

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
ESCOLA DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL NOS
TRÓPICOS**

TESE DE DOUTORADO

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA HUMORAL A
LIPOFOSFOGLICANOS DE *Leishmania infantum* EM CÃES COM
DIFERENTES APRESENTAÇÕES CLÍNICAS DE
LEISHMANIOSE VISCERAL**

GABRIELA PORFIRIO-PASSOS

SALVADOR – BA

2017



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
ESCOLA DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL NOS TRÓPICOS

Gabriela Porfirio-Passos

AVALIAÇÃO DA RESPOSTA HUMORAL A LIPOFOSFOGLICANOS DE
***Leishmania infantum* EM CÃES COM DIFERENTES APRESENTAÇÕES**
CLÍNICAS DE LEISHMANIOSE VISCERAL

SALVADOR – BA

2017

GABRIELA PORFIRIO-PASSOS

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA HUMORAL A
LIPOFOSFOGLICANOS DE *Leishmania infantum* EM CÃES COM
DIFERENTES APRESENTAÇÕES CLÍNICAS DE LEISHMANIOSE
VISCERAL**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal nos Trópicos da Universidade Federal da Bahia, como requisito final para obtenção do título de Doutora em Ciência Animal nos Trópicos.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Stella Maria Barrouin-Melo

Coorientador: Prof. Dr. Ricardo Wagner Dias Portela

Coorientadora: Prof.^a. Dr.^a Daniela Farias Lorangeira

SALVADOR – BA

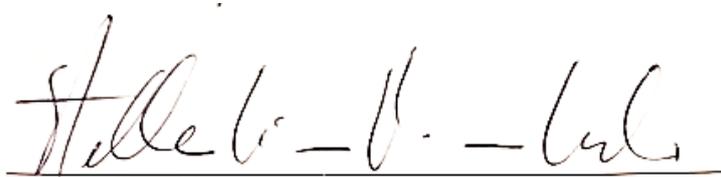
2017

GABRIELA PORFIRIO-PASSOS

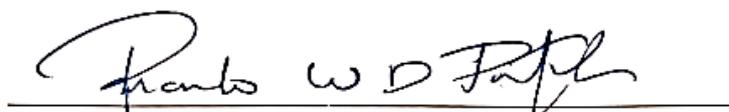
**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA HUMORAL A LIPOFOSFOGLICANOS DE
Leishmania infantum EM CÃES COM DIFERENTES APRESENTAÇÕES
CLÍNICAS DE LEISHMANIOSE VISCERAL**

Tese de Doutorado em 28 de março de 2017.

Comissão examinadora



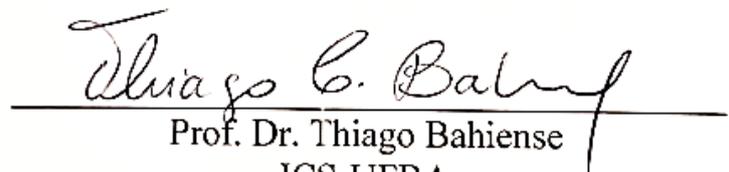
Profa. Dr.^a Stella Maria Barrouin-Melo
EMEVZ-UFBA



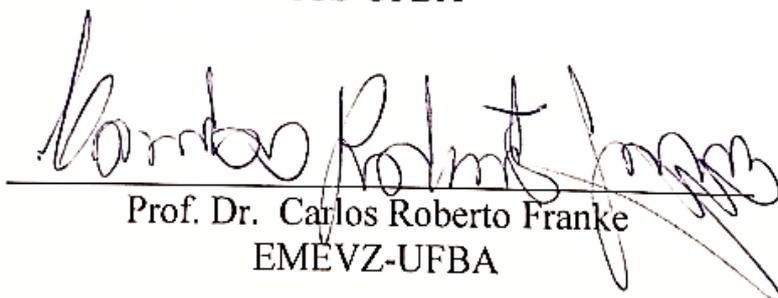
Prof. Dr. Ricardo Wagner D. Portela
ICS-UFBA



Profa. Dr.^a Flaviane Alves de Pinho
EMEVZ-UFBA



Prof. Dr. Thiago Bahiense
ICS-UFBA



Prof. Dr. Carlos Roberto Franke
EMEVZ-UFBA

Dedico este trabalho aos cães e seus tutores que participam desta jornada que é o acompanhamento do tratamento da leishmaniose visceral canina.

Em especial a Torpedo e seus tutores Bárbara e Gonçalo, a Hulk e seu tutor Jorge, a Boris e sua tutora Camila, cães que foram verdadeiros guerreiros, mas não sobreviveram a esta batalha e parabéns aos seus tutores por toda colaboração.

Estes e demais cães do projeto me servem como inspiração para continuar estudando e aprimorando meus conhecimentos contra esta terrível enfermidade.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois sem Ele, sem sua luz teria perdido a vontade de chegar até aqui. Foram diversas as pedras no caminho.

Eternamente grata à minha mãe, Prof.^a Dr.^a Lenir C. Porfirio, que ficou ao meu lado nos momentos mais decisivos desta louca jornada. Mãe, sem você, eu não conseguiria, você é meu tudo.

Grata ao meu pai, Dr. Luciano Passos, que não cansa de me perguntar quando irei parar de estudar e começarei a trabalhar de verdade. Pai, sei que não dá para viver de bolsa eternamente, depois deste doutoramento irei “só” trabalhar de verdade, mas sempre continuarei estudando. A qualquer hora encaro o “pós-doc”.

Agradeço à minha irmã Giuliana Porfirio Passos, que mesmo de longe e naquelas horas “punks” vibrou energias positivas e continuou torcendo para minha vitória, grata por ter vindo para perto também junto com minha cópia, a mais linda e amada sobrinha Melissa P. P. dos Santos que me anima, me irrita e muito me diverte com suas tiradas fantásticas.

Apesar da longa espera de seis meses por sua vinda para Salvador, Janaína Alves, sou muito grata por sua companhia e amor. Já passamos por poucas e boas por aqui e isto é só mais uma parte da nossa história. Depois desta defesa, você escutará mais respostas positivas do que negativas quando perguntar se podemos viajar, passear ou mesmo se podemos ir ali e finalmente conheceremos os lugares belíssimos da Bahia, quiçá do mundo.

Agradeço a todos meus familiares que mesmo de longe sempre emanaram energias positivas para que eu concluísse mais esta etapa. Em especial aos primos Inajara, Fábio, Eric, Clara, Isadora e Beatriz, que souberam me acolher com muito carinho neste último ano.

Minha gratidão a Carlos Virgens, que apesar do início desconfiado, se mostrou um excelente amigo, mais que um colega de laboratório, se tornou “meu Xú baiano”, eterno amigo. Se não fosse você, iria precisar de um pouco mais de tempo para aprender a realizar a técnica da punção esplênica. Cada reencontro com você é muito importante para mim.

Em especial minha gratidão à minha surda predileta e minha muda favorita, na verdade são meus “zamuris”, Rafaela Gonçalves e Clauceane de Jesus. Não precisou de tanto tempo para nos tornarmos uma superequipe, um supertime, mais que verdadeiras

amizades, vocês são meus amores. Minhas meninas que estão prontas para esta vida acadêmica surreal. Sem vocês, sem nossa cumplicidade, este trabalho teria sido quase impossível.

Neste período do doutoramento passaram pelo LIVE diversos estagiári@s, uns já formaram, outros já estão na residência, tem também aquel@s que já estão no mestrado, sou muito grata a tod@s que participaram do projeto e me ajudaram intensamente. #foreverteamLIVE. Dinah Becerra, Tiago Mota, Roseclea Chagas, Mariana Pierote, Larissa Lago, Emanuelle Yagi, Mariana Mendes, Mayro Rafaga, Raíza Cazumbá, Driele Silva, Mainara Mota, Jhennifer Cassiano, Rafaela Andrade e Stephanie Luyse.

Agora o então Prof. Dr. Jairo Torres, que será meu eterno amigo “boss”, ex-detentor do “comando” do LIVE, meu agradecimento por toda paciência, amizade e seu apoio.

Agradecimento mais que especial às amigas Ianei Carneiro, Indira Trüeb, Fernanda Libório, Ana Cláudia Raposo, Prof.^a Dr.^a Bárbara Paraná, Dr.^a Sabrina Lambert, Ercy Bono e Camila Amaral, valeu por todos os momentos que me emprestaram os ombros e ouvidos para aqueles desabafos nos corredores, por mensagens, por telefone, vocês são incríveis.

Agradeço imensamente a todos os membros das famílias LAC e CMPA (tivemos trocas de residentes, por isso não citarei nomes) que nesses quase quatro anos de convívio intenso dentro do HOSPMEV, entre um paciente e outro, sempre foram demasiadamente solícitos para esclarecer dúvidas, para receber um exame fora do horário, para emprestar um corante, para dividir conhecimento. Vocês farão parte da minha vida para sempre.

Agradeço também aos amigos e amigas que também dividiram conhecimentos, carinho, contos, piadas, aulas e também ganharam um cantinho especial no meu coração: Marcos Bernardo, Ioná Brito, Tiago Barral, Müller Ribeiro, Rogério Fernando, Emanuel Martins, Vinícius Brito, Deusdete Conceição, João Victor Romano, Eunice Andrade, Madalena Souza, Ítalo Ramos, Taís Mota, Gabriela Nery, Renata Monção, Ana Glaicy, Nilson Santana e Aretha, com certeza esquecerei alguém, me perdoem.

Grata pela amizade construída com tutores que entendem o verdadeiro significado de posse responsável. Em especial Marília Campos (Chay e Trovão); Magna Santana (Léo); Camila Machado (Tobias e Loli); Thereza Gabriela (Lola); Evelyn (Bambi, Bole, Pustchú e Zoe); Carlos Frederico e Iracema (Mike); Eliza e Emídio (Spike); Viviane e Adriano (Luna); Dora e Fernando (Nego).

Gratidão e respeito às Prof.^{as} Dr.^{as} Arianne Oriá, Caterina Muramoto, Monica Mattos e Alessandra Estrela por todo suporte, conselhos, orientações, convites e dúvidas esclarecidas. Agradeço também aos Prof.^s Dr.^s Roberto Franke e João Moreira pelas conversas e sugestões.

Meu muitíssimo e eterno obrigada à minha coorientadora (irmã científica que me adotou) Prof.^a Dr.^a Daniela Larangeira, que sempre esteve disposta a me ajudar em momentos dentro e fora da academia.

Muito grata ao meu coorientador Prof. Dr. Ricardo Portela (quase primo), que é sempre solícito, um verdadeiro amigo e conhecedor das melhores delícias “engordativas” da cidade, sempre foram excelentes as reuniões com guloseimas, os puxões de orelha e sua amizade.

Agradeço a Prof.^a Dr.^a Stella Barrouin por ter me aceitado, ter permitido que eu ajudasse neste projeto que já desenvolve há anos e pudesse colaborar com mais conclusões acerca do diagnóstico de cães sem sinais clínicos e o acompanhamento durante o tratamento da leishmaniose visceral.

Sou grata a tod@s.

RESUMO

Este é o primeiro estudo sobre o uso de lipofosfoglicanos (LPG) de *Leishmania infantum* no diagnóstico da leishmaniose visceral (LV) em cães infectados e com diferentes apresentações clínicas da doença. A LV canina (LVC) é uma zoonose crônica, transmitida nas Américas por insetos vetores do gênero *Lutzomyia*, sendo a *L. infantum* a espécie isolada em cães infectados. A suscetibilidade ou resistência do cão ao desenvolvimento da doença clínica dependem da resposta imune desencadeada pelo parasito após a infecção. Os LPGs são moléculas que medeiam etapas metabólicas essenciais à virulência da *Leishmania*, e uma boa resposta humoral tanto no vetor flebotomíneo quanto no hospedeiro mamífero. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar o LPG como antígeno para imunodiagnóstico da LVC pelo teste ELISA indireto. Para padronização do ensaio ELISA-LPG, foram utilizadas 165 amostras de soro de cães, 97 positivos na análise molecular (PCR) de aspirado esplênico e infectados naturalmente por *L. infantum* e estadiados clínica e laboratorialmente, sendo 10,3% (10/97) no estadio I, 23,7% (23/97) no estadio II, 57,7% (56/97) no estadio III e 8,2% (8/97) no estadio IV. Como controles negativos, foram utilizados 68 soros de cães de área não endêmica para LVC. As amostras de soro testadas pelo ELISA-LPG foram comparativamente testadas por ELISA indireto *in house* utilizando antígeno total lisado (ATL) de *L. infantum* (ELISA-ATL). O ELISA-LPG apresentou sensibilidade de 91,7%, especificidade de 98,5%, acurácia de 99,7%, valor preditivo positivo (VPP) de 98,8% e valor preditivo negativo (VPN) de 89,3%. Para verificação de reatividade cruzada nos ensaios ELISA-LPG e ELISA-ATL, foram utilizados soros de cães naturalmente infectados por *Hepatozoon canis*, *Ehrlichia canis*, *Babesia vogeli canis*, *Anaplasma platys*, *Leishmania braziliensis* e amostras de soro de cães infectados experimentalmente por *Trypanosoma cruzi* nas fases aguda e crônica. O teste ELISA-ATL, o qual teve 98,8% de especificidade e 85% de sensibilidade, apresentou reação cruzada para *Ehrlichia canis* e *Babesia vogeli canis*, enquanto que no ensaio ELISA-LPG não houve reação cruzada em soros de cães infectados com os agentes testados. As amostras de soro de 90% (9/10) cães sem sinais clínicos, classificados no estadio I da LVC, foram positivas no ELISA-LPG, enquanto o ELISA-ATL não apresentou sororreatividade. O ELISA-LPG apresentou também maior intensidade de reatividade em amostras de soro de cães no estadio II da LVC, quando comparado ao ELISA-ATL. Conclui-se que o LPG de superfície de *L. infantum* foi reconhecido por soros de cães infectados e demonstrou ser uma ferramenta com alto poder de detecção de cães sem sinais clínicos. Os resultados permitem recomendar a aplicação do ELISA-LPG para o diagnóstico sorológico de LVC.

Palavras-chave: Cães. Imunodiagnóstico. Leishmaniose visceral. Lipofosfoglicano.

ABSTRACT

This is the first study on the use of lipophosphoglycans (LPG) of *Leishmania infantum* in the diagnosis of visceral leishmaniasis (VL) in infected dogs and with different clinical presentations of the disease. Canine VL (CVL) is a chronic zoonosis, transmitted in the Americas by insects' vectors of the genus *Lutzomyia*, with *L. infantum* being the isolated species in infected dogs. The susceptibility or resistance of the dog to the development of clinical disease depends on the immune response triggered by the parasite after infection. LPGs are molecules that mediate metabolic steps essential to the virulence of *Leishmania*, both in the sandfly vector and in the mammalian host. Therefore, the aim of this study was to evaluate LPG as an antigen for the immunodiagnosis of CVL by the indirect ELISA. For the standardization of the LPG -ELISA assay, 165 serum samples from dogs were used. 97 positives in the molecular analysis (PCR) of splenic aspirate and infected naturally by *L. infantum* were staged clinically and laboratorially in 10.3% (10/97) in stage I, in 23.7% (23/97) in stage II in 57.7% (56/97) in stage III and 8.2% (8/97) in stage IV. As negative controls, 68 sera of dogs of non-endemic area for LVC were used. Serum samples tested by the LPG-ELISA were comparatively tested by indirect ELISA using lysed total antigen (TLA) from *L. infantum* (TLA-ELISA). The LPG-ELISA presented sensitivity of 91.7%, specificity of 98.5%, accuracy 99.7%, positive predictive value (PPV) 98.8%, and negative predictive value (NPV) 89.3%. To verify cross-reactivity in LPG-ELISA and TLA-ELISA assays, sera from dogs naturally infected with *Hepatozoon canis*, *Ehrlichia canis*, *Babesia vogeli canis*, *Anaplasma platys*, *Leishmania braziliensis* and serum samples of dogs experimentally infected by *T. cruzi* were used in acute and chronic phases. The TLA-ELISA test, which had 98.8% specificity and 85% sensitivity, showed a cross reaction to *Ehrlichia canis* and *Babesia vogeli canis*, whereas in the LPG-ELISA test there was no cross-reaction in sera from dogs infected with none of the agents tested. Serum samples from nine out of ten dogs without clinical signs, classified as stage I of CVL, were positive in the LPG-ELISA, whereas the TLA-ELISA did not show seroreactivity for any of these samples. LPG-ELISA also showed higher reactivity intensity in sera from dogs in stage II of LVC when compared to TLA-ELISA. In conclusion, the surface LPG of *L. infantum* was recognized by sera from infected dogs and demonstrated to be a tool with high detection power of dogs with no clinical signs. The results allow to recommend the application of the LPG-ELISA for the serological diagnosis of CVL.

Keywords: Dogs. Immunodiagnosis. Visceral Leishmaniasis. Lipophosphoglycan.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Estrutura do lipofosfoglicano. O LPG tem quatro domínios, o fosfatidilinositol-ancorado, âncora lipídica liso-alquilglicerol, a região núcleo glicano conservada, as unidades repetidas e o cap. A estrutura e número de unidades repetidas de fosfoglicanos repetidas variam e dependem do estágio de diferenciação e das espécies de *Leishmania*. Gal = galactose; Man = manose; Core = núcleo hexasacarídeo glican; Cap = oligossacarídeo neutro. Adaptado de Assis et al. (2012a)29
- Figura 2 – O papel dos LPGs na infectividade e virulência da *Leishmania*. As funções dos LPGs incluem no inseto: (1) proteção física das promastigotas contra enzimas hidrolíticas no trato digestório do inseto; (2) ligação das promastigotas à parede intestinal; (3) no hospedeiro mamífero, os LPGs protegem as promastigotas contra a lise por proteínas do complemento; (4) ligação dos parasitos às membranas dos macrófagos ou a de células transitariamente infectadas, como neutrófilos e células dendríticas; (5) inibição transitória da maturação do fagossoma; (6) proteção física contra a degradação do parasito por enzimas lisossomais; (7) modulação da ativação de macrófagos por meio do impedimento da síntese de compostos nitrogenados e citocinas relacionadas ao controle da infecção e proteção contra radicais livres do oxigênio (ROS). Adaptado de Franco; Beverley; Zamboni (2012)30
- Figura 3: Diagrama das avaliações antes e após imunização com as vacinas comerciais Leishmune® e Leish-Tec®.....37
- Figura 4 – *Western blotting* para avaliação do reconhecimento de solução de LPG por soros de cães positivos e negativos para infecção por *L. infantum*. A solução de LPG foi submetida à eletroforese em gel de 15% de acrilamida, transferida para membrana de nitrocelulose, e incubada com pool de soros positivos e negativos. (1) Padrão de peso molecular; (2) membrana incubada com pool de soros negativos para infecção por *L. infantum*; (3) membrana incubada com pool de soros positivos para infecção com *L. infantum*. Os números ao lado representam os pesos moleculares do padrão, em kDa.....42
- Figura 5 – Distribuição dos resultados individuais para 165 amostras de soros positivas e 97 negativas. Os soros foram ensaiados por ELISA indireto “in house” com antígeno total lisado (ATL) de *L. infantum* e testados por sistema imunoenzimático com antígeno lipofosfoglicano (LPG) de *L. infantum* para a identificação de anticorpos IgG específico em cães: (A) ELISA-LPG e (B) ELISA-ATL. As linhas representam o ponto de corte (A = 0,251 e B = 0,288) dos ensaios.....43
- Figura 6 – Diagrama das curvas ROC do ensaio de ELISA para determinar a especificidade dos ensaios para detecção de IgG anti-*L. infantum*. Foram utilizados como antígeno o

lipofosfoglicano (LPG) ou antígeno total lisado (ATL). Análise: SPSS v.12.0: (A) ELISA-LPG e (B) ELISA-ATL.....	45
Figura 7 – Resultados individuais para amostras controles de soros de cães clinicamente saudáveis, parasitados e clinicamente doentes, infectados naturalmente por <i>L. braziliensis</i> (A) e experimentalmente por <i>T. cruzi</i> (B). Os soros foram testados por ELISA indireto usando LPG e ATL como antígenos. As linhas representam o ponto de corte (A = 0,251 e B = 0,288) dos ensaios.....	46
Figura 8 – Resultados individuais para amostras de soros controles de animais infectados por <i>H. canis</i> , <i>E. canis</i> , <i>B. canis vogeli</i> e <i>A. platys</i> e cães apresentando coinfeção com dois ou três hemoparasitos. (A) ELISA-LPG e (B) ELISA-ATL para a identificação de anticorpos IgG específicos de <i>L. infantum</i> . As linhas representam o ponto de corte (A = 0,251 e B = 0,288) dos ensaios.....	47
Figura 9 – Cinética das DOs nas sete avaliações sequenciais (M0 a M6) das amostras de soros de cães imunizados com a vacina Leishmune® (Fort Dodge®) que contém antígeno ligante fucose manose (FML) liofilizado (1,5 mg) e saponina (0,5 mg), em que M0 corresponde ao momento antes da imunização; M1, M2, M3 (21 dias após cada dose de vacina); M4, M5 e M6 (intervalos de 2 meses após última dose de vacina). (A) ELISA-LPG e (B) ELISA-ATL para a identificação de anticorpos IgG específico de <i>L. infantum</i> . As linhas representam o ponto de corte (A = 0,251 e B = 0,288) dos ensaios. As amostras dos soros dos cães imunizados foram cedidas por Fernandes et al. (2014)	48
Figura 10 – Cinética das DOs nas sete avaliações sequenciais (M0 a M6) das amostras de soros de cães imunizados com a vacina Leish-Tec® (Ceva Hertape®) que contém 0,10 mg do antígeno A2 e 0,5mg de saponina em 0,9% de solução salina (1,0 mL), em que M0 corresponde ao momento antes da imunização; M1, M2, M3 (21 dias após cada dose de vacina); M4, M5 e M6 (intervalos de 2 meses após última dose de vacina). (A) ELISA-LPG e (B) ELISA-ATL para a identificação de anticorpos IgG específico de <i>L. infantum</i> . As linhas representam o ponto de corte (A = 0,251 e B = 0,288) dos ensaios. As amostras dos soros dos cães imunizados foram cedidas por Fernandes et al. (2014)	49
Figura 11 – Distribuição dos resultados individuais no momento zero (M0) por grupos de estadiamento clínico das amostras de soros de cães testados por ensaio de referência ELISA “in house” com ATL de <i>Leishmania</i> e testados por outro sistema imunoenzimático com antígeno LPG de <i>L. infantum</i> para a identificação de anticorpos IgG específicos em cães: (A) ELISA-LPG e (B) ELISA-ATL. G1 = estadio 1; G2 = estadio 2; G3 = estadio 3; G4 = estadio	

4. G1 ao G4 n=96 cães positivos e 68 soros controles negativos. As linhas representam o ponto de corte ($A = 0,251$ e $B = 0,288$) dos ensaios.....	51
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Número de amostras (n=73) de soros utilizados para realizar ensaios ELISA de reação cruzada com antígenos de LPG e ATL	36
Tabela 2 – Validação dos parâmetros encontrados para os testes ELISA desenvolvidos para identificação de anticorpos IgG específicos contra antígenos de LPG e ATL de <i>L. infantum</i> , usando técnicas de identificação/isolamento do parasito ou PCR para <i>L. infantum</i> como padrão ouro	44
Tabela 3 - Classificação clínica da leishmaniose canina dos 97 cães sororreagentes com base no perfil sorológico, sinais clínicos e achados laboratoriais para cada estadio.....	50
Tabela 4 – Ensaio de ELISA desenvolvidos para o diagnóstico da infecção com <i>L. infantum</i> , com suas respectivas especificidades, sensibilidades, acurácias e achados de reações cruzadas em soros de cães	58

LISTA DE SIGLAS

ATL	Antígeno total lisado (de <i>Leishmania infantum</i>)
AUC	Área sob a curva (do inglês <i>area under the curve</i>)
BOD	Estufa com demanda de oxigênio e umidade
CFMV	Conselho Federal de Medicina Veterinária
CSA	Antígeno solúvel bruto
DAT	Teste de aglutinação direta
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade óptica
DRC	Doença renal crônica
DTH	Reação de hipersensibilidade tardia
ELISA	Ensaio imunoenzimático por adsorção à placa
FC	Fixação do Complemento
FML	Ligante Fucose Manose
IFI	Imunofluorescência indireta
IgG, IgG2	Anticorpos da classe G e subclasse G2
IL-12, IL-2, IL6	Interleucinas
IRIS	<i>International Renal Interest Society</i>
LABIMUNO	Laboratório de Biologia Molecular – ICS – UFBA
LIVE	Laboratório de Infectologia Veterinária – UFBA
LPG	Lipofosfoglicano
ELISA-LPG	ELISA com antígeno LPG
LPGs	Lipofosfoglicanos
ELISA-ATL	ELISA com antígeno total solúvel
LV	Leishmaniose visceral
LVC	Leishmaniose visceral canina
MAPA	Ministério da Agricultura e Pecuária e Abastecimento
MO	Medula óssea
MS	Ministério da Saúde
NNN	Novy-Mac-Neal-Nicolle
PBS	Salina tamponada com fosfato
PBST	Salina tamponada com fosfato com detergente Tween
PCR	Reação em cadeia da polimerase
rK26, rK39 e rA2	Antígenos recombinantes de <i>Leishmania</i>
ROC	<i>Receiver operating characteristics</i>
SMF	Sistema mononuclear fagocitário
TNF	Fator de necrose tumoral
TR DPP-LVC®	Teste rápido <i>Dual Path Platform</i>
UFBA	Universidade Federal da Bahia
UFES	Universidade Federal do Espírito Santo
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UFOP	Universidade Federal de Ouro Preto
UPC	Razão proteína:creatinina urinária
β-ME-ELISA	Ensaio imunoenzimático tratado com β-mercaptoetanol

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1 A leishmaniose visceral e <i>Leishmania infantum</i>	20
2.2 Leishmaniose visceral canina.....	21
2.3 Aspectos da resposta imune canina à infecção por <i>L. infantum</i>.....	22
2.4 Diagnóstico da resposta imune humoral do cão à infecção por <i>L. infantum</i>...	23
2.5 Diagnóstico clínico-laboratorial e estadiamento da LVC.....	24
2.6 Desafios no diagnóstico da LVC.....	25
2.7 Vacinação canina como estratégia profilática para a LVC no Brasil.....	27
2.8 Lipofosfoglicanos (LPGs) de <i>L. infantum</i> como nova proposta para o diagnóstico.....	28
3 JUSTIFICATIVA	31
4 HIPÓTESE	32
5 OBJETIVOS.....	32
5.1 Objetivo geral	32
5.2 Objetivos específicos	33
6 METODOLOGIA	33
6.1 Seleção dos cães com LV e cães controles.....	33
6.2 Identificação parasitológica direta por citologia de <i>Leishmania</i> sp.....	34
6.3 Cultivo de <i>Leishmania</i> sp. a partir do aspirado esplênico.....	34
6.4 Extração de DNA do aspirado esplênico e realização da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção de <i>L. infantum</i>.....	35
6.5 Cultivo de <i>L. infantum</i> para obtenção de antígeno total lisado (ATL) de promastigotas.....	35
6.6 Amostras de soros de cães para ensaio de avaliação de reação cruzada.....	36
6.7 Aspectos éticos.....	38
6.8 Purificação de lipofosfoglicano (LPG) de <i>L. infantum</i>.....	38
6.9 <i>Western blotting</i> para reconhecimento do antígeno purificado LPG de <i>L. infantum</i>.....	38
6.10 Desenvolvimento dos testes ELISAs com antígeno total lisado (ATL) e com lipofosfoglicano (LPG).....	39
6.11 Análises matemáticas para padronização dos testes ELISAs indiretos.....	40
6.12 Estadiamento clínico-laboratorial dos cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i>.....	41
6.13 Análises estatísticas	41
7 RESULTADOS	42
7.1 <i>Western blotting</i> para reconhecimento antigênico da solução purificada de lipofosfoglicano (LPG) de <i>L. infantum</i>.....	42
7.2 Padronização dos ensaios ELISA-LPG e ELISA-ATL com amostras controle.....	43
7.3 Resultados da validação dos ensaios ELISA-LPG e ELISA-ATL	44
7.4 Avaliação de reatividade cruzada entre soros de cães com outras infecções e o LPG.....	45
7.5 ELISA-LPG e ELISA-ATL com soros de cães imunizados com vacinas comerciais.....	47
7.6 Comparação entre os ensaios ELISA-LPG e ELISA-ATL com soros de cães infectados por <i>L. infantum</i> segundo o estadiamento clínico de LVC.....	49

8 DISCUSSÃO	51
9 CONCLUSÕES	59
10 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	59
REFERÊNCIAS.....	60
ANEXO 1.....	74
ANEXO 2.....	75

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é uma zoonose crônica e letal, quando não tratada, transmitida por insetos vetores do gênero *Lutzomyia*, causada por parasitos intracelulares pertencentes ao complexo *Leishmania donovani*, sendo a espécie *Leishmania donovani* na Índia e África Central, enquanto que no Oriente Médio, China, Mediterrâneo e nas Américas, *Leishmania infantum* (sinonímia *chagasi*) é o agente prevalente (MAURÍCIO; STOTHARD; MILES, 2000). Os reservatórios silvestres potenciais, no Brasil, são as raposas e gambás e o principal reservatório doméstico é o cão (*Canis familiaris*), sendo este identificado como principal fonte de infecção para o vetor em área urbana (COSTA, 2005; MONTEIRO, 2010; OLIVEIRA, 2012.).

A LV é considerada a terceira doença transmitida por vetores mais importante do mundo, não só pelo seu alto grau de letalidade, mas também pela ampla distribuição mundial, sendo endêmica em 98 países, com milhares de novos casos relatados anualmente, dos quais 90% concentram-se na Índia, Nepal, Sudão, Bangladesh e Brasil (DINIZ et al., 2008; ROMERO; BOELAERT, 2010; ALVAR et al., 2012).

Na LV no Novo Mundo, *Leishmania infantum* é a espécie comumente isolada nos pacientes (BRASIL, 2014). A transmissão das leishmanioses envolve diversas espécies de flebotomíneos fêmeas infectadas (Diptera:Psychodidae:Phlebotominae) do gênero *Lutzomyia* (RANGEL, LAINSON, 2009). No Brasil, os vetores da LV são *Lutzomyia longipalpis* (LUTZ, NEIVA, 1912), que apresentam uma ampla distribuição por todo o país (BRASIL, 2014); e *Lutzomyia cruzi* (MANGABEIRA, 1938), no estado de Mato Grosso do Sul (MISSAWA et al., 2011; BRASIL, 2014).

A leishmaniose visceral canina (LVC) é endêmica em várias regiões do Brasil com prevalência variando entre 23,8 e 50,3% (LEÇA-JÚNIOR et al., 2015; SOCCOL et al., 2017). A susceptibilidade ou resistência dos cães infectados depende da interação entre o sistema imunológico e o parasito (SOULAT; BOGDAN, 2017). A avaliação de diferentes fatores como carga parasitária, resposta humoral ou a imunidade mediada por células, determinada pela expressão de citocinas ou pelo teste intradérmico, têm valor preditivo sobre o progresso da infecção e podem ser tomados como marcadores de resistência ou suscetibilidade à LVC (ABBEHUSEN et al., 2017; SOULAT; BOGDAN, 2017). O equilíbrio estabelecido entre os fatores envolvidos na resposta imune do hospedeiro contra o parasito reflete-se na variedade de formas clínicas que podem ser observadas em cães naturalmente infectados, ou na ausência de sinais clínicos até desenvolver leishmaniose clínica grave (SOLANO-GALLEGO et al., 2009).

Leishmania é um parasito com grande capacidade de evasão do sistema imune. Para sobreviver e se multiplicar de forma tão bem-sucedida no interior das células monocíticas fagocitárias e na circulação do hospedeiro, os parasitos desenvolveram adaptações bioquímicas e morfológicas profundas. Os glicoconjugados são moléculas que participam nestes processos de adaptação; eles são extremamente importantes para a sobrevivência e patogênese do parasito. Os glicoconjugados de superfície mais estudados e abundantes nos parasitos do gênero *Leishmania* são os lipofosfoglicanos (LPGs), que formam um denso glicocálix que recobre toda a superfície do parasito e do flagelo (ASSIS et al., 2012a; FRANCO; BEVERLEY; ZAMBONI, 2012).

Os LPGs são moléculas-chave que medeiam passos importantes e essenciais à virulência da *Leishmania*, tanto no organismo do vetor flebotomíneo quanto no hospedeiro mamífero, e induzem mecanismos de sobrevivência e evasão ao sistema imune. São moléculas altamente imunogênicas, capazes de estimular tanto a resposta inata quanto a adaptativa em modelos murinos, o que os torna alvos promissores para produção de futuras vacinas e testes de diagnóstico (COELHO-FINAMORE et al., 2011; ASSIS et al., 2012a; FRANCO; BEVERLEY; ZAMBONI, 2012).

Na leishmaniose visceral canina (LVC), vários são os desafios para se estabelecer ferramentas diagnósticas com alta sensibilidade e especificidade, particularmente, em áreas endêmicas quando se trata de cães sem sinais clínicos (SOLANO-GALLEGO et al., 2000; GOMES et al., 2008; BRASIL, 2014). No Brasil, o Ministério da Saúde recomenda como protocolo para diagnóstico da LVC, o teste rápido TR-DPP®, ensaio imunocromatográfico de duas plataformas para triagem e como teste de confirmação o ensaio imunoenzimático (ELISA) indireto EIE®, que apresentam sensibilidade que varia de 92,1% e 89,5% respectivamente em cães sem sinais clínicos e para cães com sinais clínicos varia de 89,4% e 91,5% respectivamente e especificidade tem descrição de 95,1% (TR-DPP®) e 77,8% (ELISA) (LAURENTI et al., 2014), uma vez que não há um método facilmente acessível para o diagnóstico de LV em cães com e sem sinais clínicos que ofereça 100% de especificidade e sensibilidade (FERREIRA et al., 2007). ELISA com antígeno bruto de *Leishmania* e teste rápido DPP, têm precisão e qualidade no delineamento moderada para diagnóstico da LVC sendo que a implementação e análise de estudos de validação de testes diagnósticos para essa doença requerem urgentemente melhorias (PEIXOTO; OLIVEIRA; ROMERO, 2015).

Até o momento, não existem estudos sobre as respostas desencadeadas por LPGs em cães com LV, o que torna o presente estudo relevante. Os dados obtidos contribuem para uma

melhor compreensão da resposta imunológica induzida pelos LPGs na infecção por *Leishmania* sp. em cães provenientes de áreas endêmicas da Bahia.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A leishmaniose visceral e *Leishmania infantum*

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença parasitária provocada pelo tripanossomatídeo do gênero *Leishmania* e transmitida pelo artrópode *Lutzomyia* (SRINIVASAN et al., 2018).

O Brasil concentra cerca de 97% dos casos humanos de LV (LARA-SILVA et al., 2015), resultantes possivelmente da interação de múltiplos fatores, tais como trânsito intenso de pessoas e cães infectados para áreas onde o vetor está presente, as mudanças climáticas e ambientais que favoreceram a disseminação dos flebotomíneos, a urbanização e a coinfeção com patógenos como o HIV (DUPREY et al., 2006; WITT et al., 2009). De 1990 a 2016 o Brasil apresentou 81.469 casos humanos confirmados desta doença, com média anual de 3.134 novos casos e letalidade registrada em 10% dos casos (ALVARENGA et al., 2010; BRASIL, 2016a). Na Bahia ocorreram 14.946, com média anual de 575 casos confirmados durante os últimos 26 anos (BRASIL, 2016a).

L. infantum pertence ao complexo *Leishmania donovani* e ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae. É um protozoário intracelular obrigatório de células do sistema fagocítico mononuclear (SMF). A infecção é transmitida pelo inseto vetor pertencente à família Psychodidae, gênero *Lutzomyia*, e no Brasil a principal espécie transmissora é *L. longipalpis* (LAINSON; SHAW, 1972) e *L. cruzi*, no Estado de Mato Grosso (BRASIL, 2011b; MISSAWA et al., 2011).

O ciclo de vida da *L. infantum* inicia-se com a infecção do *Lutzomyia* spp. durante a realização do repasto sanguíneo em um mamífero infectado, quando ingere macrófagos parasitados por formas amastigotas do protozoário. No trato digestório anterior do vetor, ocorre diferenciação do parasito na forma flagelada, denominadas promastigotas onde sofrem metaciclogênese. As formas promastigotas procíclicas transformam-se em promastigotas paramastigotas e colonizam o esôfago e a faringe do flebotomíneo, onde se diferenciam na forma infectante, chamada promastigota metacíclica. O vetor, ao realizar um novo repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado, libera as promastigotas metacíclicas que são

fagocitadas por macrófagos da epiderme, onde se diferenciam em formas amastigotas e multiplicam-se intensamente até o rompimento da membrana celular (SACKS, 1989).

2.2 Leishmaniose visceral canina

Algumas espécies silvestres são consideradas reservatórios deste parasito, porém o cão (*Canis familiaris*) se destaca por ser considerado o principal reservatório doméstico e fonte de infecção para o vetor. Tendo em vista a proximidade com os humanos e sua marcante presença nas cidades, os cães são considerados como uma peça-chave no ciclo epidemiológico da LV, principalmente a partir da década de 80, devido aos processos que facilitaram a disseminação do vetor nos centros urbanos (DINIZ et al., 2008).

As estratégias de controle da LVC utilizadas no Brasil consistem no diagnóstico e tratamento dos casos em humanos, monitoramento e sacrifício dos cães soropositivos para anticorpos anti-*Leishmania*, manejo ambiental e controle químico do vetor (MAIA-ELKHOURY et al., 2008; DUARTE et al., 2016). A eutanásia dos cães positivos é uma medida bastante controversa (DINIZ et al., 2008; ROMERO; BOELAERT, 2010), porém é sugerida pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2014).

No Brasil, o tratamento de cães com LVC ainda é tema polêmico. O uso de fármacos antiparasitários com antimoniais ou anfotericina B só é realizado em humanos, e tais fármacos são proibidos, de acordo com as normas do Ministério da Saúde descritas na Portaria Interministerial nº 1.426, de 11 de julho de 2008, para uso em cães ou outros animais domésticos com LV (BRASIL, 2014; 2016). Os antimoniais são distribuídos pelo governo exclusivamente à população humana (BRASIL, 2014; 2016).

Diferentemente, na Europa os antimoniais são amplamente comercializados para uso como terapêutica clássica da LVC no âmbito veterinário. Os protocolos mais utilizados na Europa associam antimoniais pentavalentes e o alopurinol (FERRER et al. 1995; RIBEIRO, 2007; SOLANO-GALLEGO et al., 2009). O alopurinol, substância do grupo dos análogos das purinas, as pirazolopirimidinas, vem sendo citado como potencialmente eficaz no tratamento da LVC (AMUSATEGUI et al., 1995; FERRER et al., 1995). O alopurinol é considerado um fármaco anti-*Leishmania* de ação parasitostática e/ou imunomoduladora, indicado na literatura como medicação única para tratamento a longo prazo (FERRER et al., 1995; SOLANO-GALLEGO et al., 2009).

Existem publicações de estudos sobre diversos fármacos e protocolos terapêuticos para a LVC realizados no Brasil (MARZOCHI et al., 1985; VIRBAC, 2016; NERY et al., 2017) e na Europa (FERRER et al., 1995; RIBEIRO et al., 2007; MIRÓ et al., 2009; SOLANO-GALLEGO et al., 2011). Os protocolos de tratamento citados associam drogas antiparasitárias, tratamento de suporte, e, em alguns casos, drogas supressoras da resposta humoral e anti-inflamatórias (AMUSATEGUI et al., 1995; NERY et al., 2017).

Em termos oficiais, no Brasil, a partir de 2016 o tratamento de cães portadores de LVC com miltefosina passou a ser uma possibilidade legal, em conformidade com a Nota Técnica Conjunta nº 001/2016 MAPA/MS, do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL, 2016b). Entretanto, é controversa a eficácia e os efeitos da miltefosina no tratamento da LVC no Brasil (ANDRADE et al., 2011).

2.3 Aspectos da resposta imune canina à infecção por *L. infantum*

Diferentes estudos são desenvolvidos a fim de esclarecer os mecanismos responsáveis pela resistência ou susceptibilidade de cães à LVC. Porém, sabe-se que a susceptibilidade ou resistência ao desenvolvimento da LV canina dependem da resposta imune desencadeada pelo parasito após a infecção (PINELLI et al., 1994).

A infecção por *Leishmania* em cães pode se manifestar como infecção subclínica, doença auto limitante ou enfermidade progressiva e grave (SOLANO-GALLEGO et al., 2009).

A determinação da predominância de resposta Th1, Th2 ou a presença de ambas, irá influenciar no quadro clínico do animal (STRAUSS-AYALI et al. 2007; TRAVI et al. 2014; BOGGIATTO et al. 2010). A resposta imunológica pode ser determinada pela quantificação de citocinas pro-inflamatórias ou anti-inflamatórias, produzidas por células mononucleares de sangue periférico de cães com LV estimuladas *in vitro* com antígenos de *Leishmania*. O aumento na produção de citocinas como IFN- γ e TNF- α , caracteriza uma resposta do tipo Th1, geralmente, observada em cães com perfil de resistência a infecção por *Leishmania* (MATTNER et al., 1996; WEI et al., 1999). Quando ocorre a modulação da resposta para o tipo Th2, observa-se elevação na expressão de IL-10 e TGF- β , associados à elevação de anticorpos séricos IgM, IgA, IgE ou IgG-*Leishmania* específicos e uma queda na expressão de linfócitos T CD8⁺, que apresenta potencial citotóxico (PINELLI et al, 1994; GOTO, PRIANTI, 2009).

O padrão de resposta imune apresentando supressão de células Th2, com produção elevada de IL-10 em respostas imunes não protetoras, é observado em cães com doença ativa,

uma vez que o aumento desta citocina é relacionado positivamente ao aumento da carga parasitária e gravidade do estado clínico (REIS et al., 2010). Dessa forma, a doença clínica pode variar desde uma discreta dermatite papular, associada à imunidade específica celular e baixa resposta humoral, até uma doença grave, caracterizada por glomerulonefrite devido à deposição de imunocomplexos, em decorrência a uma resposta humoral massiva e altas cargas parasitárias (SOLANO-GALLEGO et al., 2009).

A associação dos achados clínicos com os mecanismos imunes deve ser melhor estudada, tanto em cães com sinais clínicos quanto naqueles com infecção subclínica. A compreensão das respostas sistêmicas e locais possibilitarão o avanço no desenvolvimento de protocolos terapêuticos e/ou profiláticos (HOSEIN; BLAKE; SOLANO-GALLEGO, 2017).

2.4 Diagnóstico da resposta imune humoral do cão à infecção por *L. infantum*

A LV canina está frequentemente associada à resposta humoral intensa, porém não protetora, pois falha em controlar a infecção (PINELLI et al., 1994; REIS et al., 2006b; TORRES et al., 2010; ROATT et al., 2017). Os níveis de imunoglobulinas específicas para *Leishmania* detectáveis em cães infectados e com doença ativa são maiores que nos infectados sem sinais clínicos (INIESTA et al., 2005; REIS et al., 2006a; REIS et al., 2010; TEIXEIRA NETO et al., 2010). A densidade parasitária tecidual é diretamente proporcional à intensidade de doença clínica assim como às altas titulações de anticorpos anti-*Leishmania* (QUINNELL et al., 2003; TORRES et al., 2010; REIS et al., 2010).

A LVC apresenta características muito similares às da doença humana também com relação aos isotipos e subclasses de anticorpos presentes e predominantes no soro. A produção de anticorpos das classes IgA, IgE, e IgM e mostra-se como marcadora da doença a classe IgG. O aumento nos níveis de IgG também é observado e associado à doença ativa, sendo a subclasse IgG1 associada à susceptibilidade em animais sem sinais clínicos (TEIXEIRA NETO et al., 2010; COURA-VITAL et al., 2011) e doença grave (FUJIWARA et al., 1992; REIS et al., 2006b; RODRIGUEZ-CORTES et al., 2007), enquanto a IgG2 predomina em cães naturalmente resistentes ou vacinados (FUJIWARA et al., 1992; RAFATI et al., 2005; SOLANO-GALLEGO et al., 2009; FERNANDES et al., 2014).

Estudos que avaliam a resposta de subclasses de IgG apresentam resultados divergentes, havendo os que reportam predominância de IgG2 em cães com sinais clínicos de doença ativa (FERNANDEZ-PEREZ et al., 2003; INIESTA et al., 2005; DAY, 2007).

As investigações que encontraram uma associação entre predominância de IgG2 e maior intensidade de doença clínica em cães, utilizaram em seus ensaios sorodiagnósticos o teste ELISA indireto com antígeno bruto de promastigotas (ALVAR et al., 2004; ROSÁRIO et al., 2005) ou antígeno bruto de *L. major* (De ARRUDA et al., 2013, 2016) ou antígenos recombinantes para o diagnóstico indireto de leishmaniose visceral (GOMES et al., 2008; ROSÁRIO et al., 2005).

A afinidade do antígeno pode ser outro fator de discrepância, enquanto o antígeno recombinante interage com frações definidas dos anticorpos séricos, o antígeno do lisado total do parasito interage com anticorpos dirigidos contra o parasito (PALATNIK-DE-SOUSA et al., 2009).

Considera-se um bom antígeno para diagnóstico adequado da *Leishmania* sp., aquele que apresentar elevada sensibilidade, especificidade (NOGUEIRA, 2014). Deve também ser uma molécula capaz de diferenciar animais sem sinais clínicos daqueles que apresentem sinais clínicos leves ou graves, que possam diferenciar animais não vacinados daqueles que receberam vacina (DUARTE et al., 2016).

2.5 Diagnóstico clínico-laboratorial e estadiamento da LVC

Os cães infectados com *L. infantum* apresentam sinais clínicos e achados laboratoriais diversos, decorrentes principalmente de doença imunomediada devido à formação e deposição capilar de imunocomplexos (DANTAS-TORRES, 2008). Achados de uveíte, vasculite, imunossupressão, anemia, hipergamaglobulinemia, esplenomegalia, hepatomegalia e dermatoses são frequentes e o óbito ocorre por falência renal e/ou infecções secundárias por diferentes agentes (BARROUIN-MELO et al., 2006; REIS et al., 2006a; SOLANO-GALLEGO et al., 2009).

Antes de iniciar um protocolo de tratamento para LVC, é necessário avaliar os seguintes parâmetros em todos os animais doentes: em primeiro lugar observar a ocorrência de lesões em alguma parte do corpo, principalmente olhos, pele ou unhas. Avaliar e classificar o estado nutricional. No exame físico observar aumento do volume de linfonodos, baço ou fígado. Na análise clínico-laboratorial solicitar: hemograma, proteinograma, concentração sérica de ureia, creatinina e da atividade sérica da enzima alanina aminotransferase (ALT). Realizar exame indireto para titulação de anticorpos e exame direto parasitológico (AMUSATEGUI et al., 1995; SOLANO-GALLEGO et al., 2009), e também realizar a urinálise associada à razão

proteína:creatinina urinárias (UPC) (SOLANO-GALLEGO et al., 2009), com estas informações é possível realizar o estadiamento clínico de cada animal com leishmaniose.

No estadio I os cães soropositivos apresentam-se com sinais clínicos leves da doença como linfonomegalia periférica ou dermatites papulares, sem alterações nos parâmetros laboratoriais. No estadio II os cães podem apresentar lesões cutâneas difusas ou simétricas como dermatite esfoliativa, onicogribose, ulcerações, anorexia, perda de peso, febre e epistaxe. No laboratório, o hemograma apresenta anemia e o proteinograma com alterações significativas como hipoalbuminemia e hipergamaglobulinemia, redução dos valores da razão albumina:globulina, porém o perfil renal permanece preservado. No estadio III, além das alterações mencionadas podem apresentar lesões provocadas por imunocomplexos como vasculite, artrite, uveíte e glomerulonefrite. No laboratório clínico já aparecem valores compatíveis com lesão renal. No estadio IV ocorre comprometimento orgânico de forma mais grave, pode-se observar tromboembolismo pulmonar, ou síndrome nefrótica e doença renal terminal. Nos exames laboratoriais, as alterações no hemograma são evidentes, como anemia grave sem regeneração e na bioquímica sérica e urinária há comprometimento grave de órgãos importantes para a sobrevivência do animal, como os rins (SOLANO-GALLEGO et al., 2009, 2011).

A frequência da monitorização dos parâmetros clínico-patológicos pode variar em cada paciente, entretanto, os aspectos clínico-laboratoriais devem, na maioria dos casos, ser monitorizados mais frequentemente antes do tratamento, após o primeiro mês de tratamento e, posteriormente, a cada três a quatro meses. Com a remissão dos sinais clínicos e estabilização do quadro, a partir do momento que o cão estiver clinicamente recuperado, o acompanhamento poderá ser realizado a cada seis meses ou uma vez ao ano (SOLANO-GALLEGO et al., 2009).

2.6 Desafios no diagnóstico da LVC

Os exames laboratoriais para diagnóstico da infecção canina são diretos ou indiretos. Os exames diretos baseiam-se na demonstração do parasito em amostras biológicas do cão suspeito por métodos parasitológicos, ou do DNA dos parasitos por métodos moleculares (BARROUIN-MELO et al., 2006; SOLCÁ et al., 2014; MAGALHÃES-JUNIOR et al., 2016). Exemplos de métodos laboratoriais indiretos incluem os testes imunodiagnósticos, como os que detectam imunoglobulinas anti-*Leishmania*, e exames de patologia clínica, como hemograma, bioquímica sérica e sumário de urina, que evidenciam as alterações patológicas existentes no

organismo causadas pela presença, multiplicação e resposta imunológica e inflamatória do cão infectado (BARROUIN-MELO et al., 2006; SOLANO-GALLEGO et al., 2009, 2011).

Os exames diretos para demonstração do parasito são: citologia de material de punção de medula óssea, do baço, do fígado, de linfonodos, de sangue total e pele; cultura em meio bifásico Novy-MacNeal-Nicolle (NNN) ou similar; inoculação em hamster para isolamento e identificação, além de exame histopatológico de diferentes amostras de tecidos. Os métodos imunológicos incluem a reação de hipersensibilidade tardia (DTH do inglês *delayed type hypersensitivity*); a imunofluorescência indireta (IFI); a hemaglutinação passiva; a fixação do complemento (FC); o teste de aglutinação direta (DAT); o ensaio imunoenzimático por adsorção em placa (ELISA, do inglês *enzyme-linked immunosorbent assay*); a reação de Dot-ELISA (ELISA em membrana de nitrocelulose ou similar); a citometria de fluxo (FACS, do inglês *fluorescence activated cell sorter*) e o teste imunológico *Western Blot* (TANNÚS et al., 2007; SAMPAIO et al., 2009; ZANINI et al., 2010).

Dentre os testes citados, se destaca o ensaio ELISA indireto, que é o método mais utilizado para o imunodiagnóstico em cães (ROMERO, BOELAERT, 2010). Apesar da maioria dos animais nos estágios iniciais da doença demonstrarem soronegatividade, posteriormente ocorre grande produção de anticorpos da classe IgG, o que facilita a realização dos testes sorológicos (GOTO, PRIANTI, 2009). O ELISA é um teste relativamente rápido, com o qual pode-se testar várias amostras ao mesmo tempo, com boa sensibilidade e especificidade, permitindo a detecção de baixos títulos de anticorpos, sendo, portanto, o método sorológico oficial utilizado para detecção dos animais soropositivos (ROMERO, BOELAERT, 2010). O ELISA consiste na reação de anticorpos presentes nos soros com antígenos solúveis e purificados de *Leishmania* obtidos a partir de cultura *in vitro*, no entanto, pode apresentar reações cruzadas com parasitos dos gêneros *Trypanosoma*, *Babesia*, *Ehrlichia*, *Toxoplasma* e *Neospora* (ZANETTE et al., 2014).

De acordo com o Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral Canina do Ministério da Saúde do Brasil, o ensaio imunoenzimático indireto (ELISA) era utilizado como método de triagem, em conjunto com a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) – (titulação $\geq 1:40$) utilizada como teste confirmatório, até 2011 (BRASIL, 2014). Até então, para avaliar a soroprevalência em inquéritos caninos em saúde pública, estavam disponíveis exames para o diagnóstico sorológico recomendados pelo Ministério da Saúde como a RIFI e o ELISA. A RIFI é utilizada para o diagnóstico de várias doenças causadas por parasitos, entretanto pode apresentar reações cruzadas principalmente com outras espécies dos gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma*. O resultado é considerado sororreagente quando apresenta título igual ou

superior ao ponto de corte que é a diluição de 1:40 (ZANETTE et al., 2014). O resultado também é considerado sororreagente quando o valor da densidade óptica é igual ou superior ao ponto de corte que é estabelecido pela média dos controles negativos mais três vezes o desvio padrão (BRASIL, 2014).

A partir do final de 2011, foram implantadas novas recomendações para o diagnóstico sorológico da LVC, por apresentarem maior acurácia que os testes anteriores. Desde então, o teste imunocromatográfico rápido (TR-DPP LVC[®]), que utiliza uma quimera entre proteínas recombinantes (rK28, junção de K26 e K39), foi adotado como teste de triagem, e o ELISA indireto (EIE – LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA Bio-Manguinhos[®]) como ensaio confirmatório (BRASIL, 2011). Segundo Mendonça et al. (2017), a sensibilidade e especificidade em área endêmica para cães positivos, com e sem sinais clínicos, foi de 98% e 98% no TR-DPP LVC[®] e 91% e 98% no ELISA indireto que usa o antígeno total lisado de *L. major*.

2.7 Vacinação canina como estratégia profilática para a LVC no Brasil

Como estratégia profilática, duas vacinas contra LVC foram comercializadas no mercado brasileiro, a Leishmune[®] e a Leish-Tec[®]. A Leishmune[®] utilizava o antígeno glicoproteico complexo fucose-manose-ligante (FML), presente na superfície da *Leishmania* em todos os estágios do ciclo de vida, juntamente com saponina como adjuvante (DA SILVA et al., 2001; PARRA et al., 2007; PALATNIK-DE-SOUSA, 2012), porém, foi retirada do mercado em 2014. A vacina Leish-Tec[®] contém a proteína de superfície recombinante A2, que é uma proteína específica do estágio amastigota de várias espécies de *Leishmania*, associada à saponina (RESENDE, 2008; OLIVEIRA et al., 2011). Somente a Leish-Tec[®] é a vacina aprovada desde 2007 pelos critérios da Instrução Normativa Interministerial 31/2007 do Ministério da Saúde e MAPA (CEVA HERTAPE, 2015). No entanto, um estudo conduzido em área altamente endêmica demonstra um tempo médio de soroconversão maior entre os cães submetidos à Leish-Tec[®] (~ 18 meses), quando comparados ao grupo de cães não vacinados presentes na mesma região (~ 9 meses), reforçando a necessidade da realização de maiores estudos acerca da eficácia dessa vacina (GRIMALDI et al., 2017).

A necessidade de se conhecer o efeito da vacina sobre os cães é imprescindível, pois uma das questões mais importantes a ser respondida é a diferenciação entre animais vacinados e infectados sororreagentes em testes imunológicos convencionais. Tal questão gera polêmica

quanto à realização de sacrifício de animais vacinados que soroconverteram, uma vez que os órgãos de saúde pública brasileiros se baseiam na positividade à sorologia para submeter os cães à eutanásia como meio de controle da infecção de LV em áreas endêmicas (BORJA-CABRERA et al., 2004; VON ZUBEN, DONALÍSIO, 2016). Em um estudo anterior, o teste ELISA com antígeno lisado total, realizado em amostras de soro de cães vacinados com Leish-Tec®, resultou em um pico de reatividade aos 21 dias após o reforço com segunda dose da vacina, enquanto o ELISA de amostras de soro de cães vacinados com a Leishmune® resultou em um pico de reatividade aos 21 dias após a primeira dose de vacina, demonstrando que animais vacinados apresentam soroconversão e assim podem ser confundidos com cães portadores de LVC natural (FERNANDES et al., 2014).

Diante da comercialização de vacinas contra a LVC, a estratégia brasileira de controle da leishmaniose baseada no sorodiagnóstico seguido de sacrifício de cães apresenta mais controvérsia (BRASIL, 2014, VON ZUBEN, DONALÍSIO, 2016), uma vez que tanto os cães vacinados como os infectados naturalmente apresentam resultados positivos nos testes sorológicos com os antígenos disponíveis no mercado (FERNANDES et al., 2014). Além disso, há risco de reações cruzadas com antígenos próximos filogeneticamente ao gênero *Leishmania*, como *Trypanosoma* (TRONCARELLI et al., 2009; SOUZA et al., 2013; ZANETTE et al., 2014). Existe outra categoria de cães soropositivos, os que não são de fato doentes, pois são resistentes ao desenvolvimento da infecção no organismo (PINELLI et al., 1994; IKEDA-GARCIA; MARCONDES, 2007; NICOLATO et al., 2013). Isso demonstra aspectos relacionados ao papel do cão na epidemiologia da LVC ainda desconhecidos, sugerindo a necessidade de reformulação das medidas empregadas para o seu controle (MADEIRA et al., 2003; ALVES et al., 2012). Portanto, umas das questões mais importantes é a diferenciação entre animais vacinados, infectados sororreagentes, daqueles não infectados sororreagentes, para evitar não só a eutanásia desnecessária de animais, como também permitir a adoção de medidas profiláticas mais eficazes (BORJA-CABRERA et al., 2004).

2.8 Lipofosfoglicanos (LPGs) de *L. infantum* como nova proposta para o diagnóstico

Os glicoconjugados são moléculas extremamente importantes para a sobrevivência e patogênese do parasito. Nos processos biológicos da *Leishmania*, os glicoconjugados são expressos tanto na membrana celular das formas promastigotas, quanto secretados pelos parasitos cultivados *in vitro*. As moléculas ancoradas incluem os lipofosfoglicanos (LPG),

glicoinositolfosfolipídeos (GIPLs), glicoproteínas 63 (GP63) e os proteofosfoglicanos (PPG). Muitos glicoconjugados são produzidos sob a forma de proteínas contendo fosfoglicanos (PGs), e incluem o proteofosfoglicano secretado (PPGs) e uma fosfatase ácida secretada (PAs) (ASSIS et al., 2012b, FRANCO; BEVERLEY; ZAMBONI, et al., 2012).

Os LPGs são os glicoconjugados de superfície da *Leishmania* mais estudados e mais abundantes, formando um denso glicocálix que recobre toda a superfície do parasito e do flagelo (DESCOTEAUX; TURCO, 1999). São predominantemente expressos em promastigotas e estão pouco expressos na forma amastigota intracelular (MOODI; HANDMAN, 1993; TURCO, 2003). A estrutura do LPG foi descrita em diversas espécies dermatrópicas e viscerotrópicas de *Leishmania* (SPÄTH et al., 2003; COELHO-FINAMORE, 2010). Basicamente, essas moléculas apresentam uma região de núcleo glicano conservada de Gal(a1,6)Gal(a1,3)Gal(f1,3)[Glc(a1)-PO₄]Man(a1,3)Man(a1,4)-GlcN(a1), ligada a uma âncora 1-O-alkil-2-liso-fosfatidilinositol. A parte saliente do LPG é outro domínio conservado que consiste numa espinha dorsal de unidades repetidas Gal(b1,4)Man(a1)-PO₄. A característica marcante dos LPGs, responsável pelo polimorfismo entre as espécies de *Leishmania*, está na variabilidade da composição de açúcares e na sequência de ramificação dos açúcares ligados à parte central (“core”) composta por unidades repetidas Gal/Man-fosfato (Figura 1) (SOARES et al., 2002; ASSIS et al., 2012a).

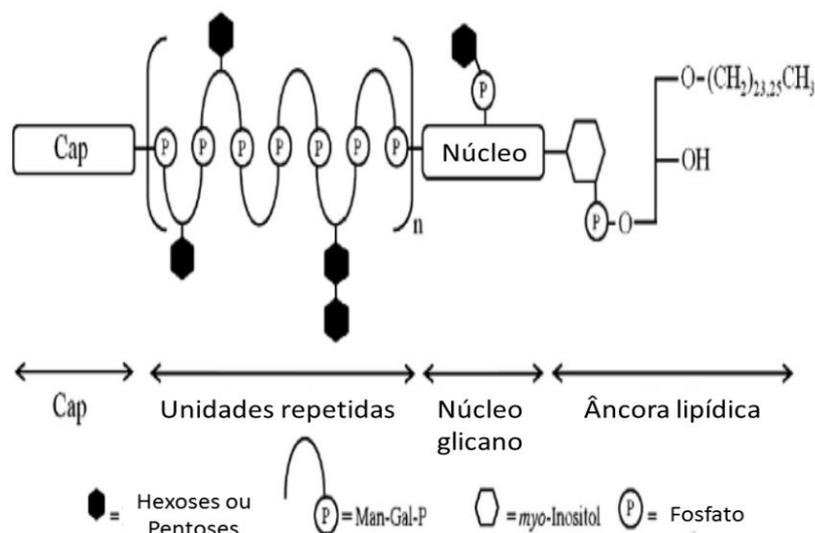


Figura 1 – Estrutura do lipofosfoglicano. O LPG tem quatro domínios, o fosfatidilinositol-ancorado, âncora lipídica liso-alkilglicerol, a região núcleo glicano conservada, as unidades repetidas e o cap. A estrutura e número de unidades repetidas de fosfoglicanos variam e dependem do estágio de diferenciação e das espécies de *Leishmania*. Gal = galactose; Man = manose; Core = núcleo hexasacarídeo glicano; Cap = oligossacarídeo neutro. Adaptado de Assis et al. (2012a).

Os LPGs têm sido considerados um fator de virulência parasitária e são associados a uma série de funções, tanto no hospedeiro vertebrado quanto no invertebrado (ASSIS et al., 2012b). No hospedeiro vertebrado, os LPGs estão associados à ligação e entrada do parasito nos macrófagos; modulação da produção de óxido nítrico e de radicais livres do oxigênio; inibição da proteína-quinase C; inibição da lise pelo complemento; impedimento da maturação do fagolisossoma; proteção contra enzimas lisossomais; e impedimento à produção de citocinas relacionadas à resposta Th1, principalmente IFN- γ e TNF- α (ASSIS et al., 2012b; FRANCO; BEVERLEY; ZAMBONI, 2012).

No vetor invertebrado, variantes de LPGs têm sido relacionadas à especificidade da *Leishmania* a diferentes vetores. O reconhecimento de sítios de ligação no epitélio digestório do inseto pelos LPGs da forma promastigota é um passo crucial na fixação do parasito durante o repasto sanguíneo. Além disso, essas moléculas impedem que o protozoário seja digerido por enzimas hidrolíticas. Durante o processo de diferenciação metaciclogênico, o LPG exerce papel crucial na mudança estrutural do protozoário (**Figura 2**) (COELHO-FINAMORE et al., 2011; FRANCO; BEVERLEY; ZAMBONI, 2012).

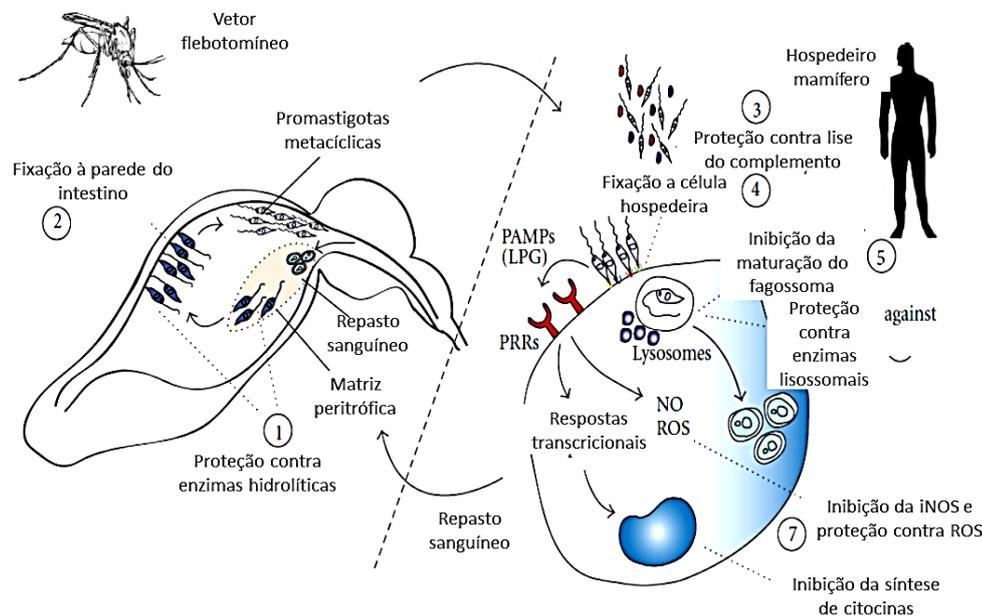


Figura 2 – O papel dos LPGs na infectividade e virulência da *Leishmania*. As funções dos LPGs incluem no inseto: (1) proteção física das promastigotas contra enzimas hidrolíticas no trato digestório do inseto; (2) ligação das promastigotas à parede intestinal; (3) no hospedeiro mamífero, os LPGs protegem as promastigotas contra a lise por proteínas do complemento; (4) ligação dos parasitos às membranas dos macrófagos ou a de células transitoriamente infectadas, como neutrófilos e células dendríticas; (5) inibição lisossômica da maturação do fagossoma; (6) proteção física contra a degradação do parasito por enzimas lisossomais; (7) modulação da ativação de macrófagos por meio do impedimento da síntese de compostos nitrogenados e citocinas. Adaptado de Franco; Beverley; Zamboni. (2012).

Estudos com LPGs purificados de *L. infantum* demonstraram que essas moléculas são fortes indutoras da resposta imune inata, por meio da interação com receptores das células do sistema imune inato, tais como os receptores Toll-like (TLR) (COELHO-FINAMORE et al., 2011). Essa interação induz a rápida ativação da tirosina quinase (PTKs) nos macrófagos e podem ativar a secreção de citocinas como IL-12 e TNF, além da síntese de NO pelos macrófagos. Além disso, ocorre ativação dos receptores do Toll 2, o que induz mecanismos inatos de defesa como a produção de intermediários reativos do oxigênio e nitrogênio, secreção de citocinas e quimiocinas, e diferenciação celular (FRANCO; BEVERLEY; ZAMBONI, 2012).

Os estudos pioneiros que envolvem a caracterização e resposta imune contra LPGs incluíram muitas espécies de *Leishmania* do Velho Mundo, como *L. donovani*, *L. major*, *L. tropica* e *L. aethiopica*. Em contraste, muitos aspectos da glicobiologia das espécies do Novo Mundo ainda são desconhecidos (ASSIS et al., 2012a).

Em estudo conduzido na região do Mediterrâneo que utilizou LPG purificado de *Leishmania* como antígeno em ensaio de imunoabsorbância, foi possível observar que esta molécula foi capaz de detectar resposta imune humoral em humanos com sensibilidade e especificidade de 92% respectivamente, sendo um bom antígeno para diagnóstico da Leishmaniose Visceral do Mediterrâneo (MAALEJ et al., 2003). A sensibilidade e especificidade de 92%, também foi descrita em estudo para diagnóstico da LV em pacientes co-infectados com HIV na Índia que utilizaram LPG purificado de *Leishmania* como antígeno no ELISA (SINGH, 2014).

3. JUSTIFICATIVA

A leishmaniose visceral (LV) é uma das doenças transmitidas por vetores mais importantes do mundo e que tem sido negligenciada em muitos países. Portanto, faz-se necessário o desenvolvimento de metodologias e ferramentas que auxiliem a produção de métodos profiláticos e diagnósticos mais precisos, principalmente para cães, que são reservatórios importantes do parasito e são submetidos à eutanásia quando soropositivos.

Os LPGs são moléculas-chave que medeiam diversos passos importantes essenciais à virulência da *Leishmania*, tanto no organismo do vetor flebotomíneo quanto no hospedeiro mamífero, e são alvos promissores para produção de futuras vacinas e testes de diagnóstico. É conhecida a importância dos LPGs na fisiopatologia do parasito e no direcionamento da

resposta imune no hospedeiro. Contudo, a literatura ainda carece de muitas informações a respeito das repostas em cães induzidas por tais moléculas. Um aspecto importante para ser investigado é entender como ocorre a resposta imune humoral do hospedeiro canino aos LPGs de *L. infantum*.

Até o momento, não houve estudos envolvendo avaliação das respostas desencadeadas por estas moléculas (LPGs) em cães com diferentes apresentações clínicas. Portanto, a realização do presente estudo possibilita um melhor entendimento da resposta imune humoral induzida pelos LPGs na infecção por *L. infantum* em cães. Com tais resultados é possível auxiliar no desenvolvimento de um teste para diagnóstico com possibilidade de diferenciar de forma efetiva os cães infectados dos não infectados, vacinados dos não vacinados. Este aspecto foi o objeto principal da proposta de Tese.

4 HIPÓTESE

O cão, principal reservatório da LV, apresenta resposta imune humoral detectável aos LPGs de *L. infantum*, resposta essa variável segundo o estadiamento clínico no cão naturalmente infectado e, no cão hígado, com estímulo imunogênico vacinal.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo geral

Avaliar a presença e características da reatividade de anticorpos a LPGs de *L. infantum* em soros de cães naturalmente infectados e com diferentes perfis clínicos de LV (sem sinais clínicos e com sinais clínicos variáveis e classificáveis).

5.2 Objetivos específicos

- ✓ Desenvolver o método baseado em ELISA indireto para pesquisa de anticorpos IgG de cão contra LPG de *L. infantum* (ELISA-LPG);

- ✓ Validar o método ELISA-LPG padronizado com soros de cães naturalmente infectados por *L. infantum*, cães imunizados com vacinas contra LVC, e cães portadores de outras doenças infecciosas;
- ✓ Avaliar soros de cães com diferentes perfis clínicos de LVC naturalmente adquirida por meio da reatividade de imunoglobulinas a LPG de *L. infantum*, em comparação ao ATL do parasito, utilizando o ensaio ELISA indireto.

6. METODOLOGIA

6.1 Seleção dos cães com LV e cães controles

Foram encaminhados para atendimento no Ambulatório de Leishmanioses do Hospital-Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia (HOSPMEV-UFBA), no período de abril de 2014 a outubro de 2016, 121 cães domiciliados de diferentes idades, raças, pesos e ambos os sexos, naturalmente infectados por *Leishmania* sp. Os cães eram provenientes de diversos municípios do estado da Bahia, e foram encaminhados para confirmação parasitológica pela presença de *Leishmania* em tecidos de órgãos linfoides secundários.

Os cães foram incluídos no estudo quando apresentaram resultados positivos na citologia de medula óssea e/ou linfonodos com presença de formas amastigotas do parasito, e presença de formas promastigotas no cultivo de aspirado esplênico. Além disso, alíquotas do aspirado esplênico foram submetidas à análise molecular qualitativa e incluídos os animais que apresentaram resultado positivo, sendo selecionados 97 cães. Os cães positivos (isolamento + e/ou PCR positivo) foram estadiados clínico-laboratorialmente e serviram como controles positivos na padronização nos testes de ELISA indireto.

Como controles negativos, 68 cães foram selecionados por meio de busca ativa em áreas não endêmicas para LVC, os quais passaram por avaliação clínica e laboratorial pelos mesmos testes que os cães positivos. Todos os cães negativos deveriam estar hígidos, além de terem sido testados e apresentarem resultados negativos em exames parasitológicos, moleculares e sorológicos para detecção de infecção por *L. infantum*.

6.2 Identificação parasitológica direta por citologia de *Leishmania* sp.

Os exames parasitológicos diretos foram realizados utilizando-se amostras obtidas por técnica de punção aspirativa por agulha fina (PAAF) da medula óssea e linfonodos (BARROUIN-MELO et al., 2006; REIS et al., 2006b; BRASIL, 2014). Os animais foram sedados com a administração de 0,1mg/Kg de acepromazina por via intravenosa. As amostras obtidas da medula óssea e linfonodos por punção foram estendidas em lâminas pela técnica de *squash*, secas ao ar e submetidas à coloração com kit rápido Panótico LB[®] (Laborclin, Paraná, Brasil). Foram examinadas de cinco a dez lâminas obtidas pelo aspirado de cada órgão. As lâminas foram submetidas à microscopia de luz, objetiva de 40X e 100X, com auxílio do microscópio óptico (Zeiss[®], Alemanha). O resultado foi positivo, quando identificadas formas circulares-ovaladas com presença de núcleo e cinetoplasto sugestivas de formas amastigotas de *Leishmania* sp. intra ou extracelulares.

6.3 Cultivo de *Leishmania* sp. a partir do aspirado esplênico

Para o cultivo de *Leishmania* sp., a partir do aspirado esplênico (BARROUIN-MELO et al., 2006), aproximadamente 100-200 μ L de cada amostra foi inoculado em meio bifásico, contendo 1,5mL de meio sólido Novy-MacNeal-Nicolle (NNN) (ágar sangue desfibrinado de coelho) e 2mL de meio líquido Schneider's (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA), suplementado com 20% de soro fetal bovino (Gibco, N.Y, USA) inativado a 56°C por 30 minutos e 50 μ g/mL de gentamicina. Os cultivos foram mantidos em estufa BOD a 23°C, examinadas semanalmente em microscopia de luz em aumento de 40X por até 30 dias. O diagnóstico positivo foi admitido pela visualização de formas promastigotas que apresentavam movimentação ativa; ou negativo pela ausência de formas promastigotas após quatro semanas de observação dos cultivos (BARROUIN-MELO et al., 2004).

6.4 Extração de DNA do aspirado esplênico e realização da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção de *L. infantum*

A extração de DNA das amostras de aspirado esplênico foi realizada com o *kit* comercial Wizard Genomic DNA Purification Kit[®] (Invitrogen Life, Brasil), seguindo as instruções do

fabricante. A pesquisa do DNA de *Leishmania infantum* por meio da técnica da reação da polimerase em cadeia (PCR) foi realizada como descrita por Lachaud et al. (2002), utilizando-se os primers RV1 (forward; 5'-CTTTTCTGGTCCCGCGGGTAGG-3') e RV2 (reverse; 5'-CCACCTGGCCTATTTTACACCA-3') (Invitrogen Life, Brasil), específicos para *L. infantum*.

6.5 Cultivo de *L. infantum* para obtenção de antígeno total lisado (ATL) de promastigotas

Formas promastigotas de *L. infantum* isoladas a partir de macerado do baço de hamsters cronicamente infectados com cepa referência de *L. infantum* (MHOM/BR/74/BH46) foram inoculadas em meio bifásico NNN-Schneider's (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA), suplementado com 20% de soro fetal bovino inativado pelo calor a 56°C e acrescido de 50µg/mL de gentamicina. O cultivo foi realizado em garrafas de cultura de 25cm² em triplicata e contados diariamente em câmara de Neubauer. Após duas ou três passagens em cultura de promastigotas em fase estacionária, os cultivos foram lavados por centrifugação por 3 vezes com PBS estéril a 3000rpm por dez minutos e estocados em freezer a -80°C. Para o preparo do antígeno os sedimentos do cultivo, contendo formas promastigotas do parasito congeladas em nitrogênio líquido, foram descongelados à temperatura ambiente por três vezes consecutivas, depois sonicados em potência de 4Hz em um ciclo de 1 minuto (Sonic Desmembrator, Fischer Scientific, USA). Seguiu-se a centrifugação a 14000rpm por dez minutos a 4°C, o sobrenadante contendo a fração solúvel do extrato foi coletado, do qual se obteve alíquota para quantificação de proteína pelo método de Bradford (Bio-Rad®). Esse foi aliquotado, criopreservado a -20°C e utilizado nos ensaios ELISA indireto.

6.6 Amostras de soros de cães para ensaio de avaliação de reação cruzada

Para verificação de reatividade cruzada, isto é, a presença de anticorpos produzidos por outras enfermidades que ocorrem em regiões endêmicas para LVC, foram utilizadas amostras de cães infectados por outros patógenos como soros controles.

Para determinar a presença de reação cruzada foram realizados ensaios com soros controles de animais positivos para a detecção dos patógenos *Leishmania braziliensis*, *Trypanosoma cruzi*, *Hepatozoon canis*, *Ehrlichia canis*, *Babesia canis vogeli* e *Anaplasma platys*, todos os animais provindos de regiões não endêmicas para LVC. As amostras de soros

dos cães com diferentes infecções, assim como informações sobre métodos diagnósticos de confirmação, foram provenientes de bancos de soros e gentilmente cedidas por pesquisadores de outros laboratórios de instituições colaboradoras – Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) – e basearam-se na detecção visual do agente e ensaio de PCR específico.

Os cães cujos soros foram utilizados como controles positivos para imunoglobulinas contra outros patógenos no teste de reatividade cruzada (validação) no ELISA deveriam também ser positivos em exames de visualização direta dos parasitos em esfregaços sanguíneos e/ou positividade em reação em cadeia da polimerase (PCR) de amostras de sangue. As amostras de soros de cães com *Trypanosoma cruzi* provinham de cães infectados experimentalmente com o parasito e foram coletadas na fase aguda e crônica da enfermidade, fornecidos gentilmente pela Dr.^a Therezinha Bahia, da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP).

A **Tabela 1** apresenta as características e quantidades das amostras de soros controles utilizados neste estudo.

Tabela 1 – Número de amostras (n=73) de soros utilizados para realizar ensaios ELISA de reação cruzada com antígenos de LPG e ATL

Classificação dos grupos de cães de acordo com o tipo de infecção (n=73)*	n	Método de diagnóstico
Cães clinicamente saudáveis parasitados por <i>Leishmania braziliensis</i>	7	Cultivo e ELISA
Cães clinicamente doentes parasitados por <i>Leishmania braziliensis</i>	6	Cultivo e ELISA
Cães experimentalmente infectados por <i>Trypanosoma cruzi</i> (fase aguda)	20	ELISA
Cães experimentalmente infectados por <i>Trypanosoma cruzi</i> (fase crônica)	20	ELISA
Cães infectados por <i>Hepatozoon canis</i>	6	Citologia e PCR
Cães infetados por <i>Ehrlichia canis</i>	4	Citologia e PCR
Cães infectados por <i>Babesia canis vogeli</i>	3	Citologia e PCR
Cães infectados por <i>Anaplasma platys</i>	2	Citologia e PCR
Cães clinicamente doentes coinfectados por 2 ou 3 hemoparasitos	5	Citologia e PCR

*Amostras cedidas por outras instituições.

A partir do banco de dados e soroteca do Laboratório de Infectologia Veterinária da UFBA (LIVE-UFBA), também incluídos no presente estudo os soros de 32 cães imunizados com duas vacinas comerciais (dois grupos de 16 amostras de soros de cães vacinados com cada

vacina). Assim, 32 amostras da soroteca de cães vacinados (FERNANDES et al., 2014) foram testadas nos ensaios ELISA-ATL e ELISA-LPG. As amostras de soros desses cães foram coletadas em sete momentos ao longo de 11 meses, sendo uma colheita de sangue realizada antes, e as demais durante e após a imunização, para verificação da resposta humoral a antígenos vacinais e de uma possível infecção natural com *Leishmania* sp. As avaliações foram realizadas imediatamente antes da primeira (M0), da segunda (M1) e da terceira (M2) doses de vacina; 21 dias depois da terceira dose (M3); e 90 (M4), 180 (M5) e 280 (M6) dias após M3 (FERNANDES et al., 2014) (**Figura 3**).

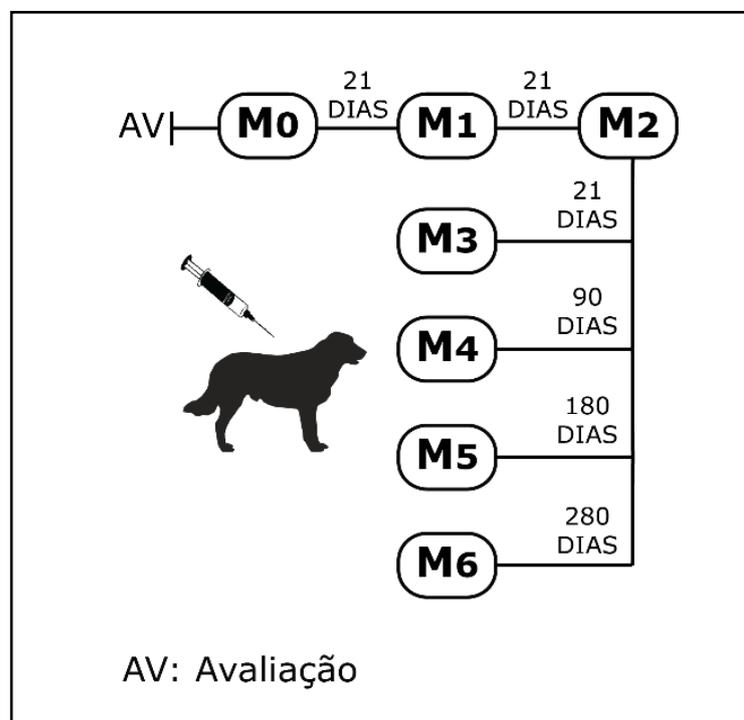


Figura 3: Diagrama das avaliações antes e após imunização com vacinas comerciais

6.7 Aspectos éticos

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal da Bahia, sob o protocolo número 019/2011, em Anexo 1.

6.8 Purificação de lipofosfoglicano (LPG) de *L. infantum*

Para extração dos glicoconjugados foi empregado o método de Orlandi; Turco (1987). Os parasitos na forma de promastigotas foram lavados em tampão fosfato (PBS) e centrifugados a 700 rpm em temperatura ambiente. Ao sedimento foram adicionados 2,5mL de CHCl₃/MeOH (3:2) e 0,5mL de MgCl₂ a 4mM, que foi posteriormente sonicado e centrifugado. À fase sólida intermediária foram adicionados novamente 2,5mL de solução 4mM de MgCl₂, a qual foi posteriormente sonicada e centrifugada. Em seguida, foram adicionados ao sedimento 3,0mL de solução de CHCl₃/MeOH/H₂O (10:10:3) e 0,5mL CHCl₃/MeOH (1:1), somente para a primeira centrifugação. Para extração do LPG foram acrescentados 2,5mL de ESOAK (água/etanol/etiléter/piridina/NH₄OH; 15:15:5:1:0,017), seguido de sonicação e centrifugação. O sobrenadante contendo LPG foi evaporado em nitrogênio a 45°C. Após esta etapa, a amostra foi ressuspensa em 1 mL de CH₃COOH 0,1N / NaCl 0,1N, sonicada e aplicada em uma coluna de fenil sefarose.

Utilizando-se uma coluna de cromatografia (Bio-Rad 731-1550), foram adicionados cerca de 2mL de fenil sefarose, de modo que o volume final após empacotamento estivesse entre 0,6 e 1,0mL. A coluna foi lavada com aproximadamente seis volumes de CH₃COOH 0,1N / NaCl 0,1N para empacotar a resina. Após o último mL de CH₃COOH 0,1N / NaCl 0,1N penetrar na coluna foi adicionada a amostra contendo LPG. Em seguida o material foi lavado de acordo com a seguinte sequência: 1mL de CH₃COOH 0,1N; 1mL ddH₂O e 4mL de ESOAK utilizado para eluir o material já purificado. A fração contendo LPG foi novamente evaporada em nitrogênio em banho a 45°C, ressuspensa em 1mL de água ultra-pura Milli-Q®. Para confirmar a purificação do LPG foi realizada a técnica de ELISA com o anticorpo monoclonal CA7AE, que reconhece as unidades repetitivas presentes em LPGs presentes na superfície de promastigotas e amastigotas de *Leishmania* sp. (HANDMAN et al., 1984).

6.9 Western blotting para reconhecimento do antígeno purificado LPG de *L. infantum*

Para confirmar o reconhecimento do LPG pelos anticorpos dos soros dos animais positivos, foi realizada a técnica de *Western Blotting*. Para isso, a solução de LPG passou por eletroforese SDS-PAGE e uma parte do gel foi corado com nitrato de prata para assegurar a presença do LPG. Outra parte do gel foi transferida para membranas de nitrocelulose utilizando 100V durante 1 hora, que foram em seguida bloqueadas com tampão caseína 5% em PBS 0,05%

de Tween 20 durante 14 horas a 4°C. Posteriormente, as membranas foram lavadas três vezes com PBS-Tween 20, por cinco minutos em cada etapa, e incubadas por duas horas, em agitação, à temperatura ambiente, com cada *pool* de amostras de soro (positivo ou negativo) em tampão PBS-Tween contendo 1% de caseína diluído 1:1000. As membranas foram novamente lavadas três vezes com PBS-Tween 0,05% e incubadas com anticorpo secundário anti-IgG de cão conjugado com peroxidase (Bethyl, USA) sob agitação constante por uma hora. Em seguida, após mais três lavagens, as membranas foram submersas em solução reveladora (4-cloro-1-naftol e peróxido de hidrogênio), e a reação foi parada com água destilada.

6.10 Desenvolvimento dos testes ELISAs com antígeno total lisado (ATL) e com lipofosfoglicano (LPG)

O antígeno total lisado (ATL) foi obtido segundo protocolo descrito por Laemmli (1970). As formas promastigotas de *Leishmania infantum* (WDCM731), originadas de cães, foram cultivadas em meio bifásico (sólido, Novy-MacNeal-Nicolle – NNN; e líquido, Schneider), a 24±1°C em estufa incubadora refrigerada com demanda bioquímica de oxigênio (B.O.D.) até a fase estacionária do crescimento.

A lavagem das promastigotas se deu por meio do uso de solução tampão fosfato (PBS) (NaCl 0,13M, KCl 0,002M, KH₂PO₄ 0,0017M, Na₂HPO₄ 0,010M), pH 7,2, sob centrifugação à 2000 rpm durante 10 minutos, seguida de sonicação ultrassônica para rompimento da membrana celular. O material sonicado foi novamente centrifugado a 18500 rpm, por 90 minutos, a 4°C. O sobrenadante obtido foi submetido à diálise em PBS (NaCl 0,13M, KCl 0,002M, KH₂PO₄ 0,0017M, Na₂HPO₄ 0,010M), pH 7,2, durante 36 horas, com troca da solução de PBS a cada 6 horas. Após diálise, o material passou por filtração em membrana de 0,22µm, em condições estéreis, para purificação do material.

A concentração das proteínas contidas no ATL obtido foi avaliada pelo método de Lowry (LOWRY et al., 1951), diluídas em PBS (NaCl 0,13M, KCl 0,002M, KH₂PO₄ 0,0017M, Na₂HPO₄ 0,010M) estéril para uma concentração final de 2,0 mg/ml e estocadas em freezer a -20 °C.

O ensaio ELISA foi desenvolvido baseado no procedimento de titulação em bloco, primeiramente considerando uma diluição fixa de anticorpo anti-IgG de cão conjugado com peroxidase (Bethyl, USA), variando-se a concentração de antígenos (proteína/glicoconjugado) e a diluição das amostras. Na segunda etapa da titulação, após definidas as concentrações de

antígeno e diluições das amostras que deram maior relação de leitura de densidade óptica (DO) do *pool* positivo / DO do *pool* negativo, foram testadas diferentes diluições do conjugado. O *pool* positivo consistia de igual quantidade de dez amostras de controles positivos, bem como o *pool* negativo também era uma mistura de dez amostras de controle negativos.

O teste foi desenvolvido em microplacas de poliestireno fundo chato de alta adsorção de 96 poços (Parker Elmer, Waltham USA), que foram sensibilizadas com antígenos diluídos em tampão carbonato/bicarbonato pH 9,6 a 100µL/poço e incubadas a 4°C durante 14 horas.

As placas foram lavadas quatro vezes com PBS adicionado de 0,05% de Tween 20 (PBST), bloqueadas com PBST adicionado de caseína a 10% e incubadas a 37°C por duas horas. Após quatro lavagens com PBST, foram adicionados 100µL de amostras de *pools* dos soros diluídas em PBST caseína a 5% a 100µL/ poço e incubadas a 37°C por uma hora. Cada amostra de soro foi testada em duplicata. As placas foram lavadas com PBST quatro vezes e a IgG anti-conjugado a peroxidase diluída em PBST caseína a 5% foi adicionada na placa, 100uL por poço e incubadas a 37°C por uma hora. Após a incubação, as placas foram lavadas quatro vezes com PBST e foram aplicados em cada poço 100µL de solução preparada com tampão citrato pH 5,3 adicionado de 12µL de H₂O₂ e 5mg de ortofenilenediamina (OPD) (Sigma Aldrich) por placa. A reação foi parada com 50µL por poço de H₂SO₄ 4N.

6.11 Análises matemáticas para padronização dos testes ELISAs indiretos

O valor do ponto de corte para cada ELISA foi definido pela média da densidade óptica (DO) dos soros controles negativos (n=68) mais três desvios padrões (FREY et al., 1998). Com base nos resultados dos soros no ELISA, as amostras foram classificadas em quatro diferentes estados: verdadeiramente positivo (positivo na detecção do parasito e/ou PCR e positivo no ensaio ELISA); verdadeiramente negativo (negativo na detecção do parasito e/ou PCR e negativo no ensaio ELISA); falso positivo (negativo nos testes de detecção do parasito e/ou PCR e positivo no ensaio ELISA); e falso negativo (positivo nos testes de detecção do parasito e/ou PCR e negativo no ensaio ELISA). Com estes resultados, os parâmetros de sensibilidade (Se), especificidade (Sp), valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e acurácia (Ac) do ensaio ELISA foram determinados para detecção de anticorpos contra antígeno total lisado (ATL) e lipofosfoglicano (LPG) de *L. infantum*, usando as seguintes fórmulas, em que TP é verdadeiramente positivo, TN é verdadeiramente negativo, FP é falso positivo e FN é falso negativo: Sensibilidade = $TP / TP + FN$; Especificidade = $TN / TN + FP$;

Valor Preditivo Positivo = $TP / TP + FP$; Valor Preditivo Negativo = $TN / TN + FN$; Precisão = $TP + TN / TP + TN + FP + FN$, (KAWAMURA, 2002).

A curva ROC (Receiver Operating Characteristics) foi obtida usando o software SPSS v. 12.0 que definiu a precisão a partir da área formada sob a curva (AUC). O nível de concordância foi classificado utilizando o teste Kappa (K) como descrito por Landis, Koch (1977): 0 - nenhum acordo; 0 a 0,19 - correlação muito baixa, 0,20 a 0,39 - concordância fraca, 0,40 a 0,59 - concordância moderada, 0,60 a 0,79 - concordância substancial e concordância alta de 0,80-1,00.

6.12 Estadiamento clínico-laboratorial dos cães naturalmente infectados por *L. infantum*

Todos os 97 cães naturalmente infectados e confirmados parasitologicamente passaram por avaliação clínica e laboratorial com estadiamento da leishmaniose visceral canina (LVC) conforme metodologia de Solano-Gallego et al. (2009, 2011). Os cães foram classificados com base na sorologia por ELISA indireto, com ATL de *L. infantum*, para verificação de positividade para IgG anti-*Leishmania*, sinais clínicos presentes e achados de patologia clínica e divididos em grupos para melhor identificação: grupo 1 (G1), cães com doença branda – estadio I (cl clinicamente saudáveis parasitados); grupo 2 (G2), cães com doença moderada – estadio II; grupo 3 (G3), cães com doença grave – estadio III; e grupo 4 (G4), cães com doença muito grave – estadio IV.

Para estadiamento dos cães sororreagentes foram realizados o hemograma em contador automatizado da marca Roche®, Sysmex pocH-100iVDiff (Indiana, USA), análises bioquímicas séricas dos analitos ureia, creatinina, proteína, albumina e globulina e quantificação urinária da proteína e creatinina para o cálculo da razão proteína:creatinina (UPC).

6.13 Análises estatísticas

Os resultados foram expressos como média das duplicatas realizadas em cada experimento de ELISA. Houve normalização dos valores de densidade óptica das placas segundo Frey et al. (1998), em que foi definido o ponto de corte para ELISA-ATL na DO de

0,288; e para ELISA-LPG na DO de 0,251. As curvas ROC, assim como os valores de área sob a curva (AUC) foram obtidas através do software SPSS V.12.0.

Para verificar a repetitividade e a reprodutibilidade, foi utilizado *pool* de amostras positivas e negativas testadas em três dias diferentes por técnicos distintos do laboratório de imunologia e biologia celular (reprodutibilidade) e 20 vezes no mesmo dia (repetitividade) nas mesmas condições. Os resultados para estes parâmetros são expressos em porcentagem (%) de concordância tanto para a reprodutibilidade como para a repetitividade.

As figuras dos gráficos foram geradas a partir do software GraphPad Prism 6.0 (Graph Prism Inc., San Diego, Ca).

7 RESULTADOS

7.1 *Western blotting* para reconhecimento antigênico da solução purificada de lipofosfoglicano (LPG) de *L. infantum*

A primeira etapa do estudo foi a validação e reconhecimento antigênico da solução purificada de LPG utilizada nos ELISAs. Pode-se observar na **Figura 4** que o *pool* de soros de animais com isolamento e/ou detecção molecular de *L. infantum* foi capaz de reconhecer uma banda de cerca de 43 kDa de peso molecular, o que é compatível ao peso molecular do LPG (FREITAS, 2010). O *pool* de soros negativos não apresentou nenhuma reatividade.

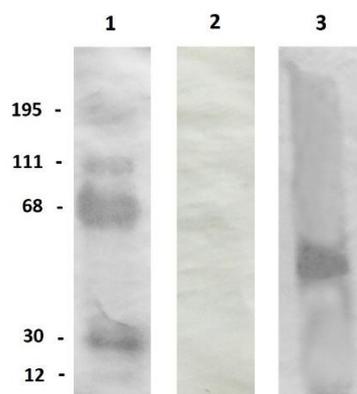


Figura 4 – *Western blotting* para avaliação do reconhecimento de solução de LPG por soros de animais positivos e negativos para infecção com *L. infantum*. A solução de LPG foi submetida à eletroforese em gel de 15% de acrilamida, transferida para membrana de nitrocelulose, e incubada com *pool* de soros positivos e negativos. (1) Padrão de peso molecular; (2) membrana incubada com *pool* de soros negativos para infecção com *L. infantum*; (3) membrana incubada com *pool* de soros positivos para infecção com *L. infantum*. Os números ao lado representam os pesos moleculares do padrão, em kDa.

7.2 Padronização dos ensaios ELISA-LPG e ELISA-ATL com amostras controle

As melhores concentrações de antígenos, diluições das amostras e anticorpo anti-IgG de cão conjugado com peroxidase para o ELISA utilizando LPG foram 0,50µg/mL, 1:400 e 1:10.000. Os antígenos, amostras de soro e diluição do anticorpo anti-IgG de cão conjugado com peroxidase escolhidos apresentaram a relação de densidade óptica de soros controles positivo/negativo de 17,99 no ELISA-LPG. A distribuição dos valores de leitura de densidades ópticas (DOs) está demonstrada na **Figura 5**, que identifica cada amostra dos soros controles positivos e negativos, e a linha horizontal determina o ponto de corte de cada teste.

As melhores concentrações de antígenos, diluições das amostras e anticorpo anti-IgG de cão conjugado com peroxidase para o ELISA utilizando ATL foram 0,50µg/mL, 1:500 e 1:20.000. Os antígenos, amostras de soro e diluição do anticorpo anti-IgG de cão conjugado com peroxidase escolhidos apresentaram a relação de densidade óptica de soros controles positivo/negativo de 11,78 no ELISA-ATL. A distribuição dos valores de leitura de densidades ópticas (DOs) está demonstrada na **Figura 5**, que identifica cada amostra dos soros controles positivos e negativos, e a linha horizontal determina o ponto de corte de cada teste.

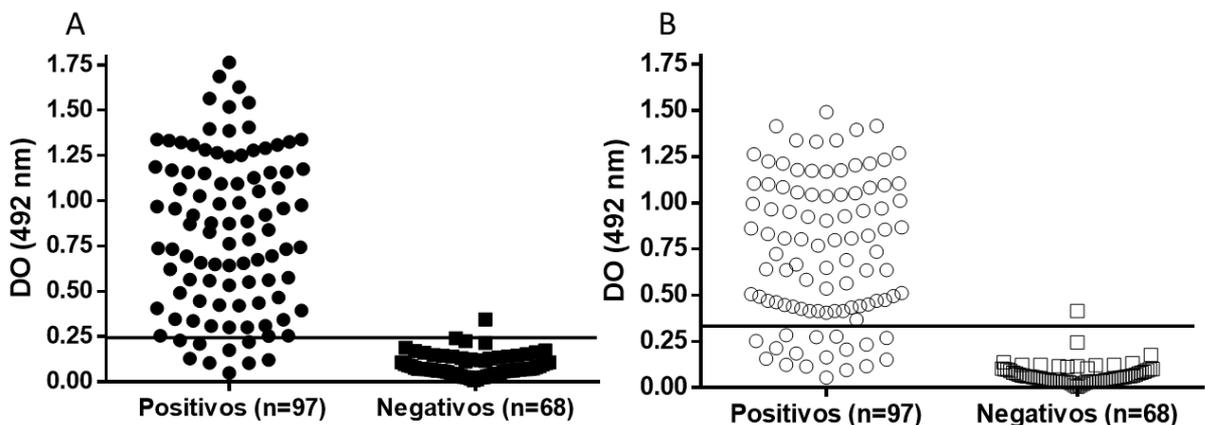


Figura 5 – Distribuição dos resultados individuais de 97 amostras de soros positivas e 68 negativas testados por ELISA indireto com antígeno lipofosfoglicano (LPG) de *Leishmania infantum* e avaliadas por ELISA indireto “in house” com antígeno total lisado (ATL) de *Leishmania infantum* para a identificação de anticorpos IgG específico em cães: (A) ELISA-LPG e (B) ELISA-ATL. As linhas representam o ponto de corte (A = 0,251 e B = 0,288) dos ensaios.

7.3 Resultados da validação dos ensaios ELISA-LPG e ELISA-ATL

Na **Tabela 2** são apresentados os critérios de validação para o ensaio ELISA, com o número de amostras de soros utilizados na padronização. O ponto de corte foi definido a partir da leitura de DO média dos controles negativos mais três vezes o desvio padrão, sendo de 0,251 no ELISA-LPG e 0,288 no ELISA-ATL. Foi possível determinar no ELISA-LPG, a presença de uma amostra sérica de um cão com resultado falso-positivo, e de outro cão no ELISA-ATL. No teste que utilizou como antígeno o LPG foi alcançada uma sensibilidade de 91,5% enquanto no teste com ATL foi de 85,0%. A especificidade de 98,5% e VPP 98,9% foram estabelecidos em ambos os testes, entretanto o VPN foi de 89,3% com LPG e 84,8% com ATL.

Tabela 2 – Validação dos parâmetros encontrados para os testes ELISA desenvolvidos para identificação de anticorpos IgG específicos contra antígenos de LPG e ATL de *L. infantum*, usando técnicas de identificação/isolamento do parasito ou PCR para *L. infantum* como padrão ouro

Parâmetros	LPG	ATL
Nº de amostra testadas	165	165
Controles positivos	97	97
Controles negativos	68	68
Verdadeiramente positivos	88	80
Verdadeiramente negativos	67	67
Falsos negativos	9	17
Falsos positivos	1	1
Ponto de corte	0,251	0,288
Sensibilidade (%)	91,5	85,0
Especificidade (%)	98,5	98,5
Acurácia (AUC) (%)	0,997	0,986
VPP (%)	98,9	98,9
VPN (%)	89,3	84,8
Kappa (<i>K</i>)	0,9	
Repetitividade + (resultado) (%)	97,5	97,1
Repetitividade + (DO) (média)	1,176	1,390
Repetitividade - (resultado) (%)	89,7	86,4
Repetitividade - (DO) (média)	0,038	0,068
Reprodutibilidade + (resultado) (%)	99,7	nt
Reprodutibilidade + (DO)	0,393	nt
Reprodutibilidade - (resultado) (%)	99,2	nt
Reprodutibilidade - (DO)	0,033	nt

*nt = não testado

A precisão dos testes foi estabelecida a partir da área sob a curva ROC (AUC), que pode ser observada na **Figura 6**, na qual foram compilados os dados dos controles positivos e

negativos, obtendo como resultado para o ELISA-LPG, uma AUC de 0,997; e para o ELISA-ATL, AUC de 0,986.

O nível de concordância para ELISA-LPG com o teste Kappa (K) foi de 0,9, classificado como alto de acordo com Landis & Koch (1977).

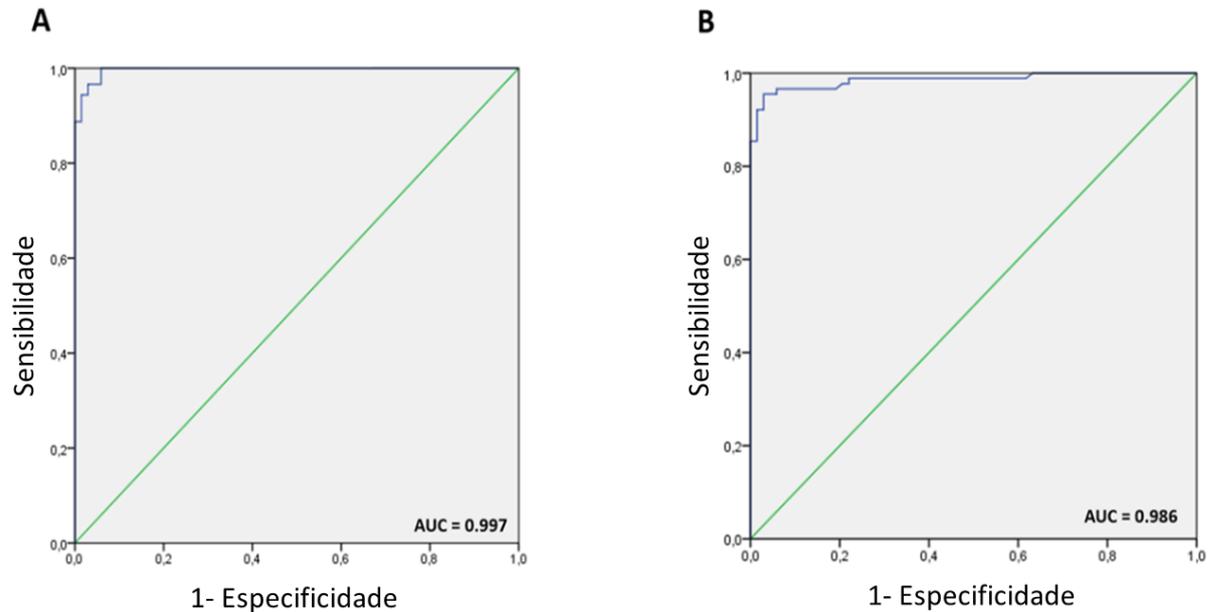


Figura 6 – Diagrama das curvas ROC do ensaio de ELISA para determinar a especificidade dos ensaios para detecção de IgG anti-*L. infantum*. Foram utilizados como antígenos, o lipofosfoglicano ou antígeno total lisado. Análise: SPSS v.12.0: (A) ELISA-LPG e (B) ELISA-ATL.

7.4 Avaliação de reatividade cruzada entre soros de cães com outras infecções e o LPG

Na **Figura 7A**, são apresentados os resultados dos ensaios de verificação de reações cruzadas nos testes de ELISA com os antígenos LPG e ATL com as amostras de soros de cães infectados por *L. braziliensis*, clinicamente saudáveis ou com manifestações clínicas de leishmaniose cutânea, e cujo parasitismo foi confirmado por visualização direta do cultivo e PCR convencional.

Na **Figura 7B** estão retratados os dados de testes de reações cruzadas que utilizaram amostras de soros de cães infectados experimentalmente com *T. cruzi* e nas fases aguda e crônica da enfermidade.

Em ambas as avaliações, os resultados obtidos nos testes de ELISA com LPG e ATL mostraram que não houve reatividade cruzada com os soros de *L. braziliensis* e *T. cruzi*.

Na **Figura 8**, foram investigadas possíveis reações cruzadas entre o LPG e o ATL e soros de cães infectados com os agentes infecciosos *Hepatozoon canis*, *Ehrlichia canis*, *Babesia canis vogeli* e *Anaplasma platys*, bem como animais com coinfeção que podem gerar resultados falso-positivos na identificação de cães infectados por *L. infantum*. Como está representado na **Figura 8B**, 18,2% (2/11) correspondentes aos cães com erliquiose e 12,5% (1/8) relativos ao cão com babesiose apresentaram reação cruzada contra ATL. Nenhuma reação cruzada foi encontrada no ELISA-LPG (**Figura 8A**).

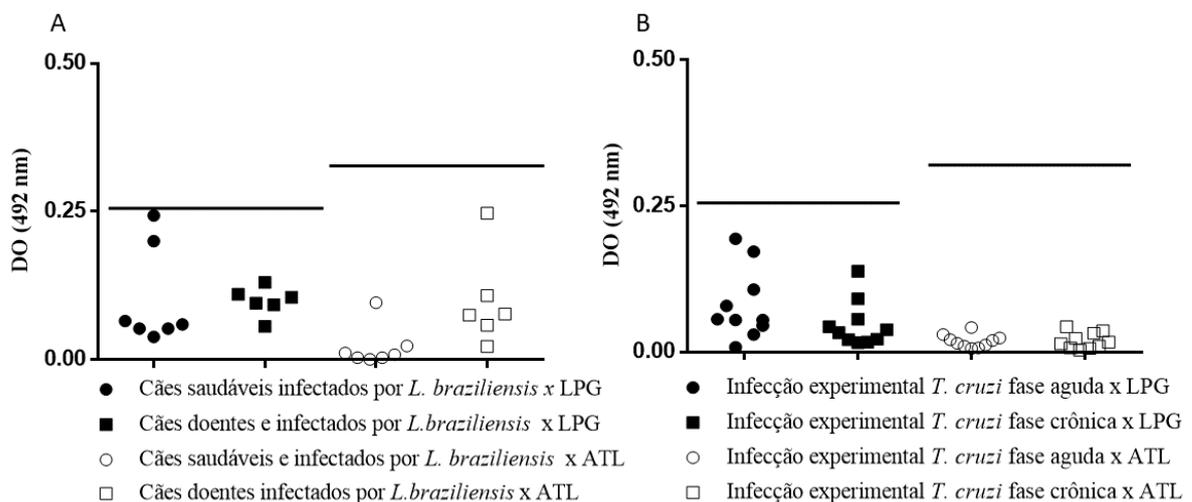


Figura 7 – Resultados individuais de amostras de soros de cães infectados naturalmente por *L. braziliensis* apresentando ou não sinais de leishmaniose tegumentar (A), de cães infectados experimentalmente por *T. cruzi* (B). Os soros foram testados por ELISA indireto usando LPG e ATL como antígenos. As linhas representam o ponto de corte (A = 0,251 e B = 0,288) dos ensaios.

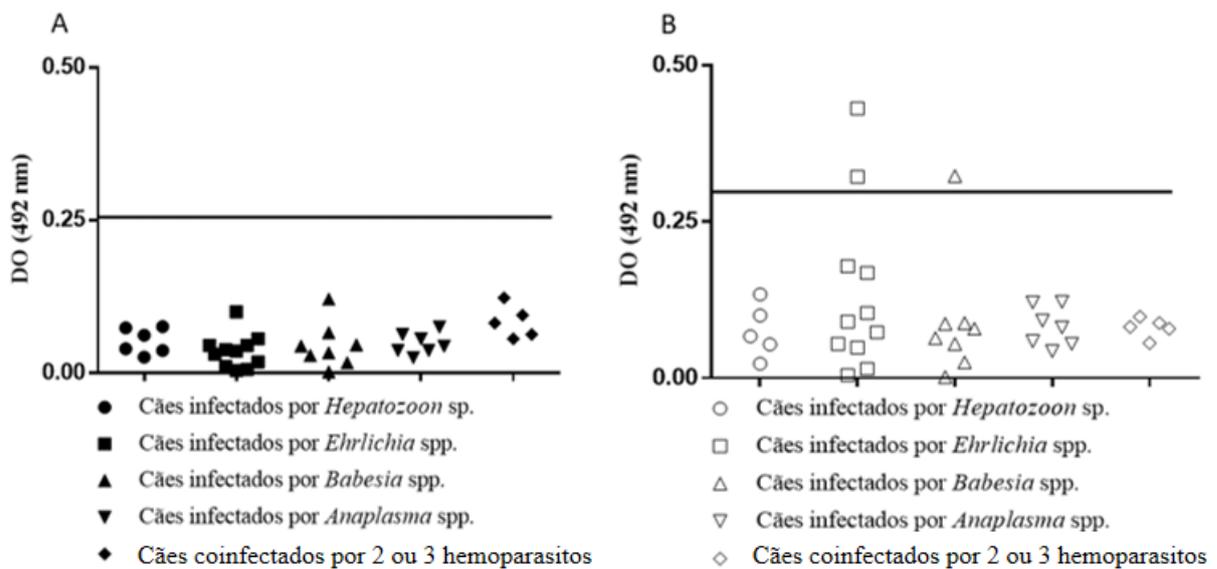


Figura 8 – Resultados individuais para amostras de soros controles de animais infectados por *Hepatozoon canis*, *Ehrlichia canis*, *Babesia canis vogeli* e *Anaplasma platys* e cães apresentando coinfeção com 2 ou 3 hemoparasitos. (A) ELISA-LPG e (B) ELISA-ATL para a identificação de anticorpos IgG específico de *L. infantum*. As linhas representam o ponto de corte (A = 0,251 e B = 0,288) dos ensaios.

7.5 ELISA-LPG e ELISA-ATL com soros de cães imunizados com vacinas comerciais

A **Figura 9** mostra a curva das leituras de DOs dos soros de cães imunizados com a vacina comercial à base de FML e saponinas, cujas amostras pertencem a um banco de soros do LIVE-HOSPMEV-UFBA. Os soros de cães vacinados foram coletados em sete momentos, a intervalos de 21 dias, seguidos de dois meses a partir da primeira dose vacinal. A imunização foi realizada em três doses com intervalos de 21 dias, e a primeira coleta de sangue foi realizada antes da imunização e aos 21 dias após a primeira dose vacinal e assim sucessivamente até a quarta avaliação. Os intervalos de coletas de amostras entre o 4^o-5^o, 5^o-6^o, e 6^o-7^o momentos foram de dois meses (FERNANDES et al., 2014).

Os resultados da avaliação da curva de resposta humoral dos cães imunizados com FML-saponina mostraram que no momento antes da vacina (M0) todos os cães apresentaram DO abaixo do ponto de corte no ELISA-ATL (**Figura 9B**), após 21 dias do início da imunização no M1 (n=1), M2 (n=1), M3 (n=5), M4 (n=2), M5 (n=2) e M6 (n=2) os cães apresentaram soroconversão, enquanto no ELISA-LPG (**Figura 9A**) desde o momento antes da vacinação já havia cães que apresentaram reatividade cruzada ao antígeno.

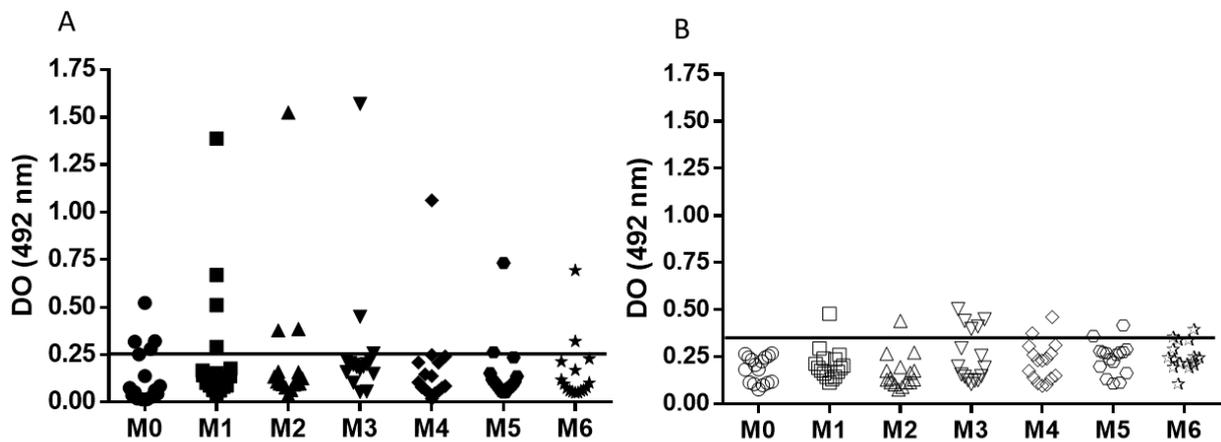


Figura 9 – Cinética das DOs nas sete avaliações sequenciais (M0 a M6) das amostras de soros de cães imunizados com a vacina Leishmune® (Fort Dodge) que contém antígeno ligante fucose manose (FML) liofilizado (1,5 mg) e saponina (0,5 mg), em que M0 corresponde ao momento antes da imunização; M1, M2, M3 (21 dias após cada dose de vacina); M4, M5 e M6 (intervalos de 2 meses após última dose de vacina). (A) ELISA-LPG e (B) ELISA-ATL para a identificação de anticorpos IgG específico de *L. infantum*. As linhas representam o ponto de corte (A = 0,251 e B = 0,288) dos ensaios. As amostras dos soros dos cães imunizados foram cedidas por Fernandes et al. (2014).

A **Figura 10** mostra a curva das leituras de DOs dos soros de cães imunizados com a vacina à base do antígeno recombinante A2. As amostras, provenientes do banco de soros do grupo (FERNANDES et al., 2014), foram testadas com os métodos ELISA-LPG e ELISA-ATL.

Os resultados da avaliação da curva de resposta humoral dos cães imunizados com Leish-Tec® mostraram que no momento antes da vacina (M0), após 21 dias da primeira (M1) e segunda dose (M2), todos os cães apresentaram DO abaixo do ponto de corte no ELISA-ATL (**Figura 10B**), no M3 (n=3), M4 (n=1), M5 (n=5), M6 (n=2), os cães apresentaram soroconversão, enquanto no ELISA-LPG no momento antes da vacinação (**Figura 10A**) já havia presença de cães apresentando reatividade ao LPG, mas nenhuma reatividade foi observada nos soros do mesmo grupo de cães nos momentos M3, M4 e M6.

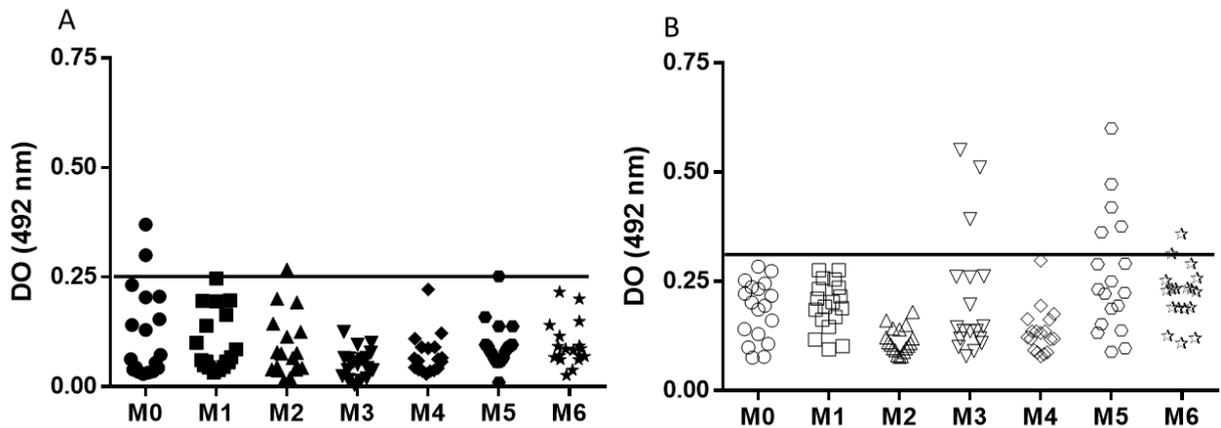


Figura 10 – Cinética das DOs nas sete avaliações sequenciais (M0 a M6) das amostras de soros de cães imunizados com a vacina Leish-Tec® (Ceva Hertape) que contém 0,10 mg do antígeno A2 e 0,5mg de saponina em 0,9% de solução salina (1,0 mL), em que M0 corresponde ao momento antes da imunização; M1, M2, M3 (21 dias após cada dose de vacina); M4, M5 e M6 (intervalos de 2 meses após última dose de vacina). (A) ELISA-LPG e (B) ELISA-ATL para a identificação de anticorpos IgG específico de *L. infantum*. As linhas representam o ponto de corte (A = 0,251 e B = 0,288) dos ensaios. As amostras dos soros dos cães imunizados foram cedidas por Fernandes et al. (2014).

7.6 Comparação entre os ensaios ELISA-LPG e ELISA-ATL com soros de cães infectados por *L. infantum* segundo o estadiamento clínico de LVC

Quando considerada a reatividade de anticorpos IgG específicos para LPG em cães com diferentes classificações clínicas de LVC, pode-se observar diferenças na intensidade de reação entre o ELISA-LPG e o ELISA-ATL, como mostrado na **Figura 11**. Cães no estadio I (G1), ou seja, cães sem sinais clínicos, mas com detecção parasitológica e/ou molecular do parasito, e que apresentaram reatividade no ELISA-LPG, sendo que de dez animais, nove foram positivos (90%), enquanto isso no ELISA-ATL só um cão (10%) foi capaz de apresentar resultado positivo.

Com relação aos cães no estadio II (G2) de LVC, 20 de um total de 23 cães (86,95%) apresentaram resultados positivos no ELISA-LPG, enquanto 17 (73,91%) foram positivos no ELISA-ATL. Para o estadio III (G3), houve 92,85% de soropositividade no ELISA-LPG, e 96,42% de animais positivos no ELISA-ATL. Todos os animais no estadio IV (G4) de LVC foram positivos nos dois ensaios.

Tabela 3 – Classificação clínica da leishmaniose canina dos 97 cães sororreagentes com base no perfil sorológico, sinais clínicos e achados laboratoriais para cada estadio

Estadio clínico	Sorologia	Sinais clínicos	Achados laboratoriais	Prognóstico
Estadio I Doença branda (n=10)	Nove cães com sorologia negativa e um cão com sorologia alta	Cães com linfonodomegalia periférica	Perfil renal normal: creatinina < 1.4 mg/dl; não-proteinúrico: UPC < 0.5	Bom
Estadio II Doença moderada (n=23)	Seis cães com sorologia negativa e 17 cães com níveis de anticorpos positivos baixos a altos	Cães com linfonodomegalia, dermatite esfoliativa / onicogrifose, ulcerações (plano nasal, coxins, proeminências ósseas, junções mucocutâneas), anorexia, perda de peso e febre	Cães com anemia não regenerativa, hiperglobulinemia, hipoalbuminemia. Cães com: a) Perfil renal Normal: creatinina < 1.4 mg/dl; não proteinúrico: UPC < 0.5 b) Creatinina <1,4 mg/dl; UPC = 0,5-1; proteinúrico	Bom a reservado
Estadio III Doença grave (n=56)	Dois cães com sorologia negativa e 54 com níveis de anticorpos positivos baixos a altos	Os cães com sinais listados nos estadios I e II, e apresentaram sinais originados de lesões por imunocomplexos como vasculite, artrite, uveíte e glomerulonefrite.	Alterações clínico-patológicas listadas no estadio II. Doença renal crônica (DRC) IRIS estadio I com UPC > 1 ou estadio II (creatinina 1,4-2 mg/dl) (IRIS)	Reservado a desfavorável
Estadio IV Doença muito grave (n=8)	Oito cães com níveis de anticorpos positivos médios a altos	Cães com sinais clínicos indicados na fase III e doença renal terminal	Alterações clínico-patológicas listadas no estadio II. DRC IRIS estadio III (creatinina 2-5 mg/dl) e estadio IV marcada proteinúria UPC > 5	Desfavorável

Fonte: Adaptado de SOLANO-GALLEGO et al. (2009, 2011) e IRIS (2015) demonstrando os sinais clínicos predominantes dos 97 cães sororreagentes.

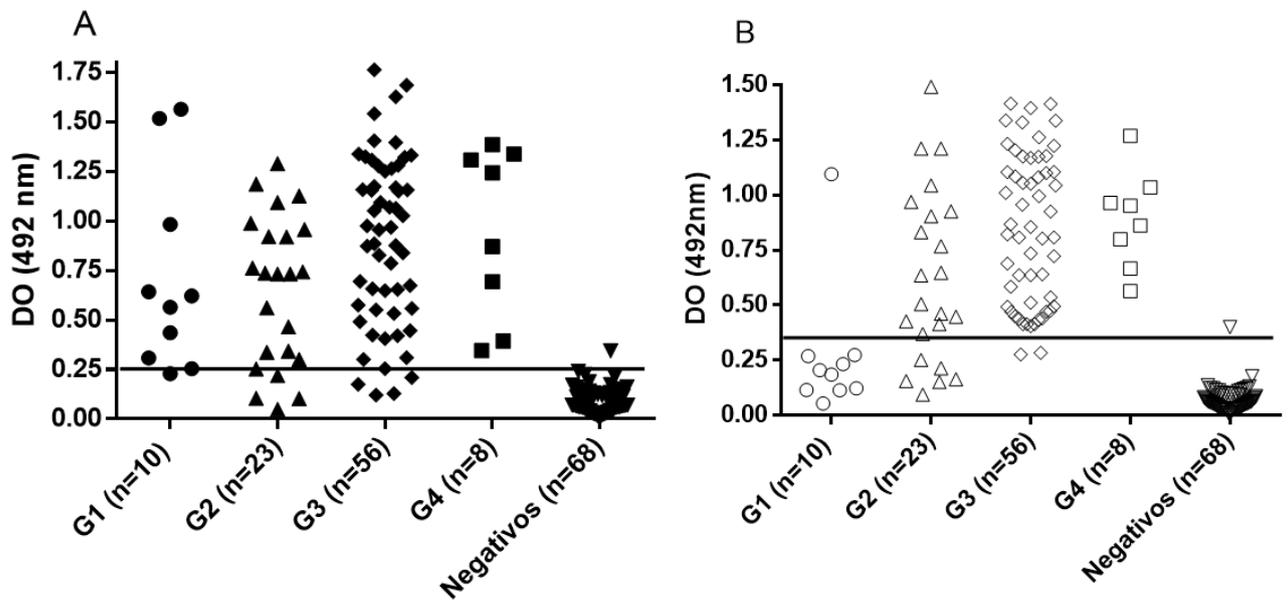


Figura 11 – Distribuição dos resultados individuais em grupos de cães infectados por *L. infantum* segundo estadiamento clínico, cujas amostras de soro foram testadas por ELISA com antígeno lipofosfoglicano (LPG) de *Leishmania infantum* e por ELISA *in house* com antígeno total lisado (ATL) para a identificação de anticorpos IgG específico em cães: (A) ELISA-LPG e (B) ELISA-ATL. G1 = estadiamento I; G2 = estadiamento II; G3 = estadiamento III; G4 = estadiamento IV. G1 ao G4 n=96 cães positivos e 68 soros controles negativos. As linhas representam o ponto de corte (A = 0,251 e B = 0,288) dos ensaios.

8 DISCUSSÃO

Desde o final de 2011, o Ministério da Saúde brasileiro tem utilizado o ELISA indireto com antígeno bruto (*L. major*-like) como teste confirmatório da LVC e o TR-DPP LVC[®] implementado como triagem em inquérito soropidemiológico da população canina, obtendo alta sensibilidade e especificidade apenas com amostras de cães que apresentam sinais clínicos sugestivos de LVC. Neste trabalho, as amostras de cães testados no ELISA-ATL, adotado como padrão, foram submetidas ao ELISA-LPG, que foi capaz de detectar resposta imune humoral aos LPGs de *L. infantum* em cães com e sem sinais clínicos, sendo, portanto, uma molécula promissora para diagnosticar cães infectados que ainda não apresentam doença.

O investimento na pesquisa de novas técnicas sorodiagnósticas tem como base a busca por antígenos capazes de contribuir para a execução de um teste confiável, seguro e acessível. Assim, o presente estudo investiu na investigação do potencial do LPG para o sorodiagnóstico de LVC. A técnica de *Western blotting* foi determinante para a caracterização da banda observada a partir do purificado de LPG de *L. infantum*. A banda de massa molecular de 43kDa, obtida no presente estudo (**Figura 4**), é compatível com o resultado demonstrado por Freitas

(2010), no qual, o LPG apresentou massa molecular em torno de 50 kDa no ponto médio do arraste, utilizando metodologia de extração e purificação semelhantes.

Os dados deste trabalho reportam pela primeira vez o uso de um glicoconjugado de superfície de *L. infantum*, o lipofosfoglicano (LPG), como antígeno em ensaio ELISA indireto para imunodiagnóstico da LVC no Brasil. Diferentes tipos de antígenos já foram relacionados ao ensaio imunoenzimático: originários de promastigota (PORROZZI et al., 2007; LIMA et al., 2010; DE ARRUDA et al., 2013), amastigota (SCHWANKE et al., 2014) e antígenos recombinantes (ROSÁRIO et al., 2005; PORROZZI et al., 2007; HOSEIN; BLAKE; SOLANO-GALLEGO, 2017). Esta diversidade de antígenos limita consideravelmente a especificidade dos ensaios imunológicos e dificulta a padronização, gerando restrições à utilização destes testes na rotina clínica ou epidemiológica (ALVAR et al., 2004). Ensaios padronizados com antígenos brutos são limitados por apresentam reatividade cruzada frente a anticorpos produzidos no soro de cães com outras doenças infecciosas, que os acometem em áreas endêmicas de ocorrência da LVC (PALTRINIERI et al., 2010). Para uma compreensão melhor desta argumentação, a **Tabela 4** e apresenta um resumo de antígenos testados no diagnóstico de LVC, seus respectivos parâmetros de validação e reações cruzadas.

O ELISA-LPG apresentou maior índice de sensibilidade (91,7%), quando comparado ao ELISA-ATL empregado neste estudo (85,0%). De Arruda e colaboradores (2013) validaram dois testes ELISA produzidos por Bio-Manguinhos[®] (Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil), um que emprega antígeno bruto de *L. major*, cuja sensibilidade é de 91,85%, sendo este atualmente utilizado como teste confirmatório por laboratórios oficiais de diagnóstico de LVC no Brasil; e um segundo teste confirmatório ELISA com antígeno de *L. infantum* em estado bruto, cuja sensibilidade foi de 89,80%. No presente estudo, o índice de sensibilidade encontrado no ELISA com o antígeno LPG de promastigota de *L. infantum* foi mais elevado (91,7%) que o teste Bio-Manguinhos[®] com antígeno da mesma *L. infantum*, além de ser capaz de identificar cães soropositivos em estadio I, sem doença clínica aparente. Comparativamente, a sensibilidade observada nos ensaios de Barral-Veloso et al. (2013) com o que denominaram TRYP-ELISA, cujo antígeno de promastigota é tratado com tripsina, foi também menor (87,1%) que a do ELISA-LPG aqui observado. Além disso, aqueles autores demonstraram ser o TRYP-ELISA menos sensível que o β -ME-ELISA, antígeno de promastigota tratado com mercaptoetanol (93,5%), também por eles desenvolvido (BARRAL-VELOSO et al., 2013) .

O ELISA descrito por Lage et al. (2016) tem como antígeno epítomos que combinam aminoácidos de duas diferentes regiões de uma proteína hipotética sintética, denominada LiHyD da *Leishmania*, cuja sensibilidade apresentada ficou entre 92,5% e 100%, maior do que

o valor encontrado para o ELISA-LPG neste estudo. No entanto, deve-se considerar a facilidade e os custos associados ao processo de obtenção do LPG, uma vez que ensaios de imunoproteômica para obtenção de antígenos hipotéticos apresentam custo consideravelmente elevados. Além disso, verificamos uma maior reprodutibilidade do ELISA-LPG, o que pode ser atribuído às estruturas de LPG, moléculas-chave que interferem em diferentes processos relacionados à virulência da *Leishmania*, e que desencadeiam resposta imune humoral nos cães detectável em ensaio imunoenzimático para diagnóstico da LVC. Um alto índice de reprodutibilidade foi também encontrado anteriormente por Anish et al. (2013), ao utilizarem epítomos da região do cap de LPG para diagnóstico de LVC.

Ainda comparando índices de sensibilidade da literatura e os encontrados no presente estudo quanto ao ELISA-LPG (91,7%), o ensaio imunocromatográfico com o antígeno rK39, realizado por Lima et al. (2010), apresentou sensibilidade de 91,5%. A proteína recombinante K39 é uma sequência de 39 aminoácidos clonada da região quinase de *L. infantum* (BURNS et al., 1993), e é um teste que tem se mostrado altamente sensível e específico para o diagnóstico da LV (KUMAR et al., 2001), sendo utilizado para diagnóstico de LVC no Brasil. A diferença significativa entre os dois métodos é que o teste produzido com o LPG foi capaz de diferenciar efetivamente os cães infectados dos não infectados, cães com diferentes apresentações clínicas e cães vacinados dos não vacinados, fatores importantes no processo de triagem e diagnóstico caninos.

Neste estudo, foi verificada uma especificidade elevada (98,5%) em ambos os testes ELISA com o uso dos antígenos LPG e ATL. Esses valores foram superiores aos encontrados no teste β -ME-ELISA (97,6%) e TRYP-ELISA (95,1%) (BARRAL-VELOSO et al., 2013), e nos ELISAs com antígeno bruto de *L. major* (83,75%) (DE ARRUDA et al., 2013), e com antígeno bruto de *Leishmania*, ELISA-CTA (91,2%) e antígeno rK39 (94,7%) (LIMA et al., 2010).

Uma alta acurácia, medida de precisão diagnóstica, foi observada tanto no ensaio ELISA indireto para o antígeno LPG (99,7%) quanto para o ATL (98,6%) e ambos os antígenos apresentaram resultados superiores à acurácia dos testes ELISA apresentados por De Arruda et al. (2013, 2016) com antígenos de *L. major* (92,0%) e *L. infantum* (89,8%).

A alta sensibilidade, especificidade e acurácia dos resultados apresentados pelo ELISA-LPG reforçam a utilização desta molécula para a realização de diagnósticos de LVC. Além disso, um fator a ser considerado, é a necessidade de um teste sorológico ser capaz de diferenciação entre cães com variadas apresentações clínicas de LV, residentes em áreas endêmicas e portadores de outras doenças infecciosas, com sinais clínicos semelhantes aos cães

portadores de LV (PORROZZI et al., 2007). O ELISA-LPG padronizado no presente estudo foi capaz de prover tal diferenciação, o que o qualifica como candidato potencial ao uso em testes de rotina, tornando mais precisos e confiáveis os resultados obtidos em avaliações soroepidemiológicas desses cães. Considerando ainda que o Ministério da Saúde brasileiro tem como parâmetro diagnóstico para determinação de eutanásia em cães soropositivo um teste rápido imunocromatográfico (TR-DPP LVC[®], Bio-Manguinhos) de triagem, seguido de um ensaio imunoenzimático (ELISA) com um antígeno do tipo *L. major*-like (Bio-Manguinhos), como teste confirmatório, faz-se necessário investir em antígenos capazes de oferecer um resultado seguro, evitando assim um diagnóstico equivocado e a eutanásia desnecessária de cães. Reforçamos que testes sorológicos altamente sensíveis, como o presente ELISA-LPG ou o TR-DPP LVC[®], Bio-Manguinhos, capazes de identificar cães vacinados e resistentes, não se prestam como teste único em programas de eliminação de cães. A literatura especializada já demonstrou exaustivamente que a eliminação de cães resistentes em áreas endêmicas para leishmaniose visceral não é uma medida eficaz de controle da doença, sendo, ainda, contraproducente (NUNES et al., 2010; MAROLI et al., 2010.; COSTA, 2011).

O ELISA-LPG demonstrou alto valor preditivo positivo (VPP) de 98,8% e valor preditivo negativo (VPN) de 89,3%, comparados aos encontrados por De Arruda et al. (2013; 2016) quando utilizou antígeno bruto de *L. infantum* ou *L. major*.

O alto grau de confiança, determinado pelo valor de Kappa ($k=0,9$) para o ELISA-LPG, bem como o alto percentual de repetitividade (97,5%) e reprodutibilidade (99,7%) (Tabela 2) também reforçam a segurança diagnóstica da molécula de LPG. Esses resultados do valor de Kappa no presente estudo, foram compatíveis com os encontrados por Souza et al. (2013), durante a produção de um antígeno recombinante de *L. infantum*, o ATP difosfohidrolase (rLic-NTPDase-2), destinado para uso e validação no imunodiagnóstico da LVC, com alto grau de confiança ($k=1$), demonstrando a aplicabilidade da molécula de LPG pelo valor de Kappa apresentado. A reprodutibilidade e a repetibilidade são importantes para determinar a estabilidade do teste e os custos laboratoriais associados (DE ARRUDA et al., 2013), aspectos fundamentais quando se investe em novos testes diagnósticos, especialmente em áreas que ainda praticam a eutanásia de cães positivos.

A ausência de reatividade cruzada com outras infecções, verificada nos resultados do ELISA-LPG no presente estudo, é um achado promissor. Reações cruzadas foram descritas em estudos sobre ELISAs desenvolvidos com antígeno cru de *L. infantum* com *Ehrlichia canis* e *Babesia canis* (de OLIVEIRA et al., 2008), assim como com *Trypanosoma cruzi*, *Toxoplasma gondii*, *Ehrlichia canis* e *Babesia canis* (ZANETTE et al., 2014). Silva et al. (2011), utilizando

o teste padrão de ensaio imunoenzimático da Bio-Manguinhos (EIE-Leishmaniose-Visceral-Canina-Bio-Manguinhos®), que tem por base antígeno de *L. major*-like, observaram reação cruzada com soros de cães infectados por *Leishmania braziliensis*. Além disso, a literatura ainda reporta que soros de cães positivos testados com antígenos recombinantes rLic-NTPDase-2 demonstraram baixa reatividade cruzada com *T. cruzi* (Souza et al., 2013). Foi ainda observada reação cruzada em ensaios com os antígenos recombinantes de rK26, rK39 e rA2, ao se utilizar soro de cão infectado por *Leptospira interrogans* e *L. braziliensis* (PORROZZI et al., 2007).

Os resultados deste trabalho demonstraram que o antígeno LPG permitiu a padronização e a validação de um teste baseado em ELISA indireto, com ótimo índice de sensibilidade. Além disso, foi demonstrada a ótima especificidade do ELISA-LPG, teste que não apresentou reações cruzadas em amostras séricas de cães infectados por outros patógenos comumente encontrados em regiões endêmicas para LVC, como *Leishmania braziliensis*, *Trypanosoma cruzi*, *Hepatozoon canis*, *Ehrlichia canis*, *Babesia canis vogeli* e *Anaplasma platys*. Dessa forma, o ELISA-LPG foi capaz de identificar e diferenciar os cães infectados por *L. infantum*. Além disso, o LPG mostrou ser melhor antígeno que o ATL, uma vez que houve reatividade cruzada no ensaio ELISA-ATL em 18,2% (2/11) das amostras de soro-controle de cães clinicamente doentes e infectados por *Ehrlichia canis*, e em 12,5% (1/8) por *Babesia canis vogeli*. Considerando os dados da literatura, mesmo antígenos recombinantes que têm sido desenvolvidos para minimizar as reações cruzadas nos ensaios de sorodiagnóstico de leishmaniose visceral (GOMES et al., 2008), a exemplo de proteínas recombinantes de *Leishmania* marcadas com histidina (OLIVEIRA et al., 2011), antígenos recombinantes K39 e K26 de promastigota de *Leishmania* (ROMERO et al., 2010), ATP difosfohidrolase (rLic-NTPDase-2) de *Leishmania* (SOUZA et al., 2013) e proteína A2 recombinante de *Leishmania* (PORROZZI et al., 2007; COELHO et al., 2016), apresentaram especificidade inferior quando comparada à verificada no presente estudo com o antígeno de LPG. Enfatizamos ainda que o custo associado à produção do antígeno LPG é menor que o custo de um antígeno recombinante.

O ELISA-LPG revela-se como uma ferramenta diagnóstica de alta acurácia; sensível e específica para detectar anticorpos anti-*Leishmania* em cães clinicamente saudáveis sem sinais clínicos e com doença ativa. Podemos considerar que o teste assim padronizado pode ser aplicado em substituição a ensaios menos eficazes, bem como em testes sorológicos em cães que apresentem coinfeção com outros patógenos.

O teste ELISA-ATL desenvolvido neste estudo apresentou especificidade (98,5%) e acurácia (98,6%) elevadas, no entanto, a sensibilidade (85%) foi menor do que a encontrada no ELISA-LPG. As limitações da utilização de antígeno bruto nos ensaios diagnósticos estão

associadas à reatividade cruzada de anticorpos contra *Leishmania* com outros patógenos, como, por exemplo, *Ehrlichia canis* e por *Babesia canis vogeli*, comum em áreas endêmicas e não endêmicas para LVC. Além disso os antígenos brutos apresentam alta variabilidade de resultados entre diferentes laboratórios, variabilidade de pontos de corte entre reações positivas e negativas e reações falso-positivas de cães com LVC e infectados por outros patógenos (AGUIAR, 2008), especialmente outros microrganismos da família Trypanosomatidae (SUNDAR; RAI, 2002), o que reduz a confiabilidade no teste que utiliza ATL como antígeno.

Os critérios de vacinação contra leishmaniose visceral, estabelecidos no Brasil em função dos produtos comerciais, determinam que cães a ser vacinados devem ser soronegativos para anticorpos anti-*Leishmania* (BRASIL, 2014; CEVA-HERTAPE, 2015;). No presente estudo, ao se testar soros de cães provenientes de um banco de amostras de um estudo que comparou duas vacinas comerciais, verificou-se que soros que eram dados como negativos ao se utilizar o ELISA com antígeno total daquele estudo (FERNANDES et al., 2014), resultaram positivos no ELISA-LPG. Além disso, o ELISA-ATL padronizado no presente estudo corroborou todos os dados de soronegatividade nas amostras do estudo de Fernandes e colaboradores (2014). Isso significa que, de fato, o ELISA utilizando o antígeno LPG é mais eficiente para detectar cães soropositivos, em comparação com o ELISA que utiliza como antígeno a fração solúvel total de *L. infantum* (ATL). Além disso, o ELISA LPG foi também capaz de identificar positividade em cerca de 5% de cães que haviam sido considerados como tendo reatividade limítrofe em testes pós-vacinais (M1, M2 e M5) nos achados de Fernandes et al. (2014). Da mesma forma, os soros de antes da imunização (M0) e submetidos ao ELISA-ATL no presente estudo demonstraram resultados concordantes com os apontados no referido estudo (FERNANDES et al., 2014). Um estudo desenvolvido por outro grupo de pesquisadores, também comparando vacinas comercializadas contra LVC no Brasil, encontrou, diferentemente, positividade pós-vacinal em apenas um único cão, e somente após seis meses da vacinação, utilizando o teste DPP-LVC®, utilizado pelo MS para triagem sorológica (CAMPOS et al., 2017). De qualquer forma, diferentes estudos realizados com vacinas nacionais destacam a necessidade do desenvolvimento de testes diagnósticos mais acurados, capazes de diferenciar cães vacinados de infectados (BRASIL, 2011b; FARIA; ANDRADE, 2012).

O ELISA-LPG e o ELISA-ATL apresentaram diferenças na intensidade de reatividade quando usados para testar o soro de cães com diferentes classificações clínicas de LVC (**Figura 10**). Um alto percentual (90%, 9/10) de detecção de cães positivos, com infecção por *L. infantum* comprovada em cultivo parasitológico de amostras de baço e/ ou teste molecular, porém sem

sinais clínicos (estadio I – G1), foi observado no ELISA-LPG. Contrariamente, o ELISA-ATL detectou apenas 10% (1/10) de positividade nesses cães G1. Comparativamente, a literatura traz um estudo que demonstrou a detecção de anticorpos IgG1 anti-*Leishmania* em 41,2% de soros de cães com manifestações clínicas de LVC, e em 82,4% e cães com infecção subclínica (METTLER et al., 2005). O antígeno rK39 em teste ELISA foi 100% sensível para detectar cães sem sinais clínicos da doença (ALVAR et al., 2004). De fato, o presente estudo mostrou que antígeno bruto, no caso o ELISA-ATL, resultou negativo em nove cães com infecção subclínica. O antígeno rA2 aplicado no teste sorológico de cães em estadio I, sem sinais clínicos, apresentou 88% de sensibilidade, e a sensibilidade caiu para 66% quando foram utilizados os antígenos rK39 e rK26 (PORROZZI et al., 2007).

Com relação aos cães classificados no presente estudo como pertencentes ao estadio II (G2) de LVC, 86,95% (20/23) apresentaram resultados positivos no ELISA-LPG, enquanto 73,91% (17/23) foram positivos no ELISA-ATL. Comparativamente, os resultados de Carvalho et al. (2002), utilizando antígeno rA2 apresentaram detecção de 93,3% (14/15) de cães com sinais clínicos de LVC. Já nos cães classificados no estadio III (G3), 92,85% (52/56) foram soropositivos no ELISA-LPG, e 96,42% (54/56) de cães positivos no ELISA-ATL. De fato, o desempenho do teste ELISA no diagnóstico da LVC está relacionado não só com o tipo de antígeno utilizado, mas também com o estado clínico do cão em teste (FARIA; ANDRADE, 2012). Todos os 100% (8/8) dos cães no estadio IV (G4) de LVC foram positivos nos dois ensaios, demonstrando que quanto mais grave a doença, maior a possibilidade de reação positiva em sorotestes, independentemente do antígeno. Os resultados conjuntos do teste ELISA-LPG nos cães em estadios II, III e IV no presente estudo mostram que mais de 90% (78/86) dos cães com sinais clínicos foram positivos à sorologia. Esses achados são semelhantes aos 90% de detecção encontrados por outros autores, ao estudar o antígeno ligante fucosemanose (FML) em ELISA para detecção de cães com doença clínica manifestada, concluindo não haver antígeno disponível com 100% de especificidade e sensibilidade para o diagnóstico de LVC, e considerando que a escolha do antígeno utilizado depende do objetivo da investigação (CÂNDIDO et al., 2008). Conforme já descrito na literatura, os cães mais susceptíveis ao desenvolvimento de doença clínica apresentam uma resposta humoral intensa e não protetora (PINELLI et al, 1994;1995; REIS et al., 2006b).

A validação realizada no presente estudo leva à conclusão de que o antígeno purificado LPG apresentou eficiência no teste ELISA frente aos perfis de soros caninos testados, e foi capaz de identificar cães em estadio I da LVC, sendo assim uma molécula que poderá ser utilizada na produção de testes para diagnóstico em rotina laboratorial.

Tabela 4 – Ensaio de ELISA desenvolvidos para o diagnóstico da infecção com *L. infantum*, com suas respectivas especificidades, sensibilidades, acurácias e achados de reações cruzadas em soros de cães.

Antígeno/teste	n Positivos	n Negativos	Especificidade (%)	Sensibilidade (%)	AUC (%)	Reatividade s/ sinais clínicos	Reações Cruzadas	Referências
LPG	97	68	98,5	91,5	99,7	10		Este estudo
ATL	97	68	98,5	85,0	98,6		<i>E. canis; B. canis</i>	
<i>L. major</i>	98	1.327	83,75	91,8	92,0			De Arruda et al. (2013)
<i>L. infantum</i>	98	1.327	82,7	89,8	89,8			
ELISA	27	33	83,4	91,8	95,0			De Arruda et al. (2016)
IFA	27	33	53,4	90,8	95,0			
β-ME-ELISA	68	37	97,6	93,5	X	68	<i>T. cruzi, Microsporium canis</i>	Barral –Velooso et al. (2013)
TRYP-ELISA	68	37	95,1	87,1	X			
DAT			100	100				
<i>L. amazonensis</i> soro	106	25	100	100		48	<i>T. cruzi, D. immitis</i>	Rosário et al. (2005)
Eluado			96	100				
<i>L. infantum</i> soro			100	98			<i>T. cruzi, D. immitis, B. canis</i>	
Eluado (fracionado)			88	100				
rk39 soro			100	98,1				
Eluado (fracionado)			100	97,2				
Rk26 soro			96	99,1				
Eluado			96	100				
ATL/CTA	47	52	92,1	100				Lima et al. (2010)
Rk39	43	54	94,7	91,5				
ATL/CSA	15	35	87	30		50	<i>L. braziliensis</i>	Porrozzi et al., 2007
rk26	33	17	90	66			<i>L. braziliensis, L. interrogans</i>	
rk39	33	17	85	66			<i>L. braziliensis, L. interrogans</i>	
rA2	42	08	96	88			<i>L. braziliensis</i>	
ATL/CS	44	6		88		50		Porrozzi et al., 2007
rk26	47	3		94				
rk39	50	0		100				
rA2	35	15		70				

9 CONCLUSÕES

- O lipofosfoglicano (LPG) de superfície de *L. infantum* apresentou boa eficácia na identificação de imunoglobulina G (IgG) específica de cão com leishmaniose visceral. Os resultados deste trabalho demonstraram que o antígeno LPG permitiu a padronização e a validação de teste baseado em ELISA indireto, com melhores índices de sensibilidade e com ausência de reações cruzadas em amostras séricas de cães infectados por outros patógenos comumente encontrados em regiões endêmicas para LVC, quando comparado ao extrato antigênico obtido de lisado total de *L. infantum*.
- Os parâmetros de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo e acurácia do ELISA com antígeno LPG mostraram-se equivalentes ou muitas vezes superiores aos melhores resultados citados na literatura sobre antígenos recombinantes ou frações de promastigotas ou amastigotas de *Leishmania* sp. para o diagnóstico da LVC.
- O LPG de superfície de *L. infantum* foi reconhecido por soros de cães infectados com o parasito, e demonstrou ser uma boa ferramenta com elevado poder discriminatório entre cães infectados sadios sem sinais clínicos daqueles cães doentes e com sinais clínicos. Devido à facilidade de obtenção e purificação de LPG, atribuídas a um processo simples e de baixo custo, espera-se que o ELISA-LPG possa se tornar um ensaio de rotina laboratorial para diagnóstico mais acurado da LVC.

10 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Espera-se este trabalho tenha contribuído para mostrar que o LPG é uma molécula candidata ao uso em larga escala para testes imunodiagnósticos, pois os resultados apontam qualidades significativas para uso na rotina laboratorial para diagnóstico da infecção canina por *L. infantum*. Mais estudos estão em andamento para verificar a aplicabilidade do LPG no monitoramento de cães sob tratamento para leishmaniose com diferentes protocolos. Considera-se que nosso trabalho consiste em uma significativa contribuição para atender a uma importante demanda do Ministério da Saúde do Brasil.

REFERÊNCIAS

- ABBEHUSEN, M.M.C.; ALMEIDA, V.A.; SOLCÀ, M.; PEREIRA, L.S.; COSTA, D.J.; GIL-SANTANA, L.; BOZZA, P.T.; FRAGA, D.B.M.; VERAS, P.S.T.; DOS-SANTOS, W.L.C.; ANDRADE, B.B.; BRODSKYN, C.I. Clinical and immunopathological findings during long term follow-up in *Leishmania infantum* experimentally infected dogs. **Scientific Reports**, v.7, p.1-11, 2017. doi:10.1038/s41598-017-15651-8.
- ANDRADE, H.M.; TOLEDO, V.P.C.P.; PINHEIRO, M.B.; GUIMARÃES, T.M.P.D.; OLIVEIRA, N.C.; CASTRO, J.A.; SILVA, R.N.; AMORIM, A.C.; BRANDÃO, R.M.S.S.; YOKO, M.; SILVA, A.S.; DUMONT, K.; RIBEIRO JR., M.L.; BARTCHEWSKYD, W.; MONTE, S.J.H. Evaluation of miltefosine for the treatment of dogs naturally infected with *L. infantum* (= *L. chagasi*) in Brazil. **Veterinary Parasitology**. v.181, p.83– 90, 2011. Doi: 10.1016 / j.vetpar.2011.05.009
- AGUIAR, C. S. **Aplicações dos sorotestes ELISA e Western Blotting na avaliação de reatividade cruzada no diagnóstico diferencial de infecções causadas por *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania chagasi* em soros caninos de área endêmica na Bahia**. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal nos Trópicos) – Universidade Federal da Bahia, Escola de Medicina Veterinária, Salvador, Bahia, 2008.
- ALVAR, J.; CANAVATE, C.; MOLINA, R.; MORENO, J.; NIETO, J. Canine Leishmaniasis. **Advances in parasitology**, v. 57, 88 p. 2004. DOI: 10.1016/S0065-308X(04)57001-X.
- ALVAR, J.; VÉLES, I.D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; DEN BOER, M.; THE WHO LEISHMANIASIS CONTROL TEM. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **PLOS One**. v.7, n.5, p.1-12 ,2012. DOI:10.1371/journal.pone.0035671.
- ALVARENGA, D. G.; ESCALDA, P. M. F.; DA COSTA, A. S. V.; MONREAL, M. T. F. D. Leishmaniose Visceral: Estudo retrospectivo de Fatores Associados à Letalidade. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 43 n. 2 p. 194-197, 2010, DOI: 10.1590/S0037-86822010000200017.
- ALVES, A. S.; MOUTA-CONFORT, E.; FIGUEIREDO, F. B.; OLIVEIRA, R. V.; SCHUBACH, A. O.; MADEIRA, M. F. Evaluation of serological cross-reactivity between canine visceral leishmaniasis and natural infection by *Trypanosoma caninum*. **Research in Veterinary Science**, v. 26, n. 12, 2012.
- AMUSATEGUI, I., SAINZ, A., RODRIGUEZ, F., TESOURO, M. A. Tratamiento de la leishmaniosis canina. **Medicina Veterinaria**. v. 12, n. 5, p. 289-298, 1995.
- ANISH, C.; MATIN, C. E.; WALBRINK, A.; BOGDAN, C.; NTAIL, P.; ANTONIOU, M.; SEEBERGER, P. H. Immunogenicity and diagnostic potential of synthetic antigenic call surface glycans of leishmania. *Acs Chemical Biology*. n. 8, p. 2412-2422, 2013. DOI: /10.1021/cb400602k

ASSIS, R. R.; IBRAIM, I. C.; NOGUEIRA, P. M.; SOARES, R. P.; TURCO, S. J. Glycoconjugates in New World species of *Leishmania*: Polymorphisms in lipophosphoglycan and glycoinositolphospholipids and interaction with hosts. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1820, p. 1354–1365, 2012a.

ASSIS, R.R.; IBRAIM, I.C.; NORONHA, F.S.; TURCO, S.J.; SOARES, R.P. Glycoinositolphospholipids from *Leishmania braziliensis* and *L. infantum*: Modulation of Innate Immune System and Variations in Carbohydrate Structure. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 2, e1543, 2012b. DOI: 10.1371/journal.pntd.0001543.

BARRAL-VELOSO, L.; SEMIÃO-SANTOS, S.J.; ANDRADE, P.P; MELO, M.A.; MARTINS, L.; MARINHO, A.A.; ALMEIDA, J.A.A.; CARDOSO, L.; HARITH, A. A β -mercaptoethanol–modified enzyme linked immunosorbent assay for diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 25, n. 2, p. 239 – 242, 2013. DOI: 10.1177/1040638712474818.

BARROUIN-MELO, S.M.; LARANGEIRA, D.F.; TRIGO, J. et al. Comparison between splenic and lymph node aspirations as sampling methods for the parasitological detection of *Leishmania chagasi* infection in dogs. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.**, v. 99, p. 95-197, 2004.

BARROUIN-MELO, S. M.; LARANGEIRA, D. F.; ANDRADE-FILHO, F. A.; TRIGO, J.; JULIÃO, F. S.; FRANKE, C. R.; AGUIAR, P. H. P.; DOS-SANTOS, W. L. C.; PONTES-DE-CARVALHO, L. Can spleen aspirations be safely used for parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniasis? A study on asymptomatic and polysymptomatic animals. **The Veterinary Journal**, v. 171, p. 331-339, 2006. DOI:10.1016/j.tvjl.2004.11.010.

BOGGIATTO, P.M.; RAMER-TAIT, A.E.; METZ, K.; KRAMER, E.E.; GIBSON-CORLEY, K.; MULLIN, K.; HOSTETTER, J.M.; GALLUP, J.M.; JONES, D.E.; PETERSEN, C. Immunologic Indicators of Clinical Progression during Canine *Leishmania infantum* Infection. **Clinical Vaccine Immunology**. v.17, n.2, p.267–273, 2010. DOI: 10.1128/CVI.00456-09

BORJA-CABRERA, G. P; MENDES, A. C.; SOUZA, P; OKADA, H. Y. L; TRIVELLATO, F.A.A.; KAWASAKI, J.K.A; COSTA, C.C.A; REIS, A.B; GENARO, O; BATISTA, L.M; PALATNIK, M; PALATNIK-DE-SOUZA, C.B. Effective immunotherapy against canine visceral leishmaniasis with the FML-vaccine. **Vaccine**, v. 22, p. 2234-2243, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Casos confirmados de Leishmaniose Visceral, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2010. **Ministério da Saúde – Secretaria de Vigilância em Saúde**, Brasília, 2011a. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/lv_casos_05_09_11.pdf>. Acesso em: 17 dez. 2012, 10:15:24.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Epidemiologia Serviço em Saúde. **Nota técnica conjunta nº1/2011: tratamento da leishmaniose visceral e leishmaniose tegumentar americana no Brasil**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2011b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral /**

Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 1. ed., 5. Reimpr. – Brasília: Ministério da Saúde, 2014. 120 p.: il.

BRASIL. Ministério da Saúde. Casos confirmados de Leishmaniose Visceral, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federativas, 1990 a 2016. **Ministério da Saúde – Secretaria de Vigilância em Saúde**, Brasília, 2016a. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2017/setembro/14/LV-Casos.pdf>>. Acesso em: 07 ago. 2018.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária E Abastecimento Coordenação de Fiscalização De Produtos Veterinários-DFIP-SDA – CPV. **NOTA TÉCNICA Nº11/2016/CPV/DFIP/DAS/GM /MAPA**. Nota Técnica Conjunta nº 001/2016 MAPA/MS. Brasília, 2016b.

BURNS, J.M. JR.; SHREFFLER, W.G.; BENSON, D.R.; GHALIBT, H.W.; BADARO, R.; REED, S.G. Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, n. 2, p. 775-9, Jan 1993.

CAMPOS, M.P. DE.; DE LUCA, P.M.; RENZETTI, A.R.S.; SOUZA, S.M.M.; MENDES JÚNIOR, A.A.V.; BARROS, R.S.; FIGUEIREDO, F.B. Can vaccines against canine visceral leishmaniasis interfere with the serological diagnostics recommended by the Brazilian Ministry of Health? **Ciência Rural**, v. 47, n. 4, e20160846, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20160846>>.

CÂNDIDO, T.C.; PERRI, S.H.V.; GERZOSCHKWITZ, T.O.; LUVIZOTTO, M.C.R.; LIMA, V.M.F. de; Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay based on crude and purified antigen in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in symptomatic and oligosymptomatic dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 157, p.175–181, 2008. DOI:10.1016/j.vetpar.2008.08.010.

CARVALHO, F.A.A., CHAREST, H., TAVARES, C.A.P., MATLASHEWSKI, G., VALENTE, E.P., RABELLO, A., GAZZINELLI, R.T., FERNANDES, A.P. Diagnosis of American visceral leishmaniasis in human and dogs using the recombinant *Leishmania donovani* A2 antigen. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. v. 43, p. 289-295, 2002.

CEVA HERTAPE - Saúde Animal S.A, 2015. Disponível em: <www.hertape.com.br/novo/produtos/leish-tec/>. Acesso em: maio 2017.

COELHO, E.A.F.; COSTA, L.E. LAGE, D.P., MARTINS, V.T.; GARDE, E.; PEREIRA, N.C.J.; LOPES, E.G.P.; BORGES, L.F.N.M.; DUARTE, M.C.; MENEZES-SOUZA, D.; MAGALHÃES-SOARES, D.F.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, M.A.; SOTO, M. TAVARES, C.A.P. Evaluation of two recombinant *Leishmania* proteins identified by an immunoproteomic approach as tools for the serodiagnosis of canine visceral and human tegumentary leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**. v. 215, p. 63-72, 2016. Disponível em: DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.11.006>>.

COELHO-FINAMORE, J.M.C. **Caracterização do polimorfismo intraespecífico do lipofosfoglicano (LPG) de *Leishmania infantum* Nicolle, 1908 e seu papel na interação com *Lutzomyia longipalpis* e macrófagos murinos**. Dissertação (Mestrado em Ciências da

Saúde) – Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Centro de Pesquisas René Rachou. Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, 2010.

COELHO-FINAMORE, J.M.; FREITAS, V.C.; ASSIS, R.R.; MELO, M.N.; NOVOZHILOVA, N.; SECUNDINO, N.F.; PIMENTA, P.F.; TURCO, S.J.; SOARES, R.P. *Leishmania infantum*: Lipophosphoglycan intraspecific variation and interaction with vertebrate and invertebrate hosts. **International Journal for Parasitology**, v. 41, p. 333–342, 2011. DOI:10.1016/j.ijpara.2010.10.004.

COSTA, J.M.L.; Epidemiology of the Leishmaniasis in Brazil. **Gazeta Médica da Bahia**, v.75, n.1, p.3-17, 2005.

COSTA, C.H. How effective is dog culling in controlling zoonotic visceral leishmaniasis? A critical evaluation of the science, politics and ethics behind this public health policy. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.44, p.232-242, 2011.

COURA-VITAL, W.; MARQUES, M.J.; GIUNCHETTI, R.C.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; MOREIRA, N.D.; VITORIANO-SOUZA, J.; VIEIRA, P.M.; CARNEIRO, C.M.; CORRÊA-OLIVEIRA R.; MARTINS-FILHO, O.A.; CARNEIRO M.; REIS, A.B. Humoral and cellular immune responses in dogs with inapparent natural *Leishmania infantum* infection. **The Veterinary Journal**, n. 190, p. e43-e47, 2011.

DA SILVA, V.O.; BORJA-CABRERA, G.P.; CORREIA, P.N.N.; DE SOUZA, E.P.; LUZ, K.G., PALATNIK, M.; A phase III trial of efficacy of the FML-vaccine against canine kalaazar in an endemic area of Brazil (São Gonçalo do Amarante, RN). **Vaccine**, v. 19, p. 1068-78, 2001.

DANTAS-TORRES, F. Canine vector-borne diseases in Brazil. **Parasite & Vectors**, v. 1, n. 25, p. 1-17, 2008.

DAY, M. J. Immunoglobulin G subclass distribution in canine leishmaniasis: a review and analysis of pitfalls in interpretation. **Veterinary Parasitology**, v. 147, p. 2-8, 2007.

De ARRUDA, M.M.; FIGUEIREDO, F.B.; CARDOSO, F.A.; HIAMAMOTO, R.M.; BRAZUNA, J.C.M.; OLIVEIRA, M.R.F.; NORONHA, E.F.; ROMERO, G.A.S. Validity and reliability of enzyme immunoassays using *Leishmania major* or *L. infantum* antigens for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil. **PLOS ONE**, v. 8, n. 7, e69988, 2013.

De ARRUDA, M.M.; FIGUEIREDO, F.B.; MARCELINO, A.P.; BARBOSA, J.R.; WERNECK, G.L.; NORONHA, E.F.; ROMERO, G.A.S. Sensitivity and specificity of parallel or serial serological testing for detection of canine *Leishmania* infection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 111, n. 3, p. 168-173, 2016. DOI: 10.1590/0074-02760150364.

DESCOTEAUX, A.; TURCO SJ. Glycoconjugates in *Leishmania* infectivity. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1455, p. 341-52, 1999.

DINIZ, S.A.; SILVA, F.L.; CARVALHO NETA, A.V.; BUENO, R.; GUERRA, R.M.S.N.C.; ABREU-SILVA, A.L.; SANTOS, R.L. Animal reservoirs for visceral leishmaniasis in

densely populated urban áreas. **Journal Infectology Developing Countries** v. 2, n. 1, p. 24-33, 2008.

DUARTE, M.C.; LAGE, D.P.; MARTINS, V.T.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, M.A.; ROATT, B.M.; MENEZES-SOUZA, D.; GOULART, L.R., SOTO, M.; TAVARES, C.A.P.; COELHO, E.A.F. Recent updates and perspectives on approaches for the development of vaccines against visceral leishmaniasis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, n. 4, p. 398-407, 2016. DOI:10.1590/0037-8682-0120-2016.

DUPREY, Z.; STEURER, F.; ROONEY, J.; KIRCH- HOFF, L.; JACKSON, J.; ROWTON, E.; SCHANTZ, P. Canine visceral leishmaniasis, United States and Canada, 2000–2003. **Emerging Infectology Disease**, v. 12, p. 440-446, 2006.

FARIA, A.R.; ANDRADE, H.M. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: major technological advances and few practical applications. **Revista Pan-Amazônia de Saúde**, v. 3, n. 2, Ananindeua Jun. 2012 doi.org/10.5123/S2176-62232012000200007.

FERNANDES, C.B.; MAGALHÃES JUNIOR, J.T.; JESUS, G.; SOUZA, B.M.P.S.; LARANGEIRA, D.F.; FRAGA, D.B.M.; VERAS, P.S.T.; BARROUIN-MELO, S.M. Comparison of two commercial vaccines against visceral leishmaniasis in dogs from endemic areas: IgG, and subclasses, parasitism, and parasite transmission by xenodiagnosis. **Vaccine**, v. 32, p. 1287-1295, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.12.046>.

FERNANDEZ-PEREZ, F. J.; GOMEZ-MUNOZ, M. T.; MENDEZ, S.; ALUNDA, J. M. *Leishmania*-specific lymphoproliferative responses and IgG1/IgG2 immunodetection patterns by Western blot in asymptomatic, symptomatic and treated dogs. **Acta tropica**, v. 86, p. 83-91, 2003.

FERREIRA, E.C.; LANA, M.; CARNEIRO, M.; REIS, A.B.; PAES, D.V.; DA SILVA, E.S.; SCHALLIG, H.; GONTIJO, C.M.F. Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. **Veterinary Parasitology**, v.146, p.235–241, 2007.

FERRER, L.; AISA, M. J.; ROURA, X.; PORTÚS, M. Serological diagnosis and treatment of canine leishmaniasis. **Veterinary Records**. v. 136, p. 514-516, 1995.

FRANCO, L.H.; BEVERLEY, S.M.; ZAMBONI, D.S. Innate Immune Activation and Subversion of Mammalian Functions by *Leishmania* Lipophosphoglycan Review Article. **Journal of Parasitology Research**, v. Article ID 165126, p.11, 2012. DOI:10.1155/2012/165126.

FREITAS, V.C. **O processo de interação de *Leishmania (Leishmania) chagasi* com *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* e a importância do lipofosfoglicano (LPG)**. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Centro de Pesquisas René Rachou. Fundação Oswaldo Cruz. Belo Horizonte, 2010. 183 f.

FREY A., Di CANZIO J.; ZURAKOWSKI D.A. A statistically defined end point titer determination method for immunoassays. **Journal of Immunology Methods**, v. 221, p. 35-41, 1998.

FUJIWARA, R. T.; VALE, A. M.; FRANCA DA SILVA, J. C.; DA COSTA, R. T.; QUETZ JDA, S.; MARTINS FILHO, O. A.; REIS, A. B.; CORREA OLIVEIRA, R.; MACHADO-COELHO, G. L.; BUENO, L. L.; BETHONY, J. M.; FRANK, G.; NASCIMENTO, E.; GENARO, O., RASO, P., DA COSTA, C.A., CARVALHO, M.D., DO AMARAL, F., BOTELHO, A.C., WILLIAMS, P., DIAS, M., MAYRINK, W. Montenegro skin tests in dogs experimentally infected with *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 87, p. 163-164, 1992.

GRIMALDI, G.Jr.; TEVA, A.; DOS-SANTOS, C.B.; SANTOS, F.N.; PINTO, I.S.; FUX, B.; LEITE, G.R.; FALQUETO, A. Field trial of efficacy of the Leish-tec® vaccine against canine leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* in an endemic area with high transmission rates. **PLOS ONE**.v.12, n.9, p. 1-18, 2017. DOI: doi.org/10.1371/journal.pone.0185438

GOMES, Y.M.; PAIVA CAVALCANTI, M.; LIRA, R.A.; ABATH, F.G.C.; ALVES, L.C. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Biotechnological advances. Review. **The Veterinary Journal**, v. 175, p. 45-52, 2008. DOI: 10.1016/j.tvjl.2006.10.019.

GOTO, H.; PRIANTI, M. G. Immunoactivation and immunopathogeny during active visceral leishmaniasis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 51, n. 5, p. 241-246, 2009.

HANDMAN, E.; GREENBLATT, C.L.; GODING, J.W. An amphipathic sulphated glycoconjugate of *Leishmania*. Characterization with monoclonal antibodies. **The EMBO Journal**, v. 3, p. 2301-6, 1984.

HOSEIN, S.; BLAKE, D.P.; SOLANO-GALLEGU, L. Insights on adaptive and innate immunity in canine leishmaniosis. **Parasitology**, v.144, p.95–115, 2017.

IKEDA-GARCIA, F. A.; MARCONDES, M. Métodos de diagnóstico da leishmaniose visceral canina. **Clínica Veterinária**. n. 71, p. 34-42, 2007.

INIESTA, L.; GÁLLEGO, M.; PORTÚS, M. Immunoglobulin G and E responses in various stages of canine leishmaniasis. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v. 103, p. 77-81, 2005.

IRIS staging of chronic renal disease. Disponível em: <<http://www.iris-kidney.com/guidelines/staging.html>>. Acesso em: 01 dez. 2015.

KAWAMURA, T. Interpretação de um teste sob a visão epidemiológica. Eficiência de um teste. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v. 79, p. 437-41, 2002.

KUMAR, R.; PAI K.; PATHAK K.; SUNDAR S. Enzyme-linked immunosorbent assay for recombinant K39 antigen in diagnosis and prognosis of Indian visceral leishmaniasis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 8, p. 1220-1224, 2001.

LACHAUD, L.; MARCHERGUI-HAMMAMI, S.; CHABBERT, E. et al. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 210-215, 2002.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Leishmaniasis of the New World: taxonomic problems. **British Medical Bulletin**, n,28, p.44-8, 1972.

LAEMMLI, V.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**. v. 227, p.680–685, 1970.

LAGE, D.P.; MARTINS, V.T.; DUARTE, M.C.; COSTA, L.E.; GARDE, E.; DIMER, L.M.; KURSANCEW, A.C.S.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, M. A.; MAGALHÃES-SOARES, D.F.; MENEZES-SOUZA, D.; ROATT, B.M.; MACHADO-DE-ÁVILA, R. A.; SOTO, M.; TAVARES, C.A.P.; COELHO, E.A.F. A new *Leishmania*-specific hypothetical protein and its non-described specific B cell conformational epitope applied in the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Parasitology Research**. v. 115, p. 1649-1658, 2016. DOI 10.1007/s00436-016-4904-x.

LANDIS, J.R.; KOCH, G.G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, v. 33, n. 1 p. 159-174, 1977.

LARA-SILVA, F. O.; MICHALSKY, E. M; FORTES-DIAS, C. L.; FIUZA, V. O. P.; PESSANHA, J. E. M.; REGINA-SILVA, S.; DE AVELAR, D.M.; SILVA, M. A.; LIMA, A. C. V. M. R.; DA COSTA, A. J. A.; MACHADO-COELHO, G. L. L.; DIAS, E. S. Aspectos epidemiológicos do vetor, parasita e reservatório doméstico em áreas de transmissão recente e nenhum caso humano relatado de leishmaniose visceral no Brasil **Acta Tropica**. v. 148, p.128-136, 2015, DOI: 10.1016/j.actatropica.2015.04.002.

LAURENTI, M.D.; LEANDRO JR, M.V.S.; TOMOKANE; T.Y.; DE LUCCA, H.R.L.; ASCHAR, M.; SOUZA, C.S.F.; SILVA, R.M.; MARCONDES, M.; DA MATTA, V.L.R. Comparative evaluation of the DPP® CVL rapid test for canine serodiagnosis in area of visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v.205, p.444–450, 2014.

LEÇA-JÚNIOR, N.F.; GUEDES, P.E.B.; SANTANA, L.N.; ALMEIDA, V.A.; CARVALHO, F.S.; Albuquerque; G.R.; WENCESLAU, A.A.; MUNHOZ, A.D.; SILVA, F.L. Epidemiology of canine leishmaniasis in southern Bahia, Brazil. **Acta Tropica**, v.148, p.115–119, 2015.

LIMA, V.M.F. DE; FATTORI, K.R.; MICHELIN, A.F.; SILVEIRA NETO, L.; VASCONCELOS, R.O. Comparison between ELISA using total antigen and immunochromatography with antigen rK39 in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 173, p. 330-333, 2010. DOI:10.1016/j.vetpar.2010.07.012.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**. v.193, n.1, p.265-275, 1951.

LUTZ, A.; NEIVA, A. Contribuição para o conhecimento das espécies do gênero *Phlebotomus* existentes no Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.4, p.84-95, 1912.

MAALEJ, I. A.; CHENIK, M.; LOUZIR, H.; SALAH, A. B.; BAHLOUOL, C.; AMRI, F.; DELLAGI, K. Comparative evaluation of ELISAS vased on ten recombinant or purified

Leishmania antigens for the serodiagnosis of mediterranean visceral leishmaniasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. n.68, v.3, p.312-320, 2003.

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.

MAGALHÃES-JUNIOR, J.T.; MOTA, T.F.; PORFIRIO-PASSOS, G.; LARANGEIRA, D.F.; FRANKE, C.R.; BARROUIN-MELO, S.M. Xenodiagnosis on dogs with visceral leishmaniasis: Canine and sand fly aspects related to the parasite transmission. **Veterinary Parasitology**. v. 223, p. 120-126, 2016.

MAIA-ELKHOURY, A. N. S.; ALVES, W. A.; SOUSA-GOMES, M. L.; SENA, J. M.; LUNA, E. A. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 12, p. 2941-2947, 2008.

MANGABEIRA, F. O., **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**. v.33, n.4, p. 349-356, 1938.

MAROLI, M.; GRADONI, L.; OLIVA, G.; CASTAGNARO, M.; CROTTI, A; LUBAS, G.; PALTRINIERI, S.; ROURA, X.; ZINI, E.; ZATELLI, A. Guidelines for prevention of leishmaniasis in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v.236, p.1200-1206, 2010.

MARZOCHI, M.C.A.; COUTINHO, S.G.; SABROZA, P.C.; SOUZA, M.A.; SOUZA, P.P.; TOLEDO, L.M.; RANGEL FILHO, F.B. Leishmaniose visceral canina no Rio de Janeiro – Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**. v. 1, n. 4, p. 1985. DOI dx.doi.org/10.1590/S0102-311X1985000400004.

MAURÍCIO, I.L.; STOTHARD, J.R.; MILES, M.A. The Strange Case of *Leishmania chagasi*. **Parasitology Today**, v.16, n.5, P.188-189, 2000.

MATTNER, F.; MAGRAM, J.; FERRANTE, J.; LAUNOIS, P.; Di PADOVA, K.; GATELY, M. K.; LOUIS, J. A.; ALBER, G. Genetically resistant mice lacking interleukin-12 are susceptible to infection with *Leishmania major* and mount a polarized Th2 cell response. **European Journal of Immunology**, v. 26, n. 7, p. 1553-1559, 1996. DOI: 10.1002/eji.1830260722.

METTLER, M.; GRIMM, F.; CAPELLI, G.; CAMP, H.; DEPLAZES, P. Evaluation of Enzyme-Linked Immunosorbent Assays, an Immunofluorescent-Antibody Test, and Two Rapid Tests (Immunochromatographic-Dipstick and Gel Tests) for Serological Diagnosis of Symptomatic and Asymptomatic *Leishmania* Infections in Dogs. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 11, p. 5515-5519, Nov. 2005. DOI:10.1128/JCM.43.11.5515-5519.2005.

MIRÓ G., OLIVA G., CRUZ I., CAÑAVATE C., MORTARINO, M., VISCHER C.; BIANCIARDI, P.; Multicentric controlled clinical study to evaluate effectiveness and safety of miltefosine and alopurinol for canine leishmaniosis. **Veterinary Dermatology**. v. 20, p. 397-404, 2009.

- MISSAWA, N.A.; VELOSO, M.A.E.; MACIEL, G.B.M.L.; MICHALSKY, É.M.; DIAS, E.S. Evidência de transmissão de leishmaniose visceral por *Lutzomyia cruzi* no município de Jaciara, Estado de Mato Grosso, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 1, p. 76-78, 2011.
- MONTEIRO, S.R.D. Participação dos gambás na epidemiologia da leishmaniose na Mata Atlântica do estado de Pernambuco, Brasil. Dissertação (Pós-Graduação em Ciência Veterinária) – Universidade Federal Rural de Pernambuco – Pernambuco, 2010, p. 61.
- MOODI, F.; HANDMAN, E. The structure of *L. major* amastigote lipophosphoglycan. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 268, n. 25, p. 8457-66, 1993.
- NERY, G.; BECERRA, D.R.D.; BORJA, L.S.; MAGALHÃES-JUNIOR, J.T.; SOUZA, B.M.P.S.; FRANKE, C.R.; VERAS, P.S.T.; LARANGEIRA, D.F.; BARROUIN-MELO, S.M. Avaliação da infectividade parasitária a *Lutzomyia longipalpis* por xenodiagnóstico em cães tratados para leishmaniose visceral naturalmente adquirida. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, n. 7, p. 701-707, 2017. <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-736x2017000700009>.
- NICOLATO, R.C., ABREU, R.T., ROATT, B.M., AGUIAR-SOARES, R.D.O., REIS, L.E.S., CARVALHO, M.G., CARNEIRO, C.M., GIUNCHETTI, R.C., BOUILLET, L.E.M., LEMOS, D.S., COURA-VITAL, W., REIS, A.B. Clinical forms of canine visceral Leishmaniasis in naturally *Leishmania infantum*-infected dogs and related myelogram and hemogram changes. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, p. 1-6, 2013.
- NOGUEIRA, C. T. **Busca de antígenos para diagnóstico da leishmaniose visceral canina: potencial uso e aplicação da proteína rLc36**. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Estadual Paulista Araraquara – São Paulo 2014, p.104.
- NUNES, C.M.; PIRES, M.M.; SILVA, K.M.; ASSIS, F.D.; GONÇALVES FILHO, J.; PERRI, S.H.V. Relationship between dog culling and incidence of human visceral leishmaniasis in an endemic area. **Veterinary Parasitology**, v.170, n.(1-2), p.131–133, 2010. doi:10.1016/j.vetpar.2010.01.044
- OLIVEIRA, R. L. **Pesquisa de anticorpos IgG anti-*Leishmania infantum* em raposas (*Cerdocyon thous*) de vida livre e de cativeiro e em cães domésticos (*Canis familiaris*) em Unidades de Conservação do Estado de Pernambuco**. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife - 2012. 53 f.
- OLIVEIRA, T.M.F.S; FURUTA, P.I.; CARVALHO, D.; MACHADO, R.Z.; A study of cross-reactivity in serum samples from dogs positive for *Leishmania* sp., *Babesia canis* and *Ehrlichia canis* in enzyme-liked immunosorbent assay and indirect fluorescent antibody test. **Brazilian Journal Veterinary Parasitology**, v. 17, n. 1, p. 7-11, 2008.
- OLIVEIRA, T.F; VASCONCELOS, E.J; NAKAGHI, A.C; DEFINA, T.P; JUSI, M.M; BALDANI, C.D; CRUZ, A.K; MACHADO, R.Z. A novel A2 allele found in *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 1, p. 42-48, 2011.

ORLANDI, P. A.; TURCO, S. J. Structure of the lipid moiety of the *Leishmania donovani* lipophosphoglycan. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 262, p. 10384-10391, 1987.

PALATNIK-DE-SOUSA, C. B.; SILVA-ANTUNES, I.; MORGADO, A. A.; MENZ, I.; PALATNIK, M.; LAVOR, C. Decrease of the incidence of human and canine visceral leishmaniasis after dog vaccination with Leishmune® in Brazilian endemic areas. **Vaccine**, v. 27, p. 3505-3512. 2009.

PALATNIK-DE-SOUSA, C. B. Vaccines for canine leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 3, n. 69, p. 1-15, 2012.

PALTRINIERI, S.; SOLANO-GALLEGO, L.; FONDALI, A.; LUBAS, G.; GRANDONI, 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. DOI: 10.2460/javma.236.11.1184

PARRA, L.E.; BORJA-CABRERA, G.P.; SANTOS, F.N.; SOUSA, L.O.; PALATNIK-DE-SOUSA, C.B.; MENZ, I. Safety trial using the Leishmune® vaccine against canine visceral leishmaniasis in Brazil. **Vaccine**, v. 25, p. 2180-6, 2007.

PEIXOTO, H. M.; OLIVEIRA, M. R. F.; ROMERO, G. A. S. Serological diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil: systematic review and meta-analysis. **Tropical Medicine and International Health**. v.20, n.3, p. 334-352, 2015, DOI: 10.1111/tmi.12429.

PINELLI, E.; KILLICK-KENDRICK, R.; WAGENAAR, J.; BERNADINA, W.; DEL REAL, G.; RUITENBERG, J. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 1, p. 229, 1994.

PORROZZI, R.; SANTOS DA COSTA, M.V.; TEVA, A.; FALQUETO, A.; FERREIRA, A.L.; DOS SANTOS, C.D.; FERNANDES, A.P.; GAZZINELLI, R.T.; CAMPOS-NETO, A.; GRIMALDI JR., G. Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays based on crude and recombinant leishmanial antigens for serodiagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania infantum* visceral infections in dogs. **Clinical and Vaccine Immunology**. v. 14, p. 544–548, 2007.

QUINNELL, R. J.; COURTENAY O.; GARCEZ, L.M.; KAYE, P.M.; SHAW, M.A.; DYE C, DAY, M.J. IgG subclass responses in a longitudinal study of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 91, n. 3-4, p. 161-168, 2003.

RAFATI, S.; NAKHAE, A.; TAHERI, T.; TASLIMI, Y.; DARABI, H.; ERAVANI, D.; SANOS, S.; KAYE, P.; TAGHIKHANI, M.; JAMSHIDI, S.; RAD, M.A. Protective vaccination against experimental canine visceral leishmaniasis using a combination of DNA and protein immunization with cysteine proteinases type I and II of *L. infantum*. **Vaccine**. v. 23, p. 3716-3725, 2005.

RANGEL, E.F.; LAINSON, R. Proven and putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in Brazil: aspects of their biology and vectorial competence. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, n. 7, v. 104, p. 937-954, 2009.

REIS, A.B., TEIXEIRA-CARVALHO, A.; VALE, A.M.; MARQUES, M.J.; GIUNCHETTI, R.C.; MAYRINK, W.; GUERRA, L.L.; ANDRADE, R.A.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O.A. Isotype patterns of immunoglobulins: hallmarks for clinical status and tissue parasite density in Brazilian dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 112, p. 102-116, 2006a.

REIS, A. B.; MARTINS-FILHO, O. A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; CARVALHO, M. G.; MAYRINK, W.; FRANÇAA-SILVA, J. C.; GIUNCHETTI, R. C.; GENARO, O.; CORREA-OLIVEIRA, R. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. **Research in Veterinary Science**, v. 81, p. 68-75, 2006b.

REIS, A. B.; GIUNCHETTI, R. C.; CARRILLO, E.; MARTINS-FILHO, O. A.; MORENO, J. Immunity to *Leishmania* and the rational search for vaccines against canine leishmaniasis. **Trends Parasitology**, v. 26, p. 341-349, 2010.

RESENDE, D.M; CAETANO, B.C; DUTRA, M.S; PENIDO, M.L; ABRANTES, C.F; VERLY, R.M; RESENDE, J.M; PILO-VELOSO, D; REZENDE, S.A; BRUNA-ROMERO, O; FERNANDES, A.P; GAZZINELLI, R.T. Epitope mapping and protective immunity elicited by adenovirus expressing the *Leishmania* amastigote specific A2 antigen: Correlation with IFN- γ and cytolytic activity by CD8⁺ T cells. **Vaccine**, v. 26, n. 35, p. 4585-4593, 2008.

RIBEIRO, V. M. Leishmaniose visceral canina: aspectos de tratamento e controle. **Clínica Veterinária**, ano XII, n. 71, 2007.

ROATT, B.M.; AGUIAR-SOARES, R.D.O.; REIS, L.E.S.; CARDOSO, J.M.O.; MATHIAS, F.A.S.; BRITO, R.C.F.; SILVA, S.M.; GONTIJO, N.F.; FERREIRA, S.A.; VALENZUELA, J.G.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; GIUNCHETTI, R.C.; REIS, A.B. A Vaccine Therapy for Canine Visceral Leishmaniasis Promoted Significant Improvement of Clinical and Immune Status with Reduction in Parasite Burden. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 1-17, 2017. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00217>

RODRIGUEZ-CORTES, A., FERNANDEZ-BELLON, H., RAMIS, A., FERRER, L., ALBEROLA, J., SOLANO-GALLEGO, L. *Leishmania*-specific isotype levels and their relationship with specific cell-mediated immunity parameters in canine leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 116, p. 190-198, 2007.

ROMERO, G. A. S.; BOELAERT, M. Control of Visceral Leishmaniasis in Latin America - A Systematic Review. **PLoS**, v. 4, n. 1, p. 1-17, 2010.

ROMERO, H.D.; SILVA, L.A.; SILVA-VERGARA, M.L.; COSTA, V.R.R.T.; GUIMARÃES, S.F.; ALECRIM, W. MORAES-SOUZA, H.; PRATA, A. Comparative Study of Serologic Tests for the Diagnosis of Asymptomatic Visceral Leishmaniasis in an Endemic Area. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 81, n. 1, p. 27-33, 2010.

ROSÁRIO, E.Y.; GENARO, O.; FRANÇA-SILVA, J.C.; COSTA, R.T.; MARYNK, W.; REIS, A.B.; CARNEIRO, M. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay using crude

Leishmania and recombinant antigens as a diagnostic marker for canine visceral leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 197-203, 2005.

SACKS, D.L. Metacyclogenesis in *Leishmania* promastigotes. *Experimental Parasitology*, n.69, p.100-103, 1989. DOI: doi.org/10.1016/0014-4894(89)90176-8.

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, 2009.

SCHWANKE, K.; SILVA, A.M.M.; PACHECO, A.; BAHIA, M.; SILVEIRA, F.T.; SCOFIELD, A.; GÓES-CAVALCANTE, G. Molecular diagnosis and frequency of anti-*Leishmania infantum chagasi* antibodies in dogs in Belém/Pará, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 3, Rio de Janeiro, mar. 2014

SILVA, D.A.; MADEIRA, M.F.; TEIXEIRA, A.C., SOUZA, C.M.; FIGUEIREDO, F.B. Laboratory tests performed on *Leishmania* seroreactive dogs euthanized by the leishmaniasis control program. **Veterinary Parasitology**, v. 179, p. 257-261, 2011. DOI:10.1016/j.vetpar.2011.01.048.

SINGH, S. Changing trends in the epidemiology, clinical presentation, and diagnosis of *Leishmania*-HIV co-infection in India. **International Journal of Infectious Diseases**. v. 29, p103-112, 2014. DOI: 10.1016/j.ijid.2014.07.011.

SOARES, R. P. P.; MACEDO, M. E.; ROPERT, C.; GONTIJO, N. F.; ALMEIDA, I. C.; GAZZINELLI, R. T.; PIMENTA, P. F. P.; TURCO, S. J. *Leishmania chagasi*: lipophosphoglycan characterization and binding to the midgut of the sand fly vector *Lutzomyia longipalpis*. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 121, p. 213-224, 2002.

SOCCOL, V.T.; PASQUALI, A.K.S.; POZZOLO, E.M.; LEANDRO, A.S.; CHIYO, L.; BAGGIO, R.A.; MICHALISZYN, M.S.; SILVA, C.; CUBAS, P.H.; PETERLLE, R.; PAZ, O.L.S.; BELMONTE, I.L.; BISETTO-JUNIOR, A. More than the eyes can see: The worrying scenario of canine leishmaniasis in the Brazilian side of the triple border. **PLoS ONE**. n.12 v.12, 2017. Disponível em: e0189182. 2017https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189182.

SOLANO-GALLEGO, L.; LLULL, J.; RAMOS, G.; RIERA, C.; ARBOIX, M.; ALBEROLA, J.; FERRER, L. The Ibizaian hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection. **Veterinary Parasitology**, v. 90, p. 37-45, 2000.

SOLANO-GALLEGO, L.; KOUTINAS, A.; MIRÓ, G.; CARDOSO, L.; PENNISI, M.G.; L. FERRER, L.; BOURDEAU, P.; OLIVA, G.; BANETH, G. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis – Review. **Veterinary Parasitology**, v. 165, p. 1-18, 2009. DOI: 10.1016/j.vetpar.2009.05.022.

SOLANO-GALLEGO, L.; MIRÓ, G.; KOUTINAS, A.; CARDOSO, L.; PENNISI, M.G.; FERRER, L.; PATRICK BOURDEAU, P.; OLIVA, G.; BANETH, G. LeishVet guidelines

- for the practical management of canine leishmaniosis. **Parasites & Vectors**, v. 4, n. 86, p. 1-16, 2011. DOI: 10.1186/1756-3305-4-86.
- SOLCÁ, M.S.; BASTOS, L.A.; GUEDES, C.E.S.; BORDONI, M.; BORJA, L.S.; Evaluating the Accuracy of Molecular Diagnostic Testing for Canine Visceral Leishmaniasis Using Latent Class Analysis. **PLoS ONE**, v. 9, n. 7, p. 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0103635.
- SOULAT, D.; BOGDAN, C. Function of Macrophage and Parasite Phosphatases in Leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v.8, p.1-21, 2017. doi: 10.3389/fimmu.2017.01838
- SOUZA, R.F.; SANTOS, Y.L.; VASCONCELLOS, R.S.; BORGES-PEREIRA, L.; CALDAS, I.S.; ALMEIDA, M.R.; BAHIA, M.T.; FIETTO, J.L.R. Recombinant *Leishmania (Leishmania) infantum* Ecto-Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase NTPDase-2 as a new antigen in canine visceral leishmaniasis diagnosis. **Acta Tropica**, v. 125, 60-66, 2013. doi.org/10.1016/j.actatropia.2012.09.011.
- SPÄTH, G.F.; GARRAWAY, L.A., TURCO, S.J.; BEVERLEY, S.M. The role (s) of lipophosphoglycan (LPG) in the establishment of *Leishmania major* infections in mammalian hosts. **PNAS, Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 100, n. 16, p.9536-9541, 2003. DOI: 10.1073 pnas.1530604100.
- SRINIVASAN, R; AHMAD, T.; RAGHAVAN, V.; KAUSHIK, M.; PATHAKA, R. Positive Influence of Behavior Change Communication on Knowledge, Attitudes, and Practices for Visceral Leishmaniasis/Kala-azar in India. **Global Health: Science and Practice**. v.6, n.1, p. 192-209, 2018. doi.org/10.9745/GHSP-D-17-00087.
- STRAUSS-AYALI, D.; JAFFE, C.L.;BURSHTAIN; GONEN, L.; BANETH, G. Polymerase Chain Reaction Using Noninvasively Obtained Samples, for the Detection of *Leishmania infantum* DNA in Dogs. **The Journal of Infectious Diseases**. v.189, p.1729-1733, 2004.
- SUNDAR, S.; RAI, M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 9, n. 5, p. 951-8, Sep 2002. DOI: 10.1128/CDLI.9.5.951-958.2002
- TEIXEIRA NETO, R.G; GIUNCHETTI, R.C.; CARNEIRO, C.M. VITOR, R.W.A. COURAVITAL, W.; QUARESMA, P.F.; KER, H.G.; MELO, L.A.; GONTIJO, C.M.F. REIS, A.B. Relationship of *Leishmania*-specific IgG levels and IgG avidity with parasite density and clinical signs in canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**. v. 169, p. 248-257, 2010. DOI: 10.1016/j.vetpar.2010.01.023.
- TORRES, M.; BARDAGÍ, M.; ROURA, X.; ZANNA, G.; RAVERA, I.; FERRER, L.; Long term follow-up of dogs diagnosed with leishmaniosis (clinical stage II) and treated with meglumine antimoniate and allopurinol. **The Veterinary Journal**. v. 188, p. 346-51, 2010.
- TRAVI, B. Ethical and epidemiological dilemmas in the treatment of dogs for visceral leishmaniasis in Latin America. **Biomedica**. v.34, p.7-12, 2014. DOI: 10.7705/biomedica.v34i1.2153

TRONCARELLI, M.Z.; CAMARGO, J.B.; MACHADO, J.G.; LUCHEIS, S.B.; LANGONI, H.; *Leishmania* spp. and/or *Trypanosoma cruzi* diagnosis in dogs from endemic and nonendemic areas for canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 164, p.118-123, 2009.

TURCO, S.J. **Trypanosomatid surface and secreted carbohydrates**. In: MARR, J.J.; NILSEN, T.W.; KOMUNIECKI, R.W. editors. *Molecular Medical Parasitology*. California: Academic Press; 2003. p. 225-40.

VIRBAC - Milteforan™ - **Folheto Técnico** Completo Para Veterinários. Disponível em: https://www.virbac.com.br/files/live/sites/br-public/files/contributed/PDFs/AF_FOLDER_VET_DIGITAL.pdf. Acesso em: 01 dez. 2016.

VON ZUBEN, A.P.B.; DONALÍSIO, M.R. Dificuldades na execução das diretrizes do Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral em grandes municípios brasileiros. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 32, n. 6, p.: e00087415, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/0102-311X00087415>.

WEI, X. Q.; LEUNG, P. B.; NIEDBALA, W.; PIEDRAFITA, D.; FENG G.J.; SWEET, M.; DOBBIE, L.; SMITH, A. J. H.; LIEW, F.Y. Altered immune responses and susceptibility to *Leishmania major* and *Staphylococcus aureus* infection in IL-18-deficient mice. **The Journal of Immunology**, v. 163, n. 5, p. 2821-2828, 1999.

WITT, C. J.; RICHARDS, A. L.; MASUOKA, P. M.; FOLEY, D. H.; BUCZAK, A. L.; MUSILA, L. A.; RICHARDSON, J. H.; COLACICCO-MAYHUGH, M. G.; RUEDA, L. M.; KLEIN, T. A.; ANYAMBA, A.; SMALL, J.; PAVLIN, J. A.; FUKUDA, M. M.; GAYDOS, J.; RUSSELL, K. L. The AFHSC-Division of GEIS Operations Predictive Surveillance Program: a multidisciplinary approach for the early detection and response to disease outbreaks. **BMC Public Health**, v. 11 (Suppl. 2), 2009.

ZANETTE, M.F.; LIMA, V.M.F.; LAURENTI, M.D.; ROSSI, C.N.; VIDES, J.P.; VIEIRA, R.F.C.; BIONDO, A.W.; MARCONDES, M. Serological cross-reactivity of *Trypanosoma cruzi*, *Ehrlichia canis*, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Babesia canis* to *Leishmania infantum chagasi* tests in dogs. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 47, n. 1, p. 105-107, 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-1723-2013>.

ANEXO 1



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
ESCOLA DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal da Bahia aprovou, na reunião de 25 de novembro de 2011, o parecer referente ao protocolo nº 19/2011 e certifica que o projeto de pesquisa intitulado "Estudos sistêmicos para o aprimoramento das ações de prevenção e controle das Leishmanioses no Estado da Bahia: Animais como reservatório, transmissibilidade parasitária e estratégias de educação em saúde", sob a coordenação da Profa. Stella Maria Barroin Melo", está de acordo com os princípios de ética e bem estar animal.

Salvador, 01 de dezembro de 2011.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'L. Aragão', is written over a horizontal line.

Lúcio Leopoldo de Aragão da Silva
Coordenador CEUA/MEVZ-UFBA

ANEXO 2



TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO

Pelo presente instrumento, declaro que fui suficientemente esclarecido(a) pelo(a) médico(a) veterinário(a) _____ sobre os procedimentos a serem realizados descritos no projeto intitulado **Avaliação da resposta humoral a lipofosfoglicanos de *Leishmania infantum* em cães com diferentes apresentações clínicas de leishmaniose visceral**, segundo o qual meu animal de nome _____, sexo _____, porte (P) (M) (G), raça _____, idade _____ e cor _____ será tratado e acompanhado em exames nos intervalos de 45, 90, 180, 210, 360 e 720 dias após o início do acompanhamento, realizados por médicos veterinários da equipe, para os quais eu me comprometo a disponibilizar o animal. Declaro que fui informado(a) sobre todos os exames aos quais meu animal vai ser submetido, incluindo o diagnóstico, riscos e objetivos do estudo sobre a resposta do animal ao acompanhamento e, também, estou ciente que serei o responsável por custear o acompanhamento do meu animal.

Declaro também que fui informado(a) de todos os cuidados e orientações pelo(a) veterinário(a) que devo seguir. Estou ciente que deverei informar ao(à) médico(a) veterinário(a) responsável imediatamente sobre possíveis alterações / problemas que possam ocorrer.

Pelo presente também manifesto expressamente minha concordância e meu consentimento para realização dos procedimentos previstos no programa.

Local e data

 Nome e assinatura do proprietário

 Documento de Identidade

 Testemunha

 Testemunha