



## MÉTODOS PARA DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA - Revisão

Gabriela Porfírio-Passos<sup>1</sup>, Paulo Marcos Amaral Silva<sup>2</sup>, Sayanne Luns Hatum de Almeida<sup>3</sup>, Lenir Cardoso Porfírio<sup>4</sup>, Marcos Santos Zanini<sup>5</sup>

1. Mestranda no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Espírito Santo - Centro de Ciências Agrárias - UFES - (gporfiriopassos@gmail.com)
2. Graduando em Ciências Biológicas na Universidade Federal do Espírito Santo - Centro de Ciências Agrárias - UFES
3. Graduanda em Medicina Veterinária da Universidade Federal do Espírito Santo - Centro de Ciências Agrárias - UFES
4. Professora Doutora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Espírito Santo - Centro de Ciências Agrárias - UFES
5. Professor Doutor do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Espírito Santo - Centro de Ciências Agrárias - UFES  
Alto Universitário, s/n - Alegre - Espírito Santo - Brasil - CEP 29500-000

Recebido em: 06/10/2012 – Aprovado em: 15/11/2012 – Publicado em: 30/11/2012

### RESUMO

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é causada por protozoários do gênero *Leishmania*, que acomete a pele e mucosa, de humanos, animais silvestres e domésticos. Esta zoonose permanece endêmica em áreas da América Latina. Diversas são as técnicas sorológicas e parasitológicas que podem auxiliar no seu diagnóstico, no entanto, se faz necessário a associação de outras técnicas para assegurar o resultado acurado e preciso. O objetivo deste trabalho é descrever os diferentes métodos diagnósticos e as técnicas empregadas para detecção de anticorpos e sua interação com antígenos solúveis, bem como a identificação do protozoário por meio de cultivo e a presença de ácidos nucléicos. Considera-se que são necessários testes parasitológicos ou moleculares associados a testes sorológicos anti-*Leishmania* para diagnóstico seguro de LTA.

**PALAVRAS-CHAVE:** Técnicas diagnósticas, *Leishmania*, humanos e cães.

### METHODS FOR AMERICAN TEGUMENTARY LEISHMANIOSIS DIAGNOSIS - Review

#### ABSTRACT

American Tegumentary Leishmaniasis (ATL) is caused by protozoa of the genus *Leishmania*, which affects the skin and mucosa of humans, wild and domestic animals and that remains endemic in areas of Latin America. Numerous techniques are serology and parasitological which may assist in the diagnosis of this disease, however, it is necessary association of other techniques to ensure an accurate and precise result. The aim of this paper was to describe the different diagnostic methods

and techniques used to detect antibodies and their interaction with soluble antigens, and identification of the parasite for culture medium and presence of nucleic acids. It was concluded that tests are needed parasitological or associated molecular serological tests for anti-*Leishmania* safe diagnosis of ATL.

**KEYWORDS:** diagnostic techniques, *Leishmania*, humans, dogs.

## INTRODUÇÃO

### ASPECTOS GERAIS DA LEISHMANIOSE

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é causada por protozoários do gênero *Leishmania*, que acomete a pele e mucosa, mas classificada como doença infecciosa e não contagiosa (CARDOSO *et al.*, 2009). Apresenta-se como zoonose amplamente distribuída em todas as regiões do território brasileiro (MADEIRA *et al.*, 2003), e representa problema em saúde pública no Brasil (UCHOA *et al.*, 2004). A LTA permanece endêmica em áreas da América Latina, e apresenta como agentes causadores, a *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Leishmania) mexicana*, *Leishmania (Viannia) panamensis* dentre outras espécies GONTIJO & CARVALHO (2003), cuja transmissão ocorre por meio da picada de flebotomíneos fêmeas infectadas, do gênero *Lutzomyia* (REY, 2001; FALQUETO *et al.*, 2003).

Em humanos a enfermidade apresenta formas inaparentes, lesões discretas de pele que podem evoluir espontaneamente para cura, ulcerações múltiplas, lesões de mucosas de curso lento e tratamento difícil (COUTINHO *et al.*, 1981). Os cães apresentam lesões ulceradas principalmente nas orelhas, focinho, bolsa escrotal que também podem cicatrizar espontaneamente (VELASQUEZ, MEMBRIVE & MEMBRIVE, 2006).

Para detecção direta do parasito, utilizam-se a pesquisa direta do protozoário por meio de visualização em lâmina a partir de esfregaços ou biópsias, também se realiza cultura de amostras clínicas em meio de cultivo para verificar o crescimento de formas promastigotas de *Leishmania* sp. (SAMPAIO *et al.*, 2009) além do teste de hipersensibilidade tardia, descritas como técnica amplamente utilizada em humanos que são realizadas em cães com resposta satisfatória (ALMEIDA *et al.*, 2012).

O diagnóstico de leishmaniose deve ser realizado pelo histórico do paciente, exame dermatológico e pela positividade de pelo menos, dois exames diagnósticos específicos. Deve ser realizada pesquisa de amastigotas em esfregaço, cultura para *Leishmania*, exame histopatológico das lesões e identificação de *Leishmania* por reação em cadeia de polimerase (PCR) e anticorpos monoclonais (SAMPAIO *et al.*, 2009).

Os métodos para detecção de anticorpos circulantes mais utilizados no diagnóstico da LTA são: imunofluorescência indireta (IFI), imunoenzimáticos como ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) e *immunoblotting*, além de testes de aglutinação direta e citometria de fluxo (TANNÚS *et al.*, 2007).

A LTA mostra redução da resposta humoral em cães e os níveis de anticorpos específicos podem não ser detectados por imunofluorescência indireta (IFI). Embora a sensibilidade do ELISA seja maior que da IFI, mas o melhor antígeno para o diagnóstico da LTA em cães ainda não está definido (RIBEIRO *et al.*, 2007).

O objetivo desta revisão é descrever os diferentes métodos de diagnóstico para LTA, bem como sua aplicação.

## DIAGNÓSTICOS DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA

### MÉTODO PARASITOLÓGICO DIRETO

BRASIL (2010) indica que na ocorrência de lesões típicas de leishmaniose, pode ser realizado o diagnóstico clínico e epidemiológico, especialmente se o paciente originar de áreas endêmicas ou mesmo que tenha permanecido em lugares onde há casos de leishmaniose. Entretanto, a confirmação do diagnóstico por métodos parasitológicos é fundamental, visto que há inúmeras doenças que fazem diagnóstico diferencial com a LTA. A sensibilidade da técnica poderá ser aumentada pela repetição do exame, cujos procedimentos podem ser por escarificação, biópsia com impressão por aposição e punção aspirativa (Figura 1).



**FIGURA 1.** LTA – Anestesia local na borda da lesão cutânea, com lidocaína a 2% para realização de biópsia e posterior cultivo para identificação do protozoário. Fonte: Adaptado de BRASIL, (2010).

ARRAES *et al.*, (2008) mostraram em trabalho com 130 indivíduos de família e/ou vizinhos de pessoas que tiveram leishmaniose tegumentar americana (LTA), todos eles moradores das proximidades da mata existente na localidade de Borba Gato, Maringá, PR, a ocorrência de casos sub-clínicos que apesar da detecção de reatividade cruzada com outras doenças, como a de Chagas, o teste parasitológico direto (microscopia direta) foi capaz de detectar 97% dos pacientes com resultados positivos.

FIGUEIREDO *et al.*, (2009) avaliaram dermatologicamente 220 animais, entre cães e gatos. Apenas um cão apresentou uma lesão ulcerada na região da bolsa escrotal cujo exame parasitológico evidenciou formas amastigotas de *Leishmania* spp. A detecção de caso autóctone proporcionou alerta para a instalação de um possível foco de leishmaniose tegumentar americana na localidade de Santa Rita de Cássia, município de Barra Mansa, Rio de Janeiro.

## CULTIVO PARA ISOLAMENTO DE LEISHMANIA

BRASIL (2010) preconiza o isolamento do parasito por meio de cultura é um método de confirmação do agente etiológico e permite a identificação da espécie de *Leishmania* envolvida no processo infeccioso. Os fragmentos obtidos da lesão cutânea por procedimento de biópsia da borda da úlcera devem ser inoculados em meios de cultivo NNN – Novy MacNeal, e Nicolle (Ágar sangue modificado) e LIT (Liver Infusion Triptose) ou Schneider acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB), e com cultivo entre 24°C e 26°C, com bom crescimento. Após cinco dias de cultivo já podem ser encontradas formas promastigotas do parasito, caso não haja ainda crescimento, a cultura deve ser mantida até um mês, com observação, antes da liberação do resultado negativo. Outro teste alternativo é a utilização de material obtido por punção das úlceras com o uso de tubo a vácuo já com meio de cultura.

SAMPAIO *et al.*, (2009) selecionaram pacientes atendidos no Hospital Universitário de Brasília de agosto de 2006 a junho de 2007, quando foram registrados 10 casos autóctones de LTA. Todos os pacientes com leishmaniose cutânea apresentaram lesão ulcerada, única, localizada preferencialmente nos membros superiores (seis), seguidos dos membros inferiores (dois), cabeça (um) e abdome (um). Dos 10 pacientes em estudo, seis deles chegaram ao hospital com até três meses de duração da lesão. De todos os pacientes, 50% tiveram culturas identificadas como *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

FIGUEIREDO *et al.*, (2009) encontraram um cão com lesão sugestiva de *Leishmania* da qual foi realizada biópsia visando o isolamento parasitário. Para este procedimento, o animal foi sedado por via intramuscular com acepromazina (0,1-0,2 mg/kg) e cetamina (10 mg/kg). Procederam a anestesia no local da biópsia com lidocaína 2%. Fragmentos foram obtidos do bordo da lesão e conservados em solução fisiológica contendo 1.200 UI de penicilina; 1.000 ug de estreptomicina e 100ug de 5-fluorocitosina por mililitro. Após 24 horas foram semeados em meio de cultura bifásico NNN (Novy, MacNeal, Nicolle) /Schneider suplementado com 10% de soro fetal bovino. Os tubos foram incubados a temperatura de 26°C-28°C e examinados semanalmente. Este exame possibilitou o isolamento de formas promastigotas, identificadas posteriormente, por isoenzimas como *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

## MÉTODO DE REAÇÃO DE HIPERSENSIBILIDADE

### INTRADERMORREAÇÃO DE MONTENEGRO (IDRM)

BRASIL (2010) conceitua que a IDRM é um teste fundamentado na reação de hipersensibilidade tardia (ou tipo IV) e sua interpretação deve ser cuidadosa, uma vez que seu resultado pode ser negativo nas primeiras semanas após surgimento da lesão cutânea em humanos, em contrapartida pode-se obter resultados falsos positivos quando esse teste é repetido com intervalo de poucas semanas.

TOLEDO *et al.*, (2001) utilizaram uma preparação do antígeno padronizado pelo Ministério da Saúde, que foi injetado por via intradérmica no antebraço humano. Foram realizadas leituras com 48h após injeção e consideraram as reações positivas na presença de endurecimento maior que 5mm no local da aplicação, identificando positividade em 88% dos casos, confirmando a validade deste teste como uma ferramenta útil de diagnóstico na leishmaniose cutânea em humanos.

PEDRAS *et al.*, (2003) realizaram metodologia similar a TOLEDO *et al.*, (2001), mas verificaram as leituras no local da injeção após 72h, e

foram consideradas positivas as reações cutâneas com tamanho igual ou maior que 5mm. Os autores obtiveram 100% de positividade em pacientes com leishmaniose mucosa (LC), 94,1% na leishmaniose mucocutânea (LMC) e em pacientes que apresentaram associação de LC e LMC, a positividade chegou a 97,2%.

#### INTRADERMORREAÇÃO (IDR)

Em estudos com cães, SANTOS *et al.*, (2005) obtiveram resultados inconsistentes, onde a positividade da intradermorreação (IDR) foi de 10,1%. Neste estudo foi utilizada a mesma concentração do antígeno padronizado utilizado no teste realizado em humanos (PEDRAS *et al.*, 2003; TOLEDO *et al.*, 2001). Foi aplicado 0,1mL por via intradérmica com 0,25µg de concentração de proteínas.

Entretanto, quando GENARO *et al.*, (1992) utilizaram uma maior concentração de proteínas (200µg em 0,1mL) na técnica descrita por MARZOCHI & BARBOSA-SANTOS (1988) os resultados obtidos experimentalmente, em animais com infecções recentes (3 meses de infecção) apresentaram positividade de 100%, com leitura após 72h de inoculação. Apesar de descreverem diferentes tamanhos do endurecimento no local de inoculação do antígeno, são necessários mais estudos críticos e esclarecimentos sobre os processos celulares imunológicos dos cães infectados com *L. (V.) braziliensis*, com antígeno padronizado para humanos.

Em cães naturalmente infectados pelo parasita, foram observadas pela técnica de IDR com antígeno padronizado para humanos, houve positivities de 36,5% relatados por MARZOCHI & BARBOSA-SANTOS (1988) e 30,7% por HERMETO *et al.*, (1994) em áreas endêmicas de LTA.

### EXAMES MOLECULARES

#### REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

O teste pela reação em cadeia da polimerase (PCR) é um procedimento rápido, com elevadas taxas de sensibilidade e especificidade, apresenta custo reduzido e pode ser realizado a partir de quantidades reduzidas de DNA ou RNA. Os protocolos de PCR envolvem o uso de enzimas como a DNA polimerase, responsável pela adição de desoxirribonucleotídeos durante a replicação, regiões específicas do ácido nucléico pesquisado (*primers*), desoxirribonucleotídeos (dNTPs), além de outros reagentes. A reação é realizada em termociclador que tem por função realizar ciclos, em diferentes temperaturas, que atuarão no processo de replicação *in vitro* (STEPHENS *et al.*, 2009).

A partir destas características, o uso de técnicas baseadas em PCR tem se tornado uma nova opção de diagnóstico. Um dos alvos para o diagnóstico é a amplificação do gene correspondente ao kDNA de *Leishmania* spp., que amplifica fragmentos de 100 a 150 pares de bases de regiões ditas conservadas, comum a todas as espécies de *Leishmania*, e regiões variáveis, que amplificam fragmentos variam de 700 a 1000 pares de bases de acordo com a espécie (SILVA *et al.*, 2012).

Até o momento, nenhum procedimento laboratorial é considerado como padrão-ouro para o diagnóstico de LTA. No entanto, a PCR pode se aproximar deste *status* devido as novas técnicas de extração de DNA. Pesquisas demonstram, para este teste, especificidade de 100% e sensibilidade global entre 92 e 98% (POURMOHAMMADI *et al.*, 2010).

Vale ressaltar que além da PCR, técnicas como eletroforese de enzimas, anticorpos monoclonais, ou outros métodos moleculares como o PCR multiplex,

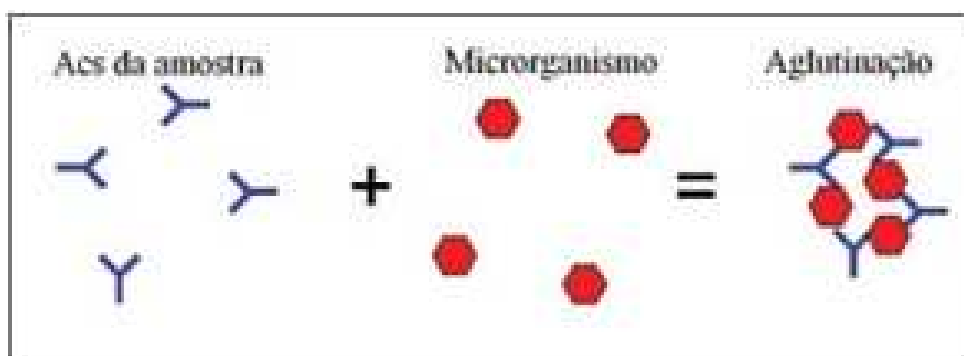
PCR-RFLP e RAPD podem ser utilizados. No entanto, a eletroforese de enzimas exige procedimentos como cultivo e isolamento do parasita, pois o uso de anticorpos monoclonais é limitado pelos índices de reação cruzada. Enquanto as variações da PCR requerem uma estrutura laboratorial sofisticada, reagentes de alto custo, e técnicas como PCR-RFLP apresenta pouca reprodutibilidade. Por outro lado, a PCR padrão apresenta elevada sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade (LIMA JÚNIOR *et al.*, 2009)

A técnica de PCR é indicada especialmente em pacientes suspeitos para LTA, mas que apresentam resultados negativos nos testes considerados convencionais para o diagnóstico etiológico. Todavia, esta metodologia não deve substituir outras formas de diagnóstico de leishmaniose, pois, mais parâmetros devem ser utilizados, como aspecto clínico e histórico epidemiológico dos pacientes (FAGUNDES *et al.*, 2010).

## TESTES SOROLÓGICOS

### TESTE DE AGLUTINAÇÃO DIRETA (TAD)

Anticorpos possuem características bivalentes, podendo se ligar de forma cruzada com antígenos particulados como, por exemplo, fungos, bactérias, protozoários ou eritrócitos estranhos, resultando em sua aglutinação (Figura 2). As diferentes classes de anticorpos diferem em sua habilidade para aglutinar o mesmo antígeno. Se um excesso de anticorpos for adicionado a uma suspensão de partículas antigênicas, cada partícula pode ser então recoberta por anticorpos em que a aglutinação é inibida. Esta falta de reatividade em altas concentrações de anticorpos é denominada prozona. Outra causa de formação de prozona é a presença de anticorpos que não conseguem causar aglutinação. A razão para sua falta de atividade aglutinante não é completamente entendida; uma possibilidade é a de que epítopos com os quais eles reagem se encontram profundamente na superfície da partícula (TIZARD, 2009).



**FIGURA 2.** Representação esquemática da reação de aglutinação direta. Fonte: Adaptado de TEVA *et al.*, 2009.

LONARDONI *et al.*, (2006) descreveram que por não necessitar de reagente espécie específica, o TAD pode ser útil na detecção da infecção de LTA em diferentes espécies animais. De acordo com a especificidade do TAD, se for inferior à encontrada na Imunofluorescência Indireta (IFI) utiliza-se o Teste de Aglutinação Direta (TAD) na triagem sorológica de cães ou na investigação de outros animais para os quais não há conjugados disponíveis.

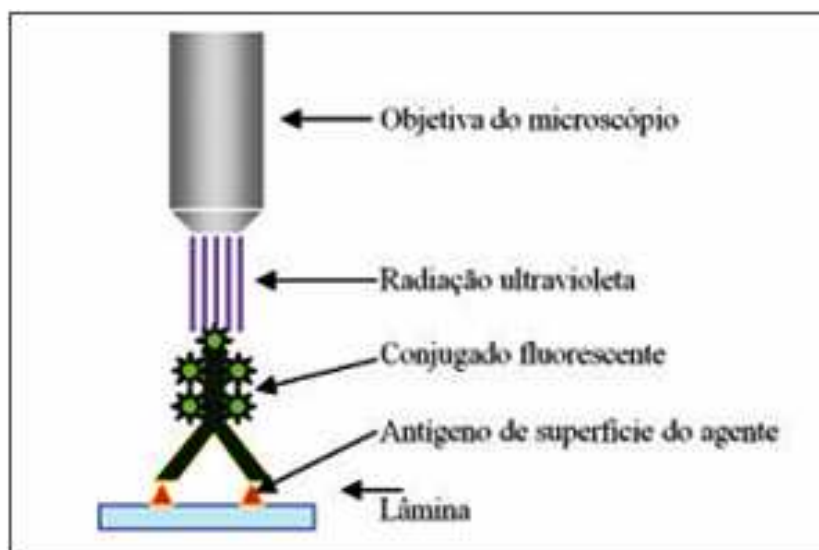
VOLTARELLI *et al.*, (2009) avaliaram animais selvagens pelo TAD e revelaram a presença de anticorpos anti-*Leishmania* variando em titulações de 1:10



a 1:2560, evidenciando que não é necessário um reagente espécie específico para a realização do teste. Obtiveram respostas positivas nas espécies de *Cerdocyon thous* (lobinho), *Lycalopex vetulus* (raposinha), *Cebus apella* (macaco prego), *Dasyprocta azarae* (cutia), *Procyon cancrivorus* (mão pelada) e *Nasua nasua* (quati). No entanto, a infecção pelo flagelado não foi detectado na cultura do sangue de nenhum desses animais, concluíram que os animais selvagens apresentam anticorpos anti-*Leishmania*, mas não foi possível o isolamento do protozoário por meio de cultivo.

### IMUNOFLOURESCÊNCIA INDIRETA (IFI)

Os testes indiretos são utilizados para mensurar anticorpos no soro, quando são mensurados, o antígeno é empregado em esfregaço que sofre incubação com soro suspeito de conter anticorpos contra o antígeno (Figura 3). O soro é lavado, deixando apenas os anticorpos específicos ligados ao antígeno e são visualizados por meio da incubação do esfregaço em antiglobulina marcada com isotiocianato de fluoresceína (FITC), o corante fluorescente. A quantidade de anticorpos no soro testado pode ser estimada ao se examinar diluições crescentes do soro em diferentes preparações de antígenos (TIZARD, 2009).



**FIGURA 3.** Esquema da reação de imunofluorescência direta.  
Fonte: Adaptado de TEVA *et al.*, 2009.

SILVEIRA *et al.*, (1996) na reação de imunofluorescência indireta realizada em pacientes humanos obtiveram positividade em 26,7% dos casos. Em pacientes sem história de LTA, 4,0%, foram positivos na IFI, estes foram então submetidos à IFI para Doença de Chagas e 22,73% tiveram títulos iguais ou superiores aos encontrados na IFI para LTA, revelando assim reações cruzadas com outros tripanossomatídeos.

Dentre pacientes humanos que apresentaram positividade em exames indicados para diagnóstico de LTA, 64,4% apresentaram título maior ou igual a 1: 40 na IFI (SILVEIRA *et al.*, 1999).

Para BARROSO-FREITAS *et al.*, (2009) a técnica IFI é comumente empregada como um método de rotina de diagnóstico para LTA no sudeste do Brasil, o teste usa como antígeno um parasita (*Leishmania major*-like) que pode ser diferente do agente etiológico que circula nesta região, que pode ser restrita a *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Em trabalho realizado com a utilização de

antígeno de *L. braziliensis* para determinação de anticorpos em paciente humanos por meio da IFI, foi observada especificidade de 86,2% e sensibilidade de 81,5%.

Em 48 animais de área endêmica estudados por MARZOCHI & BARBOSA-SANTOS (1988), foram observados 30 animais sem lesões clínicas, destes apenas dois animais (4,2%) apresentaram intradermorreação (IDR) negativa e positividade na IFI, e consideraram os animais positivos e assintomáticos para LTA.

Em pesquisa com anticorpos anti-*Leishmania*, em cães errantes de área endêmica, por meio de IFI, esta técnica apresentou sensibilidade de 78,9% e especificidade de 93,8% (título $\geq$ 40), em 37,0% tiveram títulos iguais ou superiores a 1:40. Dentre os animais que puderam ser acompanhados por intervalos de dois a 13 meses, verificaram que a titulação da IFI manteve-se igual ou diminuiu. Não foi observado desenvolvimento de lesões em nenhum dos animais. Todos os animais que obtiveram resultado na IFI superior a 1:40, foi realizada IFI para *Tripanosoma cruzi* e apenas um animal apresentou sorologia com títulos de anticorpos superiores aos anticorpos anti-*Leishmania*, o que sugere a presença da Doença de Chagas neste animal, embora essa possibilidade não tenha sido investigada (LONARDONI *et al.*, 2006).

A IFI apresentou 73,5% de sensibilidade e 85,7% de especificidade. Vinte e cinco (73,5%) soros de cães com LTA reagiram em diluições diferentes: 8,8% em título de 1:40, 55,9% variaram de 1:80 a 1:160 e 8,8% de 1:320. No grupo de cães com esporotricose, cinco amostras (14,3%) reagiram na diluição de 1:40. A esporotricose é semelhante a epidemiologia da LTA, características clínicas e achados histopatológicos e as sorologias é considerada a melhor maneira de realização de diagnóstico diferencial (RIBEIRO *et al.*, 2007).

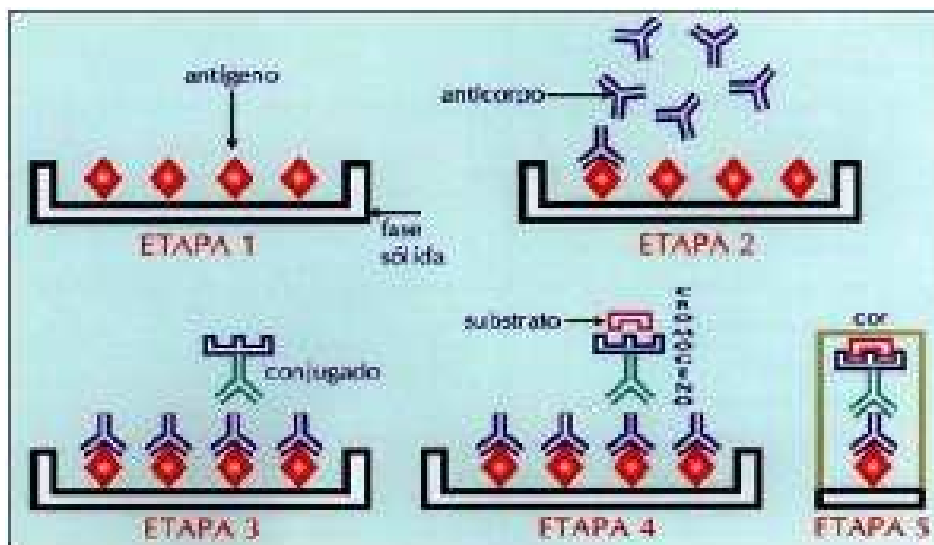
Para PITTNER *et al.*, (2009), animais sem lesões clínicas de LTA, que foram submetidos à IFI, apresentaram positividade de 14%, mesmo percentual também apresentado na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Apenas dois animais apresentaram positividade em ambos os testes, isso mostra a necessidade da utilização de mais de um método diagnóstico para resultado positivo conclusivo da doença.

A imunofluorescência não deve ser utilizada como critério isolado para diagnóstico de LTA, devido as suas reações cruzadas. Deve sempre estar associada a outras técnicas para detecção de anticorpos como IDR, ELISA ou técnicas parasitológicas (BRASIL, 2010).

#### ELISA INDIRETO (IMUNOENSAIO ENZIMÁTICO)

Esta técnica é utilizada com auxílio de enzimas para detectar e mensurar anticorpos específicos de *Leishmania (Viannia) braziliensis*, realizada em placas de poliestireno que apresentam micropoços. A interação antígeno-anticorpo é evidenciada pela ação de uma enzima (peroxidase ou fostase alcalina), conjugada com anti-anticorpo, a reação é revelada na presença de substrato para a enzima e um cromógeno, os mais usados são, a ortofenileno diamina (OPD) que produz cor amarelo ou a tetrametil benzidina (TMB) de cor azul. A reação final da ação da enzima deve ser lida em espectrofotômetro no comprimento de onda com variação de 405 a 492nm (Figura 4) (BEZERRA *et al.*, 1998; MADEIRA *et al.*, 2003; TIZARD, 2009).





**FIGURA 4.** Sequência das etapas do ELISA Indireto.  
Fonte: Adaptado de BEZERRA *et al.*, (1998).

Em pesquisa por perfil de subclasses de anticorpos contra *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* no diagnóstico e acompanhamento da leishmaniose mucosa, PEDRAS *et al.*, (2003) encontraram por meio da técnica ELISA, sensibilidade com IgG total para leishmaniose mucosa (LM) (94,7% com ambos os antígenos) e leishmaniose mucocutânea (LMC) (100% com ambos os antígenos), o que mostra que a detecção de subclasses de anticorpos IgG constituem alternativa valiosa para aumentar a eficiência do diagnóstico sorológico dessas doenças, visto que o tratamento da LM requer maior tempo de duração e concentração de drogas anti-*Leishmania*.

O teste com antígeno *L. (Viannia) braziliensis* no ELISA indireto para LTA, apresentou sensibilidade de 75,6% e especificidade de 100,0% em pacientes humanos com as formas cutâneas e mucosa da enfermidade, quando comparadas com antígeno *L. major-like*, mostrou a necessidade de antígenos específicos para diagnóstico da enfermidade em diferentes regiões do país (BARROSO-FREITAS *et al.*, 2009).

RIBEIRO *et al.*, (2007) realizaram ELISA para comparar os antígenos de *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Leishmania (Leishmania) chagasi* para detecção da imunoglobulina IgG e suas subclasses IgG1 e IgG2 para diagnóstico de LTA e sua diferenciação de esporotricose em cães. Foi observado que a detecção de IgG por meio do ELISA que utiliza antígeno de *L. (V.) braziliensis* apresenta um melhor desempenho de diagnóstico, pois apresentou sensibilidade e especificidade de 97,1%, e permitiu a discriminação entre casos de LTA e esporotricose em cães.

Em levantamento epidemiológico, CAMPOS *et al.*, (2011) comprovaram que em 100% dos animais com suspeita clínica, apresentavam lesões características de LTA em alguma região do corpo, o ELISA indireto foi válido como ferramenta de diagnóstico para animais sintomáticos e também evidenciou que 8,3% dos animais apresentaram sorologia positiva sem apresentarem sinais clínicos da doença, caracterizando-os como animais assintomáticos para LTA.

MADEIRA *et al.*, (2003) reportaram pouco conhecimento a cerca dos aspectos clínicos, parasitológicos e imunológicos do desenvolvimento da infecção pela *L. (V.) braziliensis* em cães, tornando-se necessário mais estudos para explicar esses aspectos e elucidar sobre técnicas para diagnóstico precoces em cães que

podem contribuir para explicação do papel dessa espécie animal na epidemiologia da LTA.

### *IMMUNOBLOTTING* ou *WESTERN BLOT (WB)*

O *immunoblotting* ou *Western Blot* é um ensaio imunoenzimático como ELISA, mas difere na fase sólida, pois é realizada sobre a superfície da membrana e não em uma placa de poliestireno. O teste é um valioso recurso na caracterização de frações antigênicas imunodominantes e identificação da reatividade específica dos anticorpos detectados por algum teste de triagem utilizando as múltiplas frações antigênicas como os testes confirmatórios ou suplementares. Para a detecção da interação antígeno-anticorpo é necessário inicialmente a obtenção da membrana com as frações da mistura antigênica, onde as proteínas são separadas conforme o seu tamanho, por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE). Depois de separadas, as frações são transferidas para a membrana de nitrocelulose onde permanecem inertes e depois utilizadas como suporte para a detecção da interação antígeno-anticorpo (BEZERRA *et al.*, 1998).

Pela análise de *Western Blot* é possível identificar antígenos de *Leishmania (Viannia) braziliensis* que apresentaram sensibilidade e especificidade superiores ao ELISA e ao IFI (sensibilidade de 90,9% e uma especificidade de 100%) conforme relataram BRITO *et al.*, (2000).

Segundo SZARGIKI *et al.*, (2009), em trabalho que comparou técnicas de IFI, ELISA e *Western Blot* no diagnóstico de LTA, foi possível concluir que *Western Blot* foi 100% sensível e provou ser útil na identificação de portadores assintomáticos, bem como para estabelecer diagnóstico diferencial entre Leishmaniose Cutânea e outras enfermidades como Doença de Chagas, Paracococidiodomicose e Toxoplasmose citadas como responsáveis por reações cruzadas. Neste estudo dois ou mais métodos foram aplicados em todos os casos dos grupos para confirmação da LTA e com estes resultados, puderam distinguir as doenças que cursam com os mesmos sinais clínicos da LTA, permitindo assim o tratamento precoce.

Além da detecção de baixos níveis de anticorpos, o *Western Blot* identifica animais que são portadores assintomáticos para LTA (ZANINI *et al.*, 2010), e servem também como exame de controle na confirmação da LTA por meio da técnica de ELISA indireto (CAMPOS *et al.*, 2011; ZANINI *et al.*, 2010).

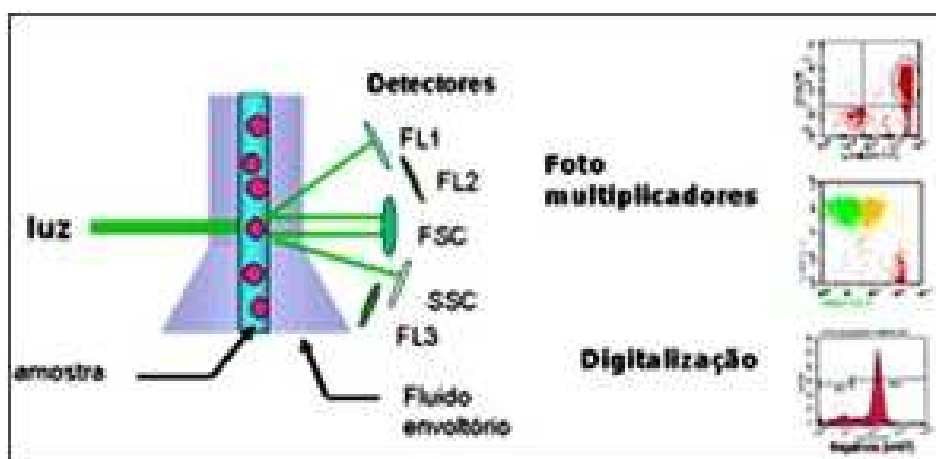
Para diagnóstico definitivo da leishmaniose é necessária associação de dois ou mais métodos de diagnóstico, preferencialmente o parasitológico, com identificação de formas amastigotas no esfregaço ou biópsias, também por formas promastigotas no cultivo "*in vitro*" das espécies (BRITO *et al.*, 2000), que deve estar associado a um teste sorológico e ainda assim ser complementado com diagnóstico molecular (BRASIL, 2010; PITTNER *et al.*, 2009).

### CITOMETRIA DE FLUXO

A citometria de fluxo é a técnica utilizada para contar, examinar e classificar partículas microscópicas, suspensas em fluxo e em meio líquido (TEVA *et al.*, 2009).

No citômetro de fluxo, por meio de bombeamento, a suspensão de células passa por um tubo estreito, seguindo umas as outras em fila. O feixe de *laser* é direcionado para o fluxo de células e os efeitos do feixe de luz sobre cada célula são observados, assim a dispersão do feixe em uma direção à frente, pode ser utilizada para mensurar o tamanho de uma célula. Quando na suspensão de células ocorre mistura do anticorpo monoclonal conjugado ao corante fluorescente,

este anticorpo conjugado irá se ligar apenas às células carregando o antígeno apropriado em sua superfície. Esta subpopulação pode ser caracterizada e contada por meio da utilização de anticorpos conjugados com diferentes cores de corantes fluorescentes. A expressão de múltiplos antígenos de superfície celular pode ser analisada simultaneamente. É possível utilizar o citômetro de fluxo para acompanhar mudanças sequenciais no imunofenótipo de populações mistas de células (Figura 5) (TIZARD, 2009).



**FIGURA 5.** Representação esquemática do citômetro de fluxo.  
Fonte: Adaptado de FLEURY, 2008.

A citometria de fluxo tem sido amplamente utilizada no estudo da expressão de antígenos das superfícies das células e também na produção de suas moléculas citoplasmáticas. Esta técnica é capaz de analisar vários parâmetros ao mesmo tempo, dentro de uma população heterogênea de células. Nos últimos anos, várias técnicas vêm sendo desenvolvidas para estudo das células produtoras de citocinas. A citometria de fluxo pode proporcionar aquisição rápida de grande número de células; além da determinação do percentual de células positivas, também identifica a subpopulação responsável para produção de citocinas por imunofenotipagem simultânea e de citocinas intracelulares, por diferentes colorações, além da medição de proteínas no citoplasma das células (SANTIAGO *et al.*, 2000).

ROCHA *et al.*, (2002), em estudo realizado com ênfase na padronização da técnica de citometria de fluxo, para identificação de infecção ativa por meio da detecção de anticorpos antipromastigotas vivas de *Leishmania (V.) braziliensis*, foi observado que tal metodologia apresenta alta sensibilidade e permite análise mais específica da resposta humoral. Este fato pode minimizar reações cruzadas, pois de forma seletiva, realizam avaliação de anticorpos dirigidos contra antígenos de membrana do parasita, o que impossibilita a reatividade com epítopos intracitoplasmáticos, potentes alvos de reatividade cruzada entre tripanosomatídeos.

BRELAZ *et al.*, (2012) reproduziram a caracterização da resposta imune de pacientes com LTA, após sofrerem estimulação com frações antigênicas de *Leishmania (V.) braziliensis*. Mostraram por meio de citometria de fluxo, a ocorrência de baixa modulação da resposta do tipo T helper 1 (Th1), que ocorre na fase inicial da doença e apresenta antígenos capazes de estimular resposta imune específica.

MACEDO *et al.*, (2012) pesquisaram a qualidade da resposta do tipo T helper 1 (Th1) estimulada após infecção por *Leishmania*. Utilizaram protocolo de citometria de fluxo multiparamétrica para avaliação de células T multifuncionais, induzidas por

extrato bruto de antígeno obtido a partir de promastigotas de *Leishmania braziliensis* (LbAg) e *Leishmania amazonensis* (LaAg) em células mononucleares do sangue periférico de pacientes com leishmaniose cutânea curadas. Foi possível observar que os resultados chamaram atenção pela importância do estudo da resposta Th1 quanto a sua qualidade, e não apenas quanto a sua magnitude. Desta maneira indicaram que neste tipo de avaliação, o melhor resultado foi obtido para auxiliar e compreender a complexa e diversa imunopatogênese da LTA.

### CONSIDERAÇÕES GERAIS

Esta revisão mostra a quantidade de métodos existentes e utilizados para testes sorológicos no diagnóstico de LTA, cultura, pesquisa direta e pesquisa de DNA do parasito.

Evidencia também a dificuldade em fornecer um diagnóstico preciso com uma única técnica.

Também demonstra a variação na sensibilidade e especificidade nos diferentes testes.

Observa-se que, algumas vezes o diagnóstico é presuntivo, com base em sinais ou sintomas da enfermidade juntamente com a epidemiologia, pois não pôde ser confirmado pela identificação do parasito.

Considera-se que não há somente um exame para diagnóstico, mas sim a associação de um teste sorológico em conjunto a pesquisa parasitológica.

Esclarece também que o Ministério da Saúde considera como padrão o teste ELISA como teste de triagem e a IFI como confirmatório, mas pela leitura atenta da revisão, parece não ser o suficiente.

### AGRADECIMENTOS

A FAPES, CAPES e UFES pelo apoio financeiro.

### REFERÊNCIAS

ALMEIDA, S.L.H.; PORFIRIO-PASSOS, G.; SILVA, P.M.A.; PASSOS, S.R.; MADUREIRA, A.P., ZANINI, M.S. DELAYED-TYPE HYPERSENSITIVITY REACTION WITH *Leishmania amazonensis* ANTIGENS TO MEASURE - CELL-MEDIATED IMMUNITY TO *Leishmania braziliensis* IN DOGS. **Anais II International Symposium on Leishmaniasis Vaccines**. Ouro Preto, Brasil, 01-06 Setembro, 2012.

ARRAES, S.M.A.A.; MARINI, M.T.; MARTELLO, D.; SILVEIRA, T.G.V.; LONARDONI, M.V.C.; NANNI, M.R. Investigação sorológica de casos subclínicos de leishmaniose tegumentar após um surto em uma localidade endêmica. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 41(2):205-208, mar-abr, 2008.

BARROSO-FREITAS, A.P.T.; PASSOS, S.R.L.; MOUTA-CONFORT, E.; MADEIRA, M. F.; SCHUBACH, A.O.; SANTOS, G.P.L.; NASCIMENTO, L.D.; MARZOCHI, M.C.A.; MARZOCHI, K.B.F. Accuracy of an ELISA and indirect immunofluorescence for the laboratory diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** v.103, n.4, p.383-389, 2009.

BEZERRA, A.C.S.; PROIETTI, A.B.FC.; LOUREIRO, P.; RIBINIK, M.L.R. **Triagem e diagnóstico sorológico em unidades hemoterápicas e laboratórios de saúde**

**pública.** Brasília: Ministério da Saúde, 1998. 54 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. 2. ed. atual. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2010.

BRELAZ, M.C.A.; De OLIVEIRA, A.P.; De ALMEIDA, A.F.; De ASSIS SOUZA, M.; MEDEIROS, Â.C.R.; De BRITO, M.E.F.; PEREIRA, V.R.A. Antigenic fractions of *Leishmania (Viannia) braziliensis*: the immune response characterization of patients at the initial phase of disease. **Parasite Immunology**, v.34, p.236–239, 2012.

BRITO, M.E.F.; MENDONÇA, M.G.; GOMES, Y.M.; JARDIM, M.L.; ABATH, F.G.C. Identification of potentially diagnostic *Leishmania braziliensis* antigens in human cutaneous leishmaniasis by immunoblot analysis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.7, n.2, p.318-321, 2000.

CAMPOS, D.R.; PALACIO, B.B.; OLIVEIRA, L.C.; ALMEIDA, S.L.H.; BRIDI, H.C.L.; PORFIRIO-PASSOS, G.; ZANINI, M.S. Utilização da técnica de ELISA para diagnóstico de Leishmaniose Tegumentar Americana em cães assintomáticos. **Anais do 38º Conbravet, Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, Florianópolis, Brasil, 01-04 Novembro, 2011.**

COUTINHO, S.G.; MARZOCHI, M.C.A.; SOUZA, W.J.S.; AMENDOEIRA, M.R.R. Leishmaniose tegumentar americana. **Jornal Brasileiro de Medicina**, v.41, p.104-118, 1981.

CARDOSO, P.G. SOUZA, M.B.; SANAVRIA, A.; MEIRA, A.M.; MERÓDIO, J.C. Flebotomos de áreas com ocorrências de casos humanos de leishmaniose tegumentar americana no Município de Seropédica, Estado do Rio de Janeiro, **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.42 p.146-150, 2009.

FAGUNDES, A.; SCHUBACH, A.; PAULA, C.C.; BOGIO, A.; ANTONIO, L.F.; SCHIAVONI, P.B.; MONTEIRO, V.S.; MADEIRA, M.F.; QUINTELLA, L.P.; VALETE-ROSALINO, C.M.; FERREIRA E VASCONCELLOS, E.C.; COUTINHO, R.B.G.A.; PACHECO, R.S.; MARZOCHI, M.C.A.; MARZOCHI, K.B.F. Avaliação da reação em cadeia da polimerase no diagnóstico de rotina da leishmaniose tegumentar em um centro de referência. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.105 n.1 Rio de Janeiro, fev, 2010.

FALQUETO, A.; SESSA, P.A.; FERREIRA, A.L.; VIEIRA, V.P.; SANTOS, C.B.; VAREJÃO, J.B.M.; CUPOLILLO, E.; PORROZZI, R.; CARVALHO-PAES, L.E.; GRIMALDI JR, G. Epidemiological and Clinical Features of *Leishmania (Viannia) braziliensis* American Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis in the State of Espírito Santo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, n.8, p.1003-1010, 2003.

FIGUEIREDO, F.B.; BONNA, I.C.F.; NASCIMENTO, L.D.; COSTA, T.; BAPTISTA, C.; PACHECO, T.M.V.; AMENDOEIRA, M.R.R.; MADEIRA, M.F. Avaliação sorológica para detecção de anticorpos anti-*Leishmania* em cães e gatos no bairro

de Santa Rita de Cássia, Município de Barra Mansa, Estado do Rio de Janeiro **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.42, n.2, p.141-145, mar-abr, 2009.

FLEURY. Medicina e Saúde. **Imunofenotipagem das neoplasias hematológicas**, última atualização em 05/11/2008, disponível em <http://www.fleury.com.br/Medicos/SaudeEmDia/ManualHematologia/pages/ImunofenotipagemdasNeoplasiasHematol%C3%B3gicas.aspx>, último acesso em 20/11/2011.

GONTIJO, B. & CARVALHO, M.L.R. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** v.36 n.1 p.71-80, 2003.

GENARO, O.; RASO, P.; COSTA, C.A.; CARVALHO, M.G.; AMARAL, F.; BOTELHO, A.C.C.; WILLIAMS, P.; DIAS, M.; MAYRINK, W. Montenegro skin tests in dogs experimentally infected with *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.87, n.1, p.163-164, 1992.

HERMETO, M.V.; VIEIRA-DIAS, D.; GENARO, O.; ROTONDO-SILVA, A.; COSTA, C.A.; TOLEDO, V.P.C.P.; MICHALICK, M.S.M.; WILLIAMS, P.; DIAS, M.; MAYRINK, W. et al. Outbreak of cutaneous leishmaniasis in the Rio Doce Valley, Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro v.89, n.4, p.519-521, 1994.

LIMA JUNIOR, M.S.C.; ANDREOTTI, R.; DORVAL, M.E.M.C.; OSHIRO, E.T.; OLIVEIRA, A.G.; MATOS, M.F.C. Identification of *Leishmania* species isolated in human cases in Mato Grosso do Sul, by means of the polymerase chain reaction. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.42, n.3, p.303-308, mai-jun, 2009.

LONARDONI, M.V.C.; BERNAL, F.H.Z. SILVEIRA, T.G.V.; ANTUNES, V.; TEODORO, U.; JORGE, F.A.; ZANZARINI, P.D. Comparação entre imunofluorescência indireta e aglutinação direta para o diagnóstico sorológico da leishmaniose tegumentar americana em cães errantes. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.58, n.6, p.1001-1008, 2006.

MACEDO, A.B.; SÁNCHEZ-ARCILA, J.C.; SCHUBACH, A.O.; MENDONÇA, S.C.; MARINS-DOS-SANTOS, A.; MADEIRA, M.F.; GAGINI, T.; PIMENTEL, M.I.; DeLUCA, P.M. Multifunctional CD4<sup>+</sup> T cells in patients with American cutaneous leishmaniasis. **Clinical & Experimental Immunology**, Mar; v.167, n.3, p.505-13, 2012.

MADEIRA, M.F.; UCHÔA, C.M.A, LEAL, C.A. SILVA, R.M.M.; DUARTE, R.; MAGALHÃES, C.M.; SERRA, C.M.B. *Leishmania (Viannia) braziliensis* em cães naturalmente infectados. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** v.36, n.5, p. 551-555, 2003.

MARZOCHI, M.C.A.; BARBOSA-SANTOS, E.G.O. Evaluation of a skin test on the canine mucocutaneous leishmaniasis diagnosis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 83, n. 3, 1988.



PEDRAS, M.J.; ORSINIA, M., CASTRO, M.; PASSOS, V.M.A.; RABELLO, A. Antibody subclass profile against *Leishmania braziliensis* and *Leishmania amazonensis* in the diagnosis and follow-up of mucosal leishmaniasis **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease** v.47, n.3, p. 477-485, 2003.

PITTNER, E.; VOLTARELLI, E.; PERLES, T.F.; ARRAES, S.M.A.A., SILVEIRA, T.G.V.; LONARDONI, M.V.C. Ocorrência de leishmaniose tegumentar em cães de área endêmica no Estado do Paraná. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.6, n.3, p.561-565, 2009.

POURMOHAMMADI, B.; MOTAZEDIAN, M.H.; HATAM, G.R.; KALANTARI, M.; HABIBI, P.; SARKARI, B. Comparison of Three Methods for Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis. **Iranian Journal of Parasitology**, v.5, n.4, p.1-8, 2010.

REY, L. **Parasitologia**: parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001, 856 p.

RIBEIRO, F.C.; SCHUBACH, A.O.; MOUTA-CONFORT, E.; SCHUBACH, T.M.P.; MADEIRA, M.F.; MARZOCHI, M.C.A. Use of ELISA employing *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* antigens for the detection of IgG and IgG1 and IgG2 subclasses in the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis in dogs. **Veterinary Parasitology** v.148, n. 3-4, p 200-206, 2007.

ROCHA, R.D.R.; GONTIJO, C.M.F.; ELÓI-SANTOS, S.M.; CARVALHO, A.T.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; MARQUES, M.J.; GENARO, O.; MAYRINK, W.; MARTINS-FILHO, O.A. Anticorpos antipromastigotas vivas de ao *Leishmania (Viannia) braziliensis*, detectados pela citometria de fluxo para infecção ativa na leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** v.35, n.6, p.551-562, 2002.

SAMPAIO, R.N.R.; GONÇALVES, M.C.; LEITE, V.A.; FRANÇA, B.V.; SANTOS, G.; CARVALHO, M.S.L.; TAUIL, P.L. Estudo da transmissão da leishmaniose tegumentar americana no Distrito Federal. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.42, n.6, p.686-690, nov-dez, 2009.

SANTIAGO, M.A.; DELUCA, P.M.; BERTHO, Á.L.; AZEREDO-COUTINHO, R.B.G.; COUTINHO, S.G. Detection of Intracytoplasmic Cytokines by Flow Cytometry. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** v.95, n.3, p.401-402, 2000.

SANTOS, G.P.L.; SANAVRIA, A.; MARZOCHI, M.C.A.; SANTOS, E.G.O.B.; SILVA, V.L.; PACHECO, R.S.; MOUTA-CONFORT, E.; ESPÍNDOLA, C.B.; SOUZA, M.B.; PONTE, C.S.; CONCEIÇÃO, N.F.; ANDRADE, M.V. Prevalência da infecção canina em áreas endêmicas de leishmaniose tegumentar americana, do município de Paracambi, Estado do Rio de Janeiro, no período entre 1992 e 1993. **Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.38, p.161-166, 2005

SILVA, J.G.L.; SILVA, T.M.; PELOSO, E.F.; MACHADO-COELHO, G.L.L.; MAYRINK, W.; ARIOSIA, M.C.F.; SILVA, P.M.F.; MARQUES, M.J. Comparison among three Polymerase Chain Reaction assays on detection of DNA from *Leishmania* in biological samples from patients with american cutaneous leishmaniasis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, MAR-APR; v.45, n.2, p.257-9, 2012.

SILVEIRA, T.G.V.; TEODORO, U.; LONARDONI, M.V.C.; GUILHERME, A.L.F.; TOLEDO, M.J.O.; RAMOS, M.; ARRAES, S.M.A.A.; BERTOLINI, D.A.; SPINOZA, R.P.; BARBOSA, O.C. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose tegumentar em área endêmica do Estado do Paraná, Brasil. **Caderno de Saúde Pública** v.12, n.2, p.141-147, 1996.

SILVEIRA, T.G.V.; ARRAES, S.M.A.A.; BERTOLINI, D.A.; TEODORO, U.; LONARDONI, M.V.C.; ROBERTO, A.C.B.S.; RAMOS, M.; SOBRINHO, A.N.; ISHIKAWA, E.; SHAW, J. Observações sobre o diagnóstico laboratorial e a epidemiologia da leishmaniose tegumentar no Estado do Paraná, sul do Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** v.32, n.4, p.413-423, 1999.

STEPHENS, P.R.S.; OLIVEIRA, M.B.S.C.; RIBEIRO, F.C.; CARNEIRO, L.A.D. Capítulo 2 Virologia. In: Molinaro, E.M.; Caputo, L.F.G.; Amendoeira, M.R.R. **Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde**, volume 4, Rio de Janeiro, EPSJV; IOC, 2009.

SZARGIKI, R.; CASTRO, E. A.; LUZ, E.; KOWALTHUK, W.; MACHADO, Â.M.; THOMAZ-SOCCOL, V. Comparison of Serological and Parasitological Methods for Cutaneous Leishmaniasis Diagnosis in the State of Paraná, Brazil **The Brazilian Journal of Infectious Diseases** v.13, n.1, p.147-52, 2009.

TANNÚS, M. M.; RODRIGUES, F.H.; MASTRANTONIO, E.C.; ROCHA, F.A.; PEREIRA, C.G.; SILVA, A.L.N.; SOUZA, M.A. Reatividade sorológica de cães frente a antígenos de três espécies de *Leishmania*. **Horizonte Científico**, v. 1, n.1, p. 1-28, 2007.

TEVA, A.; FERNANDEZ, J.C.C.; SILVA, V.L. Capítulo 1 Imunologia In: Molinaro, E.M.; Caputo, L.F.G.; Amendoeira, M.R.R. **Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde**, volume 4, Rio de Janeiro, EPSJV; IOC, 2009.

TIZARD, I.R. **Imunologia Veterinária**, 8ª edição, Elsevier, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009, p.587.

TOLEDO, V.P.C.P.; MAYRINK, W.; GOLLOB, K.J. et al. Immunochemotherapy in American cutaneous leishmaniasis: immunological aspects before and after treatment. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 96, n. 1, p.89-98, 2001.

UCHOA, C.M.A.; SERRA, C.M.B.; MAGALHÃES, C.M.; OLIVEIRA, M.A.P.; COSTA, C.A.; GENARO, O.; PINTO, J.A.; AFONSO, L.C.C. Educação em saúde: ensinando sobre a leishmaniose tegumentar americana. **Caderno de Saúde Pública** v.20, n.4,

p. 935-941, 2004.

VELASQUEZ, L.G.; MEMBRIVE, N.; MEMBRIVE, U.; RODRIGUES, G.; REIS, N.; LONARDONI, M.V.C.; TEODORO, U.; TESSMANN, I.P.B.; SILVEIRA, T.G.V. PCR in the investigation of canine American tegumentary leishmaniasis in northwestern Paraná State, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.22, n.3, p.571-578, 2006.

VOLTARELLI, E.M.; ARRAES, S.M.A.A.; PERLES, T.F.; LONARDONI, M.V.C.; TEODORO, U.; SILVEIRA, T.G.V. Serological survey for *Leishmania* sp. Infection in wild animals from the municipality of Maringá, Paraná State, Brazil. **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Disease** v.15, n.4, p.732-744, 2009.

ZANINI, M.S.; VIANNA, K.F.; REIS, A.B.; CAMPOS, D.R.; MUSSI, J.M.S.; ZANINI, S.; LEMOS, E.M. *Leishmania (Viannia) braziliensis*: Immunoblotting analysis for the detection of IgG subclasses in the diagnosis of symptomatic and asymptomatic dogs. **Veterinary Parasitology**, n.173, p.143-146, 2010.