
**PANORAMA HISTÓRICO DO DIAGNÓSTICO
LABORATORIAL DA LEISHMANIOSE VISCERAL
ATÉ O SURGIMENTO DOS TESTES
IMUNOCROMATOGRÁFICOS (RK39)**

Zilma Ferreira Dourado, ¹ Hugo Delleon Silva, ² Elisângela de Paula Silveira-Lacerda ³ e Marco Túlio Antonio Garcia-Zapata ¹

RESUMO

Este estudo faz uma revisão do diagnóstico da Leishmaniose visceral humana no Brasil e no mundo. O diagnóstico parasitológico direto, utilizado a partir de 1930, possui elevada especificidade e sensibilidade, entre 60% e 95%. A Reação de Fixação do Complemento (em desuso), desenvolvida na década de 1940, apresentou resultados promissores, porém demonstrou reações cruzadas com doença de Chagas, sífilis e blastomicose. A reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), empregada a partir dos anos 60, utiliza formas promastigotas do parasito que a limitam em termos de especificidade e reprodutibilidade. Nos anos 70, a técnica de Enzimaímunoensaio (com antígenos crus ou purificados), assim como suas variações (Dot-ELISA, Fast-ELISA, e micro ELISA, entre outras), começou a ser utilizada e mostrou-se mais sensível e menos específica que a RIFI. Nos anos 80, a Reação em Cadeia da Polimerase foi empregada, apresentando boa sensibilidade, contudo, em virtude do elevado custo operacional não está adaptada ao diagnóstico de rotina. Nos anos 90, o Teste Rápido Anticorpo *L. donovani*, marcado com o antígeno rK39, apresentou limitações, pois não detectava infecção em animais com títulos de RIFI de 1:40 a 1:320. Atualmente, um novo método de Teste Rápido para detecção de *Leishmania spp.* (TRL), marcado com o antígeno rK39, está sendo utilizado no Brasil. Neste estudo o TRL demonstrou sensibilidade de 95,8% e especificidade de 99,7%. Este teste pode ser utilizado na área de campo, visto que apresenta resultados em curto espaço de tempo e tem baixo custo operacional.

DESCRITORES: Leishmaniose visceral. Histórico. Diagnóstico Rápido.

INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV), ou calazar, é uma doença de grande expansão geográfica no mundo e ocorre em regiões tropicais e subtropicais.

-
- 1 Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia-GO, Brasil.
 - 2 Mestrando em Ciências da Saúde, Hospital das Clínicas da UFG.
 - 3 Instituto de Ciências Biológicas da UFG.

Endereço para correspondência: Zilma Dourado, Caixa Postal 12911, CEP: 74643-970, Goiânia, GO, Brasil. E-mail: zilmadourado@uol.com.br

Recebido para publicação em 28/9/2006. Revisto em: 24/9/2007. Aceito em: 1/12/2007.

Endêmica em 62 países, estima-se que 200 milhões de pessoas estejam sob o risco de adquirir a infecção (17).

A doença é causada por protozoários da família *Trypanosomatidae*, do gênero *Leishmania* que possui três espécies pertencentes ao complexo donovani: *Leishmania chagasi*, *Leishmania infantum* e *Leishmania donovani*. A principal forma de transmissão do parasito para o homem e outros hospedeiros mamíferos é pela picada de fêmeas de dípteros da família *Psychodidae*, subfamília *Phebotominae*, conhecidos genericamente por flebotomíneos. O agente etiológico da LV no Brasil é a *L. chagasi* e a principal espécie transmissora é a *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (30). Nos países do Mediterrâneo e da Ásia, o agente etiológico é *L. infantum* e na Índia é a *L. donovani* (25).

A ocorrência da doença em uma determinada área depende basicamente da presença do vetor susceptível e de um hospedeiro/reservatório igualmente susceptível. A possibilidade de que humanos, principalmente crianças desnutridas, sejam fontes de infecção pode levar a um aumento da complexidade da transmissão da LV (15).

Embora haja métodos específicos de tratamento e diagnóstico específico da LV, a maior parte da população brasileira ainda não tem acesso a esses recursos, o que eleva os índices de mortalidade.

No Brasil, a LV é um problema de saúde pública, pois já foram registrados casos autóctones em 19 dos 27 estados brasileiros. A Região Nordeste concentra mais de 90% dos casos humanos da doença. O aparecimento de focos importantes nas Regiões Norte, Sudeste e Centro-Oeste tem contribuído para uma crescente prevalência, com uma média anual nos últimos cinco anos de 3.500 casos (19).

Na Região Norte, com a criação do estado do Tocantins em 1989, houve aumento da incidência de LV em decorrência das modificações ecoepidemiológicas, como a construção da capital, o intenso fluxo migratório e a falta de estrutura básica e sanitária, que propiciaram um ambiente adequado para a urbanização do vetor e a propagação da doença (18).

Nas áreas endêmicas, afastadas dos grandes centros, há carência de profissionais para a realização do diagnóstico da LV e muitas vezes são aplicados apenas critérios básicos como características clínicas e aspectos epidemiológicos. No estado do Tocantins, muitos municípios não possuem médicos qualificados para a realização do diagnóstico parasitológico direto (PD), por isso há uma sobrecarga na capital nos hospitais Dona Regina Siqueira Campos e Hospital Geral de Palmas, onde apenas dois médicos realizam a punção aspirativa de medula óssea ou vísceras (4).

Diferentes metodologias podem ser utilizadas para o diagnóstico de LV humana. Atualmente, há uma variedade de técnicas, mas nenhuma apresenta 100% de sensibilidade e especificidade (15).

O requisito básico, seguro e determinante (*padrão-ouro ou gold standard*) no diagnóstico laboratorial da leishmaniose visceral é a documentação de formas amastigotas em material obtido da punção de medula óssea ou baço. Ainda hoje o PD humano e os inquéritos caninos são realizados por meio de pesquisa das formas

amastigotas no material obtido de punção de medula óssea e de vísceras (baço e fígado). A especificidade desses métodos é de 100%, mas a sensibilidade é muito variável, em torno de 60% a 85%, em punção de medula óssea (PMO), e 95% em punção esplênica (32, 34). Essas duas punções são consideradas procedimentos invasivos e exigem ambientes apropriados para a coleta, portanto não são consideradas adequadas para estudos epidemiológicos em larga escala (8).

A sorologia é útil para triagem de casos quando for difícil demonstrar as formas amastigotas de *Leishmania chagasi*. Diversas técnicas sorológicas podem ser empregadas para diagnosticar a LV. A reação de fixação do complemento (RFC), atualmente em desuso, foi bastante realizada na década de 1930, quando se utilizava o antígeno extraído do bacilo da tuberculose. Apresentava resultados promissores com elevada sensibilidade e especificidade; no entanto, com esse método podem ocorrer reações cruzadas em títulos baixos com a doença de Chagas, sífilis e blastomicose (14). A Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), utilizada a partir da década de 1960 (12), é uma metodologia que utiliza formas promastigotas do parasito, que a limitam em termos de especificidade e reprodutibilidade (29). Os antígenos mais utilizados são promastigotas fixados em lâminas e amastigotas provenientes de fígado e baço de *hamsters*. A partir da década de 1970, surgiu a metodologia de Enzimoimunoensaio, assim como suas variações, Dot-ELISA, Fast-ELISA e micro ELISA, entre outras, que utilizam antígenos crus ou purificados. A utilização de antígenos recombinantes ou purificados, como as glicoproteínas de membrana gp 63, gp 70, gp 72 e rK39, específicas do gênero *Leishmania*, melhora a sensibilidade e a especificidade do diagnóstico.

De maneira geral, essas metodologias diferem quanto à sensibilidade e à especificidade, à sua aplicação prática nas condições de campo e à disponibilidade de reagentes. Essas técnicas possuem limitações de uso, pois os anticorpos podem permanecer presentes após o tratamento (cicatriz sorológica), não permitindo avaliação de resposta terapêutica. Podem ocorrer, ainda, reações cruzadas com outras doenças, como tripanossomíase, hanseníase, malária, esquistossomose, tuberculose e outras leishmanioses (5, 30, 31).

Mesmo com o advento de novas metodologias de diagnóstico mais sensíveis, como o ensaio Imunoenzimático, a RIFI continua sendo utilizada nos principais laboratórios públicos de referência do Brasil para o diagnóstico de LV humana e canina.

A partir da década de 1980, iniciou-se o estudo de várias metodologias de diagnóstico baseadas na biologia molecular para identificação do gênero *Leishmania*. É um método de hibridização por meio de sondas específicas e técnicas de amplificação de ácidos nucleicos, incluindo a reação em cadeia da polimerase-transcriptase reversa (RT PCR) para detecção de RNA e a PCR para detecção de DNA. O DNA de *Leishmania chagasi* é encontrado em pequena quantidade nas amostras clínicas obtidas de punção medular, esplênica ou hepática e, em maiores quantidades, nas células mononucleares do sangue periférico (14). O método de

hibridização com sondas pode apresentar sensibilidade de até 94% (20). Entretanto, seus resultados dependem de algumas variáveis envolvidas, como área endêmica, tipo de amostra, alvo do DNA utilizado para amplificação de minicírculos do kDNA e método de extração do DNA (20). Apesar de ser um método sensível para a detecção de *Leishmania* em uma variedade de materiais clínicos de humanos e cães, a PCR é mais utilizada em estudos epidemiológicos do que em diagnóstico de rotina (27). Para utilização em larga escala, a PCR necessita de ajustes para se tornar mais simples e com custo operacional mais baixo.

Na década de 1990, ocorreu a união das técnicas imunoenzimáticas com a cromatografia, originando, assim, a imunocromatografia. As técnicas imunoenzimáticas permitem a quantificação de antígenos ou anticorpos que possam ser marcados com enzimas, sendo um procedimento rápido, de custo baixo e extremamente sensível, embora haja reações cruzadas com outras doenças (29). A cromatografia clássica (ou padrão) mostra um bom desempenho para análises quantitativas, é uma técnica com elevado investimento, porém o procedimento pode demandar tempo (35). A associação das duas técnicas originou a imunocromatografia, que se tornou um método mais sensível, rápido e com custo operacional mais baixo. Esta metodologia pode ser empregada nos diagnósticos de inúmeras doenças, tais como: leishmaniose visceral, leishmaniose dérmica pós-calazar (29, 30, 32, 33, 34), malária (1), rotavirose (26), infecções por *Streptococcus pneumoniae* (9), brucelose (24) e giardíase (28).

Em regra geral, as técnicas imunocromatográficas apresentam diversos sistemas acopladores e são vistas como métodos vantajosos. Os principais métodos são: imunoblot, ensaios receptores, ensaios enzimáticos inibidores e sistemas enzimáticos com proteína A ligada a corantes específicos (35).

Os sistemas enzimáticos com proteína A ligada a corantes específicos, como ouro coloidal, têm sido empregados, nos últimos anos, para a realização de teste por imunocromatografia ou Dot-Elisa em papéis, que podem ser usados para o diagnóstico rápido da LV em áreas endêmicas, dispensando etapas críticas de incubação e equipamentos de leitura óptica (25). O diagnóstico desta doença, por imunocromatografia, detecta anticorpo IgG contra o antígeno recombinante K39, que é um antígeno expresso nas espécies de leishmanias do complexo *L. donovani* (2, 3, 30, 34).

A proteína recombinante K39 (utilizada nas reações de ELISA), que é parte de uma proteína dominante de *L. Chagasi*, contém 39 aminoácidos que se repetem. Em 1998 foi adaptada para um teste imunocromatográfico por Badaró (2), recebendo o nome de TRALd (Teste Rápido Anticorpo *L. donovani*). O TRALd não apresentou reação cruzada com leishmaniose cutânea, doença de Chagas, tuberculose, hanseníase e esquistossomose (2). A sensibilidade foi de 92% e a especificidade de 99,5% quando o teste foi realizado em cães de áreas endêmicas; no entanto, não foi capaz de detectar infecção em animais com títulos de RIFI de 1:40 a 1:320 (13).

Sundar et al. fizeram, em 2003, um extenso estudo no nordeste da Índia, no qual utilizaram o teste imunocromatográfico DiaMed IT LEISH. Este teste faz a detecção rápida de anticorpos contra *Leishmania spp.* por meio de uma tira-teste impregnada com antígeno recombinante K39 (rK39), que é um epítipo repetitivo altamente conservado entre os membros do complexo *L. Donovanii* (32).

O Quadro 1 mostra a evolução do diagnóstico laboratorial da LV desde a primeira identificação na Índia até os métodos utilizados atualmente.

Quadro 1. Evolução cronológica das técnicas utilizadas no diagnóstico laboratorial da Leishmaniose visceral (1903-2003)

Ano da descoberta ou aplicação inicial	Marco histórico / nome do responsável	Referência bibliográfica
1903 (Índia)	William Leishman e Charles Donovan identificaram o protozoário no baço de um soldado morto.	Donovan, 1903 (10)
1913 (Paraguai)	Mignone descreveu o primeiro caso autóctone de LV na América.	Chagas e Cunha, 1937 (7)
1934 (Brasil)	Penna identificou o protozoário em material de viscerotomia post- Mortem.	Penna, 1934 (22)
1936 (Brasil)	Evandro Chagas identificou o protozoário in vivo.	Chagas, 1936 (6)
1938 (Brasil)	Reação de Fixação do Complemento (RFC). Em 1957 pesquisadores brasileiros descreveram a técnica de RFC.	Nussenzweig et al., 1957 (21)
1964 (EUA)	Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)	Duxbury e Sadun, 1964 (12)
1970 (EUA)	ELISA	HO et al., 1983 (16)
1990 (EUA)	Imunocromatografia TRALd K39	Reed et al., 1990 (23)
1998 (Brasil)	Imunocromatografia TRALd K39	Badaró, 1996 (2)
2001 (Sudão)	Imunocromatografia K39 ELISA K39	Zijlstra et al., 2001 (34)
2002 (Índia)	Teste Rápido K39	Sundar et al., 2002 (30)
2003 (Índia)	Diamed IT-LEISH K39	Sundar et al., 2003 (32)

Os testes rápidos que utilizam o antígeno recombinante K39 possibilitam a detecção de infecções clínicas ou subclínicas, sendo muito importantes em áreas onde a LV é hiperendêmica (3). Esses testes possuem limitações, visto que, por se basearem na pesquisa de anticorpos, podem permanecer positivos após a cura da doença. Apesar de suas limitações, são testes bastante promissores para uso em programas de saúde pública, pois requerem pequena quantidade de sangue periférico, são de rápida execução e fácil leitura. Em alguns estudos esses testes não apresentaram reações cruzadas com doença de Chagas, malária, esquistossomose, toxoplasmose, tuberculose e febre tifóide (3, 5, 29). A variação de sensibilidade e especificidade (Tabela 1) provavelmente ocorre por causa das variações regionais de cepas.

A Tabela 1 mostra os resultados dos testes rápidos com utilização do antígeno recombinante K39 em vários estudos no mundo e no Brasil.

Tabela 1. Estudo comparativo da eficiência dos métodos imunocromatográficos com o antígeno rK39 no diagnóstico da Leishmaniose visceral, no Brasil e no mundo

Métodos	Sensibilidade %	Especificidade %
Teste rápido K39 (Índia) (3, 29)	100	98
Imunocromatografia K39 (Nepal) (3, 29)	100	100
Imunocromatografia K39 (Alemanha) (3, 29)	71,4	100
Imunocromatografia (Sudão) (3, 29)	67	-
TRALd K39 (Brasil) (2)	92	99,5
DiaMed IT- LEISH K39 (Índia) (33)	100	95

Atualmente, pesquisa desenvolvida no Laboratório de Parasitologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) e no Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Goiás – Brasil investiga a utilização do DiaMed-IT LEISH, fabricado por DiaMed AG-1785 Cressier Sur Morat/Switzerland. Este teste está sendo realizado por equipes do IPTSP/ICB – UFG e por profissionais do PSF e do SUS em populações de municípios endêmicos (estado do Tocantins) e não endêmicos (estado de Goiás).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em razão das dificuldades encontradas no diagnóstico da LV em áreas endêmicas, é urgente o emprego de técnicas simples, de baixo custo e fácil execução e que apresentem elevada sensibilidade e especificidade.

O TRL para detecção de anticorpos antileishmania é um excelente método para áreas de campo, pois não requer equipamentos, acondicionamento em congeladores ou geladeiras e pessoal técnico qualificado para a realização do teste. A amostra é coletada mediante punção digital, portanto necessita de pouca quantidade de sangue, a leitura é feita em apenas 20 minutos e o custo operacional do teste é US\$ 2,71. Quando se compara o TRL com a PD, fica evidente que o custo da PD é superior (US\$ 72,1), pois requer profissional qualificado (médico), anestesia e materiais específicos para realização do aspirado de medula óssea ou vísceras. A sorologia por RIFI, que é atualmente mais utilizada, apresenta baixa especificidade e custo mais elevado (US\$ 8,56) que o do TRL (11).

O TRL poderá ser utilizado como meio de diagnóstico nos programas nacionais de saúde, aprimorando campanhas de triagem epidemiológica e de controle a baixo custo e sem a necessidade de complexa infra-estrutura e mão-de-obra qualificada. Essa observação sugere a possibilidade da incorporação desse tipo de atividade na rotina dos PSFs. Obviamente, a confirmação positiva do

teste parasitológico é o melhor método recomendado, juntamente com o método sorológico com títulos de anticorpos monitorados durante a infecção.

ABSTRACT

Historical panorama of laboratorial diagnostic of visceral leishmaniasis until the appearance of immunochromatographic tests

This is a revision about the diagnostics of human visceral leishmaniasis in Brazil and in the world. The parasitologic diagnosis, used since 1930, has high specificity and sensibility between 60 and 95%. The complement fixation reaction (not in use), developed in the forties, presented promising results, however it presented crossed reactions with Chagas Disease, Syphilis and Blastomycosis. The indirect immunofluorescence reaction (IIFR), used since the sixties, uses promastigote forms from the parasite being limited in terms of specificity and replicability. In the seventies, the Enzyme Immuno Assay (with crude or purified antigens) as well as its variations (Dot-Elisa, Fast-Elisa, micro Elisa, amongst others), started to be used as it is more sensible and less specific than IIFR. In the eighties, the polymerase chain reaction was used, presenting good sensibility, however with high operational cost and it is not adapted to routine diagnostics. In the nineties, the quick antibody test *L. donovani* marked with rK39 antigen presented limitations as it did not detect infection in animals with low results of IIFR from 1:40 to 1:320. Nowadays, a new method of Test for Quick detection to *Leishmania* spp (TQL) marked with rK39 antigen is being used in Brazil. In this study TQL demonstrated 95,8% sensitivity and 99,7% specificity. This test may be used in field areas with short term results and low operational costs.

KEY WORDS: Visceral Leishmaniasis. Historic. Rapid tests.

REFERÊNCIAS

1. Ávila PE, Kirchgatter K, Brunialti KCS, Oliveira AM, Siciliano RF, Di Santi SM. Evaluation of a rapid dipstick test, malar-check™, for the diagnosis of *Plasmodium falciparum* malaria in Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 44: 293-296, 2002.
2. Badaró R. Desenvolvimento e utilização de um antígeno recombinante específico de *Leishmania chagasi* (rK39) no diagnóstico sorológico da Leishmaniose Visceral. São Paulo. Tese de Doutorado, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP, 1996.
3. Brandoniso O, Fumarola L, Maggi P, Cavaliere R, Spinelli R, Pastore G. Evaluation of a Rapid Immunochromatographic Test for Serodiagnosis of Visceral Leishmaniasis. *Eur J Clin Microbiol Infect* 21: 461-46, 2002.
4. Brasil, Secretaria de Saúde do Estado do Tocantins, 2005.
5. Carvalho SFG, Lemos EM, Corey R, Dietze R. Performance of recombinant K39 antigen in the diagnosis of brazilian visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 68: 321-324, 2003.
6. Chagas E. Primeira verificação em indivíduo vivo de leishmaniose visceral no Brasil. *Brasil Med* 50: 221,1936.

7. Chagas E, Cunha AM, Castro GD et al. Leishmaniose visceral americana. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 32: 321, 1937.
8. Dereure J, Pralong F, Reynes J, Basset D, Bastien P, Dedet JP. Haemoculture as a tool for diagnosing visceral leishmaniasis in HIV-negative and HIV-positive patients: interest for parasite identification. *Bull World Health Organ* 76: 203-206, 1998.
9. Dominguez JM, Gali N, Blanco S. Detection of *Streptococcus pneumoniae* antigen by a rapid immunochromatographic in urine samples. *Chest* 119: 243-249, 2001.
10. Donovan C. On the possibility of the occurrence of trypanosomiasis in India. *Brasil Med J* 2: 79, 1903.
11. Dourado ZFS. Diagnóstico da Leishmaniose visceral em áreas rurais, endêmicas e não endêmicas, utilizando um teste imunocromatográfico recombinante K39 (2004-2006). Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, 2006.
12. Duxbury RE, Sadun EH. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 13: 525-529, 1964.
13. Genaro O, Costa RT, França Silva JC, Reis AB, Vieira EP, Arias JR et al. Evaluation of an immunochromatographic assay for the diagnosis for dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania chagasi* in Brasil. *Acta Parasitol Turcica* 21: 93, 1997.
14. Genaro O. *Parasitologia Humana*. 10ª edição, Atheneu S.A, São Paulo, 2002. p. 56-60.
15. Gontijo CMF, Melo MN. Leishmaniose Visceral no Brasil quadro atual, desafios e perspectivas. *Rev Bras Epidemiol* 7: 339-340, 2004.
16. HO M, Leeuwenburg J, Mbungua G, Wamachi A, Voller A. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for field diagnosis of visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 32: 943-946, 1983.
17. Leishmaniasis Worldwide. *Trans Royal Soc Trop Med Hyg* 95: 239-243, 2001.
18. Machado MRM. Leishmaniose visceral: uma endemia em expansão no Brasil e emergente no Estado do Tocantins. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, 2004.
19. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Centro Nacional de Epidemiologia. Leishmaniose Visceral no Brasil: Situação atual, principais aspectos epidemiológicos, clínicos e medidas de controle. *Boletim Epidemiológico* 6: I-II, 2001.
20. Ministério da Saúde. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose visceral. 1ª edição, 3ª reimpressão. Brasília, 2006. p.26.
21. Nussenzweig V, Nussenzweig RS, Alencar JE. Leishmaniose visceral nos arredores de Fortaleza, Estado do Ceará: inquérito sorológico utilizando a reação de fixação do complemento com antígeno extraído do bacilo de tuberculose. Observações sobre o diagnóstico e epidemiologia da doença. *O Hospital* 52: 47-69, 1957.
22. Penna H. Leishmaniose visceral no Brasil. *Brasil Med* 48: 949, 1934.
23. Reed SG, Shreffler WG, Burns JM, Scott JM, Orge MG, Ghalib HW et al. An improved serodiagnostic procedure for visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 43: 632-639, 1990.
24. Ruiz-Mesa M, Sanchez-Gonzalez J, Reguera JM. Rose Bengal test diagnostic yield and use for the rapid diagnosis of human brucellosis in departments in endemic areas. *Clin Microbiol Infect* 11: 221-225, 2005.
25. Scott JM, Shreffler WG, Ghalib HW et al. A rapid and simple diagnostic test for active visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 44: 272-277, 1991.
26. Sirolo H, Kallio ERK, Koistinen V, Kuronen I. Rapid field test for detection of hantavirus antibodies in rodents. *Epidemiol Infect* 132: 549-553, 2004.
27. Solano-Gallego L, Morell P, Arboix 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 serology. *J Clin Microbiol* 39: 560-563, 2001.
28. Sorell L, Garrote JA, Galvan JA. Celiac disease diagnosis in patients with giardiasis: High value of antitransglutaminase antibodies. *Am J Gastroenterol* 99: 1330-1332, 2004.

29. Sundar S & Rai M. Laboratory Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol* 9: 951-958, 2002.
30. Sundar S, Pai K, Sahu M, Kumar V & Murray W. Immunochromatographic strip-test detection of anti-K39 antibody in Indian visceral leishmaniasis. *Ann Trop Med Parasitol* 96: 19-23, 2002.
31. Sundar S. Diagnosis of Kala-azar – An Important Stride Japi Vol. 51: 753-754 2003.
32. Sundar S, Singh RK, Bharti K, Maurya RS, Delafosse I, Jacquier P. Evaluation of a new rapid immunochromatographic diagnostic test (Diamed-it Leish) for Indian visceral leishmaniasis and PKDL. The American Society of Tropical Medicine and Hygiene: ASTMH 52nd Annual Meeting, 2003. p. 3-7.
33. Sundar S, Maurya R, Singh KR, Bharti K, Chakravarty J, Parekh A, Rai M, Kumar K, Murray HW. Rapid, Noninvasive Diagnosis of Visceral Leishmaniasis in India: Comparison of Two Immunochromatographic Strip Tests for Detection of Anti-K39 Antibody. *J Clin Microbiol* 44: 251-253, 2006.
34. Zijlstra E E, Nur Y, Desjeux P, Khalil EAG, El-Hassan AM, Groen J. Diagnosing visceral leishmaniasis with the recombinant K39 strip test: experience from the Sudan. *Trop Med Int Health* 6: 108-113, 2001.
35. Weller G M. Immunochromatographic techniques – a critical review. *Fresenius' J Anal Chem* 366: 635-645, 2000.

PRÓXIMOS EVENTOS NA ÁREA DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA

24º Congresso Brasileiro de Microbiologia, Brasília, DF, 3 a 6 de outubro de 2007.
Informações: www.sbmicrobiologia.org.br

XVIII Congreso de la Federación Latinoamericana de Parasitología (FLAP), Isla de Margarita, Venezuela, 21 a 25 de outubro de 2007. Informações: www.flap2007.com

XXIII Reunião de Pesquisa Aplicada em doença de Chagas e Leishmanioses, Uberaba, 25 a 27 de outubro de 2007. Informações: www.reuniao-chagas-leish2007.or.br

XX Congresso Brasileiro de Parasitologia, Recife, PE, 28 de outubro a 01 de novembro de 2007. Informações: silferreira@icb.upe.br

5º. Congresso Brasileiro de Micologia, Recife, PE, 12 a 16 de novembro de 2007.
Informações: www.5micol.com

I Encontro Paranaense de Parasitologia, Curitiba, PR, 23 a 24 de novembro de 2007.
Informações: i.epparasito@gmail.com

VIII Congreso Centroamericano y del Caribe de Parasitología y Medicina Tropical, Havana, Cuba, 4 a 7 de dezembro de 2007. Informações: www.ipk.sid.cu/eventosipk/cong2007/

International Workshop on Leishmaniasis, Theran, Iran, 1st to 6th march 2008.
Informações: www.pasteur.ac.ir

44º. Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Porto Alegre, RS, 4 a 8 de março de 2008. Informações: www.sbmt.org.br

IX Simpósio Internacional de terapêutica em hepatite viral, Salvador, BA, 10 a 12 de julho de 2008. Informações: www.hepatologiadomilenio.com.br

11º. Simpósio Internacional sobre Esquistossomose, Salvador, BA, 20 a 22 de agosto de 2008. Informações: www.esquistossomose2008.com.br