p. 527-43.

AWASTHI, A.; MATHUR, R. K.; SAHA, B. Immune response to *Leishmania* infection. **Indian J. Med. Res.**, v. 119, p. 238-258, 2004.

BADARÓ, R.; REED, S. G.; CARVALHO, E. M. Immunofluorescent antibody test in American visceral leishmaniasis: sensitivity and specificity of different morphological forms of two *Leishmania* species. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 32, n. 3, p. 480-484, 1983.

BADARÓ, R.; CARVALHO, E. M.; ORGE, M. G.; TEIXEIRA, R. S.; ROCHA, H. Imunidade humoral e celular em indivíduos curados de leishmaniose visceral. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 18, n. 2, p. 77-83, 1985.

BADARÓ, R. L.; REDD, S. G.; BARRAL, A.; ORGE, G.; JONES, T. C. Evaluation of the micro enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for antibodies in american visceral leishmaniasis: antigen selection for detection of infection-specific responses. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 35, p. 72-78, 1986.

BADARÓ, R. L.; BENSON, D.; EULALIO, M. C.; FREIRE, M.; CUNHA, S.; NETTO, E. M.; PEDRAL-SAMPAIO, D.; MADUREIRA, C.; BURNS, J. M.; HOUGHTON, R. L.; DAVID, J. R.; REED, S. G. rk39 a cloned antigens of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral leishmaniasis. **J. Infect. Dis.**, v. 173, p. 758-761, 1996.

BALEIRO, C. O.; PARANHOS-SILVA, M.; DOS SANTOS, J. C.; OLIVEIRA, G. S. G.; NASCIMENTO, G. E.; PONTES-DE-CARVALHO, L.; DOS SANTOS, W. L. C. Montenegro's skin reactions and antibodies against different *Leishmania* species in dogs from a visceral leishmaniosis endemic area. **Vet. Parasitol.**, v. 139, p. 21-28, 2006.

BANETH, G. Leishmaniasis. In: GREENE, C.E. **Infectious diseases of the dog and cat**. 3 ed. Philadelphia: Elsevier; 2006. p. 685-698.

BANETH, G.; AROCH, I. Canine Leishmaniasis a diagnostic and clinical challenge. **Vet. J.**, v. 175, p. 14-14, 2008.

BARBOSA DE DEUS, R.; DOS MARES-GUIA, M. L.; NUMES, A. Z.; COSTA, K. M.; JUNQUEIRA, R. G.; MAYRINK, W.; GENARO, O.; TAVARES, C. A. *Leishmania major*-like antigen for specific and sensitive serodiagnosis of human and canine visceral leishmaniasis. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 9, n. 6, p. 1361-6, 2002.

BARBERIE, C. L. Immunology of canine leishmaniasis. **Parasite Immunol.**, v. 28, p. 329-37, 2006.

BATES, P. A.; KURTZ, M. K.; GOTTLIEB, M.; DWYER, D. M. *Leishmania donovani*: generation of monoespecific antibody reagents to soluble acid phosphatase. **Exp. Parasitol.**, v. 64, p. 157-164, 1987.

BATES, P. A.; DWYER, D. M. Biosynthesis and secretion of acid phosphatase by *Leishmania donovani* promastigotes. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 26, n. 3, p. 289-96, 1987.

BERRAHAL, F.; MARY, C.; ROZE, M.; BERENGER, A.; ESCOFFIER, K.; LAMOUROUX, D.; DUNAN, S. Canine leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 55, n. 3, p. 273-7, 1996.

BEVERLEY, S. M.; OWENS, K. L.; SHOWALTER, M.; GRIFFITH, C. L.; DOERING, T. L.; JONES, V. C.; McNEIL, M. R. Eukaryotic UDP-galactopyranose mutase (GLF gene) in microbial and metazoal pathogens. **Eukaryotic. cell.**, v. 4, n. 6, p. 1147-1154, 2005.

BEYRODT, C. G.; PINTO, A. R.; FREYMULLER, E.; BARBIÉRI, C. L. Characterization of an antigen from *Leishmania amazonensis* amastigotes able to elicit protective responses in a murine model. **Infect. Immun.**, v. 65, n. 6, p. 2052-9, 1997.

BOURDOISEAU, G.; BONNEFONT, C.; HOAREAU, E.; BOEHRINGER, C.; STOLLE, T.; CHABANNE, L. Specific IgG1 and IgG2 antibody and lymphocyte subset levels in naturally *Leishmania infantum* infected treated and untreated dogs. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 59, p. 21-30, 1997.

BORGES, V. C.; RUIZ, M. C.; GOMES, P. M.; COLOMBO, A. R.; SILVA LDE, A.; ROMERO, H. D.; PRATA, A. Montenegro intradermoreaction after the test sequential repetitions in Porteirinha, Minas Gerais State, Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 36, p. 249-251, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Brasília: Editora, 2003. p. 120.

BRITO, M. E.; MENDONÇA, M. G.; GOMES, Y. M.; JARDIM, M. L.; ABATH, F. G. Identification of potentially diagnostic *Leishmania braziliensis* antigens in human cutaneous leishmaniasis by immunoblot analysis. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 7; p. 318-21, 2000.

BRITTINGHAM, A.; MORRISON, C. J.; McMASTER, W. R.; McGUIRE, B. S.; CHANG, K. P.; MOSSER, M. D. Role of the *Leishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis. **J. Immunol.**, v 155, n. 6, p. 3102-11, 1995.

CABRAL, M.; O'GRADY, J. E.; SOUSA, J. C.; THOMPSON, H., ALEXANDER, J. The immunology of canine leishmaniosis: strong evidence for a developing disease spectrum from asymptomatic dogs. **Vet. Parasitol.**, v. 76, n. 3, p. 173-80, 1998.

CABRAL, A. W. D. **Estudo comparativo entre o diagnóstico por técnicas sorológicas e da PCR para a detecção de *Leishmania* spp.** Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2006.

CABRERA, G. P.; SILVA, V. O.; COSTA, R. T.; GENARO, O. The fucose mannose ligand- Elisa in the diagnosis and prognoses of canine visceral leishmaniasis in Brazil. **Ann. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 61, p. 296-301, 1999.

CABRERA, M. A.; PAULA, A. A.; CAMACHO, L. A.; MARZOCHI, M. C.; XAVIER, S. C.; DA SILVA, A. V.; JANSEN, A. M. Canine visceral leishmaniasis in Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: assessment of risk factors. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 45, n. 2, p. 79-83, 2003.

CAMARGO-NEVES, V. L. F. KATZ, G. Leishmaniose Visceral Americana no Estado de São Paulo. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 32, p. 63-4, 1999.

CARDEÑOSA, N.; RIERA, C.; CORTES, P.; MARCH, F.; MUÑOZ, C.; PORTUS, M.; PRATS, G. Detection and characterization by immunoblot analysis of potentially diagnostic *Leishmania infantum* polypeptides in human visceral leishmaniasis. **Parasite Immunol.**, v. 17, p. 509-516, 1995.

CARRERA, L.; FERMIN, M. L.; TESOURO, M.; GARCIA, P.; ROLLÁN, E.; GONZÁLEZ, J. L.; MÉNDEZ, S.; CUQUERELLA, M.; ALUNDA, J. M.; Antibody response in dogs experimentally infected with *Leishmania infantum*: infection course antigen markers. **Exp. Parasitol.**, v. 82; p. 139-46, 1992.

CARRERA, L.; FERMÍN, M. L.; TESOURO, M.; GARCÍA, P.; ROLLÁN, E.; GONZÁLEZ, J. L.; MÉNDEZ, S.; CUQUERELLA, M.; ALUNDA, J. M. Antibody response in dogs experimentally infected with *Leishmania infantum*: infection course antigen markers. **Exp. Parasitol.**, v. 82, p. 139-46, 1996.

CARVALHO, E. M.; TEIXEIRA, R. S.; JOHNSON, W. D. Cell mediated immunity in American Visceral Leishmaniasis. Reversible immunosuppression during acute infection. **Infect. Immun.**, v. 22, p. 649-656, 1981.

CARVALHO, E. M.; ANDREWS, B. S.; MARTINELLI, R.; DUTRA, M.; ROCHA, H. Circulating immune complexes and rheumatoid factor in visceral leishmaniasis and shistoccomiasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 32, p. 61-68, 1983.

CARVALHO, F. A.; CHAREST, H.; TAVARES, C. A.; MATLASHEWSKI, G.; VALENTE, E. P.; RABELLO, A.; GAZZINELLI, R. T.; FERNANDES, A. P. Diagnosis of American visceral leishmaniasis in humans and dogs using the recombinant *Leishmania donovani* A2 antigen. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 43, n. 4, p. 289-95, 2002.

CASTELLANI, O.; RIBEIRO, L. V.; FERREIRA, J. F. Differentiation of *Trypanosoma cruzi* in culture. **J. Protozool.**, v. 14, p. 447-451, 1967.

CHAN, E. L.; SIDAWAY, F.; HORSMAN, G. B. A comparison of the genie and western blot assays in confirmatory testing for HIV-1 antibody. **J. Med Microbiol.**, v. 44, n. 3, p. 223-5, 1996.

CHAUDHURI, G.; CHANG, K. P. Acid protease activity of a major surface membrane glycoprotein (gp63) from *Leishmania mexicana* promastigotes. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 27, n. 1, p. 43-52, 1988.

CHENIK, M.; LAKHAL, S.; BEN KHALEF, N.; ZRIBI, L.; LOUZIR, H.; DELLAGI, K. Approaches for the identification of potential excreted-secreted proteins of *Leishmania major* parasites. **Parasitology**, v. 132, 493-509, 2006.

CIBRELUS, P.; PRECIGOUT, E.; SERENO, D.; CAREY, B.; LEMESRE, J. L.; GORENFLOT, A. Secreted antigens of the amastigote and promastigote forms of *Leishmania infantum* inducing a humoral response in humans and dogs. **Parasite**, v. 6, n. 2, p. 121-9, 1999.

CLINTON, B. A.; PALCZUK, N. C.; STAUBER, L. A. *Leishmania donovani*: Partial characterization of some flagellate cytoplasmic immunogens. **J. Immunol.**, v. 108, p. 1570-77, 1972.

COLOMER-GOULD, V.; GLVAO QUINTAO, L.; KEITHLY, J.; NOGUEIRA, N. A common major surface antigen on amastigotes and promastigotes of *Leishmania* species. **J. Exp. Med.**, v. 162, n. 3, p. 902-916, 1985.

COOMBS, G. H. Proteinases of *Leishmania mexicana* and other flagellate protozoa. **Parasitology**, v. 84, n. 1, p. 149-55, 1982.

COSTA, C. A.; GENARO, O.; DE LANA, M.; MAGALHÃES, P. A.; DIAS, M.; MICHALICK, M. S. M.; MELO, M. N.; DA COSTA, R. T. Canine visceral leishmaniasis: evaluation of the serologic method used in epidemiologic studies. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 24, p. 21-25, 1991.

COSTA, S. R.; D'ÓLIVEIRA, JR. A.; BACELLAR, O.; CARVALHO, E.M. T cell response of asymptomatic *Leishmania chagasi* infected subjects to recombinant *Leishmania* antigens. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 3, p. 367-370, 1999.

COURTENAY, O.; QUINNELL, R. J.; GARCEZ, L. M.; SHAW, J. J.; DYE, C. Infectiousness in a cohort of Brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. **J. Infect.**, v. 186, p. 1314-1320, 2002.

COUVREUR, B.; JACQUET, D.; BOLLEN, A.; LE RAY, D. Molecular characterization of antigen 24, a specific immunodominant antigen family from *Leishmania infantum*. **Parasitology**, v. 115, p. 611-9, 1997.

DA COSTA, J. M.; NEOGY, A. B.; VOULDOUKIS, I.; SILVA, M. L.; GENTILINI, M.; MONJOUR, L. Antigenic components of partially purified antigens of *Leishmania donovani infantum* recognized by sera from dogs with asymptomatic or active visceral leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 55, p. 511-515, 1996.

DA SILVA, A. V.; DE PAULA, A. A.; CABRERA, M. A. A.; CARREIRA, J. C. A. Leishmaniasis in domestic dogs: epidemiological aspects. **Cad. Saúde Pública**, v. 21, p. 1-5, 2005.

DA SILVA, E. S.; GONTIJO, C. M. F.; PACHECO, R. S.; BRAZIL, R. P. Diagnosis of human visceral leishmaniasis by PCR using blood samples spotted on filter paper. **Genet. Mol. Res.**, v. 3, p. 251-57, 2004.

DAY, M. J. Immunoglobulin G subclass distribution in canine leishmaniosis: a review and analysis of pitfalls in interpretation. **Vet. Parasitol.**, v. 147, p. 2-8, 2007.

DEANE, M. P.; DEANE, L. M. Natural infection of *Phlebotomus longipalpus* by *Leptomonas*, probably *Leishmania donovani*, in a focus of kala-azar in Ceará. **Hospital de Rio de Janeiro**, Rio de Janeiro, v. 45, n. 6, p. 697-702, 1954.

DEBORGGRAEVE, S.; LAURENT, T.; ESPINOSA, D.; VAN DER AUWERA, G.; MBUCHI, M.; WASUNNA, M.; EL-SAFI, S.; AL-BASHEER, A. A.; ARÉVALO, J.; MIRANDA-VERÁSTEGUI, C.; LECLIPTEUX, T.; MERTENS, P.; DUJARDIN, J. C.; HERDEWIIN, P.; BÜSCHER, P. A simplified and standardized polymerase chain reaction format for the diagnosis of leishmaniasis. **J. Infect. Dis.**, v. 198, p. 1565-72, 2008.

DE PAULA, A. A.; DA SILVA, A. V. M.; FERNANDES, O.; JANSEN, A. M. The use of immunoblot analysis in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in an endemic area of Rio de Janeiro. **J. Parasitol.**, v. 89, n. 4, p. 832-836, 2003.

DEPLAZES, P.; SMITH, N.C.; ARNOLD, P.; LUTZ, H.; ECKERT, J. Specific IgG1 and IgG2 antibody responses of dogs to *Leishmania infantum* and other parasites. **Parasite Immunol.**, v. 17, p. 451-458, 1995.

DESCOTEAUX, A.; TURCO, S. J. Glycoconjugates in Leishmania infectivity. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1455, n. 2-3, p. 342-52, 1999.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 27, n. 5, p. 305-18, 2004a.

DIETZE, R.; FALQUETO, A.; VALLI, L. C.; RODRIGUES, T. P.; BOULOS, M.; COREY, R. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis with a dot-enzyme-linked immunosorbent assay. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 53, n. 1, p. 40-2, 1995

DIETZE, R.; BARROS, G. B.; TEIXEIRA, L.; HARRIS, J.; MICHELSON, K.; FLAQUETO, A.; COREY, R. Effect of eliminating seropositive canines on the transmission of visceral leishmaniasis in Brazil. **Clin. Infect. Dis.**, v. 25, p. 1240-42, 1997.

DISCH, J.; MACIEL, F. C.; OLIVEIRA, M. C.; ORSINI, M.; RABELLO, A. Detection of circulating *Leishmania chagasi* DNA for the non-invasive diagnosis of human infection. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 97, p. 1-5, 2003.

DOYLE, P. S.; DWYER, D. M. *Leishmania*: Immunochemical comparison of the secretory (extracellular) acid phosphatases from various species. **Exp. Parasitol.**, v. 77, p. 435-44, 1993.

DWYER, D. M. Isolation and partial characterization of surface membranes from *Leishmania donovani* promastigotes. **J. Protozool.**, v. 27, p. 176-182, 1980.

DYE, C. The logic of visceral leishmaniasis control. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 55, p.125-130, 1996.

EL AMIN, E. R.; WRIGHT, E. P.; ABDEL RAHMAN, A. M.; KOLK, A.; LAARMAN, J. J.; PONDMAN, K. W. Serodiagnosis of sudanese visceral and mucosal leishmaniasis: comparison of ELISA-immunofluorescence and indirect haemagglutination. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 80, p. 271-4, 1986.

ELASSAD, A. M.; YOUNIS, S. A.; SIDDIG, M.; GRAYSON, J.; PETERSEN, E.; GHALIB, H. H. The significance of blood levels of IgM, IgA, IgG and IgG subclasses in Sudanese visceral leishmaniasis patients. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 95, n. 2, p. 294-9, 1994.

ELLIS, S. L.; SHAKARIAN, A. M.; DWYER, D. M. *Leishmania*: amastigotes synthesize conserved secretory acid phosphatases during human infection. **Exp. Parasitol.**, v. 89, n. 2, p. 161-8, 1998.

EL-ON, J.; SCHNUR, L. F.; GREENBLATT, C. L. *Leishmania donovani*: Physicochemical, Immunological, and Biological Characterization of Excreted Factor from Promastigotes. **Exp. Parasitol.**, v. 47, n. 2, p. 254-69, 1979.

EL-SAFI, S. H.; BUCHETON, B.; KHEIR, M. M.; MUSA, H. A.; EL-OBAID, M.; HAMMAD, A.; DESSEIN, A. Epidemiology of visceral leishmaniasis in Atbara River area, eastern Sudan: the outbreak of Barbar El Fugara village (1996-1997). **Microbes Infect.**, v. 4, p. 1439-1447, 2002.

ENGVALL E, PERLMANN P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. **Immunochemistry**, v. 8, n. 9, p. 87-4, 1971.

ETGES, R.; BOUVIER, J.; BORDIER, C. The major surface protein of *Leishmania* promastigotes is a protease. **J. Biol. Chem.**, v. 261, n. 20, p. 9098-101, 1986.

EVANS, T. G.; KRUG, E. C.; WILSON, M. E.; VASCONCELOS, A. W.; DE ALENCAR, J. E.; PEARSON, R. D. Evaluation of antibody responses in American visceral leishmaniasis by ELISA and immunoblot. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v. 84, n. 2, p. 157-66, 1989.

EVANS, T. G.; VASCONCELOS, A. B.; VASCONCELOS, A. W. Canine visceral leishmaniasis in northeast Brazil: assessment of serodiagnostic methods. **Ann. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 42, p. 118-23, 1990.

FEIJÃO, A. M. M.; LIMA, J. W. O.; VIEIRA, F. C. O.; NATIONS, M. K. O significado do cachorro para a família – estudo qualitativo sobre a estratégia de eliminação de cães infectados com *Leishmania* para o controle do calazar. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 34, 2001. Suppl. 1. Apresentada na Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 230 p.

FERGUSON, M. A. J. The surface glycoconjugates of trypanosomatid parasites. **Philos. Trans. R. Soc. Lond.**, v. 352, p. 1295-1302, 1997.

FERGUSON, M. A. J. The structure, biosynthesis and functions of glycosylphosphatidylinositol anchors, and the contributions of trypanosome research. **J. Cell Sci.**, v. 112, p. 2799-2809, 1999.

FERNÁNDEZ-PÉREZ, F. J.; MENDEZ, S.; FUENTE, C.; GÓMEZ-MUÑOZ, M. T.; CUQUERELLA, M.; ALUANDA, J. M. Short report: improved diagnosis and follow-up of canine leishmaniasis using amastigote-based indirect immunofluorescence. **Ann. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 61, p. 652-3, 1999.

FERREIRA, W. A.; ÁVILA, S. L. M. **Diagnóstico Laboratorial das principais Doenças Infecciosas e Auto-imunes**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2001. p. 1-6.

FERREIRA, E. C.; DE LANA, M.; CARNEIRO, M.; REIS, A. B.; PAES, D. V.; DA SILVA, E. S.; SCHALLIG, H.; GONTIJO, C. M. Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. **Vet. Parasitol.**, v. 146, n. 3-4, p. 235-41, 2007.

FRANK, F. M.; FERNÁNDEZ, M. M.; TARANTO, N. J.; CAJAL, S. P.; MARGNI, R. A.; CASTRO, E.; THOMAZ-SOCCOL, V.; MALCHIODI, E. L. Characterization of human infection by *Leishmania* spp.

In the Northwest of Argentina: immune response, double infection with *Trypanosoma cruzi* and species of *Leishmania* involved. **Parasitology**, v. 126, p. 31-9, 2003.

FRANCK, J.; GARIN, Y. J.; DUMON, H. LDBio-Toxo II immunoglobulin G Western blot confirmatory test for anti-toxoplasma antibody detection. **J. Clin. Microbiol.**, v. 46, n. 7, p. 2334-8, 2008.

FRANKE, C. R.; GREINER, M.; MEHLITZ, D. Investigations on naturally occurring *Trypanosoma evansi* infections in horses, cattle, dogs and capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) in Pantanal de Pocone (Mato Grosso, Brazil). **Acta Trop.**, v. 58, p. 159-169, 1994.

GALIMBERTI, M. Z.; KATZ, G.; CAMRAGO-NEVES, V. L. F.; RODAS, L. A. C.; CASANOVA, C.; COSTA, A. I. Leishmaniose visceral americana no Estado de São Paulo. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 32, p. 1-217, 1999.

GARDINER, P. R.; JAFFE, C. L.; DWYER, D. M. Identification of cross-reactive promastigote cell surface antigens of some leishmanial stocks by 125I labeling and immunoprecipitation. **Infect. Immun.**, v. 43, n. 2, p. 637-643, 1984.

GARG, R.; DUBE, A. Animal models for vaccine studies for visceral leishmaniasis. **Indian J. Med. Res.**, v. 123, n.3, p. 439-54, 2006.

GENARO, O. Leishmaniose visceral. In: NEVES, D.P.; MELO, A.I.; GENARO, O.; LINARDI, P.M. **Parasitologia humana**. 10 ed. São Paulo: Atheneu, 2003. p. 56-72.

GOMES-SILVA, A.; SOUZA, M. A.; AFONSO-CARDOS, S. R.; ANDRADE, L. R.; DIETZE, R.; LEMOS, E.; BELLI, A.; FAVORETO JUNIOR, S.; FERREIRA, M. S. Serological reactivity of different antigenic preparations of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and the *Leishmania braziliensis* complex. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 41, n. 2, p. 135-41, 2008.

GONÇALVES, M. F.; UMEZAWA, E. S.; KATZIN, A. M.; DE SOUZA, W.; ALVES, M. J.; ZINGALES, B.; COLLI, W. *Trypanosoma cruzi*: shedding of surface antigens as membrane vesicles. **Exp. Parasitol.**, v. 72, n. 1, p. 43-53, 1991.

GONTIJO, C. M.; MELO, M. N. Leishmaniose Visceral no Brasil: Quadro Atual, desafios e Perspectivas. **Rev. Bras. Epidemiol.**, v. 7, n. 3, p. 338-349, 2004.

GOTTLIED, M.; DWYER, D. M. Identification and partial characterization of an extracellular acid phosphatase activity of *Leishmania donovani* promastigotas. **Mol. Cell. Biol.**, v. 2, n. 1, p. 76-81, 1982.

GOTTSTEIN, B.; DEPLAZES, P.; ARNOLD, P.; MEHLITZ, D.; REITER, I.; ECKERT, J. Immunodiagnosis of leishmaniasis in dogs by ELISA and mini-Western blot. **Schweiz. Arch. Tierheilkd.**, v. 130, p. 249-62, 1988.

GRIEMBERG, G.; FERRAROTTI, N. F.; SVIBEL, G.; RAVELLI, M. R.; TARANTO, N. J.; MALCHIODI, E. L.; PIZZIMENTI, M.C. Immunofluorescence assay with *Crithidia luciliae* for the detection of anti-DNA antibodies. Atypical images and their relationship with Chagas' disease and leishmaniasis. **Medicina**, B. Aires, v. 66, n. 1, p. 3-8, 2006.

GUERIN, P. J.; OLLIARO, P.; SUNDAR, E.; BOELAERT, M.; CROFT, S. L.; DESJEUX, P.; WASUNNA, M. K.; BRYCESON, A. D. M. Visceral leishmaniasis current status of control, diagnosis and treatment, and a proposed research and development agenda. **Lancet**, v. 83, p. 93-101, 2002.

GUIMARÃES, M. C.; CELESTE, B. J.; CORRALES, E. M.; ANTUNES, C. M. Comparison on the performance of *Leishmania major*-like and *Leishmania braziliensis braziliensis* as antigen for New World leishmaniasis IgG-immunofluorescence tests. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 33, p. 503-8, 1991.

HADMAN, E. Leishmaniasis: current status of vaccine development. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 14, p. 229-243, 2001.

HARITH, A. E.; KOLK, A. H. J.; KAGER, P. A.; LEEUWENBURG, J.; FABER, F. J.; MUIGAI, R.; KIUGU, S.; LAARMAN, J. J. Evaluation of a new developed direct agglutination test (DAT) for serodiagnosis and seroepidemiological studies of visceral leishmaniasis: comparison with IFAT and ELISA. **Trans. R. Soc. Trop. Med Hyg.**, v. 81, p. 603-606, 1987.

HEY, A. S.; THEANDER, T. G.; HVIID, L.; HAZRATI, S. M.; KEMP, M.; KHARAZMI, A. The major surface glycoprotein (gp63) from *Leishmania major* and *Leishmania donovani* cleaves CD4 molecules on human T cells. **J. Immunol.**, v. 1, n. 152, p. 4542-4548, 1994.

HO, M.; LEEUWENBURG, J.; MBUGUA, G.; WAMACHI, A.; VOLLER, A. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for field diagnosis of visceral leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 32, n. 5, p. 943-6, 1983.

HOERAUF, A.; ANDRADE, P. P.; ANDRADE, C. R.; SOLBACH, W.; ROLLINGHOFF, M. Immunoblotting as a valuable tool to differentiate human visceral leishmaniasis from lymphoproliferative disorders and other clinically similar diseases. **Res. Immunol.**, v. 143, p. 375-83, 1992.

HOMMEL, M.; PETERS, W.; RANQUE, J.; QUILICI, M.; LANOTTE, G. The micro-ELISA technique in the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 72, p. 213-8, 1978.

HOMMEL, M.; JAFFE, C.L.; TRAVI, B.; MILON, G. Experimental models for leishmaniasis and for testing anti-leishmanial vaccines. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 89, p. 55-73, 1995.

IKEDA, F. A. **Avaliação hematológica, bioquímica e parasitológica de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, submetidos a diferentes tratamentos.** Dissertação

(Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2004.

INIESTA, L.; GÁLLEGO, M.; PORTÚS, M. Immunoglobulin G and E responses in various stages of canine leishmanioses. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 103, p. 77-81, 2005.

JAFFE, C. L.; ZALIS, M. Use of purified parasite proteins from *Leishmania donovani* for the rapid serodiagnosis of visceral leishmaniasis. **J. Infect. Dis.**, v. 157, p.1212-20, 1988.

JAFFE, C. L.; DWYER, D. M. Extracellular release of the surface metalloprotease, gp63, from *Leishmania* and insect trypanosomatids. **Parasitol. Res.**, v. 91, p. 229-237, 2003.

JENSEN, A. T.; GASIN, S.; MOLLER, T.; ISMAIL, A.; GAAFAR, A.; KEMP, M.; EL HASSAN, A. M.; KHARAZMI, A.; ALCE, T. M.; SMITH, D. F.; THEANDE, T. G. Serodiagnosis of *Leishmania donovani* infections: assessment of enzyme-linked immunosorbent assays using recombinant *L. donovani* gene B protein (GBP) and a peptide sequence of *L. donovani* GBP. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 93, n. 2, p. 157-60, 1999.

KAMOUN-ESSGHAIER, S.; GUIZANI, I.; STRUB, J. M.; VAN DORSSELAER, A.; MABROUK, K.; QUELHAZI, L.; DELLAGI, K. Proteomic approach for characterization of immunodominant membrane-associated 30 to 36 kiloDalton fraction antigens of *Leishmania infantum* promastigotas, reating with sera from Mediterranean visceral leishmaniasis patients. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 12, p. 310-20, 2005.

KAR, K. Serodiagnosis of Leishmaniasis. **Crit. Rev. Microbiol.**, v. 21, p. 123-52, 1995.

KAWANO, Y.; NOMA, T.; YATA, J. Regulation og human IgG subclass production by cytokines IFN- γ and IL-6 act antagonistically in the induction of human IgG1 but additively in the induction of IgG2. **J. Immunol.**, v. 153, p. 4948-4958, 1994.

KHARAZMI, A.; REZAI, H. R.; FANI, M.; BEHFORROUZ, C. C. Evidence for the presence of circulating immune complexes in serum and C3b and C3d on red cells of Kala-azar patients. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 76: 793-96, 1982.

KOHANTEB, J.; ARDEHALI, S. Cross-reaction of sera from patients with various infectious diseases with *Leishmania infantum*. **Med. Princ. Pract.**, v. 14, n. 2, p. 79-82, 2005.

KUMAR, P.; PAI, K.; TRIPATHI, K.; PANDEY, H. P.; SUNDAR, S. Immunoblot immune response to *Leishmania donovani* polypeptides in cases of human visceral leishmaniasis: its usefulness in prognosis. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 9, n. 5, p. 1119-23, 2002.

KURSTAK, E. Progress enzyme immunoassays: production of reagents, experimental design, and interpretation. **Bull. World Health Organ**, v. 63, n. 4, p. 793-811, 1985.

LACHAUD, L.; DEREURE, J.; CHABBERT, E.; MAUBOUSSIN, J. M.; OZIOL, E.; DEDET, J. P.; BASTIEN, P. Optimised PCR using patient blood samples for diagnosis and follow-up of visceral leishmaniasis, with special reference to AIDS patients. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, p. 236, 240, 2000.

LACHAUD, L.; CHABBERT, E.; DUBESSAY, P.; REYNES, J.; LAMOTHE, J.; BASTIEN, P. Comparison of various sample preparation methods for PCR diagnosis of visceral leishmaniasis using peripheral blood. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, n. 2, p. 613-7, 2001.

LACHAUD, L.; HAMMANI, S.M.; CHABBERT, E.; DEREURE, J.; DEDET, J. P.; BASTIEN, P. Comparison of six PCR Methods using peripheral blood for detection of canine Visceral leishmaniasis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, p. 210-5, 2002.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: PETERS, W.; KILLICK-KENDRICK, R. **The Leishmaniasis in biology and medicine**. London: Academic Press, 1987. v. 1, p. 1-120.

LASRI, S.; SAHIBI, H.; NATAMI, A.; RHALEM, A. Western blot analysis of *Leishmania infantum* antigens using sera from pentamidine-treated dogs. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 91, p. 13-8, 2003.

LEANDRO, C.; SANTOS-GOMES, G.M.; CAMPINO, L. ROMÃO, P.; CORTES, S.; ROLÃO, N.; GOMES-PEREIRA, S.; RICA CAPELA, M. J.; ABRANCHES, P. Cell mediated immunity and specific immunity and specific IgG1 and IgG2 antibody responses in natural and experimental canine leishmaniosis. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 79, p. 273-284, 2001.

LEMESRE, J. L.; HOLZMULLER, P.; CAVALEYRA, M.; BRAS-GONÇALVES, R.; HOTTIN, G.; PAPIEROK, G. Protection against experimental visceral leishmaniasis infection in dogs immunized with purified excreted secreted antigens of *Leishmania infantum* promastigotes. **Vaccine**, v. 23, n. 22, p. 2825-40, 2005.

LEMESRE, J. L.; HOLZMULLER, P.; BRAS-GONÇALVES, R.; BOURDOISEAU, G.; HUGNET, C.; CAVALEYRA M.; PAPIEROK, G. Long-lasting protection against canine visceral leishmaniasis using the *L*/ESAp-MPD vaccine in endemic areas of France: Double-blind randomized efficacy field trial. **Vaccine**, v. 25, p. 4223-34, 2007.

LEPAY, D. A.; NOQUEIRA, N.; COHN, Z. Surface antigens of *Leishmania donovani* promastigotes. **J. Exp. Med.**, v. 157, p. 1562-72, 1983.

LIRA, R. A.; PAIVA CAVALCANTI, M.; NAKAZAWA, M.; FERREIRA, A. G. P.; SILVA, E.D.; ABATH, F. G. C.; ALVES, L. C.; SOUZA, W. V.; GOMES, Y. M. Canine visceral leishmaniosis: A comparative

analysis of the EIE-leishmaniose visceral canina Bio-Manguinhos and the IFI-leishmaniose visceral canina Bio-Manguinhos kits. **Vet. Parasitol.**, v. 137, p. 11-16, 2006.

LOUIS, J.; HIMMELRICH, H.; PARRA-LOPEZ, C.; TACCHINI-COTTIER, F.; LAUNOIS, P. Regulation of protective immunity against *Leishmania major* in mice. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 10, p. 459-464, 1998.

MAALEJ, I. A.; CHENIK, M.; LOUZIR, H.; BEN SALAH, A.; BAHLOUL, C.; AMRI, F.; DELLAGI, K. Comparative evaluation of ELISAs based on ten recombinant or purified *Leishmania* antigens for the serodiagnosis of Mediterranean visceral leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 68, n. 3, p. 312-20, 2003.

MACHADO DE ASSIS, T. S.; BRAGA, A. S.; JUNQUEIRA, M. P.; BARRAL, A. M.; SIQUEIRA, I. C.; COSTA, C. H.; COSTA, L. D.; HOLANDA, T. A.; SOARES, V. Y.; BIÁ, M.; CALDAS, A. J.; ROMERO, G. A.; RABELLO, A. Validation of the Rapid Immunochromatographic Test IT-Leish® for the Diagnosis of Human Visceral Leishmaniasis. **Epidemiol. Serv. Saúde**, v. 17, p. 107-116, 2008.

MAIA, C.; CAMPINO, L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. **Vet. Parasitol.**, v. 158, p. 274-287, 2008.

MALCHIODI, E. L.; CHIARAMONTE, M. G.; TARANTO, N. J.; ZWIRNER, N. W.; MARGNI, R. A. Cross-reactivity studies and differential serodiagnosis of human infections caused by *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* spp; use of immunoblotting and ELISA with a purified antigen (Ag163B6). **Clin. Exp. Immunol.**, v. 97, p. 417-23, 1994.

MANCIANTI, F.; MECIANI, N. Specific sero-diagnosis of canine leishmaniasis by indirect immunofluorescence, indirect hemagglutination, and counterimmunoelectrophoresis. **Am. J. Vet. Res.**, v. 49, p. 1409-1411, 1988.

MANSUR, B. G. (Ed.) Atualização em Diagnóstico de Leishmaniose Visceral Canina. Disponível em: < <http://www.santelaboratorio.com.br/informativos/AtualizacaoemDiagnostico.pdf> >. Acesso em: 15 maio 2009.

MARTIN, S. K.; THUTA-HARUN, L.; ANDOYO-ANDOYO, M.; WASUNNA, K. M. A diagnostic ELISA for kala azar based on antigen from *Leishmania donovani* promastigote conditioned media. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 92, n. 5, p. 571-577, 1998.

MARTY, P.; LELIÈVRE, A.; QUARANTA, J. F.; SUFFIA, I.; EULALIO, M.; GAR-TOUSSAINT, M.; LE FICHOUX, Y.; KUBAR, J. Detection by western blot of four antigens characterizing acute clinical leishmaniasis due to *Leishmania infantum*. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 89, n. 6, p. 690-1, 1995.

MARY, C.; LAMOUROUX, D.; DUNAN, S.; QUILICI, M. Western blot analysis of antibodies to *Leishmania infantum* antigens: potencial of the 14-kD and 16-kD antigens for diagnosis and epidemiologic purposes. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 47, p764-771, 1992.

MARZOCHI, M. C. A.; CHAGASTELLES, S. P.; MEDEIROS DE TOLEDO, L.; MARZOCHI, K. B. F.; TRAMONTANO, C. N.; RANGEL, F. B. Leishmaniose Visceral na cidade de Rio de Janeiro-Brasil. **Cad. Saúde Publica**, v. 1, p. 5-17, 1985.

McCONVILLE, M. J.; FERGUSON, M. A. J. The structure, biosynthesis and fuction of glycosylphosphatidylinositols in the parasitic protozoa and higher-eukaryotes. **Biochem. J.**, v. 294, p. 305-324, 1993.

McGWIRE, B. S.; O'CONNELL, W. A.; CHANG, K. P.; ENGMAN, D. M. Extracellular release of the glycosylphosphatidylinositol (GPI)-linked *Leishmania* surface metalloprotease, gp63, is independent of GPI phospholipolysis: implications for parasite virulence. **J. Biol. Chem.** V. 277, n. 11, p. 8802-9, 2002.

McGWIRE, B. S.; CHANG, K. P.; ENGMAN, D. M. Migration through the extracellular matrix by the parasitic protozoan *Leishmania* is enhanced by surface metalloprotease gp63. **Infect. Immun.**, v. 71, n. 2, p. 1008-1010, 2003.

MEDINA-ACOSTA, E.; KARESS, R. E.; SCHWARTZ, H.; RUSSELL, D. G. The promastigote surface protease (gp63) of *Leishmania* is expressed but differentially processed and localized in the amastigote stage. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 37, p. 263-274, 1989.

MENDES, D.G.; LAURIA-PIRES, L.; NITZ, N.; LOZZI, S. P.; NASCIMENTO, R. J.; MONTEIRO, P. S.; REBELO, M. M.; ROSA ADE, C.; SANTANA, J. M.; TEIXEIRA, A. R. Exposure to mixed asymptomatic infections with *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania braziliensis* and *Leishmania chagasi* in the human population of the greater Amazon. **Trop. Med. Int. Health**, v. 12, n. 5, p. 629-36, 2007.

METTLER, M.; GRIMM, F.; CAPELLI, G.; CAMP, H.; DEPLAZES, P. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays an immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania* infections in dogs. **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, n. 11, p. 5515-9, 2005.

MILES, M. A.; VEXENAT, J. A.; FURTADO CAMPOS, J. H.; FONSECA DE CASTRO, J. A. Canine leishmaniasis in Latin American: control strategies for visceral leishmaniasis. In Canine Leishmaniasis: An Update. In: PROCEEDINGS OF THE INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM, 1999, Barcelona, Spain. **Anais...** Barcelona: Editora, 1999. p. 46-53.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Brasília: Ministério da Saúde, 2003. p. 120.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Brasília: Ministério da Saúde, 2004. p. 54.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso**. 7 ed. rev. Brasília: Ministério da Saúde, 2008. p. 372.

MOHAMMED, A. R.; WRIGHT, E. P.; ABDEL-RAHMAN, A. M.; KOLK, A.; LAARMAN, J. J.; PONDMAN, K. W. Serodiagnosis of Sudanese visceral and mucosal leishmaniasis: comparison of ELISA-immunofluorescence and indirect hemagglutination. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 80, p. 271-4, 1986.

MOLINA, R.; AMELA, C.; NIETO, J.; SAN ANDRES, M.; GONZALES, F.; CASTILLO, J. A.; LUCIENTES, J.; ALVAR, J. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. **Trans. Royal Soc. Med. Hyg.**, v. 88, p. 491-493, 1994.

MOODY, S. F.; HANDMAN, E.; McCONVILLE, M. J.; BACIC, A. The structure of *Leishmania major* amastigote lipophosphoglycan. **J. Biol. Chem.**, v. 268, p. 18457-18466, 1993.

NATTAN-LARRIER, L.; GRIMARD-RICHARD, L. Une method de diagnostique de la leishmaniose viscérale. **C. R. Soc. Biol. Paris**, v. 113, p. 1484-92, 1933.

NAVIN, T. R.; ARANA, F. E.; MÉRIDA, A. M.; ARANA, B. A.; CASTILLO, L.; SILVERS, D. N. Cutaneous leishmaniasis in Guatemala: Comparison of diagnostic methods. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 42, p. 36-42, 1990.

NEVES, D. P. Leishmaniose Visceral Americana. In: _____. **Parasitologia Dinâmica**. São Paulo: Atheneu, 2003. p. 101-12.

NOGUEIRA, Y. L.; ODORIZZI, R. M. F. N.; NAKAMURA, P. M. A comparison of the immune parameters of dogs infected with visceral leishmaniasis using western blot and neutralization techniques. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.**, v. 49, n. 6, p. 379-384, 2007.

OLIVEIRA, T. M. F. S.; MINEO, T. W. P.; BASON, M.; DAY, M. J. IgG subclass profile of serum antibodies to *Leishmania chagasi* in naturally infected and vaccinated dogs. **Vet. Parasitol.** V. 162, p. 16-22, 2009.

OZENZÖY, S. Serodiagnosis and epidemiology of visceral leishmaniasis in Turkey. **Ann. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 59, p. 363-9, 1998.

PAIVA, B. R.; PASSOS, L. N.; FALQUETO, A.; MALAFRONT, R. dos S.; ANDRADE, H. F. Single step polymerase chain reaction (PCR) for the diagnosis of the *Leishmania* (Viannia) subgenus. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 46, n. 6, p. 335-8, 2004.

PALATNIK-DE-SOUSA, C. B.; DOS SANTO, W. R.; FRANÇA-SILVA, J. C.; DA COSTA, R. T.; REIS, A. B.; PALATNIK, M.; MAYRINK, W.; GENARO, O. Impacto f canine control in the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. **Am. J. trop. Med. Hyg.**, v. 65, p. 510-7, 2001.

PANAMERICAN HEALTH ORGANIZATION-WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Manual on Visceral Leishmaniasis Control**, 2005. Disponível em: <<http://www.paho.org/English/AD/DPC/CD/leishmaniasis-manual.htm>>. Acesso em: 4 abr. 2009.

PAPPAS, M. G.; HAJKOWSKI, R. R.; DIGGS, C. L.; HOCKEMEYER, W. T. Development of an antigen conservative enzyme immunoassay (Dot-ELISA) for the rapid diagnosis of visceral leishmaniasis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 77, p. 425-6, 1983.

PAPPAS, M. G.; CANNON, L. T.; HOCKEMEYER, W. T.; SMITH, D. H. Evaluation of complement fixation procedures for the diagnosis of visceral leishmaniasis. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 79, p. 147-51, 1985.

PARANHOS-SILVA, M.; FREITAS L. A. R.; SANTOS, W. C.; GRIMALDI, Jr-G.; PONTES-DE-CARVALHO, L. C.; OLIVEIRA-DOS-SANTOS, A. J. A cross-sectional serodiagnostic survey of canine leishmaniasis due to *Leishmania chagasi*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 55, p. 39-44, 1996.

PARANHOS-SILVA, M.; PONTES-DE-CARVALHO, L. C.; DE SA OLIVEIRA, G. G.; NASCIMENTO, E. G.; DOS SANTOS, W. L. Skin reactions to thimerosal and *Leishmania* in dogs from a leishmaniasis endemic área: it is better to keep them apart. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 96, p. 679-681, 2001.

PASSOS, S.; CARVALHO, L. P.; ORGE, G.; JERÔNIMO, S. M.; BEZERRA, G.; SOTO, M.; ALONSO, C.; CARVALHO, E. M. Recombinant leishmania antigens for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 12, n. 10, p. 1164-7, 2005.

PINELLI, E.; KILLICK-KENDRICK, R.; WAGENAAR, J.; BERNADINA, W.; REAL, G.; RUITENBERG, J. Cellular and Humoral Immune Responses in Dogs Experimentally and Naturally Infected with *Leishmania infantum*. **Infect. Immun.**, v. 62, p. 229-235, 1994.

PINTO, A. R.; BEYRODT, C. G.; LOPES R. A.; BARBIÉRI, C. L. Identification of a 30kDa antigen from *Leishmania (L.) chagasi* amastigotes implicated in protective cellular reponses in a murine model. **Int. J. Parasitol.**, v. 30, n. 5, p. 599-607, 2000.

PORROZI, R.; DA COSTA, M. V. S.; TEVA, A.; FALQUETO, A.; FERREIRA, A. L.; DOS SANTOS, C. D.; FERNANDES, A. P.; GAZZINELLI, R. T.; CAMPOS-NETO, A.; GRIMALDI, G. Jr. Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays based on crude and recombinant leishmanial antigens for serodiagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania infantum* visceral infections in dogs. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 14, p. 544-548, 2007.

PREVIATO, J. O.; MENDONÇA-PREVIATO, L.; JONES, C.; WAIT, R.; FOURNET, B. Structural characterization of a novel class of glycoposphosphingolipids from the protozoan *Leptomonas samueli*. **J. Biol. Chem.**, v. 267, n. 34, p. 24279-86, 1992.

PRIGIONE, I.; FACCHETTI, P.; LECORDIER, L.; DESLÉE, D.; CHIESA, S.; CESBRON-DELAUW, M. F.; PISTOIA, V. T cell clones raised from chronically infected healthy humans by stimulation with *Toxoplasma gondii* excretory-secretory antigens cross-react with live tachyzoites: characterization of the fine antigenic specificity of the clones and implications for vaccine development. **J. Immunol.**, v. 164, n. 7, p. 3741-8, 2000.

PUPKIS, M. F.; COOMBS, G. H. Purification and characterization of proteolytic enzymes of *Leishmania mexicana mexicana* amastigotas and promastigotas. **J. Gen. Microbiol.**, v. 130, n. 9, p. 2375-83, 1984.

PUPKIS, M. F.; TETLEY, L.; COOMBS, G. H. *Leishmania mexicana*: amastigotes hydrolases in unusual lysosomes. **Exp. Parasitol.**, v. 62, n. 1, p. 29-39, 1986.

QUARESMA, P. F.; MURTA, S. M.; DE CASTRO FERREIRA, E.; DA ROCHA-LIMA, A. C.; XAVIER, A. A.; GONTIJO, C. M. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Identification of *Leishmania* species by PCR-RFLP and quantification of parasite DNA by real-time PCR. **Acta Trop.** In press.

RACHAMIN, N.; JAFFES, C. L. Pure protein from *Leishmania donovani* protects mice against both cutaneous and visceral leishmaniasis. **J. Immunol.**, v. 150, p. 2322-31, 1993.

RAJASEKARIAH, G. H.; RYAN, J. R.; HILLIER, S. R.; YI, L. P.; STITELER, J. M.; CUI, L.; SMITHYMAN, A. M.; MARTIN, S. K. Optimisation of an ELISA for the serodiagnosis of visceral leishmaniasis using in vitro derived on soluble promastigote antigens. **J. Immunol. Methods**, v. 252, p. 105-119, 2001.

RAJASEKARIAH, G. H.; CARDOSO, L.; DOGCIO, D. A.; MARTIN, S. K.; SMITHYMAN, A. M. A novel Exo-antigen- based ELISA for the detection of canine Leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 78, n. 4, p. 616-623, 2008.

RAMI, M.; ATARHOUCHE, T.; DAKKAK, A. identification of two highly performing *Leishmania infantum* antigens for serodiagnosis of canine leishmaniosis. **Vet. Parasitol.**, v. 135, p. 25-31, 2005.

RAMIRO, M. J.; ZARATE, J. J.; HANKE, T.; RODRIGUEZ, D.; RODRIGUEZ, J. R.; ESTEBAN, M.; LUCIENTES, J.; CASTILLO, J. A.; LARRAGA, V. Protection in dogs against visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* is achieved by immunization with a heterologus prime-boost regime using DNA and vaccinia recombinant vectors expressing LACK. **Vaccine**, v. 21, p. 2474-2484, 2003.

RAVEL S, CUNY G, REYNES J, VEAS F. A highly sensitive and rapid procedure for direct PCR detection of *Leishmania infantum* within human peripheral blood mononuclear cells. **Acta Trop.**, v. 59, n. 3, p. 187-96, 1995.

RAVINDRAN, R.; ALI, N. Progress in vaccine research and possible effector mechanisms in visceral leishmaniasis. **Curr. Mol. Med.**, v. 4, n. 6, p. 697-709, 2004.

REED, S. G.; BADARÓ, R.; MASUR, H.; CARVALHO, E. M.; LORENÇO, R.; LISBOA, A.; TEIXEIRA, R.; JOHNSON, Jr. W. D.; JONES, T. C. Selection of a skin test antigen for American visceral leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med Hyg.**, v. 35, p. 79-85, 1986.

REED, S. G.; BADARÓ, R.; LLOYD, R. M. Identification of specific and cross-reactive antigens of *Leishmania donovani chagasi* by human infection sera. **J. Immunol.**, v. 138, n. 5, p. 1596-601, 1987.

REIS, A. B. **Avaliação de Parâmetros Laboratoriais e Imunológicos de Cães Naturalmente Infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi* Portadores de Diferentes Formas Clínicas da Infecção.** 200 f. Tese (Doutorado em Parasitologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2001.

REZAI, H. B.; ARDEHALI, S. M.; AMIRHAKIMI, G.; KHARAZMI, A. Immunological features of Kala-azar. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v27, p. 1079-1083, 1978.

ROLLAND, L.; BELKAID, M.; SEYE, A.; SCHENEIDER, P.; GENTILINI, M. Detection of serum antibodies against Leishmania 94kDa antigen in visceral and cutaneous leishmaniosis due to *Leishmania infantum*. **Parasite**, v. 2, n. 1, p. 13-21, 1995.

ROMERO, L. I.; PAZ, H. M.; ORTEGA-BARRÍA, E.; BAYARD, V.; HOCHBERG, L. P.; COLLINS, K. M.; CHAN, A. S. T.; RYAN, R. F. Evaluation of serological assays based on a novel excreted antigen preparation for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis in Panama. **J. Microbiol. Methods**, v. 57, n. 3, p. 391-97, 2004.

ROSÁRIO, E. Y.; GENARO, O.; FRANÇA-SILVA, J. C.; COSTA, R. T.; MAYRINK, W.; REIS, A. B.; CARNEIRO, M. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay using crude *Leishmania* and recombinant antigens as a diagnostic marker for canine visceral leishmaniasis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 2, p. 197-203, 2005.

ROSYPAL, A.; ZAJAC, A.; LINDSAY D. Canine visceral leishmaniasis and its emergence in the United States. **Vet. Clin. N. Am. Small. Anim. Pract.**, v. 33, p. 921-937, 2003.

ROUTIER, F. H.; DA SILVEIRA, E. X.; WAIT, R.; JONES, C.; PREVIATO, J. O.; MENDONÇA-PREVIATO, L. Chemical characterisation of glycosylinositolphospholipids of *Herpetomonas samuelpessoai*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 69, p. 81-92, 1995.

RYAN, J. R.; SMITHYAMAM, M. A.; RAJASEKARIAH, G. H.; HOCHBERG, L.; STITELER, M. J.; MARTIN, S. K. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay based on soluble promastigote antigen detects immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies in sera from cases of visceral and cutaneous Leishmaniasis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, n. 3, p. 1037-43, 2002.

SAKRU, N.; KORKMAZ, M.; OZBEL, Y.; ERTABAKLAR, H.; SENGUL, M.; TOZ, S. O. Investigation of asymptomatic visceral leishmaniasis cases using western blot in an endemic. **New Microbiol.**, v. 30, p. 13-8, 2007.

SALOTRA, P.; RAINA, A.; NEGI, N. S. Immunoblot analysis of the antibody response to antigens of *Leishmania donovani* in Indian kala-azar. **Br. J. Biomed. Sci.**, v. 56, n. 4, p. 263-7, 1999.

SANTIAGO, M. A.; RIBEIRO, F. C.; MOUTA-CONFORT, E.; NASCIMENTO, L. D.; SCHUHACH, A. O.; MADEIRA, M. F.; BERTHO, A. L. Differentiation between canine cutaneous and visceral leishmaniasis by the detection of immunoglobulin G specific for *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* antigens using flow cytometry. **Vet. Parasitol.**, v. 4, p. 341-6, 2008.

SANTOS-GOMES, G.; GOMES-PEREIRA, S.; CAMPINO, L.; ARAÚJO, M. D.; ABRANCHES, P. Performance of immunoblotting in diagnosis of visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus-Leishmania sp. coinfecting patients. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, n. 1, p. 175-8, 2000.

SÃO PAULO (Estado). Grupo de Estudos em Leishmanioses, Coordenadoria de Controle de Doenças, Superintendência de Controle de Endemias, Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. **Atualização da classificação epidemiológica dos municípios para a leishmaniose visceral americana**. Boletim Epidemiológico Paulista, v. 5, n. 50, p. 18-20, 2008.

SAVANI, E. S. M.; NUNES, V. L. B.; GALATI, E. A. B.; CASTILHO, M. T.; ARAUJO, F. S.; ILHA, I. M. N. CAMARGO, M. C.; D'AURIA, S. R. N.; FLOETER-WINTER, L. M. Occurrence of co-infection by *Leishmania (Leishmania) chagasi* and *Trypanosoma (Trypanozoon) evansi* in a dog in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 739-741, 2005.

SCHALLIG, H. D. F. H.; OSKAN, L. Molecular biological applications in the diagnosis and control of leishmaniasis as parasite identification. **Trop. Med. Int. Health**, v. 7, p. 641-51, 2002.

SCHENEIDER, P.; TREVMANN, A.; MILNE, K. G.; McCONVILLE, M. J.; ZITZMANN, N.; FERGUSON, M. A. J. Structural studies on a lipoarabinogalactan of *Crithidia fasciculata*. **Biochem. J.**, v. 313, p. 963-971, 1996.

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.**, v. 8, n. 7, p. 932-42, 1972.

SCHNUR, L. F.; ZUCKERMAN, A. Excreted factor (EF) serotypes of Israeli leishmanial strains. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 70, p. 15, 1976.

SEMPREVIVO, L. H.; MACLEOD, M. E. Characterization of the exometabolite of *Leishmania donovani* as a novel glycopeptidophosphosphingolipid. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 103, p. 1179-85, 1981.

SERGEIEV, V. P.; SHIKUNA, E. V. Soluble antigen in *Leishmania tropica major*. **Med. Parazitol.**, v. 38, n. 2, p. 208-212, 1969.

SHAMS, H.; KLUCAR, P.; WEIS, S. E.; LALVANI, A.; MOONAN, P.K.; WIZEL, B.; EWER, K.; NEPOM, G. T.; LEWINSOHN, D. M.; ANDERSEN, P.; BARNES, P. F. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* peptide that is recognized by human CD4+ and CD8+ T cells in the context of Multiple HLA alleles. **J. Immunol.**, v. 173, n. 3, p. 1966-77, 2004.

SHREFFLER, W. G.; BURNS, J. M. JR.; BARDARÓ, R.; GHALIB, H. W.; BUTTON, L. L.; MCMASTER, W. R.; REED, S. G. Antibody responses of visceral leishmaniasis patients to gp63, a major surface glycoprotein of *Leishmania* species. **J. Infect. Dis.**, v. 167, n. 2, p. 426-30, 1993.

SILVA, E. S.; GONTIJO, C. M.; PIRMEZ, C.; FERNANDES, O.; BRAZIL, R. P. Short report: detection of *Leishmania* DNA by polymerase chain reaction on blood samples from dogs with visceral leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 65, p. 896-8.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; CORBETT, C. E. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 3, p. 239-51, 2004.

SLAPPENDEL, R. J.; TESKE, E. A review of canine leishmaniasis presenting outside endemic areas. Canine Leishmaniasis: An update. In: PROCEEDINGS OF THE INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM, 1999, Barcelona, Spain. **Anais...** Barcelona: Editora, 1999. p. 54-59.

SOLANO-GALLEGO, L.; LLULL, J.; RAMOS, G. RIERA, C.; ARBOIX, M.; ALBEROLA, J.; FERRER, L. The Ibizaian hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection. **Vet. Parasitol.**, v. 90, p. 37-45, 2000.

SOLANO-GALLEGO, L.; MORELL, P.; ARBORIX, M.; ALBEROLA, J.; FERRER, L. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and sorology. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, n. 2, p. 560-3, 2001a.

SOLANO-GALLEGO, L.; RIERA, C.; ROURA, X.; INIESTA, L.; GALLEGO, M.; VALLADARES, J. E.; FISA, R.; CASTILLEJO, S.; ALBEROLA, J.; FERRER, L.; ARBOIX, M.; PORTÚS, M. *Leishmania infantum*-specific IgG, IgG1 and IgG2 antibody responses in healthy and ill dogs from endemic areas. Evolution in the course of infection and after treatment. **Vet. Parasitol.**, v. 19, n. 4, p. 265-76, 2001b.

SOUZA, B. M. P. S.; REBOUÇAS, M. F.; OLIVEIRA, L. S.; FREITAS, D. S.; JULIÃO, F. S.; ALCÂNTARA, A. C.; PAULE, B. J. A.; BARROUIN-MELO, S. M.; FRANKE, C. R. Comparação entre diferentes preparados protéicos de *Leishmania chagasi* como antígenos para ELISA indireto. **Rev. Bras. Saúde Prod. An.**, v. 5, p. 31-40, 2004.

SPANAKOS, G.; PIPERAKI, E. T.; MENOUNOS, P. G.; TEGOS, N.; FLEMETAKIS, A.; VAKALIS, N. C. Detection and species identification of Old World *Leishmania* in clinical samples using a PCR-based method. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 102, p. 46-53, 2008.

SUFFIA, I.; QUARANTA, J. F.; EULALIO, M. C.; FERRUA, B.; MARTY, P.; LE FICHOUX, Y.; KUBAR, J. Human T-cell activation by 14 and 18 kilodalton nuclear proteins of *Leishmania infantum*. **Infect Immun.**, v. 63, p. 3765-71, 1995.

SUNDAR, S.; RAI, M. Laboratory Diagnosis of visceral leishmaniasis. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 9, n. 5, p. 951-958, 2002.

TAVARES, C. A. P.; FERNANDES, A. P.; MELO, M. N. Molecular diagnosis of Leishmaniasis. **Expert Rev. Mol. Diagn.**, v. 3, p. 657-67, 2003.

TÁVORA, M. P.; PEREIRA, M. A.; SILVA, V. L.; VITA, G. F. Comparative validation study between the ELISA and RIFI techniques for diagnosing *Leishmania* sp in stray dogs caught in the municipality of Campos de Goytacazes, State of Rio de Janeiro. **Rev. Soc. Brás. Med. Trop.**, v. 40, n. 4, p. 482-3, 2007.

TESH, R. B. Control of zoonotic visceral leishmaniasis: is it time to change strategies?. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 52, n. 3, p. 287-92, 1995.

TIWARI, V.; JAIN, A.; AGARWAL, M.; MITTAL, B.; PANDEY, H. P. Evaluation of antibody responses in Indian Kala-azar by immunoblot. **Biochem. Mol. Biol. Int.**, v. 37, p. 959-64, 1995.

TURCO, S. J.; DESCOTEAUX, A. The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 45, p. 65-94, 1992.

TURCO, S. J. Trypanosomatid surface and secreted carbohydrates. **Biochem. Cell. Biol. Protoc.**, v. 10, p. 225-240, 2003.

UMEZAWA, E. S.; NASCIMENTO, M. S.; KESPER, JR. N.; COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J.; JUNQUEIRA, C. V.; CAMARGO, M. E. Immunoblot assay using excreted-secreted antigens of *Trypanosoma cruzi* in serodiagnosis of congenital, acute, and chronic Chagas' disease. **J. Clin. Microbiol.**, v. 34, p. 2143-2147, 1996a.

UMEZAWA, E. S.; NASCIMENTO, M. S.; STOLF, A. M. Enzyme-linked immunosorbent assay with *Trypanosoma cruzi* excreted-secreted antigens (TESA-ELISA) for serodiagnosis of acute and chronic Chagas' disease. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 39, n. 3, p. 169-76, 2001.

UMEZAWA, E. S.; PINEDO-CANCINO, V.; TEIXEIRA, M. M. TESA-blot for the daignosis of Chagas disease in dogs from co-endemic regions for *Trypanosoma evansi* and *Leishmania chagasi*. **Acta Trop.**, v. 30, p. 1-9, 2009.

VALE, A. M.; FUJIWARA, R. T.; DA SILVA NETO, A. F.; MIRET, J. A.; ALVAREZ, D. C. C.; DA SILVA, J. C. F.; CAMPOS-NETO, A.; REED, S., MAYRINK, W.; NASCIMENTO, E. Identification of highly specific and cross-reactive antigens of *Leishmania* species by antibodies from *Leishmania (Leishmania) chagasi* naturally infected dogs. **Zoonoses Public Health**, v. 56, p. 41-48, 2009.

VEXENAT, A. C.; SANTANA, J. M.; TEIXEIRA, A. R. L. Cross-reactivity in human infections by the kinetoplastid protozoa *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania chagasi* and *Leishmania (vianna) braziliensis*. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 38, n. 3, p. 177-185, 1996.

VÖLLER, A.; BIDWELL, D. E.; BARTLETT, A.; EDWARDS, R. A comparison of isotopic and enzyme-immunoassays for topical parasitic diseases. **Trans. R. Soc. Trop. Med Hyg.**, v. 71, n. 5, p. 431-7, 1977.

WHITE, A. C. Jr.; CASTES, M.; GARCIA, L.; TRUJILLO, D.; ZAMBRANO, L. *Leishmania chagasi* antigens recognized in cured visceral leishmaniasis and asymptomatic infection. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 46, p. 123-31, 1992.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Control of Leishmaniases**. Geneva: WHO, 1990. p. 793. (Technical Report Series).

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **DCD Annual report 2001**. Disponível em: <<http://www.emro.who.int/dsaf/dsa345.pdf>>. Acesso em: 7 Abr. 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniasis**. 2009. Disponível em: <<http://www.who.int/immunization/topics/leishmaniasis/en/>>. Acesso em: 7 Abr. 2009.

WU, Z.; BAO, Y.; YU, M.; LU, L.; ZHANG, Y. An experimental study on application of PCR in detection of kala-azar. **Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health**, v. 28, p. 169-72, 1997.

ZAMBRANO-VILLA, S.; ROSALES-BORJAS, D.; CARRERO, J. C.; ORTIZ-ORTIZ, L. How protozoan parasites evade the immune response. **Trends Parasitol.**, v. 18, p. 272-278, 2002.

ZANELLA, J. A Leishmaniose avança em São Paulo. [Entrevista a M. LUVIZOTTO]. **J. UNESP**, maio 2007, Saúde n. 222, p. 8-9.

ZIJLSTRA, E. E.; NUR, Y.; DESJEUX, P.; KHALIL, E. A.; EL-HASSAN, A. M.; GROEN, J. Diagnosing visceral leishmaniasis with the recombinant k39 strip test: experience from the Sudan. **Trop. Med. Int. Health**, v. 6, p. 108-113, 2001.