

A UTILIZAÇÃO DA IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA NO DIAGNÓSTICO DE ROTINA DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA E SUAS IMPLICAÇÕES NO CONTROLE DA DOENÇA

LÍDIA SILVA DE OLIVEIRA¹, FRED DA SILVA JULIÃO², VERENA MARIA MENDES DE SOUZA², DANIELA SOUZA FREITAS¹, BÁRBARA MARIA PARANÁ DA SILVA SOUZA¹, BRUNO JEAN ADRIEN PAULE³, PAULO HENRIQUE PALIS AGUIAR⁴, STELLA MARIA BARROUIN MELO⁴ E CARLOS ROBERTO FRANKE⁵

1. Graduanda da Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia (EMV/UFBA, Bahia, BA).
2. Aluno do curso de Mestrado em Medicina Veterinária Tropical da EMV/UFBA.
3. Doutorando do Instituto de Ciências da Saúde – UFBA.
4. Professores Assistentes do Departamento de Patologia e Clínicas da EMV/UFBA.
5. Professor Adjunto de Departamento de Produção Animal da EMV/UFBA.

RESUMO

Neste trabalho foram analisados, por *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) e imunofluorescência indireta (IFI), 101 soros caninos provenientes da Região Metropolitana de Salvador, Bahia, sendo 30 soros de cães com resultado parasitológico positivo para *Leishmania chagasi* em cultura esplênica e 71 soros de cães clinicamente sadios. Dez soros de cães com cultivo positivo e com resultados sorológicos concordantes ou não entre os testes ELISA e IFI foram testados pela técnica de *Western-Blotting* (WB). Das 30 amostras de soro com resultado positivo em cultura, o ELISA detectou 27 amostras positivas

e o IFI mostrou resultado positivo em 12. Das 71 amostras de soro de cães clinicamente sadios, todas apresentaram resultados negativos no ELISA e uma apresentou resultado positivo no IFI. A sensibilidade e a especificidade foram de 90% e 100% para o ELISA e 40% e 98,6% para IFI, respectivamente. O índice de concordância Kappa entre os testes foi considerado moderado (0,53), e os resultados do WB apresentaram maior concordância com o ELISA. Este estudo demonstra a possibilidade de falha no teste IFI na detecção de cães infectados e discute a sua implicação no controle da doença em áreas endêmicas.

PALAVRAS-CHAVE: Cães, ELISA, IFI, *Leishmania chagasi*, Western-Blotting.

ABSTRACT

THE USE OF INDIRECT IMMUNOFLUORESCENCE ASSAY AS ROUTINE DIAGNOSIS METHOD FOR VISCERAL CANINE LEISHMANIASIS AND ITS IMPLICATIONS IN DISEASE CONTROL

In this study, 101 canine sera from the Metropolitan Area of Salvador, Bahia were tested by indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and indirect immunofluorescence assay (IFA) for *Leishmania* reacting immunoglobulins. Thirty sera came from dogs living in an endemic area, with positive splenic culture for *Leishmania chagasi* and were used as positive standard. The other 71 sera came from healthy dogs, domiciliated in a non-endemic area. From the thirty dogs with positive culture, 27 were seropositive by ELISA and 12 by IFA. All 71 sera of healthy dogs were negative by ELISA and one had a positive result

by IFA. The sensitivity and specificity of ELISA were 90% and 100% and of IFI were 40% and 98,6%. The observed concordance index Kappa among the tests was moderated (0,53). Sera from ten positive culture dogs, concordant or discordant among the serotests were analysed by Western blotting, whose results gave better agreement with ELISA. These results evidenced a potential low sensitivity of IFA in detecting infected dogs with *L. chagasi* and its implications on the visceral leishmaniasis control in endemic areas are commented.

KEY WORDS: Dogs, ELISA, IFA, *Leishmania chagasi*, Western-Blotting.

INTRODUÇÃO

Aleishmaniose visceral (LV) é uma zoonose importante pela morbimortalidade a ela associada e em virtude da sua rápida expansão geográfica registrada nas últimas décadas, resultando no estabelecimento de novas áreas endêmicas, a exemplo do demonstrado nos estados da Bahia (FRANKE et al., 2002a) e Maranhão (MENDES et al., 2002) situados na Região Nordeste do Brasil. As medidas de controle da LV preconizadas pela Organização Mundial de Saúde constam do diagnóstico precoce e tratamento dos casos humanos, e do controle dos vetores e realização de inquéritos sorológicos nas populações caninas seguidos da eliminação dos animais soropositivos (WHO, 1988). Nos últimos anos, alguns autores têm observado que a eliminação de cães soropositivos não tem contribuído significativamente para a redução da incidência da doença na população humana (RACHAMIM et al., 1991; EVANS et al., 1992; DYE, 1996; PARANHOS-SILVA et al., 1998).

Uma das explicações possíveis para a reduzida eficiência da eliminação de cães soropositivos na redução da incidência de casos humanos seria a baixa sensibilidade do teste de imunofluorescência indireto (IFI) utilizado oficialmente nos inquéritos sorológicos caninos para controle da leishmaniose visceral no território brasileiro (BERRAHAL et al., 1996). A detecção apenas parcial dos casos caninos em uma determinada região resultaria na permanência de cães infectados, contribuindo para a continuidade do ciclo de transmissão do parasito nas populações caninas e humanas locais (COURTENAY et al., 2002). Outros testes sorológicos, tais como ELISA, DOT-ELISA ou *Western-Blotting* (WB), para a detecção de anticorpos antileishmania foram descritos na literatura (RACHAMIM et al., 1991; DIETZE et al., 1995; MANCIATI et al., 1996; BADARÓ et al., 1996; VERCAMMEN et al., 1997).

Comparativamente ao teste de IFI, o teste ELISA tem várias vantagens, como um procedimento mais simples e rápido, necessita apenas uma diluição de soro e é considerado mais sensível (PARANHOS-SILVA et al., 1996; CABRAL et al., 1998). A característica do teste WB de reconhecer antígenos específicos do parasito o torna mais

específico e sensível que o IFI e o ELISA (BERRAHAL et al., 1996). Este trabalho teve como objetivo analisar amostras de soros caninos provenientes da Região Metropolitana de Salvador, avaliando comparativamente a capacidade diagnóstica dos testes de Imunofluorescência Indireta, ELISA e *Western-Blotting*.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram analisados, pelos testes ELISA e IFI, 101 soros caninos provenientes da Região Metropolitana de Salvador (RMS), Bahia, sendo 30 amostras de soros obtidas de cães comprovadamente positivos em cultivo esplênico para *L. chagasi* e 71 de cães clinicamente sadios. Os soros dos cães positivos foram obtidos em inquérito domiciliar na cidade de Camaçari, RMS. Os 71 soros de cães sadios foram oriundos do canil do Hospital de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia (18), de clínicas veterinárias particulares de Salvador (20) e de campanhas de vacinação realizadas na cidade de Salvador (28). Dez soros de cães com cultivo positivo e com resultados sorológicos concordantes ou não entre os testes ELISA e IFI foram testados pela técnica de *Western-Blotting* (WB).

Preparação do antígeno (*Leishmania chagasi* isolada de cão) para ELISA e *Western-Blotting*

A *L. chagasi* foi isolada pela inoculação de tecido esplênico canino em meio de cultivo composto por 5ml de ágar sangue (Blood Agar Base – Sigma, USA) com 5% de sangue de carneiro desfibrinado estéril e 3ml de meio Schneider (Sigma, USA), contendo 20% de soro fetal bovino e 50µg/ml de gentamicina. Os parasitos isolados foram posteriormente inoculados por via intraperitoneal em três *hamsters*.

Após a apresentação dos sinais clínicos de leishmaniose, os *hamsters* foram necropsiados, e o macerado de baço e fígado foi colocado em 1 ml de meio Schneider e posteriormente transferido para uma garrafa de cultivo contendo este mesmo meio.

Após a segunda ou terceira passagem, as promastigotas de fase log foram centrifugadas a 2.500 x g, por 10 minutos a 4°C em tubo plástico de 15ml, lavadas três vezes com solução salina estéril. Em seguida, as promastigotas foram ressuspensas em solução salina com inibidor de proteases e lisadas por meio de ultra-som. Após sonicação, a preparação foi centrifugada a 10.000 x g, durante 30 minutos a 5°C. O sobrenadante foi coletado, aliquoteado e estocado a -20°C até a sua utilização.

Protocolo de Elisa

As microplacas foram sensibilizadas *overnight* a 4°C com o antígeno na concentração de 10 mg de proteínas por poço diluídas em 100ml de tampão carbonato bicarbonato 0,05M, pH 9,6. O bloqueio foi feito utilizando-se 200ml de PBS, contendo 0,05% de *tween* 20 (PBS-T) com 5% de leite em pó desnatado e incubado à temperatura ambiente durante uma hora. Os soros foram analisados utilizando-se 100ml por poço na diluição de 1/400 em PBS-T com 5% de leite em pó desnatado, incubando-se durante uma hora à temperatura ambiente. Posteriormente, 100ml de conjugado anti-IgG de cães /Peroxidase (Sigma, USA), na concentração de 1/25.000, diluído em PBS-T com 5% de leite em pó desnatado, foram acrescentados e incubados durante uma hora à temperatura ambiente. Quatro lavagens com 200ml de PBS-T foram realizadas após cada período de incubação. A revelação foi feita com peróxido de hidrogênio e OPD em tampão citrato-fosfato, e a reação foi interrompida com 50ml de ácido sulfúrico 4M por poço, sendo a placa lida imediatamente em filtro 490nm. O cálculo

do ponto de corte foi estabelecido em trabalhos anteriores como descrito por GREINER et al. (1994).

Os soros em estudo foram enviados para um laboratório autorizado da rede de saúde pública da Bahia, responsável pelo exame sorológico das amostras coletadas nos inquéritos caninos realizados oficialmente no estado, sendo que cada amostra de soro foi avaliada pelo teste IFI duas vezes.

Protocolo do *Western-Blotting*

As proteínas do antígeno utilizado para o ELISA foram separadas por SDS-PAGE com um gel de poliacrilamida de 12% e transferidas para uma membrana de nitrocelulose (marca MILLIPORE, EUA). As membranas foram bloqueadas em PBS-T com 5% de leite em pó desnatado *overnight* a 5°C. As tiras foram incubadas durante uma hora a 37°C com os soros diluídos 1/50 em PBS-T com 1% de leite em pó desnatado. Em seguida, elas foram lavadas cinco vezes em tampão PBS-T e incubadas uma hora com um conjugado anti-IgG de cão/peroxidase (Sigma, EUA) na diluição de 1/200. A revelação foi feita com o cromógeno 4-cloro-a-Naftol e peróxido de hidrogênio e a reação interrompida com água destilada.

RESULTADOS

Os resultados comparativos dos testes de ELISA e IFI estão apresentados na Tabela 1. Das 30 amostras de soro com resultado positivo em cultura, o ELISA detectou 27 amostras positivas, e o IFI mostrou resultado positivo em 12. Das 71 amostras de soro de cães clinicamente saudáveis, todas apresentaram resultados negativos no ELISA e uma apre-

TABELA 1. Resultados sorológicos dos testes ELISA e IFI das 30 amostras de cães infectados com *Leishmania* e 71 amostras de cães clinicamente saudáveis.

	ELISA				IFI			
	Positivo		Negativo		Positivo		Negativo	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Cães positivos (a)	27	90,0	3	10,0	12	40,0	18	60,0
Cães negativos	0	0	71	100,0	1	1,4	70	98,6

(a) = cães com cultura de biópsia de baço positiva.

sentou resultado positivo no IFI. A sensibilidade e a especificidade foram de 90% e 100% para o ELISA e 40% e 98,6% para IFI, respectivamente. Os valores preditivos positivos e negativos foram de 100% e 95,9% para o ELISA e 92,3% e 79,5% para o teste IFI.

O índice de concordância Kappa entre os testes foi considerado moderado (0,53). Os resultados comparativos das amostras testadas pelo WB, ELISA e IFI estão apresentados na Tabela 2. O WB apresenta melhor concordância com os resultados do ELISA nas dez amostras analisadas, sendo que, dos nove soros de cães ELISA positivo, oito foram considerados WB positivo, ao passo que três soros negativos por IFI e positivos por ELISA foram confirmados positivos por WB. A técnica de WB detectou no conjunto das doze amostras analisadas

aproximadamente quinze bandas imunorreativas, sendo as bandas de 14, 16, 30, 32, 54, 62, 68 e 72 kDa consideradas imunodominantes (Tabela 3).

TABELA 2. Resultados sorológicos comparativos de cães com cultura positiva.

Animais	IFI	ELISA	WB
I	-	-	-
J	-	+	+
K	-	+	+
L	-	+	+
O	+	+	+
P	+	+	+
Q	+	+	+
R	+	+	+
S	+	+	-
T	+	+	+

TABELA 3. Percentagem de reatividade de bandas reconhecidas por soros de cães considerados positivos por Western Blotting.

Peso (kDa)	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	% de reconhecimento
14	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	82
16	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	82
28	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	64
30	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	82
32	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	73
54	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	91
62	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	82
68	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	73
72	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
122	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	45

DISCUSSÃO

A leishmaniose visceral vem apresentando uma clara tendência de expansão geográfica nas últimas décadas como foi demonstrado por FRANKE et al. (2002a), na Bahia, e MENDES et al. (2002), no Maranhão, e sua reemergência tem sido observada em várias regiões (ARIAS et al., 1996; SILVA et al., 2001). Fatores como fenômenos climáticos, implantação de projetos agroindustriais, rápido crescimento das cidades agravado pela falta de planejamento urbano, impactos ambientais e uma progressiva deteriorização da condição socioeconômica de ampla parcela das populações

urbanas têm sido citados como responsáveis pela expansão e reemergência da LV em vários países (DESJEUX, 1996; FRANKE et al., 2002b).

Dentre as medidas de controle preconizadas pela Organização Mundial de Saúde, a realização de inquéritos sorológicos na população canina de áreas endêmicas, seguidos da eliminação dos cães infectados, tem apresentado resultados discordantes quanto a sua eficiência em reduzir a incidência de casos humanos da LV (TESH, 1995; DIETZE et al., 1997; ASHFORD et al., 1998; PALATNIK-DE-SOUSA et al., 2001). Dentre as causas desta discordância, especial atenção recai sobre a sensibilidade do teste diagnóstico utilizado nos

inquéritos sorológicos e a eficiência na retirada dos cães infectados das áreas endêmicas, fatores que contribuem para a permanência de cães infectados na área, viabilizando a continuidade do ciclo de transmissão do parasito nas populações caninas e humanas (COURTENAY et al., 2002).

A sensibilidade do teste IFI obtido em nosso estudo comparativo com o ELISA foi considerada muito baixa, ficando aquém do que normalmente é citado na literatura (PARANHOS-SILVA et al., 1996; CABRAL et al., 1998), e discordando de alguns autores que afirmam a semelhança de desempenho destes dois testes (MANCIANTI et al., 1995; SCALONE et al., 2002; VERCAMMEN et al., 2002). No entanto, os dados sobre o desempenho do IFI disponíveis na literatura normalmente foram obtidos em laboratórios de pesquisa e referem-se a um número reduzido de amostras de soro canino examinadas. Essas condições ideais de execução da técnica nem sempre podem ser reproduzidas na rotina dos laboratórios da rede pública de saúde, em virtude do fornecimento irregular de materiais de consumo, da dificuldade na realização da técnica em laboratórios muitas vezes inadequados e da subjetividade na interpretação dos resultados do IFI, freqüentemente agravada pela urgência no processamento de um número elevado de amostras coletadas durante os inquéritos sorológicos caninos nas áreas endêmicas.

Os resultados de ELISA e WB são concordantes e confirmam a baixa sensibilidade do IFI neste estudo. Esta concordância era previsível em virtude de os dois testes terem sido realizados num mesmo laboratório e com o mesmo antígeno. As bandas imunorreativas detectadas pelo WB em nosso estudo corroboram com algumas previamente descritas: 14 e 16 kDa (BERRAHAL et al., 1996), 30 e 68 kDa (VERCAMMEN et al., 2002), 32 e aproximadamente 120 kDa (MANCIANTI et al., 1995).

CONCLUSÕES

Neste trabalho foi demonstrado que o teste IFI pode eventualmente apresentar grave redução em sua sensibilidade, ocasionando uma detecção apenas parcial dos cães infectados com *Leishmania*

chagasi. Em vista deste fato e considerando que o IFI é amplamente utilizado pelos órgãos de saúde pública, é compreensível a limitada eficiência da eliminação de cães soropositivos como medida de controle da LV. A periódica validação do IFI, comparando-o com testes mais sensíveis, ou a adoção do teste de ELISA na rotina diagnóstica da leishmaniose canina é recomendação válida com vistas à otimização das ações de controle e monitoramento dessa zoonose em suas áreas de ocorrência endêmica.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio na forma de bolsas de iniciação científica para as graduandas Lídia Silva de Oliveira, Daniela Souza Freitas e Bárbara Maria Paraná da Silva Souza.

REFERÊNCIAS

- ARIAS, P. J.; MONTEIRO, P. S.; ZICKER, F. The reemergence of visceral leishmaniasis in Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 2 n. 2 Apr.-Jun. 1996.
- ASHFORD, D. A.; DAVID, J. R.; FREIRE, M.; DAVID, R.; SHERLOCK, I.; EULALIO, M. C.; SAMPAIO, D. C.; BADARÓ, R. Studies on control of visceral leishmaniasis: impact of dog control on canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 59, n.1, p. 53-57, 1998.
- BADARÓ, R.; BENSON, M.; EULALIO, M. C.; FREIRE, M.; CUNHA, S.; NETTO, E. M.; PEDRAL-SAMPAIO, D.; MADUREIRA, C.; BURNS, M. J.; HOUGHTON, L.; DAVID, J. R.; REED, S. J. K. A cloned antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral leishmaniasis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 173, p. 158-161, 1996.
- BERRAHAL, F.; MARY, C.; ROZE, M.; BERANGER, A.; ESCOFFIER, K.; LAMOUREUX, D.; DUNAN, S. Canine leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers

- by polymerase chain reaction and immunoblotting. **American Journal of Tropical Medicine Hygiene**, v. 55, n. 3, p. 273-277, 1996.
- CABRAL, M.; O'GRADY, J. E.; GOMES, S.; SOUSA, J. C.; THOMPSON, H.; ALEXANDER, J. The immunology of canine leishmaniasis: strong evidence for a developing disease spectrum from asymptomatic dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 76, p. 173-180, 1998.
- 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. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 186, n. 9, p. 1314-1320, 2002.
- DESJEUX, P. Leishmaniasis public aspects and control. **Clinics in Dermatology**, v. 14, n. 5, p. 417-423, 1996.
- DIETZE, R.; FALQUETO, A.; VALLI, L.C.P.; RODRIGUES, T. P.; BOULOS, M.; COREY, R. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis with a dot enzyme-linked immunosorbent assay. **American Journal of Tropical Medicine Hygiene**, v. 53, n. 1, p. 40-42, 1995.
- DIETZE, R.; BARROS, G. B.; TEIXEIRA, L.; HARRIS, J.; MICHELSON, K.; FALQUETO, A.; COREY, R. Effect of eliminating seropositive canines on the transmission of visceral leishmaniasis in Brazil. **Clinic Infectology Diseases**, v. 25, n. 5, p. 1240-1242, 1997.
- DYE, C. The logic of visceral leishmaniasis control. **American Journal of Tropical Medicine Hygiene**, v. 55, p. 125-130, 1996.
- EVANS, T. G.; TEIXEIRA, M. J.; MCAULIFFE, I. T.; VASCONCELOS, I. A. B.; VASCONCELOS, A. W.; SOUSA, A. Q.; LIMA, J. W. O.; PEARSON, R. D. Epidemiology of visceral leishmaniasis in northeast Brazil. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 166, p. 1124-1132, 1992.
- FRANKE, C. R.; STAUBACH, C.; ZILLER, M.; SCHLUTER, H. Trends in the temporal and spatial distribution of visceral and cutaneous leishmaniasis in the state of Bahia, Brazil, from 1985 to 1999. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96, p. 1-6, 2002a.
- FRANKE, C. R.; ZILLER, M.; STAUBACH, C.; LATIF, M. Impact of the El Niño/Southern Oscillation on Visceral Leishmaniasis, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 9, p. 914-917, Sep. 2002b.
- MANCIATI, F.; PEDONESE, F.; POLI, A. Evaluation of dot enzyme-linked immunosorbent assay (dot-ELISA) for the serodiagnosis of canine leishmaniasis as compared with indirect immunofluorescence assay, **Veterinary Parasitology**, v. 65, n. 1-2, p. 1-9, 1996.
- MENDES, W.S.; SILVA, A. A. M.; TROVÃO, J. R.; SILVA, A. R.; COSTA, J. M. L. Expansão espacial da leishmaniose visceral americana em São Luís, Maranhão, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 3, p. 227-231, 2002.
- PALATNIK-DE-SOUSA, C. B.; SANTOS, W. R.; FRANÇA-SILVA, J. C.; COSTA, R. T.; REIS, A. B.; PALATNIK, M.; MAYRINK, W.; GENARO, O. Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 65, n. 5, p. 510-517, 2001.
- 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*. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 55, n. 1, p. 36-44, 1996.
- PARANHOS-SILVA, M.; NASCIMENTO, E.G.; MELRO, M.C.B.F.; OLIVEIRA, G.G.S.; DOS SANTOS, W.L.C.; PONTES-DE-CARVALHO, L.C.; OLIVEIRA-DOS-SANTOS, A.J. Cohort study on canine emigration and *Leishmania* infection in an endemic area for American visceral leishmaniasis. Implications for the disease control. **Acta Tropica**, v. 69, p. 75-83, 1998.

RACHAMIM, N.; JAFFE, C.L.; ABRANCHES, P.; SILVA-PEREIRA, M.C.D.; SCHNUR, L.F.; JOCOBSON, R.L. Serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis in Portugal: comparison of three methods. **Annals of Tropical Medicine Parasitology**, v. 85, p. 503-508, 1991.

SILVA, E. S.; GONTIJO, C. M. F.; PACHECO, R.S.; FIUZA, V. O. P.; Visceral leishmaniasis in metropolitan region of Belo Horizonte, state of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 3, p. 285-291, 2001.

TESH, R. B. Control of zoonotic visceral leishmaniasis: is it time to change strategies?

American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v. 53, n. 3, p. 287-292, 1995.

VERCAMMEN, F.; BERKVENNS, D.; RAY, D.; JACQUET, D.; VERVOORT, T.; LE RAY, D. Development of a slide ELISA for canine leishmaniasis and comparison with four serological tests. **Veterinary Record**, v.141, n.13, p.328-330, 1997.

WHO. **Guidelines for leishmaniasis control at regional and subregional levels** (WHO/LEISH/88-25). Geneva: PDP, WHO, 1988.

