



TESTE RÁPIDO IMUNOCROMATOGRÁFICO NO DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA NO MUNICÍPIO DE BOM JESUS, PIAUÍ

Richard Atila de Sousa¹, Naira Moura Alves¹, Sandra Geisa Costa Albano¹, George Magno Sousa do Rêgo¹, Luciana Pereira Machado²

¹Discentes do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Piauí, Campus Prof.^a Cinobelina Elvas, Bom Jesus, Brasil
(riatsovet@hotmail.com)

²Professora Doutora do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Piauí, Campus Prof.^a Cinobelina Elvas, Bom Jesus, Brasil

Recebido em: 30/09/2014 – Aprovado em: 15/11/2014 – Publicado em: 01/12/2014

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo comparar o teste rápido de imunocromatografia (TRI) para diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC) com o exame parasitológico, para verificar a sua eficiência no diagnóstico da doença. Participaram do estudo dez cães, com suspeita clínica para a doença, oriundos do município de Bom Jesus/PI, área endêmica para LVC. Foram colhidos 5 mL de sangue venoso, em tubos contendo anticoagulante EDTA, para a detecção de anticorpos anti-*Leishmania chagasi* pelo teste rápido imunocromatográfico (DPP® LVC Bio-Manguinhos). Foi realizado o exame parasitológico direto para pesquisa de formas amastigotas do parasita através da punção de linfonodos, medula óssea e *imprint* de lesões de pele, foi realizado *imprint* de baço em um animal necropsiado. Nove animais tiveram resultado positivo no Teste Rápido DPP®, destes, oito foram confirmados no exame parasitológico, sendo que em um animal foi inicialmente negativo no exame parasitológico de medula, linfonodo e *imprint* de pele e em nova coleta após 30 dias, observou-se a presença do parasita nas amostras das lesões de pele. Foi possível constatar a eficácia do Teste Rápido DPP® em cães sintomáticos, uma vez que se confirmou o diagnóstico parasitológico de LVC pela visualização de formas amastigotas do parasita em 88,9% dos animais positivos no teste rápido, demonstrado que este pode ser um bom teste de triagem em áreas endêmicas.

PALAVRAS-CHAVE: calazar, *Leishmania chagasi*, TRDPP

IMMUNOCHROMATOGRAPHIC RAPID TEST DIAGNOSTIC ON CANINE VISCERAL LEISHMANIASIS IN BOM JESUS, PIAUÍ

ABSTRACT

This study aimed to compare the rapid immunochromatography test (TRI) for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis (LVC) with parasitological examination to verify its efficiency in the diagnosis of disease. Participated the study, ten dogs with clinical suspicion for the disease arising in Bom Jesus/PI endemic area for LVC. Venous blood (5mL) were collected into tubes containing EDTA anticoagulant to detection of anti-*Leishmania chagasi* by rapid immunochromatographic test (DPP® Bio-Manguinhos LVC). The cytological examination for parasite amastigote forms through the puncture of lymphnodes, bone marrow and *imprint* of skin lesions was

done, and *imprint* of spleen necropsied animal. Nine animals tested positive Rapid Test DPP®, of these, eight were confirmed parasitological examination, and in one animal was initially negative in parasitological examination of bone marrow, lymphnodes and skin and *imprint* new collection after 30 days, there was the presence of the parasite in samples of skin lesions. Quick Test DPP® was effective in symptomatic dogs, LVC was confirmed by parasitological diagnosis, parasite amastigote forms was viewed on 88.9% of rapid test positive animals, demonstrated that this can be a good screening test in endemic areas.

KEYWORDS: calazar, *Leishmania chagasi*, TRDPP

INTRODUÇÃO

Causada por um protozoário pertencente a ordem Kinetoplastida e gênero *Leishmania*, a Leishmaniose Visceral (LV) é uma enfermidade zoonótica endêmica que se distribui desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina englobando também o Brasil. No meio urbano é conhecida a íntima relação do cão no ciclo epidemiológico da LV, que no novo mundo tem como seu agente a *Leishmania infantum*, sendo transmitido principalmente a humanos e cães através do repasto sanguíneo das fêmeas do inseto vetor flebotomíneo o *Lutzomyia (L.) longipalpis* (ASSIS et al., 2010; SILVA et al., 2014).

A LV se faz uma ameaça para One Health, e é uma prova da urgente necessidade da união entre medicina humana e veterinária para instituir um programa que seja eficaz no controle e erradicação desta patologia (DAY, 2011). Esta doença se tornou uma endemia em 60 países, isto se atribui a negligência das políticas públicas, resultando em mais de 500.000 casos anualmente, sendo que 90% destes são provenientes de apenas seis países: Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Nepal e Sudão (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011).

MARTINS & LIMA (2013) afirmam que a leishmaniose tem se propagado de forma assustadora devido as interferências nos ecossistemas e por não ser uma doença prioritária tanto no setor público como no setor privado. No Brasil grande parcela dos casos situa-se na região Nordeste, contudo, com o grande avanço urbano desta doença, já está presente nas cinco regiões, com relatos inclusive no sul dos país, mais precisamente no Paraná e Rio Grande Sul (QUEIROZ-JR, 2011; MAIA, 2012). Nos últimos dez anos a média anual de LV foi de 3.379 (BRASIL, 2010). O estado do Piauí é considerado área endêmica para LV desde 1934 (SOARES et al., 2011).

A Leishmaniose Visceral Canina (LVC) é caracterizada por ser uma enfermidade crônica, que tem a capacidade de afetar tanto tecido cutâneo quanto as vísceras, nestas duas formas da doença há o parasitismo de células do sistema fagocítico mononuclear. O protozoário é obrigatoriamente um hospedeiro intracelular, afetando as células mononucleares das mucosas ou vísceras, derme, fígado, baço e medula óssea. Os animais acometidos podem ou não apresentar sintomatologia, porém, quando presente comumente é encontrado mais de um sinal clínico (QUINNELL et al., 2009; FREITAS et al., 2012). As alterações clínicas mais comuns são onicogrifose, hepatomegalia e esplenomegalia, apatia, lesões de pele, linfadenopatia, emagrecimento e alterações oftálmicas (SOARES et al., 2011; FREITAS et al., 2012; MAGALHÃES et al., 2012).

O diagnóstico conclusivo é dado pela observação direta do parasita no método parasitológico, porém trata-se de um método minucioso e depende muito da prática do observador em reconhecer o parasita. A pesquisa de parasitos pode ser

feita em lâminas confeccionadas com material obtido por punção aspirativa da medula óssea, linfonodos ou *imprint* de lesões de pele, sendo este o método menos invasivo e também eficiente. Muito raramente, são realizados esfregaços de punção de baço ou ainda através de biópsia cutânea (FAYET, 1999; QUEIROZ et al., 2009; SANTOS et al., 2010). O formato das amastigotas da *Leishmania sp.* podem variar de esférico a ovóide, e medir cerca de 2 a 6 µm de diâmetro, contém núcleo arredondado e cinetoplasto (IKEDA-GARCIA & FEITOSA, 2006).

Proteínas recombinantes como a rk39 e rk26 tem sido utilizada como antígenos para desenvolver vários testes rápidos imunocromatográficos comerciais, como também a utilização de proteínas A e G extraídas de bactérias para serem utilizadas como reagentes marcadores destes testes (QUEIROZ-JR, 2011). Na nota técnica 01/2011, publicada pelo ministério da saúde, ficou estabelecido atualmente a substituição do antigo protocolo de diagnóstico da LVC pelo teste rápido imunocromatográfico (TRI) desenvolvido pela Biomanguinhos (DPPTM®), devendo este ser o teste de escolha para triagem dos animais e o de ELISA como teste confirmatório (BRASIL, 2011).

Existem poucos estudos sobre a utilização do TRI na prática e controvérsias quanto a sua eficiência como método de triagem. Foi reportada elevada sensibilidade e especificidade no diagnóstico de cães sintomáticos em comparação ao teste de imunofluorescência indireta (IFI) (QUEIROZ-JR, 2011) e em relação à IFI e parasitológico direto (De SANTIS et al., 2013). Porém recentemente um estudo envolvendo 411 cães indicou fraca concordância do TRI com o exame parasitológico, realizado por cultivo celular de aspirado de medula (CARVALHO et al., 2014). Com isso, o objetivo deste estudo foi comparar o teste rápido de imunocromatografia para diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC) com o exame parasitológico em cães com suspeita clínica para a doença e oriundos de área endêmica.

MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi realizado sob aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal – CCEA de parecer n.º 43/09 da Universidade Federal do Piauí. O estudo foi conduzido no município de Bom Jesus/PI, área endêmica para LVC, situado a 09º04'28" de latitude sul e 44º21'31" de longitude oeste, a 277 metros de altitude. Participaram do estudo dez cães adultos, 5 machos e 5 fêmeas, com um ou mais sinais clínicos compatíveis com a doença, como lesões de pele, linfadenomegalia, onicogribose, alopecia e caquexia.

Foram colhidos 5 mL de sangue venoso por venopunção jugular, em tubos a vácuo contendo anticoagulante EDTA (ácido etilenodiaminotetracético), no qual foi realizado o teste rápido imunocromatográfico, para detecção de anticorpos anti-*Leishmania chagasi* (DPP[®] Leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil).

Conforme as orientações do fabricante o teste DPP[®] foi realizado adicionando 5 µL de sangue total ao poço 1 (amostra + tampão), e em seguida foram adicionadas 2 gotas do tampão no mesmo poço. Após 5 minutos as duas linhas azuis, controle (C) e teste (T), desapareceram. A seguir colocou-se 4 gotas do tampão no poço 2 (tampão), aguardando de 10 a 15 minutos, após esta etapa foi realizada a leitura dos resultados (Figura 1).

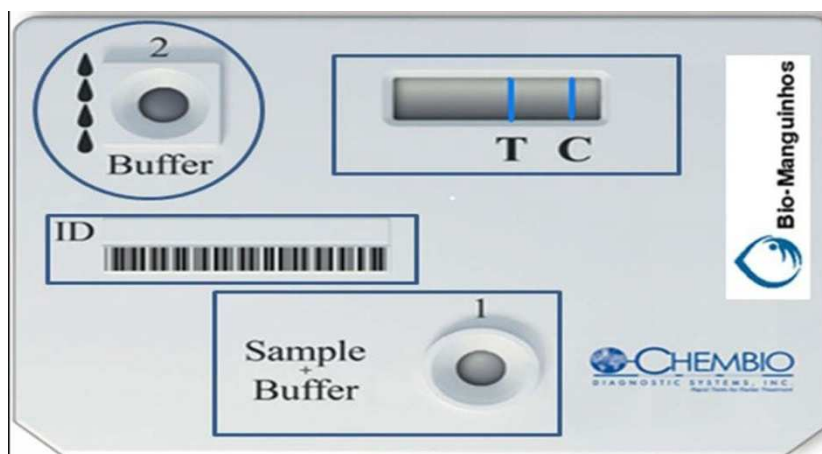


FIGURA 1 – Teste Rápido Imunocromatográfico Dual Path Plataforma (DPP®).
Fonte: QUEIROZ-JR, 2011.

Foi também realizado o exame parasitológico direto para pesquisa de formas amastigotas do parasita, preferencialmente através da punção aspirativa de linfonodos e/ou medula óssea, e nos animais com lesões ulcerativas de pele também foi realizado o *imprint* da lesão. As punções aspirativas dos linfonodos foram realizadas com uso de agulha hipodérmica (0,55X19mm), dando preferência ao linfonodo poplíteo. A punção aspirativa da medula óssea foi preferencialmente no osso esterno, utilizando-se agulhas de 1,2x40mm acopladas às seringas descartáveis de 20 mL, preenchidas com 0,5 mL de solução de EDTA a 3%, preparada em solução fisiológica. O material obtido foi imediatamente transferido para uma placa de Petri para melhor visualização das espículas medulares, que com auxílio de um tubo capilar foram capturadas e transportadas para uma lâmina histológica para confecção de *squash*. O *imprint* de pele foi realizado nos animais que apresentavam lesão ulcerativa de pele.

Após a punção, de um ou mais destes locais, foram confeccionadas lâminas e coradas com corante rápido do tipo Romanowsky (Panótico Rápido - LABORCLIN LTDA, Pinhais, Brasil). Em seguida realizou-se a leitura ao microscópio óptico com aumento de 1000x. Em dois animais reativos no DPP® o proprietário optou pela eutanásia, e após a necropsia foi realizado *imprint* do baço de um desses animais.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nove animais tiveram resultado positivo no Teste Rápido DPP®, e destes, oito foram confirmados no exame parasitológico (Tabela 1). Demonstrando de modo prático que este TRI pode ser utilizado para a confirmação do diagnóstico clínico em animais com sintomatologia característica, como sugeriam QUEIROZ-JR (2011) e De SANTIS et al., (2013).

GRIMALDI et al. (2012) afirmam que o teste rápido (DPP®) tem uma maior sensibilidade (98%) em animais sintomáticos quando comparado aos animais assintomáticos (47%). O presente estudo foi realizado com animais sintomáticos e em 88,9% dos animais reagentes houve a confirmação no exame parasitológico (Figura 2).

TABELA 1 – Resultados teste rápido de imunocromatografia (DPP®) e da pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania sp.* na punção aspirativa de medula óssea (MO), linfonodo (LF), *imprint* de lesões de pele e de baço, em 10 cães com suspeitas de leishmaniose visceral oriundos do município de Bom Jesus-PI

Animal	DPP®	Parasitológico	
		Positivo	Negativo
01	+	Pele	MO, LF
02	+	Baço*	LF
03	+	MO, LF	---
04	+	LF, Pele	---
05	-	---	---
06	+	---	LF
07	+	MO, LF	---
08	+	LF	---
09	+	LF	---
10	+	LF	MO

* *imprint* feito de órgão coletado durante necropsia

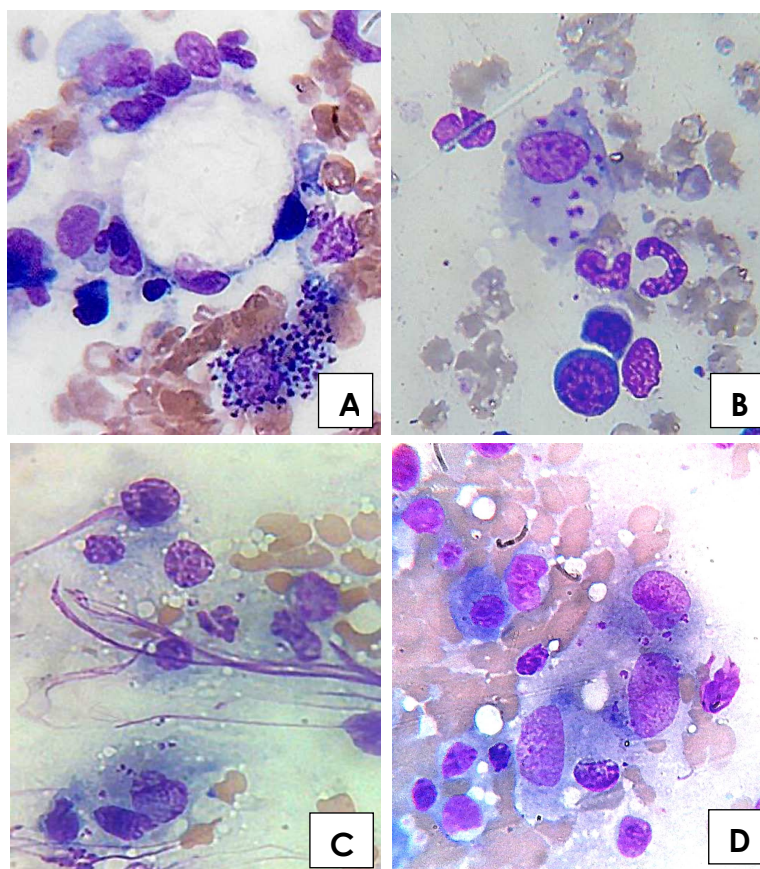


FIGURA 2 – Fotomicrografia de formas amastigotas de *Leishmania sp.* no exame parasitológico no aumento de 1000x. **A)** Linfonodo; **B)** Medula óssea; **C)** Pele e **D)** Baço. Fonte: Arquivo Pessoal, 2014.

Apenas um dos animais com suspeita clínica (Animal 05) foi negativo TRI e neste não foi realizado exame parasitológico. O proprietário não retornou para o exame porque o animal apresentava apenas apatia e linfadenopatia e teve melhora clínica após tratamento para erliquiose, que também era uma das suspeitas iniciais, provavelmente a suspeita inicial de LVC estava incorreta. Os sinais clínicos da LVC são inespecíficos e podem ser observados em várias outras doenças (De SANTIS et al., 2013). Uma vantagem reportada para o TRI é sua alta especificidade, evitando resultados falso positivo, QUEIROZ-JR (2011) observou em seu estudo especificidade de 100%, e refere que os graus de sensibilidade de testes imunocromatográficos, variam em cães de 72-97,06% e especificidade de 61-100% (QUEIROZ-JR, 2011).

Alguns animais reagentes no TRI tiveram positividade variável no exame parasitológico dependendo do local de coleta. Como os animais 01, 02 e 10. No animal 06 foi observada positividade no TRI e não observou-se a presença do parasita na punção aspirativa do linfonodo, o animal apresentava sintomatologia evidente, porém não foi possível realizar um novo exame parasitológico pois o proprietário do animal não retornou para a mesma. Segundo PALTRINIERI et al. (2010) a parasitemia encontrada nos exames parasitológicos é muito variável, e não possuem correlação com a intensidade da sintomatologia.

O animal 01 foi inicialmente negativo no exame parasitológico de medula, linfonodo e *imprint* de pele e em nova coleta após 30 dias, observou-se a presença do parasita nas amostras das lesões de pele. Em cães com lesões ulcerativas de pele a pesquisa dos parasitas nas lesões deve ser a primeira opção para o diagnóstico parasitológico direto, por ser menos invasiva e bastante eficiente, combinando-se o *imprint* e a citologia aspirativa com agulha fina da borda da lesão (SANTOS et al., 2010).

Os animais 02 e 03 também foram negativos no primeiro exame parasitológico de linfonodo e em uma nova coleta após nove dias o parasita foi observado em amostra de punção aspirativa da medula óssea e linfonodo do animal 3. No animal 02 apenas em amostra de *imprint* do baço realizada após necropsia foi possível encontrar o parasita. Resultados negativos no exame parasitológico podem ocorrer em animais na fase inicial da doença (FAYET, 1999), enfatizando a importância de realizar mais de uma coleta do exame parasitológico em animais com positividade no Teste Rápido. O exame parasitológico direto tem alta especificidade e baixa sensibilidade, de cerca de 50% nos esfregaços de medula óssea, e de 30% em esfregaços de linfonodos (FAYET, 1999). SANTOS et al., (2010) observou 69% de positividade no exame parasitológico direto em cães com sorologia reagente ao ELISA e IFI. O diagnóstico molecular é outra opção que pode ser utilizada para a confirmação da LCV, principalmente para cães assintomáticos em áreas endêmicas (SOARES et al., 2011).

SANTOS et al. (2010), utilizaram 27 cães com sinais clínicos compatíveis com leishmaniose visceral canina no município de Bom Jesus – PI e compararam nestes animais os testes parasitológicos e métodos sorológicos imunoenzimático e de imunofluorescência indireta, 69,2% dos animais positivos em ambos os testes sorológicos foram confirmados no exame parasitológico. Os autores afirmam que todos os animais positivos no exame parasitológico estavam positivos na sorologia e que 22,7% foram positivos em apenas um dos testes sorológicos e negativos no parasitológico, explicam que estes poderiam ser animais falso-positivos. Apesar do número reduzido de animais, no presente estudo houve uma melhor resposta do

TRI, visto que 88,9% foram confirmados pelo exame parasitológico. QUEIROZ-JR (2011) refere que o TRI apresenta resultados superiores ao ELISA em animais sintomáticos.

SILVA & SANTOS (2011) confirmaram o primeiro caso autóctone de LVC no município de Bom Jesus - PI, com isso, este estudo mostra mais uma vez que existe uma fragilidade deste município quanto ao controle da doença. Isto também pode ser explicado por haver um alto índice de cães errantes, e pelas condições precárias em todos os bairros do município. O TRI é realizado com procedimentos simples, de fácil de manuseio, rápido e que possibilita uso a campo (De SANTIS, et al., 2013), podendo ser muito útil nos programas de combate a LVC, principalmente nestas localidades distantes dos grandes centros.

CONCLUSÃO

Apesar do número pequeno de amostras foi possível constatar na prática a eficácia do teste rápido de imunocromatografia DPP® na detecção da leishmaniose visceral canina em cães sintomáticos, e que este teste tem demonstrado que pode ser um bom teste de triagem em áreas endêmicas.

REFERÊNCIAS

ASSIS, J.; QUEIROZ, N. M. G. P.; SILVEIRA, R. C. V.; NUNES, C. M.; OLIVEIRA, T. M. F. S.; NORONHA-JR, A. C. F.; NEVES, M. F.; MACHADO, R.Z.; BUZETTI, W. A.S. Estudo comparativo dos métodos diagnósticos par Leishmaniose Visceral em cães oriundos de Ilha Solteira, SP. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 1, p. 17-25, 2010.

BRASIL. **Guia de vigilância epidemiológica**, 7. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Nota Técnica Conjunta N.º 01/2011 – CGDT-CGLAB/DEVIT/SVS/MS**. Brasília: Ministério da Saúde, 2011.

CARVALHO, T.P.; MOURA, L.D.; SILVA, K.M.; MARÇAL, L.M.; SILVA, E.R.D.F.S.; NEGREIROS, A.S.; SILVA, K.R.; CRUZ, M.S.P. Análise de concordância entre testes sorológicos e parasitológicos no diagnóstico de leishmaniose visceral canina. In: XXXV Congresso Brasileiro da Associação Nacional dos Clínicos Veterinários de Pequenos Animais. **Anais... XXXV Congresso Brasileiro da ANCLIVEPA**, p. 971-973, 2014.

DAY, M. J. One health: the importance of companion animal vector-borne diseases. **Parasites & Vectors**, v. 4, n. 49, p. 1-6, 2011.

De SANTIS, B.; SANTOS, E.G.B.; SOUZA, C.S.F.; CHAVES, S.A.M. Performance of DPP™ immunochromathographic rapid test (IRT) for canine visceral leishmaniasis: comparison with other serological methods in suspected dogs from Cuiabá, Mato Grosso State, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 50, n. 3, p. 198-205, 2013.

FAYET, G. Canine leishmaniasis in Europe; Part 2: Pathogenesis – Clinical signs – Diagnosis, **Merial Biological Technical Bulletin**, 1999.

FREITAS, J. C. C.; NUNES-PINHEIRO, D. C. S.; NETO, B. E. L.; SANTOS, G. J. L.; ABREU, C. R. A.; BRAGA, R. R.; CAMPOS, R. M.; OLIVEIRA, L. F. Clinical and laboratory alterations in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, p. 24-29, 2012.

GRIMALDI, G. JR.; TEVA, A.; FERREIRA, A. L.; DOS SANTOS, C. B.; PINTO, I. D.; DE-AZEVEDO, C.T.; FALQUETO, A. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 106, n. 1, p. 54-59, 2012.

IKEDA-GARCIA, F. A.; FEITOSA, M. M. Métodos de diagnóstico da leishmaniose visceral canina. **Clínica Veterinária**, v. 11, n. 1, p. 32-38, 2006.

MAGALHÃES, L. F.; WILSON, T. M.; MEDEIROS, A. A. Quadro clínico de cães com leishmaniose visceral e sua correlação com a sensibilidade do teste parasitológico. **Veterinária Notícias**, v. 18, n. 2, p. 67-72, 2012.

MAIA, Z.; LIRIO, M.; MISTRO, S.; MENDES, C. M. C.; MEHTA, S. R.; BADARO, R. Comparative Study of rk39 *Leishmania* antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis: Systemic Review with meta-analysis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 1, p. 1484-1496, 2012.

MARTINS, G. A. S.; LIMA, M.D. Leishmaniose: Do Diagnóstico ao Tratamento. **Enciclopédia Biosfera**, v. 9, n. 16, p. 2556-2569, 2013.

PALTRINIERI, S.; SOLANO-GALLEGO, L.; FONDATI, A.; LUBAS, G.; GRADONI, L.; CASTAGNARO, M.; CROTTI, A.; MAROLI, M.; OLIVA, G.; ROURA, X.; ZATELLI, A.; ZINI, E. Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 236, n. 11, p. 1184-1191, 2010.

QUEIROZ, P. V. S.; MONTEIRO, G. R. G.; MACEDO, V. P. S.; ROCHA, M. A. C.; BATISTA, L. M. M.; QUEIROZ, J. W.; JERÔNIMO, S. M. B.; XIMENES, M. F. F. M. Canine visceral leishmaniasis in urban and rural areas of Northeast Brazil. **Research in Veterinary Science**, v. 86, n. 2, p. 267-273, 2009.

QUEIROZ-JR, E. M. **Validação Do Teste Imunocromatográfico Rápido Dual Path Platform Para O Diagnóstico Da Leishmaníase Visceral Canina**. 2011. 77f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza. 2011.

QUINNELL, R.J.; COURTENAY, O. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. **Parasitology**, v.136, n. 14, p. 1915-1934, 2009.

SANTOS, R. S.; OLIVEIRA, F. L. L.; SANTOS, K. R.; ROCHA, L. B.; SANTOS, J. P.; MINEIRO, A. L. B. B.; MACHADO, L. P. Pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania (Leishmania) chagasi* na citologia de medula ossea, linfonodo e pele em

cães com suspeita clínica de leishmaniose visceral canina em Bom Jesus PI. In: XVI Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária, Campo Grande. **Anais...** XVI Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária. 2010.

SILVA, T. P.VD.; SANTOS, J. P. Leishmaniose Visceral Canina em Bom Jesus, Piauí, Brasil: Um Relato de Caso Autóctone. **Enciclopédia Biosfera**, v. 7, n. 13, 2011.

SILVA, D. T.; BUZETTI, W. A. S.; MARTIN, M. F. A.; PAIXÃO, M. S.; TENÓRIO, M. S.; LOPES, M. L. M. Comparative evaluation of several methods for canine visceral leishmaniasis diagnosis. **Journal Veterinary Parasitology**, v. 23, n. 2, p. 179-186, 2014.

SOARES, M. R. A.; MENDONÇA, I. L.; BONFIM, J. M.; RODRIGUES, J. A. WERNECK, G. L.; COSTA, C. H. N. Canine visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil: Relationship between clinical features and infectivity for sand flies. **Acta Tropica**, v. 117, p. 6-9, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Visceral Leishmaniasis Rapid Diagnostic Test Performance. **Diagnostics Evaluation Series**. n. 4, p. 1-46, 2011.