

## Comparação entre diferentes preparados protéicos de *Leishmania chagasi* como antígenos para ELISA indireto.

*Comparison between different Leishmania chagasi protein preparations as antigens to an indirect ELISA*

SOUZA, B.M.P.S.\*; REBOUÇAS, M.F.\*\*; OLIVEIRA, L.S.; FREITAS, D.S.; JULIÃO, F.S.; ALCÂNTARA, A.C.; PAULE, B.J.A.; BARROUIN-MELO, S.M.; FRANKE, C.R.

Laboratório de Infectologia Veterinária, Departamento de Produção Animal, Escola de Medicina Veterinária/Universidade Federal da Bahia, [bparana@bol.com.br](mailto:bparana@bol.com.br)\*, [miriamrebouças@yahoo.com.br](mailto:miriamrebouças@yahoo.com.br)\*\*

### RESUMO

Este estudo comparou os resultados de testes ELISA para leishmaniose visceral canina (LVC) utilizando dois antígenos solúveis de *Leishmania chagasi*, um deles obtido pelo cultivo do parasito em meio sintético quimicamente definido para bactéria, e o outro em meio Schneider. Para avaliação dos ELISAs, foram utilizadas 177 amostras de soro, sendo 36 de cães com isolamento de *Leishmania sp* em amostras de aspirado esplênico, 71 de cães soronegativos para LVC e 70 amostras escolhidas aleatoriamente no banco de soros do Laboratório de Infectologia Veterinária da Universidade Federal da Bahia. Ao compararmos os resultados dos ELISAs para a população total, a concordância geral entre eles foi grande ( $\kappa = 0,62$ ). A concordância das subpopulações extremas entre os ELISAs, foi considerado excelente ( $\kappa = 0,81$ ). No entanto, a concordância foi reduzida entre as subpopulações próximas ao ponto de corte ( $\kappa = 0,11$ ). No presente estudo, apresentamos e discutimos alguns aspectos e diferenças na execução da técnica de ELISA que podem estar envolvidos na discordância entre os resultados encontrados.

Palavras-chave: *Leishmania chagasi*, ELISA, kappa, antígeno

### INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, a leishmaniose visceral tem demonstrado clara tendência de expansão geográfica (FRANKE et al., 2002). A ocorrência cada vez mais freqüente de focos da doença em áreas urbanas e periurbanas torna mais complexa a epidemiologia da doença, antes caracterizada por sua ocorrência predominantemente rural, com graves

### SUMMARY

The present study compared the results of two ELISA tests for canine visceral leishmaniasis (CVL) using two different soluble antigens from *Leishmania chagasi*. One antigen was obtained from the culture of parasites in a chemically defined synthetic medium for bacteria, while the other was from parasites cultured on Schneider medium. To evaluate the two ELISA tests, 177 serum samples were used (36 sera were from dogs with positive culture of *Leishmania sp*. from splenic aspirates; 71 sera were from dogs serologically negative; and 70 sera were randomly chosen from the Veterinary Infectology Laboratory serum bank – Federal University of Bahia). The two ELISA tests applied on the total population on this comparison presented a good agreement with a kappa index of 0.62. The agreement between the extreme subpopulations on both ELISA tests was excellent with a kappa index of 0.81. However, there was a reduced agreement between the subpopulations nearby the cutoff point with a kappa index of 0.11. In this study we presented and discussed some aspects and differences between the ELISA tests performed which may be involved on the disagreement of the obtained results.

Key-words: *Leishmania chagasi*, ELISA, kappa index, antigens

implicações para a saúde pública no Brasil (ARIAS et al., 1996; BRASIL, 2003).

O controle da leishmaniose visceral, preconizado pelo Ministério da Saúde, baseia-se em quatro ações: diagnóstico e tratamento precoce dos casos humanos, redução da população de flebotomíneos, eliminação dos reservatórios e atividades de educação em saúde (BRASIL, 2003). Dentre os animais

domésticos, a espécie canina é considerada o principal reservatório do parasito no peridomicílio (DEANE e DEANE, 1955; COSTA *et al.*, 1990 e NASCIMENTO *et al.*, 1996). Devido à elevada porcentagem (40 a 60%) de cães soropositivos assintomáticos e a baixa sensibilidade do diagnóstico parasitológico da *Leishmania chagasi*, o diagnóstico sorológico representa uma ferramenta essencial nos inquéritos caninos (BRASIL, 2003). No entanto, a diversidade de técnicas imunodiagnósticas, bem como a variedade de antígenos e os diferentes critérios de definição do ponto de corte utilizados nos experimentos, reduzem a concordância entre os resultados obtidos com diferentes técnicas e dificultam a comparação de dados epidemiológicos (BISHOP *et al.*, 1984; FREY *et al.*, 1998 e IRION *et al.*, 2002).

Os antígenos utilizados em testes ELISA para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC) constituem-se geralmente de frações antigênicas obtidas do parasito na forma promastigota. Alguns trabalhos têm demonstrado a possibilidade de utilizar antígenos recombinantes (Badaró *et al.*, 1996; Salotra *et al.*, 2002) ou antígenos excretados por promastigotas cultivadas em meio quimicamente definido, livre de proteínas (MARTIN *et al.*, 1998; RYAN *et al.*, 2002). Alguns destes metabólitos excretados, especialmente uma fosfatase ácida (S-AcP) Bates *et al.*, (1987, 1988), apresentam acentuada atividade antigênica, possibilitando sua utilização no imunodiagnóstico da leishmaniose visceral (MARTIN *et al.*, 1998). A proposta deste estudo foi avaliar e comparar os resultados de testes ELISA indiretos para diagnóstico da LVC, utilizando antígenos solúveis de promastigotas de *Leishmania chagasi*, obtidos por meio de duas técnicas diferentes. O primeiro antígeno obtido em cultivo do parasito em meio Schneider e o segundo através do cultivo em meio sintético quimicamente definido para *Corynebacterium pseudotuberculosis* e verificar se o meio definido para esta bactéria pode ser empregado no cultivo de *Leishmania chagasi*.

## MATERIAL e MÉTODOS

### Amostras de Soro

Neste experimento, foram utilizadas 177 amostras de soro canino, provenientes da Região Metropolitana de Salvador, Bahia. Destas, 107 amostras foram empregadas na padronização dos ELISAs, sendo 36 delas coletadas de cães com parasitologia positiva em cultura de aspirado esplênico e 71 provenientes de cães assintomáticos para leishmaniose visceral, sorologicamente negativos e sem histórico da doença. Para a análise comparativa entre os testes, foram incluídos mais 70 soros caninos escolhidos aleatoriamente, com a finalidade de realizar um ensaio duplo cego, dentre as amostras disponíveis no banco de soros do Laboratório de Infectologia Veterinária da Universidade Federal da Bahia.

### Preparação dos antígenos

A cepa de *Leishmania* utilizada na preparação dos antígenos solúveis foi identificada como *Leishmania chagasi* por eletroforese de enzimas no Laboratório de Pesquisas em Leishmanioses - Departamento de Imunologia do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro (LTCC - *Leishmania* Typing Culture Collection - WDCM731).

No ELISA 1, foi utilizado como antígeno o sobrenadante de cultivo de formas promastigotas de *Leishmania chagasi* em meio livre de proteínas. Para elaboração desse antígeno, parasitos cultivados por cerca de 3-5 dias em meio Schneider (Sigma, St. Louis, MO, EUA) com 10% de soro fetal bovino (GIBCO BRL, Grand Island, NY), e 20mg/ml de gentamicina, sendo, em seguida, lavados em três centrifugações (1124 x g por 10 min.) com solução salina estéril. As promastigotas lavadas foram inoculadas em 10ml de meio quimicamente definido (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 16,17g/L; K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> anidro 0,91 g/L; NH<sub>4</sub>Cl 1,00 g/L; MgSO<sub>4</sub> 0,20 g/L; CaCl<sub>2</sub> 0,02g/L; glicose 12,00 g/L; MEM aminoácidos essenciais (50 x) 20,00mL/L; MEM aminoácidos não

essenciais (100 x) 20,00mL/L (MEM Amino Acids Solution e MEM Non Essential Amino Acids Solution, Life Technologies, USA); MEM vitaminas 20,00mL/L (MEM Vitamin Solution, Life Technologies, USA) para *C. pseudotuberculosis* (MOURA-COSTA *et al.*, 2002), sem proteínas, na concentração de  $10^8$  células/mL. Os parasitos foram incubados em estufa a 24°C durante 24 horas. Em seguida, o cultivo foi centrifugado (2500 x g por 30 min a 4°C) e o sobrenadante aliquoteado e estocado à -20°C até a sua utilização.

Para o ELISA 2, o antígeno utilizado foi uma fração protéica obtida a partir de promastigotas de *Leishmania chagasi*. Os parasitos foram cultivados a 24°C em meio Schneider com 20% de soro fetal bovino e 50µg/ml de gentamicina, até atingir a fase estacionária, com uma concentração celular de  $10^8$  células/mL. Em seguida foram realizadas três centrifugações 2500 x g, durante 10 minutos a 4°C, em solução salina estéril. O sedimento, contendo as promastigotas, foi ressuspenso em solução salina contendo um coquetel de inibidores de proteases (E64 1mM; Epstatina 2mg/mL; Leupeptina 2mg/mL; PMSF 1mg/mL) e submetido a ultra-som como descrito por Paranhos-Silva *et al.* (2003). Após a sonicação, o preparado foi centrifugado a 10.000 x g durante 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi aliquoteado e estocado a -20°C até a sua utilização. A concentração protéica de ambos os antígenos utilizados no experimento foi determinada pelo método de Lowry (Kit BioRad, Hercules, EUA).

#### Protocolos dos ELISAs

Na execução do ELISA 1, as microplacas foram sensibilizadas durante a noite, com 8 µg de proteína/mL do sobrenadante de cultivo em meio sem proteínas, no volume de 100µL por poço, diluído em tampão carbonato-bicarbonato 0,05M, pH 9.6. Sítios de ligação inespecífica foram bloqueados com 200µL/poço de leite desnatado a 10% em salina (0,15M) tamponada com fosfato 0,01 M, pH 7.4, com 0,05% de Tween-20 (Sigma, St. Louis, MO, EUA) (PBS-T). Amostras de

soro foram adicionadas no volume de 100µL por poço, diluídas a 1:400 em PBS-T com 5% de leite em pó desnatado e incubadas durante 1h à temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 100µL/poço do conjugado anti-IgG de cão + peroxidase (Bethyl laboratories, INC, Montgomery-TX, USA), na diluição de 1:4000. A reação foi revelada com 5mg/mL de ortofenilenediamino (Sigma, St. Louis, MO, EUA), em tampão citrato-fosfato (ácido cítrico 0.1 M e fosfato de sódio 0.2 M), pH 4,2, e 0,03% de peróxido de hidrogênio e interrompida com 20µL/poço de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4N. Entre as etapas, as placas foram lavadas 4 vezes com PBS-T. A leitura da densidade óptica (DO) foi feita em espectrofotômetro com filtro de 492nm.

Para o ELISA 2, as microplacas foram sensibilizadas durante a noite a 4°C com 100µL/poço da fração antigênica obtida por sonicação e centrifugação dos parasitos, na concentração de 10µg de proteína por mL, diluída em tampão carbonato-bicarbonato 0,05 M e pH 9,6. Para o bloqueio da placa utilizou-se 200µL de PBS-T com 5% de leite em pó desnatado, sendo então incubada por 1h à temperatura ambiente, seguida de quatro lavagens com PBS-T. Foram incubados 100µL de soro por poço, na diluição de 1:400 em PBS-T com 5% de leite em pó desnatado durante 1h à temperatura ambiente. Após 4 lavagens, 100µL de conjugado anti-IgG de cão + peroxidase (Sigma, St. Louis, MO, EUA), na concentração de 1:25000 diluído em PBS-T com 5% de leite em pó desnatado, foi acrescentado e incubado durante 1h à temperatura ambiente. A placa foi lavada e a revelação foi feita com peróxido de hidrogênio (0,03%) e OPD (5mg/mL) em tampão de citrato-fosfato (ácido cítrico 0.1 M e fosfato de sódio 0.2 M). A reação foi interrompida com 50µL de ácido sulfúrico 4 N por poço e a placa foi lida imediatamente em espectrofotômetro com filtro de 492 nm.

#### Cálculo do ponto de corte

Para cada ELISA, os valores das densidades ópticas (DO's) individuais foram corrigidos aplicando-se a seguinte fórmula:

$DO_{c\hat{o}i,j} \text{ branqueada}$  x média das DO's C+ branqueadas das placas /  $DO_{C+j} \text{ branqueada}$   
Sendo, C+: controle positivo; i: identificação do cão; j: identificação da placa; branqueada: subtração da média dos brancos das placas  
Os pontos de corte foram estabelecidos utilizando-se a curva ROC (*Receiver Operating Characteristics*) a partir dos valores das DO's corrigidas. Os pontos de corte dos ELISAs foram escolhidos de maneira a proporcionar uma sensibilidade de 100% e o valor mais elevado de especificidade semelhante entre os dois testes.

#### Análise estatística

Para a comparação entre os resultados obtidos no dois ELISAs, foi utilizado o índice de concordância kappa.

## RESULTADOS e DISCUSSÃO

Neste estudo avaliamos comparativamente os resultados de dois testes ELISA indiretos para o diagnóstico da LVC, tendo sido constatado que, individualmente, os testes apresentaram desempenhos idênticos quanto à sensibilidade (100%), especificidade (85.9%), valor preditivo positivo (78.3%), valor preditivo negativo (100%) e eficiência (90.7%), sendo comparáveis a valores obtidos por outros autores (MANCIANTI *et al.* 1995; COSTA VAL *et al.*; 1995, BADARÓ *et al.*; 1996; SCALONE *et al.*, 2002).

De acordo com os resultados obtidos por Ryan *et al.* (2002) proteínas secretadas de *Leishmania sp.*, tais como lipofosfoglicanos (LPG) e a fosfatase ácida solúvel (s-AcP), com propriedades antigênicas específicas para as formas promastigotas, poderiam ser obtidas em cultivos por 72 horas em meio sintético (BATES *et al.*, 1988; MARTIN *et al.*, 1998). Assim, devido à ausência de protocolos de utilização de meios livres de proteínas, caracterizados para o cultivo de *Leishmania chagasi*, utilizamos o meio sintético quimicamente definido, visando a obtenção de frações antigênicas secretadas, da mesma

forma que o desenvolvido por Moura-Costa *et al.* (2002) para o cultivo de *Corynebacterium pseudotuberculosis* no cultivo de *Leishmania chagasi*. Contudo, este meio de cultivo sem proteína utilizado para a produção do antígeno no ELISA 1, foi observada a presença de parasitos mortos após 24 horas de cultivo. Devido à lise celular, provavelmente, antígenos intracelulares, ligados à membrana, de superfície celular ou nuclear, normalmente presentes em extratos brutos, podem ter sido liberados para o meio de cultivo. Além disso, proteases parasitárias podem ter sido liberadas sobre os produtos secretados no meio de cultivo, clivando as proteínas previamente secretadas, alterando provavelmente o painel de antígenos esperado. Quanto à lise celular detectada, é possível que fatores como concentração ou o pH do meio utilizado não tenham sido adequados ao cultivo da *Leishmania chagasi*, uma vez que o mesmo foi elaborado com a finalidade de obter-se proteínas secretadas de *Corynebacterium pseudotuberculosis* (MOURA-COSTA *et al.*, 2002). Ao contrário do observado no cultivo de *Corynebacterium pseudotuberculosis* em meio sintético quimicamente definido, para o qual, segundo Moura-Costa *et al.* (2002), não há a necessidade de adaptação prévia do microrganismo ao meio, o cultivo de *Leishmania donovani* em meio quimicamente definido, parece requerer um período de adaptação do parasito ao meio, intercalado com repetidas passagens em cultura celular (MCCARTHY-BURKE *et al.*, 1991). A ausência deste procedimento em nosso estudo pode ter contribuído com a não adaptação de *L. chagasi* ao meio utilizado.

A distribuição de frequência das DO's obtidas com o ELISA 2 está demonstrada no Gráfico 1. Os valores foram expressos em porcentagem do valor do ponto de corte e revelaram a diferenciação de quatro subpopulações, sendo duas negativas [subpopulação 1 (DO's até 60% do ponto de corte) e 2 (DO's entre 61 e 100% do ponto de corte)] e duas positivas [subpopulação 3 (DO's entre 101 e 200% do ponto de corte) e 4 (DO's acima de 200%)]. Este fato não foi

observado nos resultados obtidos com o ELISA 1 (Gráfico 2).

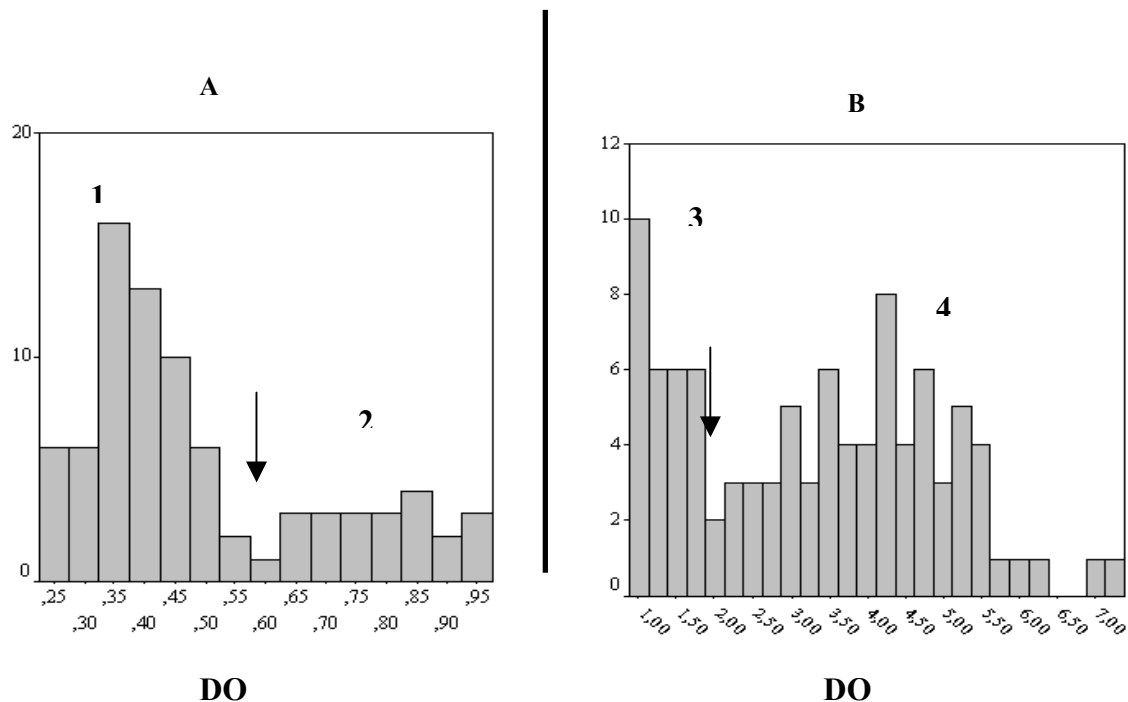


Gráfico 1. Distribuição de frequências de DO (expressas em porcentagem do valor do ponto de corte do ELISA 2) números de cães na população canina total (n = 177). A linha dividindo os dois gráficos corresponde ao ponto de corte. Representa a população negativa e (B) representa a população positiva. As setas indicam o ponto de divisão subpopulações representadas com os números 1, 2, 3 e 4.

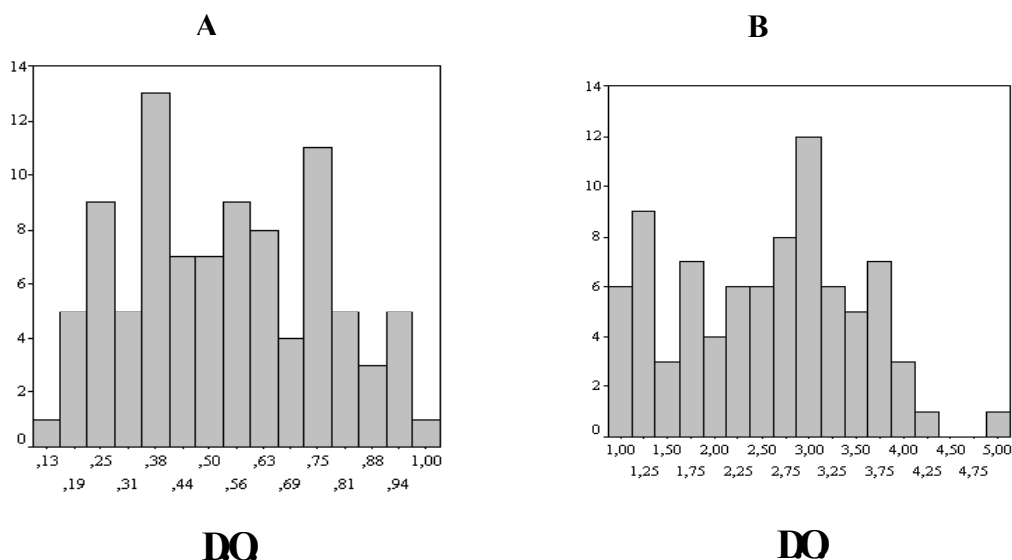


Gráfico 2. Distribuição de frequências de DO (expressas em porcentagem do valor do ponto de corte do ELISA 1) por números de cães na população canina total (n = 177). A linha dividindo os dois gráficos corresponde ao ponto de corte. (A) representa a população negativa e (B) representa a população positiva.

Ao compararmos os resultados dos testes ELISA 1 e 2, realizados com a população total de soros caninos (n=177), a concordância entre os testes ELISAs foi grande ( $\kappa = 0,62$ ) (Tabela 1), no entanto ainda inferior aos valores encontrados por Scalone *et al.* (2002) quando comparou a concordância dos resultados da imunofluorescência indireta e do ELISA ( $\kappa = 0,89$ ) no diagnóstico de LVC. Um índice semelhante de concordância foi obtido, em nosso trabalho, apenas quando comparamos as duas subpopulações extremas, subpopulações 1 e 4, entre os dois testes ELISAs ( $\kappa = 0,81$ ) (Tabela 2). Apesar dos pontos de corte terem sido escolhidos para proporcionar 100% de sensibilidade e a especificidade mais elevada e semelhante nos dois testes ELISAs (85,9%), foi observada uma concordância reduzida entre os resultados dos dois testes ( $\kappa = 0,11$ )

quanto aos soros das subpopulações 2 e 3 (Tabela 3). A baixa concordância, envolvendo resultados próximos ao ponto de corte, tem sido relatada com frequência em estudos comparativos utilizando diferentes técnicas imunodiagnósticas (PARANHOS-SILVA *et al.* 1996, KÖSTERS *et al.* 2000, MADRUGA *et al.* 2001, ZIJLSTRA *et al.* 2001, IQBAL *et al.* 2002, REITHINGER *et al.* 2002) ou a mesma técnica modificada (Irion *et al.*, 2002, MaaleJ *et al.*, 2003) revelando a existência de uma “zona cinza”, ou limítrofe, em torno do ponto de corte. Em nosso estudo, a “zona cinza” compreendeu uma faixa que vai de 0,61 a duas vezes o valor do ponto de corte, intervalo considerado amplo quando comparado aos descritos por outros autores Irion *et al.*, (2002), Nakazawa *et al.*, (2001), Scalone *et al.*, (2002).

Tabela 1. Comparação entre os resultados sorológicos para leishmaniose visceral da população canina total nos ELISAs 1 e 2 e índice de concordância kappa

População total (n = 177)						
		ELISA 2			Total	Kappa
		Positivo	Negativo			
ELISA 1	Positivo	91	14	105	0.62	
	Negativo	18	54	72		
Total		109	68	177		

Tabela 2. Comparação entre os resultados sorológicos para leishmaniose visceral dos ELISAs 1 e 2 com as subpopulações caninas 1 e 4 e índice de concordância kappa

Subpopulações 1 e 4 (n = 106)						
		ELISA 2			Total	Kappa
		Positivo	Negativo			
ELISA 1	Positivo	46	9	55	0.81	
	Negativo	1	50	51		
Total		47	59	106		

Tabela 3. Comparação entre os resultados sorológicos para leishmaniose visceral dos ELISAs 1 e 2 com as subpopulações caninas 2 e 3 e índice de concordância kappa

Subpopulações 2 e 3 (n = 71)						
		ELISA 2			Total	Kappa
		Positivo	Negativo			
ELISA 1	Positivo	45	5	50	0.11	
	Negativo	17	4	21		
Total		62	9	71		

A baixa concordância observada entre as subpopulações próximas ao ponto de corte poderia ser atribuída às diferenças entre as concentrações e composições antigênicas utilizadas nos ELISAs, o que poderia indicar a presença de proteínas de excreção-secreção, com propriedades antigênicas, liberadas pelas formas promastigotas no meio sintético, apesar do pouco tempo que sobreviveram no cultivo. A utilização de conjugados de empresas diferentes (Sigma e Bethyl Laboratories) nos ELISAs, apesar de sua padronização com soros-controle por titulação em série pode ter contribuído para a reduzida concordância entre as subpopulações 2 e 3. Além disto, Frey *et al.* (1998) e Irion *et al.* (2002) demonstraram que valores do ponto de

corte determinados pela média dos soros negativos de uma placa somados a 2 ou 3 desvios padrões (IC = 95% ou 99%, respectivamente) não são estatisticamente relevantes e que os resultados interplacas com diferentes pontos de corte podem apresentar variações que interferem na análise comparativa entre elas. Nosso estudo vem corroborar com os achados de Frey *et al.* (1998) e Irion *et al.* (2002), demonstrando que avaliações comparativas entre testes imunodiagnósticos, como o ELISA, podem gerar, em virtude da diferença entre os pontos de corte estabelecidos para cada teste, resultados confusos ou contraditórios especialmente dentre aqueles com valores de DO próximos ao ponto de corte.

## CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos, podemos concluir que, apesar do meio sintético padronizado para cultivo de *Corynebacterium pseudotuberculosis* não ter sido adequado para manutenção e crescimento de *Leishmania*, a diferença observada na comparação dos ELISAs, pode ser decorrente da presença de proteínas antigênicas, excretadas ou secretadas no meio, enquanto os parasitos ainda estavam vivos. Estudos mais aprofundados devem ser realizados, objetivando identificar as proteínas que

estariam sendo excretadas ou secretadas em meio quimicamente definido. Além disso, a padronização de um meio sem proteínas, quimicamente definido para o crescimento *in vitro* de *Leishmania* sp., merece maior atenção, por minimizar os custos e possibilitar um painel de antígenos diferente dos meios convencionais, enriquecidos, podendo gerar resultados mais específicos e sensíveis do que antígenos produzidos com extrato bruto de *Leishmania*.

## REFERÊNCIAS

ARIAS, J.R.; MONTEIRO P.S.; ZICKER F. The reemergence of visceral leishmaniasis in Brazil. **Emerging Infectious Diseases.**, v. 2, n.2, p. 145-6, 1996.

BADARÓ, R. L.; BENSON, D.; EULALIO, M. C.; FREIRE, M.; CUNHA, S.; NETTO, E. M. PEDRAL-SAMPAIO, D.; MADUREIRA, C.; BURNS, J. M.; HOUGHTON, R. L.; DAVID, J. R.; REED,

S. G. rK39: a cloned antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral leishmaniasis. **J. Infect. Dis.** v. 173, p.758-761, 1996.

BATES, P. A.; GOTTLIEB, M.; DWYER D.M. *Leishmania donovani*: identification of glycoproteins released by promastigotes during growth *in vitro*. **Exp. Parasitol.** v.67, p.199-209. 1988.

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

BISHOP, F.R.; CIPRIANI, E; LUND, J.S.; BARNES, G.L.; HOSKING, C.S. Estimation of rotavirus immunoglobulin G antibodies in human serum samples by enzyme0linked immunosorbent assay: expression of results as units derived from a standard curve. **Journal of Clinical Microbiology**.v.19, n.4, p.447-452,1984.

BRASIL. **Ministério da Saúde** Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral: normas e manuais técnicos.Brasília, 2003.(Serie A)

COSTA, C.H.N.; PEREIRA H.F.; ARAÚJO M.V. Epidemia de leishmaniose visceral no Estado do Piauí, Brasil, 1980-1986. **Rev. Saúde Pública**, v.24, n.5, p. 361-372, 1990.

COSTA VAL, A.P.; MICHALIK, M.S.M.; TORRES, S.F.; MARQUES JR., A.P. Comparação entre o teste imunoenzimático e a reação de imunofluorescência indireta no diagnóstico sorológico da leishmaniose tegumentar americana canina experimental. **Arq. Bras. Méd. Vet. Zootec**, v. 47, n.5,p. 665-674, 1995.

DEANE, L.M.; DEANE M.P. Observações preliminares sobre a importância comparativa do homem, do cão e da raposa (*Lycalopex vetulus*) como reservatório da *Leishmania donovani*, em área endêmica de Calazar, no Ceará. **O Hospital**, p. 61-76, 1955.

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, 2002.

FREY, A.; DI CANZIO, J.; ZURAKOWSKI. A statically defined

endpoint titer determination meted for immunoassays. **Journal of Immunological Methods**, v. 221, p. 35-41, 1998.

IQBAL, J.; PARSOTAM R. H.; SAROJ,G.; PHILIP,R.; AL-ALI, F.; MADDA, P.J.; SHER, A. Imported visceral leishmaniasis: diagnostic dilemmas and comparative analysis of three assays. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n.2, p. 475-479, 2002.

IRION, A.; BECK, H.; SMITH, T. Assesment of positivity in immuno-assays with variability in background measurements: a new approach applied to the antibody response to *Plasmodium falciparum* MSP2 . **Journal of Immunological Methods**, n. 259, p. 111-118, 2002.

KÖSTERS, K.; RIFFELMANN,M.; DOHRN, B.; WIRSING VON KÖNIG, C.H. Comparison of five commercial enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies to Bordetella pertussis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.7, n.3, p. 422-426, 2000.

MAALEJ, I.A.; CHENIK, M.; LOUZIR, H.; SALAH, A.B.; BAHLOUL, C.; AMRI, F.; DELLAGI, K. Comparative evaluation of ELISAS based on ten recombinant or purified leishmania antigens for the serodiagnosis of Mediterranean visceral leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg**, v. 68, n.3, p. 312-320, 2003.

MADRUGA, R.C.; MARQUES, A.P.; ARAÚJO, F.R.; MIGUITA, M.; CARVALHO, C.M.E.; ARAÚJO, F.S.; UMAKI, A.C.S., CROCCI, A. J.; QUEIROZ, R.A. Evaluation of an ELISA for detection of antibodies to Babesia bigemina in cattle and it's application in an epidemiological survey in Brazil. **Pesq. Vet. Bras**, v. 21, n. 2, p. 72-76, 2001.



MANCIANTI, F.; FALCONE, M.L.; GIANNELLI, C.; POLIA, A. Comparison between an enzyme-linked immunosorbent assay using a detergent-soluble *Leishmania infantum* antigen and indirect immunofluorescence for the diagnosis of canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v.59, p. 13-21, 1995.

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

MCCARTHY-BURKE, C.; BATES, P.A.; DWYVER, M.D. *Leishmania donovani*: use of two different, commercially available, chemically defined media for the continuous in vitro cultivation of promastigotes. **Experimental Parasitology**, v.73, p. 385-387, 1991.

MOURA-COSTA, L.F; PAULE, B.J.A; AZEVEDO, V.; FREIRE, S.M.; NASCIMENTO, I.; SCHALER, R; REGIS, L.F.; VALE, V.L.C.; MATOS, D.P.; BAHIA, R.C.; CARMINATI, R. MEYER, R. Meio sintético quimicamente definido para o cultivo de *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Rev. Bras. Saúde Prod. Na**, v.3, n.1, p. 1-9, 2002.

NAKAZAWA, M; ROSA, S.D.; PEREIRA, V.R.A; MOURA, M.O.; FURTADO, V.C.; SOUZA, W.V.; BARROS, M.N.D.S.; ABATH, F.G.C.; GOMES, Y.N. Excretory-secretory antigens of *Trypanosoma cruzi* are potentially useful for serodiagnosis of chronic Chagas' disease. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 8, n. 5, p. 1024-1027, 2001.

NASCIMENTO MD; COSTA JM; FIORI BI; VIANA GM; FILHO MS; ALVIM AC; BASTOS OC; NAKATANI M, REED S; BADARÓ R; SILVA AR; BURATTINI MN, The epidemiological determinant aspects in the maintenance of visceral leishmaniasis in the state of Maranhão, Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 29, n.3, p. 233-240, 1996.

PARANHOS-SILVA, M.; FREITAS, L. A. R.; SANTOS, W. C.; GRIMALD, G. JR.; PONTES-DE-CARVALHO, L. C.; OLIVEIRA-DOS-SANTOS, A. Z. A cross-sectional serodiagnostic survey of canine leishmaniasis due to *Leishmania chagasi*. **Am. J. Trop. Med. Hyg**, v. 55, n.1, p. 39-44, 1996.

PARANHOS-SILVA, M.; OLIVEIRA G.G.; REIS E.A.; MENEZES, R.M.; FERNANDES, O.; SHERLOCK I.; GOMES, R.B.; PONTES-DE-CARVALHO, L.C.; SANTOS, W.L. A follow-up of Beagle dogs intradermally infected with *Leishmania chagasi* in the presence or absence of sand fly saliva. **Vet. Parasitology**, n. 114, p. 97-111, 2003.

REITHINGER, R.; QUINNELL, J. R.; DAVIES, A. B.; DAVIES, C. R. Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: Comparative study using an immunochromatographic dipstick test, enzyme-linked immunosorbent assay, and PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 2352-2356, 2002.

RYAN, J. R.; SMITHYMAN, A. M.; RAJASEKARIAH, G.; HOCHBERG, L.; STITELER, J. M. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay based on soluble promastigote antigen detects immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies in sera from cases of visceral and cutaneous leishmaniasis. **J. Clinical Microbiol**, v. 40, n. 7, p.1037-1043, 1996.

SALOTRA, P; SREENIVAS, G.; NASIM, A.A.; SUBBA RAJU, B.V.; RAMESH, V. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of post-kala-azar dermal leishmaniasis with crude or recombinant k39 antigen. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, p. 370-373, 2002.

SCALONE, A.; DE LUNA, R.; OLIVA, G.; BALDI, L.; SATTA, G.; VESCO, G.; MIGNONE, C.; TURILI, C.; MONDESIRE, R. R.; SIMPSON, D.; DONOGHUE, A. R.; FRANK, G.R. GRADONI, L. Evaluation of the Leishmania recombinant K 39 antigen as a diagnostic marker for canine leishmaniasis and validation of a standardized enzyme-

linked immunosorbent assay. **Vet. Parasitology**, v. 104, p. 275-285, 2002.

ZIJLSTRA, E.E.; NUR, Y.; DESJEUX, P.; KHAIL, E.A.G.; EL-HASSAN, A.M.; GROEN, J. Diagnosing visceral leishmaniasis with the recombinant K39 strip test: experience from the Sudan. **Tropical Medicine and International Health**, v. 6, n. 2, p. 108-113, 2001.