

**LUANA DIAS DE MOURA**

**PROTEÍNAS RECOMBINANTES E SEU USO NO DIAGNÓSTICO DE  
LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA**

TERESINA

2017

**LUANA DIAS DE MOURA**

**PROTEÍNAS RECOMBINANTES E SEU USO NO DIAGNÓSTICO DE  
LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (PPGCA), da Universidade Federal do Piauí, como exigência para a obtenção do grau Mestre.

Área de concentração: Sanidade e Reprodução Animal.  
Linha de pesquisa: Diagnóstico, Epidemiologia, Controle e Terapia de Doenças Animais.

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria do Socorro Pires e Cruz.**

TERESINA

2017

FICHA CATALOGRÁFICA  
Universidade Federal do Piauí  
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Agrárias  
Serviço de Processamento Técnico

**M929p** Moura, Luana Dias de  
Proteínas recombinantes e seu uso no diagnóstico de leishmaniose visceral canina / Luana Dias de Moura - 2017.  
58 f.: il.

Dissertação ( Mestrado em Ciência Animal ) – Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2017.  
Orientação: Prof<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup> Maria do Socorro Pires Cruz

1. Calazar - Cão 2. ELISA 3. Antígenos 4. Sorologia I. Título

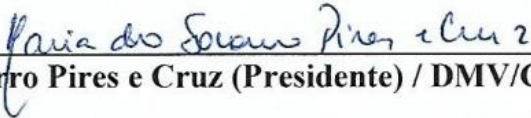
**CDD 636.089 693 64**

**PROTEÍNAS RECOMBINANTES E SEU USO NO DIAGNÓSTICO DE  
LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA**

**LUANA DIAS DE MOURA**

**Dissertação Aprovada em: 23/03/2017**

**Banca Examinadora:**

  
\_\_\_\_\_  
**Profa. Dra. Maria do Socorro Pires e Cruz (Presidente) / DMV/CCA/UFPI**

  
\_\_\_\_\_  
**Profa. Dra. Maria do Carmo de Souza Batista (Interna) / DMV/CCA/UFPI**

  
\_\_\_\_\_  
**Profa. Dra. Eliane Mattos Piranda (Externa) / UFMS**

*“Você é o único representante do seu sonho na face da terra... e o sonho te traz coisas que te faz prosseguir....”*

*Emicida.*

Aos meus pais José Carlos Moura (*in memoriam*) e Maria das Graças Dias, pelo apoio, incentivo, pelas palavras positivas, pelos diálogos tidos e acima de tudo pelo amor incondicional.

*Dedico*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por estar sempre presente em minha vida, me guiando, me dando força e saúde.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela oportunidade e apoio financeiro durante a pós-graduação. A coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (PPGCA) e a todos os professores pelos ensinamentos nas disciplinas cursadas durante o mestrado.

A minha querida MÃE. Por todo investimento, pelos momentos difíceis, pela compreensão, pelo amor incondicional, pela proteção, pelo apoio e carinho. Obrigada por tudo.

Ao meu Tio Valdenir, por sempre acreditar em mim, pelo incentivo e motivação. Por estar presente em todas as fases de minha vida, tenho um carinho muito grande por você.

Agradeço à Universidade Federal do Piauí, pela oportunidade de realizar o curso de pós-graduação e por desenvolver o experimento; a Gerência do Centro de Zoonozes de Teresina, ao Hospital Veterinário pela contribuição na coleta de amostras para realização do experimento.

Agradeço à clínica veterinária Doctor vet, em nome da Nhirneyla Marques, Indira Régia, Pollyana Ibiapina, Larissa Bessa, Silvana Silva, Carol Carvalho, Lidiany Pires, Werner Albuquerque e os demais que fazem parte da equipe da clínica, meu muito obrigado pela ajuda na obtenção de amostras de soro de cães vacinados contra LVC.

Agradeço aos proprietários que aceitaram e autorizaram a coleta de sangue de seus animais, e aos animais meus colaboradores maravilhosos e gentis.

A equipe show com qual trabalho, Leopoldo Marçal, Dayane Higino, Nailson Mello e Raíssa Paula, agradeço pela amizade, por todas as horas de dedicação, pela paciência, pelos conhecimentos adquiridos durante esses anos e pela confiança. Obrigada por tudo, sem o apoio de vocês eu não teria conseguido.

A doutora Flaviane Alves Pinho, mesmo com pouco tempo de convivência, aprendi muito com você, agradeço pelas dicas, pela paciência e pelo apoio.

Agradeço ao Laboratório de Sanidade Animal (LASAN), em nome do Thiago Saraiva e todos que compõem a equipe deste setor, obrigada pelo incentivo e

contribuição de cada um. Agradeço ao seu Francisco por cuidar tão bem dos animais em experimento.

Aos amigos próximos que sempre me apoiaram em todos os momentos, pelas brincadeiras, pela convivência e por sempre estarem presentes na minha vida, Alisson Matheus, Camila Coutinho, Alinne Rosa, Iris Lucia, Fernanda Rocha, Xicão Lima, Rafaela Leite, Thaynara Maria, Elaine Oliveira, Neide Monteiro, Elza Soares, e todos os demais se sintam citados.

Agradeço à minha querida orientadora, Profa. Dra. Maria do Socorro Pires e Cruz pelo incentivo ao espírito da pesquisa, pelos ensinamentos e conhecimentos adquiridos, pela paciência, pela compreensão e pela confiança posta em mim. Não me canso de dizer que tenho maior admiração pela pessoa que é, e a tenho como espelho e exemplo de vida. Hoje digo que não é apenas minha orientadora, mas também amiga.

*Muito Obrigada!*



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	14
1.1 Estruturação da dissertação.....	15
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	15
2.1 Histórico da Doença .....	15
2.2 Epidemiologia e Distribuição.....	16
2.3 Agente Etiológico.....	17
2.4 Vetor e Transmissão .....	17
2.5 Reservatórios.....	18
2.6 Manifestações Clínicas.....	18
2.7 Resposta Imune.....	19
2.8 Medidas de controle e Tratamento .....	20
2.9 Técnicas de diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina.....	21
2.9.1 Diagnóstico Parasitológico.....	21
2.9.2 Diagnóstico Molecular.....	22
2.9.3 Diagnóstico Sorológico.....	22
<b>3. CAPÍTULO</b> .....	<b>27</b>
Abstract.....	27
Resumo.....	28
Introdução .....	28
Materiais e Métodos.....	30
Resultados e Discussão.....	33
Agradecimentos.....	41
Referências.....	42
<b>4. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>46</b>
<b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO GERAL E REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>47</b>
<b>6. ANEXOS</b> .....	<b>57</b>
Anexo I .....	57
Anexo II .....	58

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Anticorpos IgG em soros caninos. Nível de anticorpos IgG anti-*Leishmania* em cães naturalmente infectados com *Leishmania sp.* e negativos (cães com erliquiose, cães vacinados e cães negativos para LV). Soro de cães proveniente de áreas endêmicas para LVC foram testados com diferentes antígenos proteicos KMP11 (A), H2A (B), HSP83 (C), HSP70 (D), LiP0 (E), LiP2A (F), LiP2b (G), SLA (H) ----- **38**

**Figura 2.** Anticorpos IgG em soros caninos. Nível de anticorpos IgG anti-*Leishmania* em cães naturalmente infectados com *Leishmania sp.* (sintomáticos e assintomáticos), cães com erliquiose, vacinados contra LV e cães saudáveis, negativos para LV. Soro de cães proveniente de áreas endêmicas para LVC foram testados com diferentes antígenos proteicos KMP11 (A), H2A (B), HSP83 (C), HSP70 (D), LiP0 (E), LiP2A (F), LiP2b (G), SLA (H) ----- **39**

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1</b> - Avaliação do desempenho de diferentes proteínas testadas com soros de cães naturalmente infectados com <i>L. infantum chagasi</i> e com soro de cães negativos para leishmaniose visceral - NLV (cães com erliquiose, cães vacinados contra a doença e cães negativos para LV) -----	<b>40</b>
--	-----------

**LISTA DE ABREVIATURAS**

CCA	Centro de Ciências Agrárias
CEEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade Ótica
TR-DPP	Rapid Test Dual-Path Platform
ELISA	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
GEZOON	Gerência de Controle de Zoonoses de Teresina
HVU	Hospital Veterinário Universitário
Ig	Imunoglobulina
LASAN	Laboratório de Sanidade Animal
LRPs	Proteínas Ribossomais de Leishmania
LT	Leishmaniose Tegumentar
LVA	Leishmaniose Visceral Americana
LVC	Leishmaniose Visceral Canina
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MS	Ministério da Saúde
NNN	Meio de Cultura Novy-MacNeal-Nicoll
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PPGCA	Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal
RFC	Reação de Fixação de Complemento
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
ROC	Característica de Operação do Receptor – Curva
SFM	Sistema Fagocítico Mononuclear
SLA	Antígeno Solúvel de Leishmania
SRD	Sem Raça Definida
TRIs	Testes rápidos de imunocromatográficos
UFPI	Universidade Federal do Piauí
WHO	World Health Organization – Organização Mundial de Saúde

MOURA, Luana Dias. **Proteínas recombinantes e seu uso no diagnóstico de leishmaniose visceral canina.** 2017. 58 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal), Programa de Pós Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2017.

## RESUMO

O diagnóstico de Leishmaniose Visceral Canina (LVC) é baseado em dados epidemiológicos, achados clínicos e laboratoriais, entretanto ainda é considerado um diagnóstico complexo, visto que algumas doenças compartilham sintomatologia similar. Diferentes técnicas podem ser utilizadas como testes sorológicos, exames parasitológicos e/ou moleculares. Em busca de se obter um método mais específico de diagnóstico sorológico da LV, vem se realizando pesquisas com a utilização de antígenos recombinantes de *Leishmania sp.*, uma vez que o problema na utilização de proteínas totais para o diagnóstico da doença é a existência de reações cruzadas entre soros de animais infectados com outros patógenos. O objetivo deste trabalho foi avaliar o uso de diferentes proteínas recombinantes de *Leishmania infantum chagasi* no diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral canina pelo método de ELISA. O perfil clínico dos animais foi avaliado em pontuações e o somatório dessas pontuações era dado como escore do animal incluído em uma ficha de avaliação. A técnica de ELISA foi realizada utilizando antígeno total de *Leishmania* (SLA) e sete (07) antígenos recombinantes (LiP2a, LiP2b, LiP0, HSP70, HSP83, KMP-11 e H2A). A leitura das placas foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 490 nm, em software SolftMax Pro 5.0. Na análise estatística foi utilizados os testes de ANOVA, Kruskal Wallis e Dunn's com múltiplas comparações de média e significância de 5%. O ponto de corte de cada antígeno foi estabelecido utilizando-se a curva ROC-AUC, baseado na maior sensibilidade e especificidade. Dentre todas as proteínas testadas, a que apresentou melhor resultado foi a LiP2a, a qual conseguiu discriminar bem soros de cães positivos (sintomáticos e assintomáticos) de cães negativos e distinguiu os animais positivos dos demais grupos (erliquiose canina e vacinados contra a doença), apresentando diferença significativa, além de demonstrar melhor desempenho frente ao SLA. Assim, a proteína recombinante LiP2a apresenta-se bastante promissora para ser utilizada com um antígeno alternativo para diagnóstico, com uma boa sensibilidade e especificidade nos testes de ELISA.

**Palavras-chave:** ELISA, calazar, antígenos, sorologia, cão.

MOURA, Luana Dias. **Proteínas recombinantes e seu uso no diagnóstico de leishmaniose visceral canina**. 2017. 58 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal), Programa de Pós Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2017.

### ABSTRACT

The diagnosis of Visceral Canine Leishmaniasis (LVC) is based on epidemiological data, clinical and laboratory findings, however it is still considered a complex diagnosis, since some diseases share similar symptoms. Different techniques can be used as serological tests, parasitological and / or molecular tests. In order to obtain a more specific method of serological diagnosis of VL, research has been carried out with the use of recombinant antigens of *Leishmania* sp., Since the problem in the use of total proteins for the diagnosis of the disease is the existence of reactions Animals infected with other pathogens. The objective of this work was to evaluate the use of different recombinant proteins of *Leishmania infantum chagasi* in the serological diagnosis of canine visceral leishmaniasis by the ELISA method. The clinical profile of the animals was evaluated in scores and the sum of these scores was given as a score of the animal included in an evaluation form. The ELISA technique was performed using total *Leishmania* antigen (SLA) and seven (07) recombinant antigens (LiP2a, LiP2b, LiP0, HSP70, HSP83, KMP-11 and H2A). The plates were read in a spectrophotometer with a wavelength of 490 nm in SolftMax Pro 5.0 software. In the statistical analysis, the ANOVA, Kruskal Wallis and Dunn's tests were used with multiple mean and significance comparisons of 5%. The cutoff point of each antigen was established using the ROC-AUC curve, based on the highest sensitivity and specificity. Among all the proteins tested, LiP2a was able to discriminate well from positive dogs (symptomatic and asymptomatic) from negative dogs and distinguished the positive animals from the other groups (canine and vaccinated dogs). Presenting a significant difference, besides showing a better performance against SLA. Thus, the recombinant LiP2a protein is very promising to be used with an alternative diagnostic antigen with good sensitivity and specificity in ELISA tests.

**Keywords:** ELISA, calazar, antigens, serology, dog.

## 1 INTRODUÇÃO

As doenças causadas por parasitas representam um grave problema de saúde pública nos países pobres e em desenvolvimento (AULT, 2007). Dentre os inúmeros parasitas de importância médica, destacam-se diferentes espécies do gênero *Leishmania*, protozoário agente de um amplo espectro de doenças, coletivamente referidas como leishmanioses (ALVAR et al., 2006; DUJARDIN, 2006). A qual se encontra entre as seis endemias consideradas prioritárias no mundo (WHO, 1990; DESJEUX, 2004).

Dependendo da espécie de *Leishmania* envolvida, a infecção pode causar sintomatologia diferenciada, indo desde a forma cutânea até a forma mais grave, a visceral (SCOTT et al., 2004, ALVAR et al., 2006; DUJARDIN, 2006).

A leishmaniose visceral canina (LVC), conhecida também como calazar, é uma antroponose que acomete canídeos silvestres e domésticos (HERWALDT, 1999; SILVA, 2007; SCHIMMING et al., 2012). O agente etiológico da doença em nosso país é a *Leishmania infantum chagasi* (GONTIJO e MELO, 2004).

A leishmaniose visceral (LV) tem ampla distribuição ocorrendo na Ásia, na Europa, no Oriente Médio, na África e nas Américas, onde neste último continente também é denominada leishmaniose visceral americana (LVA) (MISSAWA e LIMA, 2006; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). Na América Latina, a doença já foi descrita em pelo menos 12 países, sendo que 90% dos casos ocorrem no Brasil, especialmente na Região Nordeste (SILVA, 2007; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

No momento presente ainda não existe um método ideal que garanta sensibilidade e especificidade de 100% no diagnóstico da LV no qual possa identificar cães doentes e/ou portadores da infecção. Esse problema é maior quando se constata que também não há testes adequados para distinguir cães sintomáticos de assintomáticos e também de vacinados. A presença de anticorpos dirigidos contra proteínas do parasita (KAR, 1995; BARBIÉRI, 2006; REIS et al., 2006) tem permitido o desenvolvimento de métodos de sorodiagnósticos utilizando diferentes técnicas: técnicas de imunofluorescência indireta “western blot”, imunocromatografia e teste ELISA (do inglês Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). Porém, após a identificação de proteínas antigênicas com técnicas genômicas ou proteômicas foram descritas diferentes proteínas do parasita com potencial diagnóstico (KUBAR, 2005; SOTO, 2009).

Os testes realizados nos últimos anos utilizando proteínas recombinantes melhoram a especificidade do diagnóstico da forma sintomática de cães e de leishmaniose visceral humana. Nesse sentido deve ser dada ênfase à pesquisa de componentes antigênicos purificados que possam ser utilizados como ferramenta para obtenção de um diagnóstico específico, assegurando maior sensibilidade e especificidade aos testes (GONTIJO e MELO, 2004; KUBAR e FRAGAKI, 2005; DOURADO et al., 2007).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o uso de diferentes proteínas recombinantes de *Leishmania sp.*, já descritas como: a KMP-11, H2A, HSP83, HSP70, P0, P2a e P2b no diagnóstico sorológico da LVC pelo método de ELISA, no intuito de evitar possíveis reações cruzadas e que possam ser capazes de distinguir entre animais sintomáticos e assintomáticos, assim como, portadores de erliquiose e animais vacinados contra a doença, com os animais realmente doentes.

### **1.1 Estruturação da Dissertação**

Esta dissertação apresenta a seguinte estrutura formal: Introdução e Revisão de Literatura, redigidas segundo as normas editoriais do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (PPGCA) da Universidade Federal do Piauí (UFPI); um capítulo, na forma de artigo científico a ser submetido à publicação, assim intitulado: Capítulo I – **“Proteínas recombinantes e sua eficácia no diagnóstico de leishmaniose visceral canina.”**, onde foi redigido e formatado segundo as normas do periódico *Experimental Parasitology* e Considerações finais.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 História da Doença**

No ano de 1885 aconteceram na Índia os primeiros casos de leishmaniose visceral (LV) em humanos e, apenas em 1903, o agente causador desta enfermidade foi descoberto e descrito por William Boog Leishman e Charles Donovan (LEISHMAN, 1903; ROSS, 1903). No Brasil, uma das primeiras observações da infecção em cães por *Leishmania spp.* foi realizada por Evandro Chagas que demonstrou a existência da doença no homem, no cão e a infecção do flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis*



(CHAGAS, 1936; CHAGAS et al., 1938). A doença passou a ser de notificação obrigatória em 1978 (FUNASA, 1999).

Esta doença é conhecida no Piauí desde a década de 80, quando Teresina, a capital do estado, foi sede da primeira epidemia de LV em ambiente urbano no Brasil, decorrente principalmente dos deslocamentos populacionais provocados pelas sequencias de secas no interior do Estado (COSTA et al., 1990). Com o processo de urbanização, a LV nas últimas décadas apresentou ocorrências em outras regiões do país, além do nordeste. Entre os anos de 2006 e 2008, a transmissão autóctone da LV foi registrada em mais de 1.200 municípios em 21 estados da federação (SILVA et al., 2001; WERNECK, 2010).

## **2.2 Epidemiologia e Distribuição**

A leishmaniose é endêmica em 98 países distribuídos em quatro continentes, sendo a maior incidência observada em regiões tropicais e subtropicais, a maioria dos quais classificados como em desenvolvimento, onde existem cerca de 350 milhões de pessoas vivendo em área de risco (WHO, 2010). Em 2014, mais de 90% dos novos casos de LV notificados à Organização Mundial de Saúde (OMS) ocorreram em seis países: Brasil, Etiópia, Índia, Somália, Sudão do Sul e Sudão (WHO, 2017).

No Brasil, a LV é uma doença reemergente, obtendo-se registro de casos em 21 estados da Federação, sendo as principais áreas endêmicas localizadas na região nordeste, devido principalmente às características econômicas e culturais das populações, predominando, sobretudo nos estados da Bahia, Ceará, Piauí e Maranhão (RATH et al., 2003; PORTAL DA SAÚDE - MS, 2015). Entretanto a expansão da doença para áreas consideradas não endêmicas, também tem sido observado em várias regiões brasileiras, como na região sudeste, principalmente em Minas Gerais e São Paulo, na região norte com ocorrência maior estado do Pará e Tocantins, e com menos incidência de casos nas demais regiões do país (DE PAULA et al., 2009; SOUZA et al., 2009; PORTAL DA SAÚDE - MS, 2015).

Nas últimas décadas, a LV vem sofrendo um processo de urbanização, pois cidades de médio ou grande porte têm sido acometidas por verdadeiras epidemias. Além do Nordeste, que no ano de 2010 abrangeu 47,1% dos casos, outras regiões foram envolvidas por esse processo como: Norte (18,0%), Sudeste (17,8%), Centro-Oeste (8,6%) e Sul (0,1%). Esta ocorrência possui a influência de aspectos geográficos,

climáticos, sociais e econômicos (LAZARI, 2007; LAURENTI 2009; BRASIL-MINISTERIO DA SAÚDE, 2012).

### 2.3 Agente Etiológico

O agente etiológico da doença é um protozoário pertencente à ordem Kinetoplastida e à família Trypanosomatidae, parasita intracelular do gênero *Leishmania* que se caracteriza por apresentar mitocôndria única, possuir uma porção rica em kDNA (material genético mitocondrial), denominado cinetoplasto (ROSS, 1903; GRIMALDI JÚNIOR e TESH, 1993).

Estudos realizados com base na análise genética, amplificação de DNA polimórfico, análise de sequência de gp63, e hibridização de *L. chagasi* e *L. infantum*, demonstraram que não existe diferença genética entre ambas e, por essa razão, devem ser consideradas como sinônimos, sendo denominada por alguns autores de *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum chagasi* (GONTIJO e MELO, 2004; SHAW et al., 2006).

São parasitas heteroxenos, ou seja, possuem dois hospedeiros durante seu ciclo de vida, um invertebrado, no qual o parasita se desenvolve no tubo digestivo e outro vertebrado, onde há o desenvolvimento do agente principalmente, em células do sistema fagocítico mononuclear (SFM). As leishmanias são microrganismos intracelulares obrigatórios, que apresenta duas formas principais durante seu ciclo vital, a promastigota, forma flagelada encontrada no hospedeiro invertebrado, considerada a forma infectante e a forma amastigota, com flagelo rudimentar que se multiplica em fagolisossomos de macrófagos dos hospedeiros vertebrados (PESSOA, 1982; MARZOCHI, 1992; HERWALDT, 1999).

### 2.4 Vetor e Transmissão

A transmissão da doença ao hospedeiro ocorre durante a picada de fêmeas hematófagas do inseto vetor, este pertence à ordem díptera, família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, das espécies *Lutzomyia longipalpis* e *L. cruzi*, conhecidos popularmente como flebotomíneos e vulgarmente, como “mosquito-palha” e “birigui”. Somente as fêmeas destes insetos alimentam-se de sangue para a maturação dos seus ovos, que ocorre sete dias após o repasto sanguíneo. Ao picarem o homem ou animal, produzem escarificações na epiderme, rompendo capilares e formando um “lago” de onde obtém o sangue (PESSOA e BARRETO, 1948; FEITOSA et al., 2000;

CAMARGO e BARCINSKI, 2003; GONTIJO e MELO, 2004; MISSAWA e LIMA, 2006; CAMARGO et al., 2007).

## 2.5 Reservatórios

Os hospedeiros vertebrados na LV são animais selvagens, como: roedores, tatus, raposas e preguiças, e animais domésticos, como cães, gatos e o próprio homem. No ambiente doméstico, o cão (*Canis familiaris*) é considerado o principal reservatório do parasita, tendo assim um papel chave no ciclo hospedeiro/reservatório/vetor (ASHFORD, 2000; COURTENAY, 2002, CHAMIZO, 2005; DANTAS-TORRES, 2009). O cão é o reservatório natural mais relevante, e por essa razão é considerado um importante elo na transmissão da leishmaniose humana (SILVA et al., 2007; VERÇOSA et al., 2008).

Os cães, por apresentarem elevado parasitismo cutâneo, são altamente eficientes na manutenção da doença nos focos endêmicos, favorecendo assim, a infecção dos vetores (AGUIAR et al.; 2007; MAIA-ELKHOURY et al; 2008). A pele, nestes animais, é o órgão que mais comumente apresenta sinais de LV e a presença do parasita na pele reforça o importante papel na transmissão e no ciclo do parasita (QUEIROZ et al., 2010). Do ponto de vista epidemiológico, a doença canina é mais importante que a humana uma vez que parece preceder os casos humanos (MARZOCHI et al. 1985; SCOTT et al., 2001; MATTOS et al., 2004; LUVIZOTTO et al., 2005).

## 2.6 Manifestações Clínicas

As manifestações clínicas da LVC são altamente variáveis. Os animais, uma vez infectados, podem permanecer em um quadro infeccioso assintomático ou podem apresentar uma doença progressiva com sinais clínicos variados, ou seja, desde um aparente estado sadio a um severo estado final de doença (CIARAMELLA et al., 1997; REIS et al., 2006). Os sinais clínicos mais frequentes em cães com LVC são linfadenopatia, lesões do focinho ou orelha (úlceras), apatia, anorexia, perda de peso, mucosas pálidas, onicogribose, lesões cutâneas, hemorragia, despigmentação do focinho ou lábio, alopecia, blefarite e ceratoconjuntivite (REIS et al., 2006, SILVA et al., 2017). Alguns estudos realizados na Colômbia, Espanha e Brasil, apontam correlação positiva entre presença destes sinais clínicos e a capacidade dos reservatórios em transmitir a infecção (MOLINA et al., 1994; ALMEIDA et al., 2005). Silva et al. (2017)

demonstraram que a pontuação clínica aumenta de acordo com a positividade dos testes diagnósticos, ou seja, quanto maior a sintomatologia maior a possibilidade do animal ser diagnosticado positivo.

## 2.7 Resposta Imune

A leishmaniose pode ser considerada uma doença imunomediada, visto que o parasita pode influenciar na resposta imune do hospedeiro. Estudos mostram que a ocorrência de lesões sistêmicas está diretamente relacionada com a resposta imune do hospedeiro e a evolução da doença (BARBIERI, 2006).

Os cães naturalmente infectados com *Leishmania spp.* apresentaram elevados títulos em todas as classes imunoglobulinas, principalmente da classe IgG e em particular as subclasses IgG1, IgG2 (GOTO e LINDOSO, 2004), embora o aumento de imunoglobulinas não esteja correlacionado a proteção (PINELLI et al., 1994) e sim com a sintomatologia (COURTENAY et al., 2002). Os níveis séricos de anticorpos da subclasse IgG2 anti-*Leishmania* apresentaram uma maior correlação com os sinais clínicos característicos da doença (ALMEIDA et al., 2005; INIESTA et al., 2005; REIS et al., 2006), ou seja, apresentando correlação com a evolução da doença (FREITAS et al., 2011). Costa et al. (2013) também demonstraram que após infecção experimental em cães, uma frequência crescente desses animais apresentou sorologia positiva para *Leishmania*, e a detecção de cães positivos aumentava com a evolução da doença, bem como observou-se níveis aumentados de anticorpos da subclasse IgG2 e não de IgG1.

A resistência à infecção em animais assintomáticos dependerá da resposta celular Th1, a qual está associada à produção de citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2 e IL-12 além de linfócitos T CD4+ e CD8+. No cão, a resposta imune mais frequentemente observada é a do tipo humoral. O surgimento dos sinais clínicos em cães susceptíveis (sintomáticos) deve-se à capacidade desses animais de desenvolverem uma resposta humoral exacerbada do tipo Th2, com proliferação de linfócitos B e das citocinas IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, que vão promover uma plasmocitose. Essa resposta resulta na persistência do parasita nos tecidos e, conseqüentemente, em uma resposta humoral ineficiente (BARBIERI, 2006).

Nos cães sintomáticos observa-se uma proliferação do parasita nos macrófagos, devido a uma redução no número de linfócitos T CD4+, o que sugere a

ausência de resposta imune efetiva no sentido de eliminar o parasita (CORRÊA et al., 2007).

## 2.8 Medidas de controle e tratamento

As medidas de controle estão centradas no diagnóstico e tratamento precoce dos casos humanos, redução da população de flebotomíneos, eliminação dos reservatórios domésticos e atividades de educação em saúde. Recomenda-se no controle químico vetorial a utilização de inseticidas de ação residual. O tratamento de cães não é recomendado, sendo indicada como medida de controle a eutanásia em cães sororreagentes e/ou com parasitológico positivo (MINISTERIO DA SAÚDE, 2014).

De acordo com a portaria interministerial nº 1.426 de 11 de Julho de 2008 é proibido o tratamento de leishmaniose visceral canina com produtos de uso humano ou não registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). A portaria foi criada levando-se em consideração as normas do “Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral” do Ministério da Saúde (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016).

Entretanto a chegada do primeiro medicamento oral para a leishmaniose visceral canina, miltefosina (hexadecilfosfocolina, HepC), foi um importante avanço terapêutico no tratamento desta enfermidade (SUNDAR e OLLIARO, 2007). A miltefosina foi inicialmente desenvolvida como um agente antineoplásico e demonstrou ter uma atividade leishmanicida *in vitro* e *in vivo* (CROFT et al., 1987). O modo de ação da miltefosina está associada a alterações no metabolismo lipídico, na biossíntese de fosfolípidios (LUX et al., 2000). A miltefosina (Milteforan®) é uma droga usada no tratamento da LVC na Europa desde 2007 (RIBEIRO, 2016). Mitropoulos et al. (2010) demonstraram resultados promissores com a miltefosina no tratamento contra a leishmaniose visceral na Índia e no Paquistão (MITROPOULOS et al., 2010). Por meio da nota técnica conjunta nº 001/2016 MAPA/MS, assinada pelo MAPA e pelo Ministério da Saúde, foi autorizado o registro do produto Milteforan® (Virbac Saúde Animal), para o tratamento da leishmaniose visceral de cães no Brasil. O licenciamento do medicamento foi emitido respeitando-se as determinações da Portaria Interministerial nº 1.426 de 11 de julho de 2008, uma vez que a miltefosina, não é uma droga utilizada para o tratamento da doença em humanos no Brasil (MAPA/MS, 2016).

## 2.9 Técnicas de diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina

A suspeita da LVC é baseada em dados epidemiológicos e nos achados clínicos, entretanto ainda é considerado um diagnóstico complexo, visto que algumas doenças compartilham sintomatologia similar. Diferentes técnicas podem ser utilizadas para confirmar o diagnóstico como: testes sorológicos, pesquisa do parasita por exames parasitológicos e/ou por ensaios moleculares (MARZOCHI et al., 1985; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

### 2.9.1 Diagnóstico Parasitológico

O diagnóstico parasitológico realizado por exame direto baseia-se na detecção da forma amastigota do parasita em lâminas contendo amostras de medula óssea, linfonodo ou pele. A demonstração da *Leishmania spp.* é feita em lâminas coradas por Giemsa, Leishman ou Panótico em amostras obtidas por esfregaço cutâneo e por punção aspirativa. Em microscopia óptica com objetiva de 100x (em imersão) é possível observar as amastigotas de forma elíptica ou arredondada (3 a 4 µm), com núcleo acidofílico e cinetoplasto basofílico, no interior de macrófagos ou livres entre as células. Em preparações coradas com Giemsa, o citoplasma aparece azul e o núcleo grande vermelho. No mesmo plano do núcleo, aparece o cinetoplasto corado em vermelho ou violeta (SIDDIG et al. 1988; ZIJLSTRA et al. 1992; BONATES, 2003; REITHINGER, et al 2003, SCHIMMING & PINTO E SILVA, 2012).

A identificação do parasita pode ser feita também através da cultura do material obtido por punção de medula óssea e linfonodos em meio de cultura específico (MARZOCHI et al., 1985). No isolamento em meio de cultura (*in vitro*) as formas amastigotas do parasita modificam-se em formas promastigotas. O clássico meio de NNN (iniciais dos nomes de seus idealizadores Novy, McNeal e Nicolle) acrescido de meio Schneider e enriquecido com soro fetal bovino é o mais comumente empregado. As culturas devem ser mantidas entre 24 e 26°C e observadas em microscopia óptica comum ou invertida, semanalmente, por um período de até quatro semanas (DEANE e DEANE, 1955; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006; SINGH et al., 2006).

Apesar de ser um procedimento invasivo e de baixa sensibilidade, o diagnóstico da LVC através da demonstração do parasita em amostras oriundas de aspirados ou biópsias, continua sendo considerado o padrão-ouro devido à sua elevada especificidade e inexistência de melhores alternativas (HERWALDT 1999, DESJEUX,

2004; MURRAY et al., 2005; CUNNINGHAM et al., 2012). A visualização do parasito não deixa dúvida sobre a infecção, entretanto além de ser um método laborioso e lento, exige treinamento e prática da equipe em rotina no laboratório (FERRER, 1997).

### **2.9.2 Diagnóstico Molecular**

A utilização da reação em cadeia da polimerase (PCR) é aplicada para o diagnóstico de várias doenças parasitárias, incluindo a leishmaniose. É uma técnica que torna possível identificar e ampliar o DNA do parasita em amostras como sangue total, medula óssea, linfonodos e fragmentos de pele, constituindo uma nova perspectiva para o diagnóstico da LVC, já que apresenta sensibilidade e especificidade próximas a 100%. A técnica de PCR em tempo real foi recentemente introduzida para detectar quantitativamente leishmanias no organismo (VAN DER MEIDE et al., 2005; FRANCINO et al., 2006; IKEDA-GARCIA e FEITOSA, 2006, MANNA et al., 2009).

A combinação de técnicas sorológicas e moleculares aumenta a detecção da infecção canina em diferentes áreas endêmicas, entretanto a técnica de PCR, a qual se tem aprimorado e difundido, é comprovadamente mais sensível e poderia ser a técnica de eleição para o diagnóstico da LVC. Contudo, esta técnica ainda é onerosa, não faz parte da rotina de muitos laboratórios e também não está padronizada pelo Ministério da Saúde no Brasil (QUEIROZ et al 2010).

### **2.9.3 Diagnóstico Sorológico**

A detecção no soro de anticorpos específicos contra antígenos do parasita pode ser efetuada através dos testes sorológicos, tais como Reação de Fixação de Complemento (RFC) (NUSSENZWEIG et al., 1957), Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) (GOUVÊA et al., 2016), o teste rápido TR DPP<sup>®</sup> (do inglês “Dual-Path Platform”) (DOURADO et al., 2007), o ELISA (do inglês “Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay”) (LIRA et al., 2006), e mais recente e promissor ELISA com proteínas recombinantes (SOTO et al., 2009).

A RFC bastante realizada na década de 1930 e a RIFI utilizada a partir da década de 1960 estão em desuso por apresentarem reações cruzadas com outras doenças, como tripanossomíases, além de limitar a especificidade do parasita. Tais aplicações requerem alto nível de habilidade, experiência por serem testes complexos e laboriosos. A ativação do sistema complemento ocorre por ligação antígeno-anticorpo

que resulta na geração de complexos de ataque à membrana, capazes de destruir membranas celulares. Havendo ligação dos anticorpos anti-*Leishmania* a hemácias, ocorrendo hemólise, no qual é feita a mensuração (análise quantitativa) dos níveis de anticorpos. A técnica de imunofluorescência indireta baseia-se no princípio do uso de um conjugado fluorescente (isotiocianato de fluoresceína) ligado a imunoglobulina anti-IgG canina, para evidenciar a ligação do antígeno com anticorpos presentes no soro. São consideradas positivas as amostras que apresentarem reatividade a partir da diluição 1:40 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003; DOURADO, et al., 2007; FARIA & ANDRADE, 2012).

Na década de 1990, consolidou-se a união das técnicas imunoenzimáticas (ELISA) com a cromatografia, originando os testes rápidos imunocromatográficos (TRIs), que possuem vários pontos positivos, como: a rapidez com que o resultado é indicado, a facilidade de uso e a aplicabilidade em campo. Os antígenos que formam a linha teste são rK9, rK39 e rK26, e o anticorpo anti-IgG canino, constituindo a linha-controle. A presença de anticorpos anti-rK9, rK26 e rK39 é indicativo de infecção. Um destes TRI é o TR DPP<sup>®</sup>, que surgiu como uma alternativa para o diagnóstico da LVC, de baixo custo e extremamente sensível, embora haja reações cruzadas com outras doenças. O TR DPP<sup>®</sup> é produzido pelo Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio-Manguinhos e utiliza como proteína rK28 (antígenos rK9, rK39 e rK26), o qual é impregnada numa membrana de nitrocelulose adaptada para uso em campo. A maior desvantagem do teste com o a rK28 é a baixa especificidade, que gera uma elevada proporção de falsos positivos. Por outro lado, o teste com o rK28 auxilia na confirmação dos casos com suspeita clínica devido à alta sensibilidade e especificidade com animais sintomáticos (GRADONI, 2002, REITHINGER et al., 2002, METTLER et al., 2005; BISUGO et al., 2007; DOURADO et al., 2007, GRIMALDI et al., 2012).

Em 2011, o diagnóstico imunológico da LVC passou por modificações, anunciadas pelo Ministério da Saúde (MS) em nota técnica N°01/2011, estabelecendo um novo protocolo de diagnóstico substituindo o antigo, onde o TR DPP<sup>®</sup> passou a ser utilizado como método de triagem e o de ELISA utilizando antígeno solúvel total de *Leishmania sp.* como teste confirmatório (MINISTÉRIO DA SAÚDE-NOTA TÉCNICA, 2011).

Silva et al. (2013) sugerem que o ensaio de DPP seja usado como um teste sorológico alternativo, por seus resultados serem semelhantes aos do ensaio de ELISA-



*L. chagasi*, pela facilidade de armazenamento e transporte, e a capacidade para alcançar um diagnóstico rápido e simples, sem a necessidade de um laboratório especializado. Marcelino e Sousa Filho (2015) relatam que atualmente a produção de TR DPP® não está atendendo a demanda nacional de diagnóstico e controle da LV. No entanto já está disponível no mercado, com registro no MAPA, o TRI de plataforma única produzido pela empresa Alere™, que possui similaridade ao TRI DPP® quanto à sua composição antigênica fornecendo uma nova opção de TRI para o diagnóstico da LVC. O Alere Leishmaniose Ac Test Kit (fabricante) é um imunoenensaio imunocromatográfico para detecção qualitativa de anticorpos anti *Leishmania infantum*, através da proteína recombinante rK28 (antígenos rK9, rK39 e rK26) em amostras de soro, plasma ou sangue total canino, com resultados qualitativos (positivo ou negativo) para o diagnóstico animal.

A técnica de ELISA foi desenvolvida na década de 1970 (ENGVALL e PERLMANN, 1971) onde muitos estudos foram aprimorando o ELISA-padrão, assim como, as diversas variações de ELISA: Dot-ELISA, fucose manose ligant-ELISA ou FML-ELISA, bovine submaxillary mucin-ELISA ou BSM-ELISA, Fast-ELISA, micro ELISA, entre outras. A técnica de ELISA pode ser aplicada para um grande número de amostras em curto espaço de tempo. Além disso, pode ser adaptada para o uso com diversos antígenos, como antígenos brutos, sintéticos ou recombinantes. A utilização de antígenos recombinantes ou purificados específicos do gênero *Leishmania*, melhoram a sensibilidade e a especificidade da técnica. Entretanto, reações cruzadas com enfermidades causadas por outros tripanossomatídeos podem ainda ocorrer (ALVES e BEVILACQUA, 2004; DOURADO et al, 2007; MAIA e CAMPINO, 2008).

O kit ELISA (EIE - Bio-Manguinhos®), que utiliza o antígeno solúvel de *Leishmania major*-like, possui uma sensibilidade 72% e especificidade 87,5% (LIRA et al., 2006), entretanto a sensibilidade e especificidade desse método diagnóstico dependem do tipo de antígeno empregado (espécie ou forma evolutiva do parasita) e de outros fatores como tempo de incubação ou tipo de microplacas utilizadas (REITHINGER et al., 2002). A utilização de antígeno bruto, ou extratos solúveis das formas promastigotas ou amastigotas, limita a especificidade. A tecnologia de proteínas recombinantes, realizada a partir da clonagem molecular de genes selecionados para a codificação de proteínas antigênicas de *Leishmania sp.*, pode ser usada para o desenvolvimento de métodos sorológicos mais específicos (MAIA et al 2008).

Atualmente, muitos pesquisadores procuram obter um método mais específico de diagnóstico da LV, tanto canina como humana, principalmente, com a utilização de antígenos recombinantes de *Leishmania sp.* (SOTTO et al., 2005; SOTTO et al., 2009). As vantagens de seu uso decorrem do fato de que depois destas substâncias, de origem protéica, serem isoladas com significativo grau de homogeneidade, que propiciam para o teste de imuno-ensaio uma grande sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade, além de minimizar em reações cruzadas com certos antígenos presentes em parasitas responsáveis por outras doenças infecciosas, fato este observado, quando do emprego de antígenos tradicionais, ou seja, não recombinantes (PASSOS et al., 2005).

A utilização de proteínas totais do parasita permite obter elevados valores de sensibilidade, sobretudo na forma sintomática de LVC. No entanto, na forma oligossintomática e assintomática, a sensibilidade dos diagnósticos baseados na utilização de proteínas totais podem ser muito variadas dependendo da preparação (FERREIRA et al., 2007; PORROZZI et al., 2007; SOLANO-GALLEGO et al., 2009; MORALES-YUSTE et al., 2012). Proteínas recombinantes são proteínas produzidas a partir de expressão em bactérias ou outros organismos (como fungos) utilizando a tecnologia do DNA recombinante. O sistema de expressão em *Escherichia coli* é normalmente o mais usado para a produção industrial de proteínas recombinantes (TERPE, 2006). Essas proteínas apresentam diferentes funções na *Leishmania sp.*, dentre elas podemos citar: proteínas relacionadas à cinesina, proteínas do choque térmico, histonas nucleossomais, proteína de membrana dos kinetoplastídeos, as proteínas P ribossomais, enzimas e de função desconhecida (SRIVIDYA et al., 2012).

As proteínas de choque térmico (HSP) são intracelulares e as duas principais, HSP70 e HSP83, são sintetizadas a taxas elevadas durante o estresse por calor (BRANDAU et al., 1995). Estas proteínas são chamadas de choque térmico porque foram primeiramente descobertas em células expostas a altas temperaturas (MACFARLANE et al., 1990; POLLA, 1991; RICO et al., 1998), bem como altas concentrações de íons, gases e várias substâncias tóxicas (RICO et al., 1999) e classificadas tradicionalmente com base na sua massa molecular (LINDQUIST & CRAIG, 1988). As HSPs estão presentes em três parasitas, protozoários pertencentes à ordem Kinetoplastida: *Leishmania spp.*, *Trypanosoma brucei* e *T. cruzi* (FOLGUEIRA & REQUENA, 2007).

As histonas nucleossomais constituem proteínas estruturais com papel importante na organização e regulação dos genes. Localizam-se no núcleo das células eucarióticas e existem quatro classes principais de histonas de *Leishmania* (H2A, H2B, H3 e H4) que formam a unidade básica da cromatina, o nucleossomo (REQUENA et al., 2000a).

A proteína de membrana dos kinetoplastídeos de 11 kDa (KMP-11) foi identificada por reatividade imunológica utilizando anticorpo monoclonal específico contra uma proteína historicamente denominada proteína associada a lipofosfoglicanos (LPG) de *Leishmania* (HILL et al., 1978). Devido sua ampla distribuição na membrana celular de kinetoplastídeos, incluindo *Leishmania*, *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*, *Crithidia fasciculata*, *Leptomonas collosoma* e *Phytomonas* spp. e ausência em outros protozoários parasitas e células de mamíferos, essa proteína foi denominada de proteína de membrana dos kinetoplastídeos-11 (STEBECK et al., 1995). A proteína KMP-11 é uma glicoproteína expressa tanto nas formas amastigotas como nas promastigotas de *Leishmania* e seus níveis de expressão é maior em amastigotas e aumenta durante a metacicloogênese (JARDIM et al., 1995; MATOS et al., 2010). Experimentos de localização demonstraram KMP-11 foi encontrada em associação com estruturas de membrana (na superfície celular, bolso flagelar e vesículas intracelulares) (STEBECK et al., 1995; MATOS et al., 2010).

A família de proteínas P de *Leishmania*, constituintes da grande subunidade ribossomais, é composta por três membros (LiP0, LiP2a e LiP2b) e pode ser considerada como potente proteína imunoestimuladora durante o processo de doença. Eles foram descritos como antígenos imunodominantes reconhecidos por soros de humanos e cães infectados naturalmente com *L. infantum chagasi* (SKEIKY et al., 1994; SOTO et al., 1995a).

A melhora dos sistemas de diagnóstico depende da identificação de proteínas que permitam melhorar a sensibilidade. Com a pesquisa de componentes antigênicos purificados, ou seja, de proteínas recombinantes do parasita, acredita-se que se possa ter uma boa ferramenta utilizada para obtenção de um diagnóstico específico, assegurando maior sensibilidade e especificidade aos testes.

### 3 CAPÍTULO I

#### Proteínas recombinantes e seu uso no diagnóstico de leishmaniose visceral canina

#### Recombinant proteins and their use in the diagnosis of visceral canine leishmaniasis

Luana Dias de Moura<sup>1</sup>, Nailson de Jesus Melo<sup>1</sup>, Leopoldo Fabrício Marçal do Nascimento<sup>1</sup>, Manuel Soto<sup>2</sup>, Aldina Barral<sup>3</sup>, Maria do Socorro Pires e Cruz<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Sanidade Animal, Departamento de Morfofisiologia Veterinária, Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, Brasil.

<sup>2</sup>Departamento de Biología Molecular Severo Ochoa, Universidade Autônoma de Madri, Madri 280049, Espanha.

<sup>3</sup>Laboratório de Imunoparasitologia, Centro de Pesquisa Gonçalo Muniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, Bahia, Brasil.

\*Endereço para correspondência:

Luana Dias de Moura, Universidade Federal do Piauí, Centro de Ciências Agrárias, Laboratório de Sanidade Animal. Campus Socopo S/N, 64049-550, Teresina, Piauí, Brasil. Telefone: (86) 3215- 5756 e-mail: ldmoura18@gmail.com

#### Resumo

O diagnóstico de LVC é baseado em dados epidemiológicos, achados clínicos e laboratoriais, entretanto permanece um diagnóstico complexo, visto que algumas doenças compartilham sintomatologia similar. Diferentes técnicas podem ser utilizadas como testes sorológicos, exames parasitológicos e/ou moleculares. Buscando obter um melhor método para o diagnóstico sorológico da LV, vem se realizando pesquisas utilizando antígenos recombinantes de *Leishmania sp.*, O objetivo deste trabalho foi avaliar o uso de diferentes proteínas recombinantes de *Leishmania infantum chagasi* no diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral canina. O perfil clínico dos animais foi avaliado e atribuído escores incluídos em uma ficha de avaliação. A técnica de ELISA foi realizada utilizando antígeno total de *Leishmania* (SLA) e sete (07) antígenos recombinantes (LiP2a, LiP2b, LiP0, HSP70, HSP83, KMP-11 e H2A). Na análise estatística para comparação entre os grupos foi utilizado o teste de ANOVA, teste de Kruskal Wallis e de Dunn's com múltiplas comparações de média e significância de 5%. O ponto de corte de cada antígeno foi estabelecido utilizando a curva ROC-AUC, baseado na maior sensibilidade e especificidade. Dentre todas as proteínas testadas, a que apresentou melhor resultado foi a LiP2a, que conseguiu discriminar soros de cães

40 positivos (sintomáticos e assintomáticos) de cães negativos e distinguiu os animais  
41 positivos dos demais grupos (erliquiose canina e vacinados contra a doença),  
42 apresentando diferença significativa, além de demonstrar melhor desempenho frente ao  
43 SLA. Assim, a proteína recombinante LiP2a apresenta-se bastante promissora para ser  
44 utilizada com um antígeno alternativo para diagnóstico, com uma boa sensibilidade e  
45 especificidade no teste de ELISA.

46 **Palavras-chave:** ELISA, calazar, antígenos, sorologia, cão.

#### 47 48 **Abstract**

49 The diagnosis of LVC is based on epidemiological data, clinical and laboratory  
50 findings, however a complex diagnosis remains, since some diseases share similar  
51 symptomatology. Different techniques can be used as serological tests, parasitological  
52 and / or molecular tests. The aim of this study was to evaluate the use of different  
53 recombinant proteins of *Leishmania infantum chagasi* in the serological diagnosis of  
54 canine visceral leishmaniasis. The objective of this work was to evaluate the use of  
55 different recombinant *Leishmania infantum chagasi* proteins in the serological diagnosis  
56 of canine visceral leishmaniasis. The clinical profile of the animals was evaluated and  
57 assigned scores included in an evaluation form. The ELISA technique was performed  
58 using total *Leishmania* antigen (SLA) and seven (07) recombinant antigens (LiP2a,  
59 LiP2b, LiP0, HSP70, HSP83, KMP-11 and H2A). In the statistical analysis for  
60 comparison between the groups, the ANOVA test, Kruskal Wallis test and Dunn's test  
61 were used with multiple mean and significance comparisons of 5%. The cutoff point of  
62 each antigen was established using the ROC-AUC curve, based on the highest  
63 sensitivity and specificity. Among all tested proteins, LiP2a was able to discriminate  
64 positive dog sera (symptomatic and asymptomatic) from negative dogs and  
65 distinguished the positive animals from the other dogs (canine ehrlichiosis and  
66 vaccinated against the disease), presenting a difference Significant, as well as to  
67 demonstrate better performance against SLA. Thus, the recombinant LiP2a protein is  
68 very promising to be used with an alternative diagnostic antigen with good sensitivity  
69 and specificity in the ELISA test.

70 **Keywords:** ELISA, calazar, antígenos, serology, dog.

#### 71 72 **1. Introdução**

73  
74 A leishmaniose é endêmica em 98 países distribuídos em quatro continentes  
75 (WHO, 2010). Em 2014, mais de 90% dos novos casos de Leishmaniose Visceral (LV)  
76 notificados à Organização Mundial de Saúde (OMS) ocorreram em seis países: Brasil,  
77 Etiópia, Índia, Somália, Sudão do Sul e Sudão (WHO, 2017).

78 No Brasil, a LV é uma doença reemergente, obtendo-se registro de casos em 21  
79 estados da federação, sendo as principais áreas endêmicas localizadas na região  
80 nordeste, predominando principalmente nos estados da Bahia, Ceará, Piauí e Maranhão  
81 (PORTAL DA SAÚDE - MS, 2015).

82 Esta doença é conhecida no Piauí desde a década de 80, quando Teresina foi  
83 sede da primeira epidemia de LV em ambiente urbano no Brasil, decorrente

84 principalmente dos deslocamentos populacionais provocados pelas sequencias de secas  
85 no interior do Estado (COSTA et al., 1990).

86 A leishmaniose visceral canina (LVC), conhecida também como calazar, é uma  
87 antroponose que acometem canídeos silvestres e domésticos (HERWALDT, 1999;  
88 SILVA, 2007; SCHIMMING et al., 2012). O agente etiológico da doença em nosso país  
89 é a *Leishmania infantum chagasi* (GONTIJO e MELO, 2004). A transmissão da doença  
90 ao hospedeiro ocorre durante a picada de fêmeas hematófagas das espécies *Lutzomyia*  
91 *longipalpis* e *L. cruzi*, conhecidos popularmente como flebotomíneos e vulgarmente,  
92 como “mosquito-palha” (GONTIJO e MELO, 2004; MISSAWA e LIMA, 2006;  
93 CAMARGO et al., 2007).

94 O cão é o reservatório natural mais relevante, e por essa razão é considerado  
95 um importante elo na transmissão da leishmaniose humana (SILVA et al. 2007;  
96 VERÇOSA et al., 2008). Do ponto de vista epidemiológico, a doença canina se torna  
97 importante em relação à doença humana uma vez que parece preceder os casos humanos  
98 (MARZOCHI et al. 1985; MATTOS et al., 2004; LUVIZOTTO et al., 2005).

99 Os sinais clínicos mais frequentes em cães com LVC são linfadenopatia, lesões  
100 de focinho ou orelha (úlceras), apatia, anorexia, perda de peso, cerdas, mucosas pálidas,  
101 onicogribose, lesões cutâneas, hemorragia, despigmentação do focinho ou lábio,  
102 alopecia, blefarite e ceratoconjuntivite (SILVA et al., 2017).

103 O diagnóstico da LVC é baseado em dados epidemiológicos, nos achados  
104 clínicos e nos achados laboratoriais que ajudam a confirmar a suspeita, através de  
105 diferentes técnicas, como: testes sorológicos, pesquisa do parasita por exames  
106 parasitológicos e/ou por ensaios moleculares. Entretanto ainda é considerado um  
107 diagnóstico complexo, visto que algumas doenças compartilham sintomatologia similar  
108 (MARZOCHI et al., 1985; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

109 O Ministério da Saúde (MS) em nota técnica N°01/2011, estabeleceu como  
110 diagnóstico da LVC o uso do teste rápido TR DPP® (do inglês “Dual-Path Platform”)  
111 como triagem e o de ELISA (do inglês “Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay”)  
112 como teste confirmatório (MINISTÉRIO DA SAÚDE-NOTA TÉCNICA, 2011).

113 O kit ELISA (EIE - Bio-Manguinhos®), que utiliza o antígeno solúvel de  
114 *Leishmania major*-like, possui uma sensibilidade 72% e especificidade 87,5% (LIRA et  
115 al., 2006), entretanto a sensibilidade e especificidade desse método diagnóstico  
116 dependem do tipo de antígeno empregado (espécie ou forma evolutiva do parasita) e de

117 outros fatores como tempo de incubação ou tipo de microplacas utilizadas  
118 (REITHINGER et al., 2002).

119 A tecnologia de proteínas recombinantes, realizada a partir da clonagem  
120 molecular de genes selecionados para a codificação de proteínas antigênicas de  
121 *Leishmania*, pode ser usada para o desenvolvimento de métodos sorológicos mais  
122 específicos (MAIA et al 2008).

123 As vantagens do uso de antígenos recombinantes de *Leishmania sp.* é que  
124 propiciam para o teste de imuno-ensaio uma grande sensibilidade, especificidade e  
125 reprodutibilidade, além de minimizar reações cruzadas com certos antígenos presentes  
126 em parasitas responsáveis por outras doenças infecciosas, fato este observado, quando  
127 do emprego de antígenos tradicionais, ou seja, não recombinantes (PASSOS et al.,  
128 2005).

129 O objetivo deste trabalho foi avaliar o uso de diferentes proteínas  
130 recombinantes de *Leishmania infantum chagasi*, já descritas como a KMP-11, H2A,  
131 HSP83, HSP70, P0, P2a e P2b, no diagnóstico sorológico da LVC pelo método de  
132 ELISA.

133

## 134 **2. Material e métodos**

135

### 136 *2.1. Aspectos Éticos da Pesquisa*

137 O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal  
138 (CEEA) da Universidade Federal do Piauí sob o protocolo número 092/15, bem como  
139 também foi obtido o consentimento dos tutores dos cães para realizar as coletas para  
140 análise (Anexo I).

141

### 142 *2.2. Local de Trabalho*

143 Este trabalho foi realizado no Laboratório de Microbiologia e Imunologia, do  
144 Laboratório de Sanidade Animal (LASAN), localizado no Centro de Ciências Agrárias  
145 (CCA) na Universidade Federal do Piauí, em colaboração com a Gerência de Controle  
146 de Zoonoses de Teresina (GEZOON), Hospital Veterinário Universitário (HVU) e  
147 algumas clínicas particulares de Teresina.

148

### 149 *2.3. Avaliação Clínica*

150 O perfil clínico dos animais incluídos no estudo foi avaliado de acordo com  
151 Silva et al. (2017), sendo atribuídos escores que foram implantados em uma ficha de

152 avaliação (Anexo II). Foram avaliados, entre outros parâmetros, tamanho do linfonodo,  
153 comprometimento da pele, perda de peso, presença de lesões oculares.

154 Para cada sinal clínico observado foi atribuída uma pontuação e o somatório  
155 individual das pontuações de todos os parâmetros clínicos, ou seja, o valor total dos  
156 pontos refere-se ao escore do animal. Já para a ausência ou normalidade do sinal clínico  
157 avaliado, foram considerados sem pontuação, ou seja, foi atribuído o valor zero (0). De  
158 acordo com a gravidade do sinal clínico apresentado foi atribuída pontuação um (1) para  
159 o sinal mais brando e dois (2) para o sinal clínico mais grave dentro daquele analisado  
160 como, por exemplo, estado nutricional: magro (1), caquético (2) e assim  
161 sucessivamente.

162 Considerando que os cães positivos para LVC foram divididos em  
163 assintomáticos e sintomáticos, o grupo que compôs os animais assintomáticos foram  
164 classificados com escore de até 3 pontos, já o grupo de cães sintomáticos com escore  
165 superior a 3 pontos e o grupo de cães negativos com escore zero.

166

#### 167 2.4. Tamanho Amostral

168 Esta pesquisa contou com 202 soros, onde 138 destes animais já possuem  
169 registro no banco de dados (soros) do grupo de pesquisa, amostras provenientes do  
170 projeto anteriormente aprovado no CEEA sob o número 021/12 intitulado “Estudos das  
171 variantes genéticas de *Leishmania infantum chagasi* em Teresina, Piauí causadores de  
172 Leishmaniose Visceral Canina.” As outras 64 amostras de soros teve procedência de  
173 clínicas veterinárias particulares de Teresina e da GEZOON.

174 Neste experimento os animais foram divididos em cinco grupos: 46 amostras  
175 (soros) de animais saudáveis, sem LVC (G1), 46 amostras (soros) de animais  
176 assintomáticos, com LVC, porém sem sinais sugestivos (G2), 46 amostras (soros) de  
177 animais sintomáticos, com LVC (G3), 46 amostras (soros) de animais com Erlichiose  
178 canina (G4), sem LVC e 18 amostras (soros) de animais sem LVC vacinados com Leish-  
179 Tec® (G5).

180

#### 181 2.5. Soros Caninos

182 Amostras de sangue total foram coletadas com auxílio de tubos tipo  
183 *Vacutainer*®, com capacidade de 5mL contendo ativador de coagulação para obtenção  
184 do soro por meio de venopunção jugular. Estas amostras foram centrifugadas a 2000  
185 rpm, durante 10 minutos, e, após a centrifugação, foram aliquotados em criotubos de 2



186 mL, identificadas e armazenadas em caixas de papelão 9x9 a -20°C para a realização  
187 dos testes sorológicos.

188

### 189 *2.6. Diagnóstico de LVC e Erliquiose canina*

190 Os animais que compuseram o grupo de cães positivos para LVC foram  
191 provenientes da GEZOON e do HVU, com diagnóstico sorológico de LVC. Estes  
192 animais foram encaminhados e reavaliados, tanto em exames sorológicos (TR DPP® e  
193 ELISA), como parasitológicos (amostras de medula, linfonodo e pele), considerando  
194 para os grupos sintomáticos e assintomáticos apenas aqueles com ambos resultados  
195 positivos. Foram realizados exames sorológicos e parasitológicos dos demais grupos,  
196 nos quais foram obtidos resultado negativo para LVC. O grupo de cães com erliquiose  
197 foi selecionado a partir da positividade no Teste rápido ALERE (Erliquiose Ac Test Kit -  
198 PART.: 006/15-2105DA005). Apenas os soros do grupo de cães vacinados com Leish-  
199 Tec® foram gentilmente cedidos por clínicas particulares de Teresina.

200

### 201 *2.7. Clonagem, expressão e purificação das proteínas recombinantes*

202 As proteínas recombinantes utilizadas no estudo (KMP-11, H2A, HSP83, HSP70,  
203 P0, P2a e P2b) foram gentilmente cedidas pelo Prof Dr Manuel Soto (Departamento de  
204 Biologia Molecular Severo Ochoa, Universidade Autônoma de Madrid). A clonagem,  
205 expressão e purificação destas proteínas foi realizada segundo o protocolo descrito por  
206 Soto et al. (2015) utilizando sistema de colunas Poly Prep® Chromatography Columns  
207 (Catalog. 731-1550- Bio-Rad) e resina de Agarose NICKEL (Quiagen®). O sucesso da  
208 purificação foi monitorado por gel de eletroforese SDS-PAGE com concentrações de  
209 acordo com o tamanho das proteínas. A determinação da concentração das proteínas foi  
210 realizada pelo Método de Bradford (1976).

211

### 212 *2.8. Teste Sorológico*

#### 213 *ELISA indireto utilizando antígenos recombinantes de Leishmania*

214 Para o desenvolvimento da técnica de ELISA com antígenos recombinantes de  
215 *Leishmania* foram utilizadas placas de 96 poços de poliestireno de superfície  
216 MaxiSorp™ (NUNC/ Thermo Scientific), que foram previamente sensibilizadas com os  
217 antígenos proteicos na concentração de 2µg/mL para antígeno total de *Leishmania*  
218 (SLA) e 1µg/mL para os demais antígenos recombinantes (LiP2a, LiP2b, LiP0, HSP70,  
219 HSP83, KMP-11 e H2A) diluídos em tampão Ureia 3M pH 8, e incubadas *overnight* à

220 4°C. Após a incubação o conteúdo das placas foi desprezado e estas lavadas por três  
221 vezes com 200 µl por poço de Wash Buffer – PBS-TB (PBS + 0,5% Tween 20). Em  
222 seguida foi realizado o bloqueio dos poços com 200 µl por poço de Blocking Buffer -  
223 BB (PBS-TB com 5% de leite desnatado) e incubado por 1 hora em temperatura  
224 ambiente. Após o bloqueio as placas foram lavadas quatro vezes com 200 µl de PBS-TB  
225 (PBS + 0,5% Tween 20) por poço. Os soros caninos foram diluídos em 1:400 no BB  
226 (PBS-TB com 5% de leite desnatado), logo após, foi adicionado 100 µl em cada poço e  
227 incubados sobre agitação por 2 h. Seguiram-se novamente etapas de lavagem descritas  
228 anteriormente. Realizou-se nova incubação com o conjugado anti-cão marcado com  
229 peroxidase (SIGMA N° Cat: A6792), durante 1 hora sobre agitação, numa diluição de  
230 1:6000 em BB ( PBS-TB com 5% de leite desnatado). Seguiram-se novamente etapas  
231 de lavagem. Para revelação das reações foram utilizadas primeiramente cápsulas de  
232 tampão citrato-fosfato com perborato de sódio (PCB) (SIGMA N° Cat: P4922) diluídas  
233 em água destilada (1 capsula para 100 ml de água destilada), acrescentou-se depois 2  
234 partilhas de OPD 20 mg (o-phenylenediamine dihydrochloride) (Sigma Chemical  
235 Company – P7288), e por fim, adicionando-se 200 µl por poço, após 20 minutos em  
236 câmara escura a reação foi interrompida com solução de parada (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3N) com 50 µl  
237 por poço. A leitura das placas foi realizada em Espectrofotômetro com comprimento de  
238 onda de 490 nm, utilizando o software SolftMax Pro 5.0.

239

### 240 2.9. *Análise estatística*

241 A análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism 5.0  
242 (GraphPad Prism Inc., San Diego, CA). Para comparação entre os grupos foi utilizado o  
243 teste de ANOVA, teste de Kruskal Wallis e de Dunn's com múltiplas comparações de  
244 médias adquiridas a partir da densidade ótica-DO dos soros de cada grupo, utilizando  
245 um nível de significância de  $p < 0,05$  e IC- 95%. O ponto de corte de cada antígeno foi  
246 estabelecido utilizando a curva ROC, baseado na maior sensibilidade e especificidade,  
247 sendo o desempenho e acurácia de cada teste estabelecido a partir da área sob a curva –  
248 AUC.

249

## 250 3. **Resultados e Discussão**

251

252 A técnica de ELISA é um teste sorológico utilizado para diagnosticar a maioria  
253 das doenças infecciosas, incluindo a leishmaniose. Embora a técnica seja sensível, a sua

254 especificidade depende do antígeno aplicado (FARAHMAND e NAHREVANIAN,  
255 2016). Atualmente vem se desenvolvendo pesquisas com o intuito de melhorar o  
256 desempenho da técnica de ELISA para o sorodiagnóstico de LVC, incluindo a análise  
257 de vários antígenos recombinantes.

258 Para avaliar o desempenho diagnóstico das proteínas recombinantes de  
259 *Leishmania infantum chagasi* deste estudo, foi realizada a técnica de ELISA com todas  
260 as proteínas, ensaiadas individualmente. Como proteína de diagnóstico comparativo  
261 utilizou-se o SLA de *L. infantum* (antígeno solúvel bruto de *Leishmania*), que é o  
262 antígeno mais comumente utilizado nos ensaios de ELISA para diagnóstico de LVC  
263 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). Os valores de densidade ótica (DO) das amostras  
264 foram calculados (**Figura 1 e 2**) e os valores de corte (linhas pontilhadas) para  
265 discriminação entre as amostras negativas e positivas foram determinados usando as  
266 curvas ROC para avaliar a eficácia das proteínas recombinantes, possibilitando a  
267 seleção de antígenos possivelmente mais eficientes que o SLA no imunodiagnóstico da  
268 LVC.

269 Em uma avaliação geral do SLA (**Fig. 1H**) foi constatado que esse antígeno  
270 apresentou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grupos de animais sintomáticos e  
271 negativos, assintomáticos e negativos. Entretanto esse antígeno demonstrou baixa  
272 reatividade em soros de cães positivos para a infecção, principalmente para  
273 assintomáticos, e reativo em alguns soros de animais negativos (Erliquiose canina,  
274 vacinados contra a doença e negativos para LVC).

275 Quando comparamos os resultados discriminando cada grupo (**Fig. 2H**)  
276 observou-se que o SLA apresentou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) para a maioria dos  
277 grupos, exceto entre o grupo assintomático com o de erliquiose canina. Verificamos  
278 que este antígeno demonstrou discreta reatividade com estes soros do grupo de  
279 erliquiose canina e com soros de cães vacinados contra a doença, demonstrando assim,  
280 possível reação cruzada com epítomos compartilhados desses grupos, o que concorda  
281 com autores que relatam que a utilização de proteínas totais do parasita permite obter  
282 valores elevados de sensibilidade, sobretudo em amostras de animais com a forma  
283 sintomática da LVC (SOLANO-GALLEGO et al., 2009; MORALES-YUSTE et al.,  
284 2012).

285 No entanto, na forma assintomática a sensibilidade do diagnóstico baseado na  
286 utilização de proteínas totais pode ser variada, sendo a detecção de anticorpos  
287 geralmente menor para infecções iniciais sem sintomatologia (FERREIRA et al., 2007;

288 PORROZZI et al., 2007). Outros trabalhos também demonstraram a existência de  
289 reações cruzadas quando se utiliza as proteínas totais de *Leishmania sp*, com soros de  
290 animais infectados com outros patógenos alterando a sensibilidade e especificidade, e  
291 comprometendo o diagnóstico (FERREIRA et al., 2007; PORROZZI et al., 2007;  
292 ALVES et al., 2012).

293 Neste experimento não ocorreram bons resultados com as proteínas de choque  
294 térmico (HSP70 e HSP83). De uma maneira geral o HSP70 apresentou diferença  
295 estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grupos de animais sintomáticos e  
296 negativos (**Fig. 1D**), porém quando se avaliou de forma detalhada todos os grupos  
297 (**Fig. 2D**), este antígeno demonstrou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grupos de  
298 animais sintomáticos e de erliquiose canina, sintomáticos e cães vacinados contra a  
299 doença, sintomáticos e negativos para LVC, entretanto não apresentou diferença  
300 significativa entre o grupo de animais assintomáticos para LVC e animais negativos  
301 (erliquiose canina, vacinados contra a doença e negativos para LVC), demonstrando  
302 assim que a positividade com essa proteína é detectada apenas na fase de  
303 sintomatologia da doença, não sendo capaz de detectar a doença no início da infecção  
304 sem sinais clínicos, além de demonstrar alta reatividade para os grupos de erliquiose  
305 canina e de cães vacinados contra a doença.

306 A HSP83 apresentou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grupos de  
307 animais sintomáticos e negativos, assintomáticos e negativos (**Fig. 1C**). Entretanto a  
308 diferença significativa entre cães com LV, independente do status clínico, foi apenas  
309 com o grupo de cães vacinados contra a doença (**Fig. 2C**). Da mesma forma que a  
310 HSP70, a HSP83 também apresentou alta reatividade para os grupos de erliquiose  
311 canina e de cães vacinados contra a doença, resultando em falsos positivos para LVC.

312 Os resultados deste estudo discordam de boa parte da literatura, onde Andrade  
313 (1997) observou que pacientes e cães com calazar têm grandes quantidades de  
314 anticorpos contra HSP70 de *Leishmania*. Angel et al. (1996) relatou que a HSP83 de *L.*  
315 *infantum* é um antígeno imunodominante no calazar canino, sendo referência de  
316 possíveis candidatos para o sorodiagnóstico de leishmaniose canina. Kaur & Kaur  
317 (2013) demonstraram que as proteínas de choque térmico HSP70 e HSP83 tiveram bom  
318 potencial sorodiagnóstico contra a leishmaniose visceral murina experimental.  
319 Menezes-Souza et al. (2014) relatam que a HSP83 é um alvo promissor tanto no  
320 diagnóstico de LT humana, como no diagnóstico de LV humana e canina e a curva  
321 ROC confirmou o desempenho superior da HP83 em comparação com SLA, que é o

322 teste referência para o diagnóstico de LVC no Brasil (kit EIE-LVC®, Manguinhos,  
323 Fiocruz). Nieto et al. (1999) mostraram que o antígeno HSP70 de *L. infantum* foi  
324 reconhecido pelos soros de todos os cães infectados experimentalmente em seu estudo e  
325 que os anticorpos anti-HSP70 foram detectados no início da infecção, demonstrando  
326 assim que essa proteína pode ser utilizada como marcador de diagnóstico logo no início  
327 da infecção.

328 Dentre as histonas, a H2A avaliada neste estudo não apresentou bons  
329 resultados, com diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) apenas entre o grupo  
330 de cães assintomáticos e negativos (cães vacinados e cães negativos para a doença), não  
331 apresentou nenhuma reatividade nos grupos de cães positivos para LV (**Fig. 1B**), tanto  
332 nos sintomáticos como nos assintomáticos, entretanto apresentou discreta reatividade  
333 nos grupos de cães com erliquiose e cães vacinados contra a doença (**Fig. 2B**),  
334 demonstrando assim baixa eficiência em detectar cães positivos para a doença e a  
335 capacidade de não distinguir cães com outras patologias (erliquiose), bem como cães  
336 vacinados.

337 Estes resultados discordam da literatura, onde Soto et al. (1999) demonstraram  
338 antigenicidade em soros de cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum*, que  
339 foram detectados anticorpos contra as histonas H2A, H2B, H3 e H4 nestes cães e  
340 concluiu que a histona H2A, juntamente com a H3 são mais imunogênicas do que as  
341 demais histonas (H2B e H4) durante a infecção por *Leishmania canina*.

342 Soto et al. (1995b) relataram também que durante a infecção por *L. infantum*, a  
343 histona H2A é um alvo da resposta imune humoral, indicando em seus resultados que  
344 78% dos soros de cães com LV tinham níveis significativos de anticorpos anti-H2A,  
345 considerando a H2A uma excelente candidata para o diagnóstico de leishmaniose  
346 canina. Nieto et al. (1999) demonstraram que o aparecimento de anticorpos anti-histona  
347 (H2A e H3) está associado com a progressão da doença, pois apenas os cães que  
348 desenvolvem a doença apresentou reatividade significativa contra estas histonas.

349 A KMP-11 avaliada de uma forma geral (**Fig. 1A**) apresentou diferença  
350 estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grupos de animais sintomáticos e  
351 negativos (erliquiose canina, vacinados contra a doença e negativos para LVC),  
352 assintomáticos e negativos (erliquiose canina, vacinados contra a doença e negativos  
353 para LVC). Entretanto apresentou reatividade em soros de cães negativos para a  
354 infecção (erliquiose canina, vacinados contra a doença e negativos para LVC).

355 Já avaliando os grupos individualmente na KMP-11, é possível observar que  
356 os soros de cães sintomáticos apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) dos  
357 demais grupos (**Fig. 2A**) e o grupo de cães assintomáticos teve diferença significativa  
358 ( $p < 0,05$ ) apenas do cães negativos para LV (**Fig. 2A**). Além disso, essa proteína  
359 apresentou reatividade com soro de cães com erliquiose e com soro de cães vacinados  
360 contra a doença, induzindo assim a ocorrência de reação cruzada nestes dois grupos.  
361 Então a KMP-11 demonstrou boa detecção de soro de cães com LV, principalmente de  
362 cães com sintomatologia para a doença, mesmo não discriminando bem os demais  
363 grupos (erliquiose e vacinados), concordando assim com autores que relatam que a  
364 presença da proteína está diretamente relacionada com a presença do parasita, ou seja,  
365 com o desenvolvimento da infecção.

366 Matos et al. (2010) demonstraram que a expressão aumentada de KMP-11 em  
367 promastigotas metacíclicas, e especialmente em amastigotas indica que esta molécula  
368 tem um papel importante na relação parasita-hospedeiro. A KMP-11 atua  
369 predominantemente em macrófagos e induz a produção de IL- 10, citocina responsável  
370 pela patogênese e persistência do parasita (CARVALHO et al., 2005). Assim, esta  
371 proteína é considerada por esses autores como responsável pela infecção por aumentar o  
372 número de amastigotas dentro de macrófagos pela indução de IL-10.

373 Os resultados deste trabalho concordam também com a alta soroprevalência  
374 relatada anteriormente em 25 cães naturalmente infectados na Espanha (BERBERICH  
375 et al., 1997) e Todolí et al. (2009) relataram em seu estudo que a proteína KMP11 foi  
376 reconhecida por 75,4% dos cães infectados. A elevada taxa de soro-reconhecimento  
377 encontrada em cães naturalmente infectados e infectados experimentalmente sugere que  
378 o KMP11 desempenha um papel significativo na resposta imune humoral.

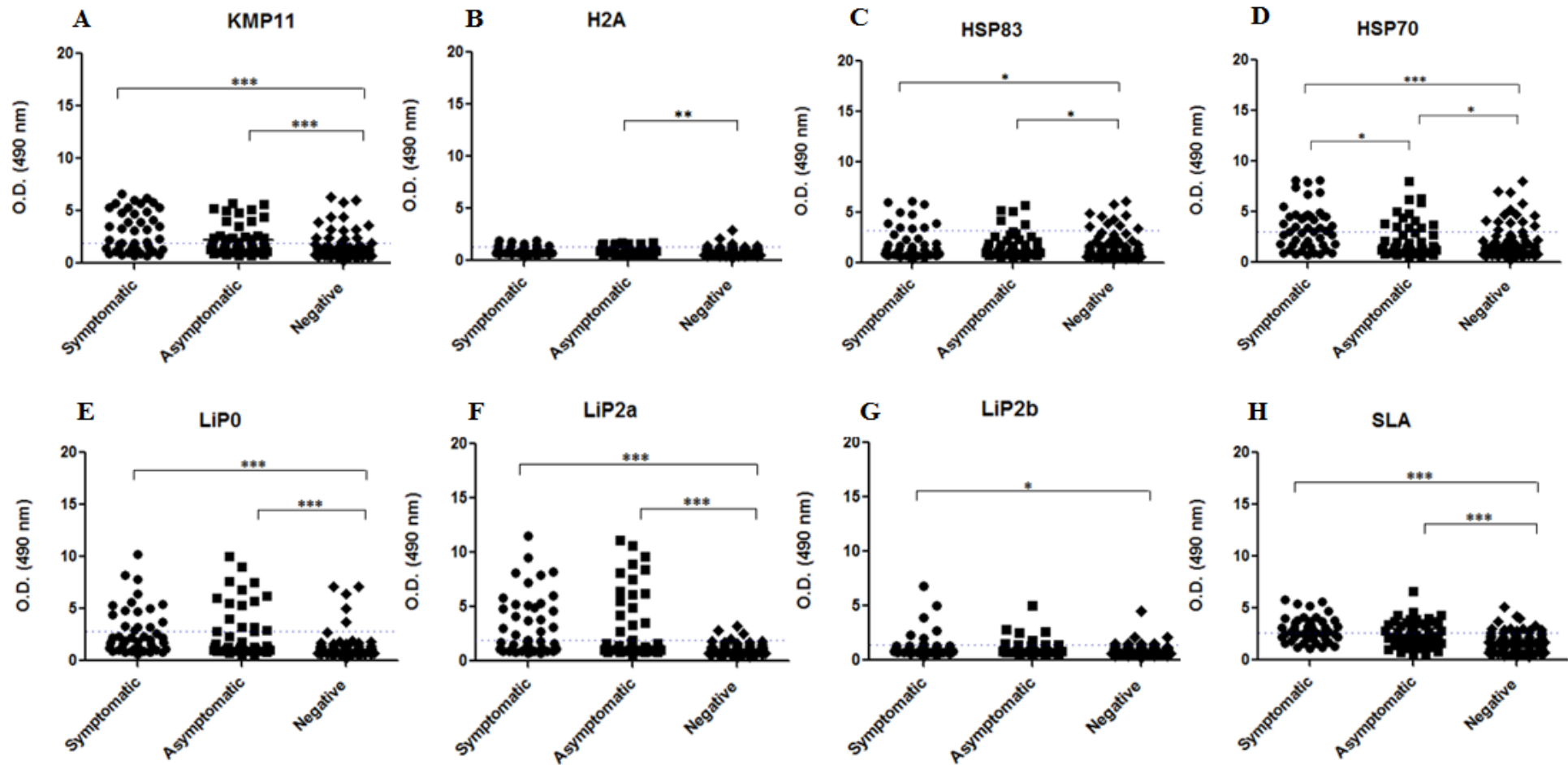
379 Ao avaliar as proteínas ribossomais de *L. infantum* (LRP) verificou-se que elas  
380 apresentaram bons resultados, exceto a LiP2b que apresentou uma baixa reatividade dos  
381 soros positivos para LVC (**Fig. 1E-G**). A proteína LiP0 apresentou diferença  
382 significativa entre os grupos sintomáticos e negativos, assintomáticos e negativos, boa  
383 reatividade em soro de cães positivos para a enfermidade (**Fig. 1E**), porém mostrou  
384 discreta reatividade em soros de cães com erliquiose e vacinados contra a doença (**Fig.**  
385 **2E**). Já a LiP2a foi à proteína mais eficiente neste estudo, uma vez que esta detectou  
386 soro de cães positivos, tanto sintomáticos como assintomáticos (**Fig. 1F**) e discriminou  
387 melhor os demais grupos (erliquiose, vacinados e negativos para LV) evitando falsos  
388 positivos na análise (**Fig. 2E**).

389           Esses resultados estão de acordo com a maioria dos autores. Soto et al. (1995a)  
390 demonstraram que existem anticorpos que reagem especificamente contra as proteínas  
391 ácidas ribossômicas LiP2a e LiP2b em soros de cães naturalmente infectados com  
392 *Leishmania infantum* e que cada uma das proteínas P provoca uma resposta imune  
393 humoral específica. Assim, as proteínas ribossomais que foram reconhecidas por mais  
394 de 80% de soros de cães com LV, são determinantes antigênicos específicos da doença.  
395 Soto et al. (1995c) mostraram que a proteína ribossomal LiP0 de *L. infantum* também é  
396 reconhecida por uma elevada percentagem de soros de cães com LV. Requena et al.  
397 (2000b) relataram que as proteínas ribossomais de *Leishmania* (LRPs) induzem fortes  
398 respostas humorais em cães com sintomatologia clínica da infecção com *L. infantum*.

399           Das oito proteínas testadas, todas apresentaram especificidade semelhante,  
400 entre 97,27 a 99,09%, entretanto os valores obtidos de sensibilidade foram variados,  
401 sendo a LiP2a foi a que apresentou maior sensibilidade 34,78%, em relação as demais  
402 proteínas, logo em seguida vem a KMP-11 com 20,88% (**Tabela 1**). Estes resultados  
403 concordam com Coelho et al. (2009) que utilizaram soros de cães com LV para avaliar  
404 os valores de sensibilidade e especificidade obtidos dos extratos de proteínas  
405 ribossomais de *L. infantum* (LRP) pelo teste de ELISA, e observaram alta  
406 sensibilidade, ou seja, 100% das amostras de soro de cães sintomáticos,  
407 oligossintomáticos e assintomáticos ensaiados, tiveram uma reação positiva contra as  
408 LRP. Todolí et al. (2009) avaliaram o uso da KMP-11 em soros de cães infectados com  
409 *L. infantum* pela técnica de ELISA e obtiveram valores de sensibilidade de 93% e de  
410 especificidade de 97%.

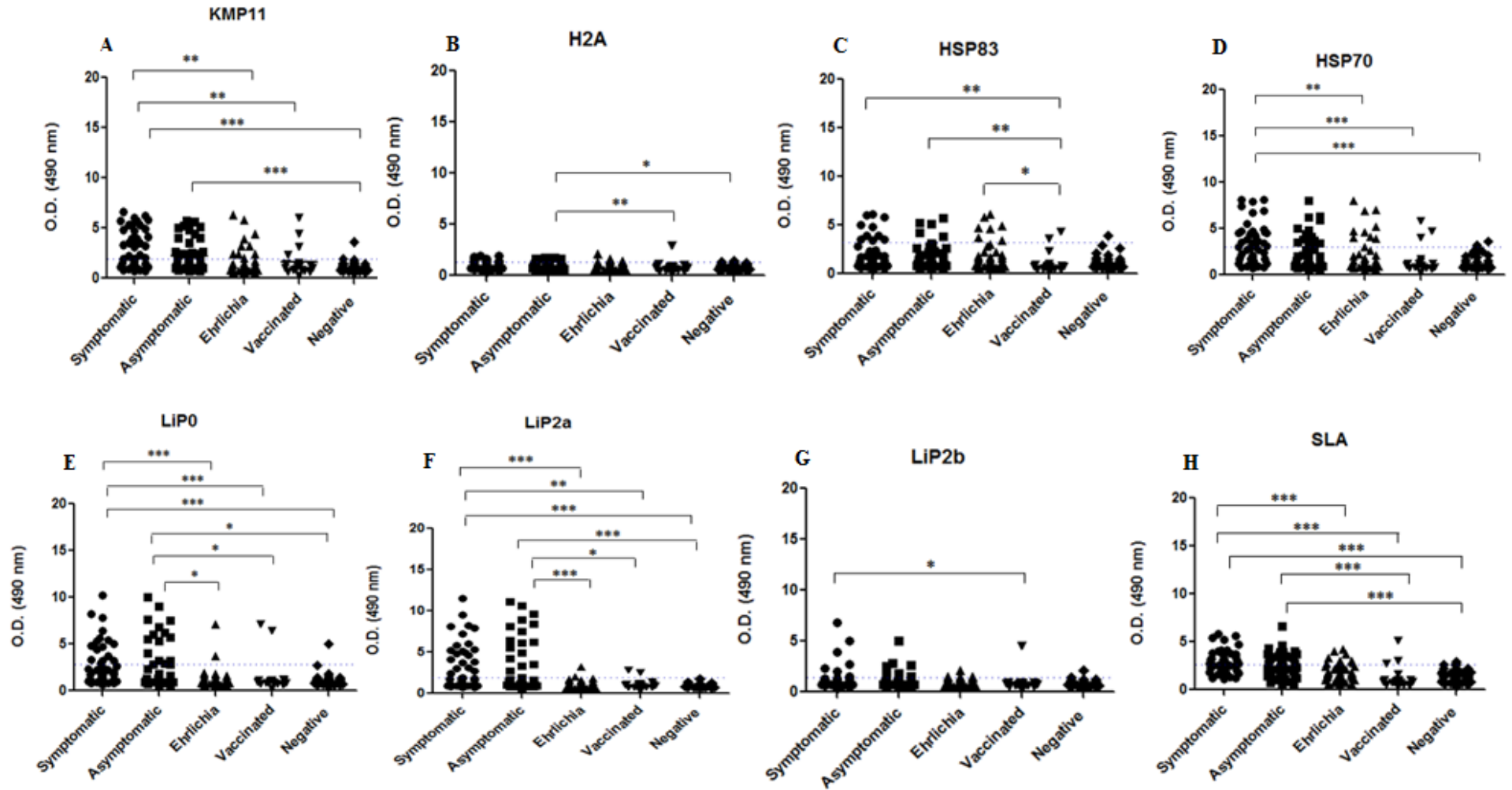
411

412



**Figura 1. Anticorpos IgG em soros caninos.** Nivel de anticorpos IgG anti-*Leishmania* em cães naturalmente infectados com *Leishmania sp.* e negativos (cães com erliquiose, cães vacinados e cães negativos para LV). Soro de cães proveniente de áreas endêmicas para LVC foram testados com diferentes antígenos proteicos KMP11 (A), H2A (B), HSP83 (C), HSP70 (D), LiP0 (E), LiP2A (F), LiP2b (G), SLA (H). O cut-off foi calculado a partir dos valores negativos e positivos da média das OD de cada amostra. Os pontos nos gráficos representam a média das OD de cada amostra. A análise foi realizada pelo teste de Kruskal- Wallis com pós teste Dunn's com múltiplas comparações. \*p<0,05, \*\*p<0,001, \*\*\*p<0,0001.





**Figura 2. Anticorpos IgG em soros caninos.** Nivel de anticorpos IgG anti-*Leishmania* em cães naturalmente infectados com *Leishmania* sp. (sintomáticos e assintomáticos), cães com erliquiose, vacinados contra LV e cães sadios, negativos para LV. Soro de cães proveniente de áreas endêmicas para LVC foram testados com diferentes antígenos proteicos KMP11 (A), H2A (B), HSP83 (C), HSP70 (D), LiP0 (E), LiP2A (F), LiP2b (G), SLA (H). O cut-off foi calculado a partir dos valores negativos e positivos da média das OD de cada amostra. Os pontos nos gráficos representam a média das OD de cada amostra. A análise foi realizada pelo teste de Kruskal- Wallis com pós teste Dunn's com múltiplas comparações. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,001$ , \*\*\* $p < 0,0001$ .

433

434

435

436 **Tabela 1.** Avaliação do desempenho de diferentes proteínas testadas com soros de cães  
 437 naturalmente infectados com *L. infantum chagasi* e com soro de cães negativos para  
 438 leishmaniose visceral (NLV).

Antígenos	Cães com LV (NLV <sup>+</sup> controles)		
	Sensibilidade %	Especificidade %	Likelihood ratio
Kmp11	20,88	97,27	7,66
H2A	18,48	97,27	6,78
Hsp83	7,609	98,18	4,18
Hsp70	5,435	99,09	5,98
LiP0	7,609	99,09	8,37
LiP2a	34,78	99,07	37,57
LiP2b	9,783	99,09	10,76
SLA	9,783	99,09	10,76

439 \*NLV - cães negativos para leishmaniose visceral (cães com erliquiose, cães vacinados contra  
 440 a doença e cães negativos para LV).

441

#### 442 **4. Conclusões**

443

444 Dentre todas as proteínas testadas, a que apresentou melhor resultado em  
 445 sensibilidade e especificidade foi a LiP2a, a qual conseguiu distinguir adequadamente  
 446 soros de cães positivos (sintomáticos e assintomáticos) de cães negativos e também os  
 447 animais positivos dos demais grupos de cães avaliados (erliquiose canina e vacinados  
 448 contra a doença), apresentando diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ), além  
 449 de demonstrar melhor desempenho frente ao SLA ( $p < 0,05$ ). Assim, a proteína  
 450 recombinante LiP2a representa uma alternativa bastante promissora para ser utilizada  
 451 como um antígeno para diagnóstico, com uma boa sensibilidade e especificidade no  
 452 teste de ELISA.

453

#### 454 **5. Agradecimentos**

455

456 Agradecemos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e  
 457 Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida à MOURA, L. D. Ao professor doutor  
 458 Manuel Soto (Departamento de Biología Molecular Severo Ochoa, Universidade  
 459 Autónoma de Madrid) pelas proteínas recombinantes cedidas. A Laura Ramirez, pela  
 460 confecção das proteínas. Ao apoio da Gerência de Controle de Zoonoses de Teresina  
 461 (GEZOON), Hospital Veterinário Universitário (HVU) e clínica particular de Teresina  
 462 Doctor Vet pela obtenção das amostras para a realização deste experimento. Meu muito  
 463 obrigado a todos que contribuíram pelo desenvolvimento deste trabalho.

464 **6. Referências**

- 465  
466 Alves AS, Mouta-Confort E, Figueiredo FB, Oliveira RV, Schubach AO, Madeira  
467 MF. Evaluation of serological cross-reactivity between canine visceral leishmaniasis  
468 and natural infection by *Trypanosoma caninum*. *Res in Vet Sci* 2012; 93(3): 1329-33.  
469  
470 Andrade, CR. *Resposta imune anti - proteínas de choque térmico na leishmaniose*  
471 *visceral* [Tese]. Pernambuco: Universidade Federal de Pernambuco; 1997.  
472  
473 Angel SO, Requena JM, Soto M, Criado D, Alonso C. During canine leishmaniasis a  
474 protein belonging to the 83-kDa heat-shock protein family elicits a strong humoral  
475 response. Madrid, Spain. *Acta Trop* 1996; 62(1): 45-56.  
476  
477 Berberich C, Requena J.M, Alonso C. Cloning of genes and expression and antigenicity  
478 analysis of the *Leishmania infantum* KMP-11 protein. *Exp Parasitol* 1997; 85(1):105-8.  
479  
480 Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram  
481 quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;  
482 7(72): 248-54.  
483  
484 Camargo JB, Troncarelli MZ, Ribeiro MG, Langoni H. Leishmaniose visceral canina:  
485 aspectos de saúde pública e controle. São Paulo, Brasil. *Clín Vet* 2007; 71: 86-92.  
486  
487 Carvalho LP, Passos S, Dutra WO, Soto M, Alonso C, Gollob KJ et al. Effect of LACK  
488 and KMP11 on IFN-gamma production by peripheral blood mononuclear cells from  
489 cutaneous and mucosal leishmaniasis patients. *Scand J Immunol* 2005; 61(4): 337-342.  
490  
491 Coelho EA, Ramírez L, Costa MA, Coelho VT, Martins VT, Chávez-Fumagalli MA, et  
492 al. Specific serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis using *Leishmania* species  
493 ribosomal protein extracts. *Clin Vaccine Immunol* 2009; 16(12): 1774–80.  
494  
495 Corrêa APFL, Dossi ACS, Vasconcelos RO, Munari DP, Lima VMF. Evaluation of  
496 transformation growth factor- $\beta$ 1, interleukin-10, and interferon-  $\gamma$  in male symptomatic  
497 and asymptomatic dogs naturally infected by *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi*.  
498 Amsterdam. *Vet Parasitol* 2007; 143: 267-274.  
499  
500 Costa, CHN, Pereira HF, Araújo MV. Epidemia de calazar no Estado do Piauí, Brasi  
501 L. *Rev Saúde Púb* 1990; 24(2): 361-372.  
502  
503 Farahmand M, Nahrevanian H. Application of Recombinant Proteins for Serodiagnosis  
504 of Visceral Leishmaniasis in Humans and Dogs. *Iran biomed J* 2016; 20(3): 128-34.  
505  
506 Ferreira Ede C, de Lana M, Carneiro M, Reis AB, Paes DV, da Silva ES et al.  
507 Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in  
508 animals presenting different clinical manifestations. *Vet Parasitol* 2007; 146(3-4): 235–  
509 241.  
510  
511 Gontijo CMF, Melo MN. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e  
512 perspectivas. São Paulo. *Rev Bras de Epidemiol* 2004; 7(3): 338-349.  
513

- 514 Herwaldt BL. Leishmaniasis. *Lancet* 1999; 354(9185): 1191-1199.  
515
- 516 Kaur J, Kaur S. ELISA and western blotting for the detection of Hsp70 and Hsp83  
517 antigens of *Leishmania donovani*. *J Parasit Dis* 2013; 37(1): 68–73.  
518
- 519 Lira RA, Cavalcanti MP, Nakazawa M, Ferreira AGP, Silva ED, Abath FGC et al.  
520 Canine visceral leishmaniosis: A comparative analysis of the EIE-leishmaniose-  
521 visceral-canina-Bio-Manguinhos and the IFI-leishmaniose-visceral-canina-Bio-  
522 Manguinhos kits. *Vet Parasitol* 2006; 137(1-2): 11–16.  
523
- 524 Luvizotto MCR, Ferrari HF, Moreira MAB. Lesão nodular na cavidade oral de cão  
525 causada por *Leishmania sp.* – relato de casos. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2005; 57: 18-  
526 19.  
527
- 528 Maia-elkhoury ANS, Alves WA, Sousa-Gomes ML, Sena JM, Luna EA. Leishmaniose  
529 visceral no Brasil: evolução e desafios. *Cad Saúde Pub* 2008; 24(12): 2941-2947.  
530
- 531 Marzochi MCA, Coutinho SG, Souza WJS, Toledo LM, Grimald Júnior G, Momem H,  
532 et al. Canine Visceral Leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. Clinical, parasitological,  
533 therapeutical and epidemiological findings (1977-1983). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*  
534 1985; 80(3): 349-357.  
535
- 536 Matos DCS, Faccioli LAP, Cysne-Finkelstein L, Lucas PM, Corte-Real S, Armôa GR,  
537 et al. Kinetoplastid membrane protein-11 is present in promastigotes and amastigotes of  
538 *Leishmania amazonensis* and its surface expression increases during metacyclogenesis.  
539 *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2010; 105(3): 341-7.  
540
- 541 Mattos Jr DG, Pinheiro JM, Menezes RC, Da Costa. Aspectos clínicos e de laboratório  
542 de cães soropositivos para leishmaniose. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2004; 56(1): 199-  
543 122.  
544
- 545 Menezes-Souza D, Mendes TA, Gomes Mde S, Reis-Cunha JL, Nagem RA, Carneiro  
546 CM, et al. Epitope mapping of the HSP83.1 protein of *Leishmania braziliensis* discloses  
547 novel targets for immunodiagnosis of tegumentary and visceral clinical forms of  
548 leishmaniasis. *Clin Vaccine Immunol* 2014; 21(7): 949–959.  
549
- 550 Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância  
551 Epidemiológica. *Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral*. 1º ed., 5º  
552 Reimpressão. Brasília, DF; 2014.  
553
- 554 Missawa NA, Lima GBM. Distribuição espacial de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz &  
555 Neiva, 1912) e *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira, 1938) no estado de Mato Grosso.  
556 Uberaba. *Rev Socied Bras Med Trop* 2006; 39(4): 337-340.  
557
- 558 Morales-Yuste M, Morillas-Márquez F, Díaz-Sáez V, Barón-López S, Acedo-Sánchez  
559 C, Martín-Sánchez J. Epidemiological implications of the use of various methods for  
560 the diagnosis of canine leishmaniasis in dogs with different characteristics and in  
561 differing prevalence scenarios. *Parasitol Res* 2012; 111(1): 155-64.  
562

- 563 Nieto CG, García-Alonso M, Requena JM, Mirón C, Soto M, Alonso C, et al. Analysis  
564 of the humoral immune response against total and recombinant antigens of *Leishmania*  
565 *infantum*: correlation with disease progression in canine experimental leishmaniasis. *Vet*  
566 *Immunol Immunopathol* 1999; 67(2): 117-130.
- 567  
568 Passos S, Carvalho LP, Orge G, Jerônimo SM, Bezerra G, Soto M, et al. Recombinant  
569 *leishmania* antigens for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Clin Diagn Lab*  
570 *Immunol* 2005; 12(10): 1164-1167.
- 571  
572 Porrozzi R, Santos Da Costa MV, Teva A, Falqueto A, Ferreira AL, Dos Santos CD,  
573 Fernandes AP, Gazzinelli RT, Campos-Neto A and Grimaldi G JR. Comparative  
574 evaluation of enzymelinked immunosorbent assays based on crude and recombinant  
575 leishmanial antigens for serodiagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania*  
576 *infantum* visceral infections in dogs. *Clin Vaccine Immunol* 2007; 14(5): 544–548.
- 577  
578 Portal da Saúde - Ministério da Saúde. *Tópico LV casos* [online]. 2015 [Citado 02 Nov  
579 2016]. Disponível a partir de: [http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-](http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/726-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/leishmaniose-visceral-lv/11334-situacao-epidemiologica-dados)  
580 [ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/726-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-](http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/726-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/leishmaniose-visceral-lv/11334-situacao-epidemiologica-dados)  
581 [z/leishmaniose-visceral-lv/11334-situacao-epidemiologica-dados](http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/726-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/leishmaniose-visceral-lv/11334-situacao-epidemiologica-dados).
- 582  
583 Reithinger R, Quinnell R, Alexander B, Davies C. Rapid detection of *Leishmania*  
584 *infantum* infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic  
585 dipstick test, enzyme-linked immunosorbent assay, and PCR. *J. Clin. Microbiol* 2002;  
586 40(7): 2352-2356.
- 587  
588 Schimming BC, Pinto e Silva JRC. Leishmaniose Visceral Canina – Revisão de  
589 literatura. *Rev Cient Eletrônica Med Vet* 2012; 10(19): 1-17.
- 590  
591 Silva JGD, Werneck GL, Cruz MSP, Costa CHN, Mendonça IL. Infecção natural de  
592 *Lutzomyia longipalpis* por *Leishmania* sp. em Teresina, Piauí, Brasil. *Cad Saúde Pub*  
593 2007; 23(7): 1715-1720.
- 594  
595 Silva FS. Patologia e patogênese da leishmaniose visceral canina. *Rev Trop: Ci Agr Biol*  
596 2007; 1(1): 20.
- 597  
598 Silva KR, Mendonça VRR, Silva KM, Nascimento LFM, Mendes-Sousa AF, Pinho FA,  
599 et al. Scoring clinical signs can help diagnose canine visceral leishmaniasis in a highly  
600 endemic area in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2017; 112(1): 53-63.
- 601  
602 Solano-Gallego L, Koutinas A, Miró G, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, Bourdeau P,  
603 Oliva G and Baneth G. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and  
604 prevention of canine leishmaniosis. *Vet Parasitol* 2009; 165(1-2): 1–18.
- 605  
606 Soto M, Requena JM, Quijada L, Angel SO, Gomez LC, Guzman F, et al. During active  
607 cutaneous visceral leishmaniasis, an anti-P2 humoral response is specifically triggered  
608 by parasite P proteins. *Clin Exp Immunol* 1995a; 100(2): 246-52.
- 609  
610 Soto M, Requena JM, Quijada L, Guzman F, Patarroyo ME, Alonso C. Identification of  
611 the P0 ribosomal protein epitope of *Leishmania infantum* in canine visceral  
612 leishmaniasis. *Immunol Lett* 1995c; 48(1): 23-28.

613

614 Soto M, Requena JM, Quijada L, García M, Guzman F, Patarroyo ME, et al. Mapping  
615 of the linear antigenic determinants from the *Leishmania infantum* histone H2A  
616 recognized by sera from dogs with leishmaniasis. *Immunol Lett* 1995b; 48(3): 209-214.

617

618 Soto M, Corvo L, Garde E, Ramírez L, Iniesta V, Bonay P, et al. Coadministration of  
619 the Three Antigenic *Leishmania infantum* Poly (A) Binding Proteins as a DNA Vaccine  
620 Induces Protection against *Leishmania major* Infection in BALB/c Mice. *PLoS Negl*  
621 *Trop Dis* 2015; 9(5): e0003751.

622

623 Soto M, Requena JM, Quijada L, Perez MJ, Nieto CG, Guzman F, et al. Antigenicity of  
624 the *Leishmania infantum* histones H2B and H4 during canine viscerocutaneous  
625 leishmaniasis. *Clin Exp Immunol* 1999; 115(2): 342-349.

626

627 Todolí F, Pérez-Filgueira M, Galindo I, Gómez-Sebastián S, Escribano JM, Rodríguez-  
628 Cortés A, et al. Seroreactivity against raw insect-derived recombinant KMPII, TRYP,  
629 and LACK *Leishmania infantum* proteins in infected dogs. *Vet parasitol* 2009; 164(2-  
630 4); 154-161.

631

632 Verçosa BL, Lemos CM, Mendonça IL, Silva SM, de Carvalho SM, Goto H, et al.  
633 Transmission potential, skin inflammatory response, and parasitism of symptomatic and  
634 asymptomatic dogs with visceral leishmaniasis. *BMC Vet Res* 2008; 4: 45.

635

636 World Health Organization (WHO). *Control of the leishmaniasis report of a meeting of*  
637 *the WHO expert committee on the control of leishmaniasis* [online]. 2010 [Citado 02  
638 Nov 2016].. Disponível em: [http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO\\_TRS\\_949\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_949_eng.pdf).

639

640 WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *Leishmaniasis - Epidemiological*  
641 *situation*. 2017. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>.

642

643

644

645

646

647

648

649

650

651

652

653

654

655

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização de proteínas recombinantes de *Leishmania sp.* no diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral canina pelo método de ELISA diminui a ocorrência de reações cruzadas pela sua alta sensibilidade identificando não apenas animais sintomáticos, como animais assintomáticos, animais vacinados contra LVC e animais com outros patógenos. Desta forma acredita-se que deve ser realizado novos ensaios com a proteína LiP2a, proteína que apresentou melhor resultado neste estudo, em outras regiões para avaliar seu desempenho frente a diferentes condições.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO GERAL E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

AGUIAR, P. H. P. et al. Clinical profile of naturally infected dogs from on endemic área for “Leishmania chagasi”(infantum) in Bahia state, Brazil, **Rev Bras Sau Prod An**, v. 8, n. 4, p. 283-294, 2007.

ALMEIDA, M. A. et al. Antileishmanial antibody profile in dogs naturally infected with Leishmania chagasi. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 106, n. 1-2, p. 151-8, Jun 2005.

ALVAR, J.; YACTAYO, S.; BERN, C. Leishmaniasis and poverty. **Trends Parasitol**, v. 22, n. 12, p. 552-7, Dec 2006.

ALVES, A. S. et al. Evaluation of serological cross-reactivity between canine visceral leishmaniasis and natural infection by Trypanosoma caninum. **Res Vet Sci**, v. 93, n. 3, p. 1329-33, Dec 2012.

ALVES, W. A; BEVILACQUA, P. D. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. **Cad Saúde Pub**, Rio de Janeiro, v.20, n.1, p. 259-265, 2004.

ASHFORD, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **Int J Parasitol**, v. 30, n. 12-13, p. 1269-81, Nov 2000.

AULT, S. K. Pan American Health Organization's Regional Strategic Framework for addressing neglected diseases in neglected populations in Latin America and the Caribbean. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 102 Suppl 1, p. 99-107, Oct 2007.

BARBIERI, C. L. Immunology of canine leishmaniasis. **Parasite Immunol**, v. 28, n. 7, p. 329-37, Jul 2006. ISSN 0141-9838 (Print) 0141-9838.

BISUGO, M. C. et al. Avaliação do diagnóstico da leishmaniose visceral canina com a utilização do teste rápido com antígeno recombinante K39 em região endêmica do estado de São Paulo. **Rev Instituto Do Lut**, v. 66, n. 2, p. 185-193, 2007.

BONATES, A. Leishmaniose Visceral (Calazar). **Vet News**, v. 61, p. 4-5, 2003.

BRANDAU, S.; DRESEL, A.; CLOS, J. High constitutive levels of heat-shock proteins in human-pathogenic parasites of the genus Leishmania. **Biochem J**, v. 310 ( Pt 1), p. 225-32, Aug 1995.

BRASIL 2012 – **MINISTÉRIO DA SAÚDE – Portal da Saúde**. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar\\_texto.cfm?idtxt=42927&janela=1](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=42927&janela=1) Acesso em: 27 de novembro de 2016.

CAMARGO, J.B. et al. Leishmaniose visceral canina: aspectos de saúde pública e controle. **Rev Clin Vet**, São Paulo, ano 12, n.71, p.86-92, 2007.



CAMARGO, L. M. A, BARCINSKI M. A Leishmanioses, feridas bravas e kalazar. **Rev Cienc Cult**, São Paulo, v. 55, n. 1, p.34-7, 2003.

CHAGAS, E. et al. Leishmaniose visceral americana (relatório dos trabalhos realizados pela comissão encarregada do estudo da leishmaniose visceral americana em 1937). **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.33, n. 1, p.189-229, 1938.

CHAGAS, E. Primeira verificação em individuo vivo da Leishmaniose visceral no Brasil. **Bras Med**, v.50, p. 221-222, 1936.

CHAMIZO, C.; MORENO, J.; ALVAR, J. Semi-quantitative analysis of cytokine expression in asymptomatic canine leishmaniasis. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 103, n. 1-2, p. 67-75, Jan 2005.

CIARAMELLA, P. et al. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **Vet Rec**, v. 141, n. 21, p. 539-43, Nov 1997.

CORRÊA, A.P.F.L. et al. Evaluation of transformation growth factor- $\beta$ 1, interleukin-10, and interferon-  $\gamma$  in male symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Vet Parasitol**, Amsterdam, v.143, p.267-274, 2007.

COSTA, D. J. et al. Experimental infection of dogs with *Leishmania* and saliva as a model for the study of canine visceral leishmaniasis. **PLoS One**, v. 8, n. 4, p. 1-11, 2013.

Costa, C. H. N., Pereira, H. F., Araújo, M. V. Epidemia de calazar no Estado do Piauí, Brasil, 1980-1986. **Rev Saúde Públ**, São Paulo, v. 24, n. 5, p. 361-372, 1990.

COURTENAY, O. et al. Infectiousness in a cohort of Brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. **J Infect Dis**, v. 186, n. 9, p. 1314-20, Nov 2002.

CROFT S.L., NEAL R.A., PENDERGAST W., CHEAN J.H., The activity of alkylphosphocholines and related derivatives against *Leishmania donovani*. **Biochem Pharmacol**, v. 36, n. 16, p. 2633-6, 1987.

CUNNINGHAM J. et al. A global comparative evaluation of commercial immunochromatographic rapid diagnostic tests for visceral leishmaniasis. **Clin Infect Dis**, vol. 55, n. 10, p. 1312-1319, 2012.

DANTAS-TORRES, F. Canine leishmaniosis in South America. **Parasit Vectors**, v. 2 Suppl 1, p. S1, Mar 2009.

DE PAULA, C. C. et al. [Canine visceral leishmaniasis in Maricá, State of Rio de Janeiro: first report of an autochthonous case]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 42, n. 1, p. 77-8, 2009 Jan-Feb 2009.

DEANE, L. M. & DEANE, M. P. Leishmaniose visceral urbana (no cão e no homem) em Sobral, Ceará. **Hospital**, Rio de Janeiro, v. 47, p. 75-87, 1985.

- DESJEUX, P. Leishmaniasis. **Nat Rev Microbiol**. v. 2, n. 9, p.692, 2004.
- UJARDIN, J. C. Risk factors in the spread of leishmaniasis: towards integrated monitoring? **Trends Parasitol**, v. 22, n. 1, p. 4-6, Jan 2006.
- ENGVALL, E.; PERLMANN, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. **Immunochemistry**, v. 8, n. 9, p. 871-4, Sep 1971.
- FARIA Z. F. et al. Panorama laboratorial da Leishmaniose visceral até o surgimento dos testes imunocromatográficos (RK39), **Rev Pat Trop**, Goiás, v. 36, n. 3, p. 205-214, 2007.
- FARIA, A. R.; ANDRADE, H. M. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina: grandes avanços tecnológicos e baixa aplicação prática. **Rev Pan-Amaz de Saude**. Minas Gerais, v.3, n.2, p.47-57, 2012.
- FEITOSA, M. M. et al. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba, São Paulo (Brasil). **Rev Clin Vet**, São Paulo, v. 5, n. 28, p. 36-44, 2000.
- FERREIRA EDE, C. et al. Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. **Vet Parasitol**, v. 146, n. 3-4, p. 235-241, 2007.
- FERRER, L. Leishmaniasis: update in diagnosis and therapy. **Proceedings of European Society of Veterinary Dermatology**, PISA, p. 33-36, 1997.
- FOLGUEIRA, C.; REQUENA, J. M. A post genomic view of the heat shock proteins in kinetoplastids. **FEMS Microbiol Rev**, v. 31, n. 4, p. 359-377, 2007.
- FRANCINO, O. et al. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniasis. **Vet Parasitol**, v. 137, n. 3-4, p. 214-21, Apr 2006.
- FREITAS, J. C. C. et al. Perfil de anticorpos anti-*leishmania* nas diferentes formas clínicas da leishmaniose canina. In: **38º CONBRAVET - Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária (Resumo)**. Santa Catarina, 2011.
- FUNASA. **Boletim Epidemiológico**. Evolução temporal das doenças de notificação compulsória no Brasil de 1980 a 1998. 1999.
- GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Rev Bras Epidemiol**. São Paulo, v. 7, n. 3, p. 338-349, 2004.
- GOTO, H.; LINDOSO, J. A. Immunity and immunosuppression in experimental visceral leishmaniasis. **Braz J Med Biol Res**, v. 37, n. 4, p. 615-23, Apr 2004.
- GOUVÊA, M. V. et al. Predictive factors for *Leishmania infantum* infection in dogs examined at a veterinary teaching hospital in Teresina, State of Piauí, Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 49, n. 1, p. 107-11, Feb 2016.

GRANDONI, L. The diagnosis of canine leishmaniasis, In: PROCEEDINGS OF SECOND INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM. Sevilla, Spain. Canine Leishmaniasis: moving towards a solution. **Slamanca: Intervet International**, p. 7-14, 2002.

GRIMALDI, G.; TESH, R. B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. **Clin Microbiol Rev**, v. 6, n. 3, p. 230-50, Jul 1993.

GRIMALDI, G. et al. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 106, n. 1, p. 54-9, Jan 2012.

HERWALDT, B.L. Leishmaniasis. **Lancet**, v.354, n. 9185, p.1191-1199, 1999.

IKEDA-GARCIA, F. A.; FEITOSA, M. M. Métodos de diagnóstico da leishmaniose visceral canina. **Rev Clin Vet**, São Paulo, v. 11, n. 62, p. 32-38, 2006.

INIESTA, L.; GÁLLEGO, M.; PORTÚS, M. Immunoglobulin G and E responses in various stages of canine leishmaniosis. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 103, n. 1-2, p. 77-81, Jan 2005.

JARDIM, A. et al. Isolation and structural characterization of the *Leishmania donovani* kinetoplastid membrane protein-11, a major immunoreactive membrane glycoprotein. **Biochem J**, v. 305 ( Pt 1), p. 307-13, Jan 1995.

KAR, K.; Serodiagnosis of leishmaniasis. **Crit Rev Microbiol** , v. 21, p. 123-152, 1995.

KUBAR, J.; FRAGAKI, K. Recombinant DNA-derived leishmania proteins: from the laboratory to the field. **Lancet Infect Dis**, v. 5, n. 2, p. 107-14, Feb 2005.

LAURENTI M. D., Correlação entre o diagnóstico parasitológico e sorológico na leishmaniose visceral americana canina, BEPA, **Boletim Epidemiológico Paulista**, vol. 6, nº 67 São Paulo 2009 versão On-line ISSN 1806-4272.

LAZARI, P. **Manual de Vigilância e Controle das Leishmanioses**. Secretaria Estadual de Saúde de Mato Grosso Superintendência de Vigilância em Saúde Coordenadoria de Vigilância em Saúde Ambiental Gerência de Vigilância de Vetores e Antropozoonoses. Cuiabá, 2007. 25 p.

LEISHMAN, W.B. On the possibility of the occurrence of trypanosomiasis in India. **The BMJ**, v.1, n. 2213, p.1252-1254, 1903.

LINDQUIST, S.; CRAIG, E. A. As heat shock proteins. **Annu Rev Genet** v. 22, p. 631-677, 1988.

LIRA, R. A. et al. Canine visceral leishmaniosis: a comparative analysis of the EIE-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos and the IFI-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos kits. **Vet Parasitol**, v. 137, n. 1-2, p. 11-6, Apr 2006.

- LUVIZOTTO, M. C. R et al. Lesão nodular na cavidade oral de cão causada por *Leishmania* sp. – relato de casos. **Arq Bras Med Vet Zootec**, v. 57, p. 18-19, 2005.
- LUX, H. et al. Ether--lipid (alkyl-phospholipid) metabolism and the mechanism of action of ether--lipid analogues in *Leishmania*. **Mol Biochem Parasitol**, v. 111, n. 1, p. 1-14, Nov 2000.
- MACFARLANE, J. et al. Identification and characterisation of a *Leishmania donovani* antigen belonging to the 70-kDa heat-shock protein family. **Eur J Biochem**, v. 190, n. 2, p. 377-84, Jun 1990.
- MAIA, C.; CAMPINO, L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. **Vet Parasitol**, v. 158, n. 4, p. 274-87, Dec 2008.
- MAIA-ELKHOURY A. N. S. et al. Leishmaniose visceral no Brasil: evolução e desafios, **Cad Saúde Pub**, v. 24, n. 12, p. 2941-2947; 2008.
- MANNA, L. et al. Evidence for a relationship between *Leishmania* load and clinical manifestations. **Res Vet Sci**, v. 87, n. 1, p. 76-8, Aug 2009.
- MARCELINO, A. P.; SOUZA FILHO, J. A. Instruções para a realização do teste rápido imunocromatografico Alere para diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral canina. **Instituto Octávio Magalhães – IOM. Fundação Ezequiel Dias – FUNED**. Belo Horizonte, 2015.
- MARZOCHI, M. C. A. Leshimanioses no Brasil: as leishmanioses tegumentares. **J Bras Med**, v. 63, p. 82-104, 1992.
- MARZOCHI, M. C. et al. Canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. Clinical, parasitological, therapeutical and epidemiological findings (1977-1983). **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 80, n. 3, p. 349-57, 1985 Jul-Sep 1985.
- MATOS, D. C. et al. Kinetoplastid membrane protein-11 is present in promastigotes and amastigotes of *Leishmania amazonensis* and its surface expression increases during metacyclogenesis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 3, p. 341-7, May 2010.
- MATTOS, JR D. G. et al. Aspectos clínicos e de laboratório de cães soropositivos para leishmaniose. **Arq Bras Med Vet Zootec**, v. 56, n. 1, p. 199-222, 2004.
- METTLER, M. et al. 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. **J Clin Microbiol**, v. 43, n. 11, p. 5515-9, Nov 2005.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO E  
MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Nota Técnica Conjunta N.º  
11/2016/CPV/DFIP/SDA/GM/MAPA/MS**. Brasília: DF, MAPA, 2016.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Brasil. **Nota Técnica Conjunta N.º 01/2011  
CGDTCGLAB/DEVIT/SVS/MS**. Brasília: DF, 2011.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Gabinete do Ministro. **Portaria Interministerial Nº 1.426 DE 11 DE JULHO DE 2008**. Disponível em: [http://www.cfmv.org.br/portal/legislacao/outras\\_normas/porta1426.pdf](http://www.cfmv.org.br/portal/legislacao/outras_normas/porta1426.pdf). Acesso em: 1 dez. 2016.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. 1º ed., 5º Reimpressão. Brasília, DF; 2014.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Serie A. Normas e Manuais Técnicos. Brasília, DF; 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Série A. Normas e Manuais Técnicos. Brasília, DF; 2003.

MISSAWA, N. A.; LIMA, G. B. M. Distribuição espacial de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) e *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira, 1938) no estado de Mato Grosso. **Ver Soc Bras Med Trop**, Uberaba, v. 39, n. 4, p. 337-340, 2006.

MITROPOULOS, P.; KONIDAS, P.; DURKIN-KONIDAS, M. New World cutaneous leishmaniasis: updated review of current and future diagnosis and treatment. **J Am Acad Dermatol**, v. 63, n. 2, p. 309-22, Aug 2010.

MOLINA, R.. et al. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v 88, n. 4, p. 491-493, 1994.

MORALES-YUSTE, M. et al. Epidemiological implications of the use of various methods for the diagnosis of canine leishmaniasis in dogs with different characteristics and in differing prevalence scenarios. **Parasitol Res**, v. 111, n. 1, p. 155-64, Jul 2012.

MURRAY, H. W. et al. Advances in leishmaniasis. **Lancet**, v. 366, n. 9496, p. 1561-77, 2005 Oct 29-Nov 4 2005.

NUSSENZWEIG, V.; NUSSENZWEIG, R. S.; ALENCAR, J. E. Leishmaniose visceral canina nos arredores de Fortaleza, Estado do Ceará: inquérito sorológico utilizando a reação de fixação do complemento com antígeno extraído de bacilo da tuberculose. Observações sobre o diagnóstico e epidemiologia da doença. **Hospital**, v. 52: p. 111-129, 1957.

PASSOS, S. et al. Recombinant leishmania antigens for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 12, n. 10, p. 1164-7, Oct 2005.

PESSÔA, S. B. & BARRETO, M.P. Leishmaniose tegumentar americana. Rio de Janeiro, **Ministério da Educação e Cultura, Imprensa Nacional**, 1948.

PESSOA, S. B. **Parasitologia Médica**. 11<sup>a</sup> ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1982.

PINELLI, E. et al. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infect Immun**, v. 62, n. 1, p. 229-35, Jan 1994.

POLLA, B.S. Heat shock proteins in host parasite interaction. **Immunol Today**, v.12, n. 3, A38-41, 1991.

PORROZZI, R. et al. Comparative evaluation of enzymelinked immunosorbent assays based on crude and recombinant leishmanial antigens for serodiagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania infantum* visceral infections in dogs. **Clin Vaccine Immunol**, v. 14, n. 5, p. 544–548, 2007.

PORTAL DA SAÚDE - MINISTÉRIO DA SAÚDE (2015). Tópico LV casos. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/726-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/leishmaniose-visceral-lv/11334-situacao-epidemiologica-dados> Acesso em: 02 de novembro de 2016.

QUEIROZ, N. M. G. P. et al. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina pelas técnicas de imunoistoquímica e PCR em tecidos cutâneos e associação com a RIFI e ELISA-teste. **Rev Bras Parasitol Vet**, Jaboticabal, v. 19, n. 1, p. 32-38, 2010.

RATH, S. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Quim Nova**, São Paulo, v. 26, n. 26, p. 550-555, 2003.

REIS, A. B. et al. Isotype patterns of immunoglobulins: hallmarks for clinical status and tissue parasite density in Brazilian dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 112, n. 3-4, p. 102-16, Aug 15 2006. ISSN 0165-2427 (Print) 0165-2427.

REITHINGER, R. et al. Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic dipstick test, enzyme-linked immunosorbent assay, and PCR. **J Clin Microbiol**, v. 40, n. 7, p. 2352-6, Jul 2002.

REITHINGER, R. et al. Evaluation of PCR as a diagnostic mass-screening tool to detect *Leishmania (Viannia) spp.* in domestic dogs (*Canis familiaris*). **J Clin Microbiol**, v. 41, n. 4, p. 1486-93, Apr 2003.

REQUENA, J. M.; ALONSO, C.; SOTO, M. Evolutionarily conserved proteins as prominent immunogens during *Leishmania* infections. **Parasitol Today**, v. 16, n. 6, p. 246-50, Jun 2000.

RIBEIRO, V. M. Milteforan® o aliado dos cães contra leishmaniose visceral no Brasil. **Rev V&Z Minas**. n. 131, p. 44-46, 2016.

RICO, A. I. et al. Immunostimulatory properties of the *Leishmania infantum* heat shock proteins HSP70 and HSP83. **Mol Immunol**, v. 36, n. 17, p. 1131-9, Dec 1999.

- RICO, A. I. et al. Characterization of the immunostimulatory properties of *Leishmania infantum* HSP70 by fusion to the *Escherichia coli* maltose-binding protein in normal and nu/nu BALB/c mice. **Infect Immun**, v. 66, n. 1, p. 347-52, Jan 1998.
- ROSS, R. Notes on the bodies recently described by Leishman and Donovan. **Brit Med J**. v. 14, n. 2, p. 1261-1262, 1903.
- SCHIMMING, B. C.; PINTO E SILVA, J. R. C. Leishmaniose Visceral Canina – Revisão de literatura. **Rev Cient Elet Med Vet** – ISSN: 1679-7353; Periódicos Semestral - Ano X – Número 19 – Julho de 2012.
- SCOTT, P. et al. The development of effector and memory T cells in cutaneous leishmaniasis: the implications for vaccine development. **Immunol Rev**, v. 201, p. 318-38, Oct 2004.
- SHAW, J. J. Further thoughts on the use of the name *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* *chagasi* for the aetiological agent of American visceral leishmaniasis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 5, p. 577-9, Aug 2006.
- SIDDIG, M. et al. Visceral leishmaniasis in the Sudan: comparative parasitological methods of diagnosis. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 82, n. 1, p. 66-8, 1988.
- DA SILVA, D. A. et al. Assessment of serological tests for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Vet J**, v. 195, n. 2, p. 252-3, Feb 2013.
- SILVA J. G. D. et al. Infecção natural de *Lutzomyia longipalpis* por *Leishmania* sp. em Teresina, Piauí, Brasil, **Cad Saúde Púb**, v. 23, n 7, p. 1715-1720, 2007.
- SILVA, K. R. et al. Scoring clinical signs can help diagnose canine visceral leishmaniasis in a highly endemic area in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 1, p. 53-63, Jan 2017.
- SILVA, E. S. et al. Visceral leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 3, p. 285-91, Apr 2001.
- SILVA, F. S. Patologia e patogênese da leishmaniose visceral canina. **Rev Trop Ci Agr Biol**, v. 1, n. 1, p. 20, 2007.
- SINGH, R. K.; PANDEY, H. P.; SUNDAR, S. Visceral Leishmaniasis (kala-azar): Challenges ahead. **Indian J Med Res**, New Delhi, v. 123, n. 3, p. 331-344, Mar. 2006.
- SKEIKY, Y. A. et al. Antigens shared by *Leishmania* species and *Trypanosoma cruzi*: immunological comparison of the acidic ribosomal P0 proteins. **Infect Immun**, v. 62, n. 5, p. 1643-51, May 1994.
- SOLANO-GALLEGO, L. et al. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. **Vet Parasitol**, v. 165, 2009.

SOTO, M. et al. During active viscerocutaneous leishmaniasis the anti-P2 humoral response is specifically triggered by the parasite P proteins. **Clin Exp Immunol**, v. 100, n. 2, p. 246-52, May 1995.

SOTO, M. et al. Searching Genes Encoding Leishmania Antigens for Diagnosis and Protection. **Scholarly Research Exchange**. 2009.

SOUZA, G. D.; SANTOS, E.; ANDRADE FILHO, J. D. The first report of the main vector of visceral leishmaniasis in America, *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 8, p. 1181-2, Dec 2009.

SRIVIDYA, G. et al. Diagnosis of visceral leishmaniasis: developments over the last decade. **Parasitol Res**, v. 110, n. 3, p. 1065-78, Mar 2012.

STEBECK, CAROLINE E; BEECROFT, ROBERT P; SINGH, BN. *et al.* Kinetoplastid membrane protein- 11 ( KMP- 11 ) is differentially expressed during the life cycle of African trypanosomes and is found in a wide variety of kinetoplastid parasites. *Molecular and biochemical parasitology*, 1995, v. 71, p. 1-13.

SUNDAR, S.; OLLIARO, P. L. Miltefosine in the treatment of leishmaniasis: Clinical evidence for informed clinical risk management. **Ther Clin Risk Manag**, v. 3, n. 5, p. 733-40, Oct 2007.

TERPE, K. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 72, n. 2, p. 211-22, Sep 2006.

VAN DER MEIDE, W. F. et al. Quantitative nucleic acid sequence-based assay as a new molecular tool for detection and quantification of *Leishmania* parasites in skin biopsy samples. **J Clin Microbiol**, v. 43, n. 11, p. 5560-6, Nov 2005.

VERÇOSA, B. L. et al. Transmission potential, skin inflammatory response, and parasitism of symptomatic and asymptomatic dogs with visceral leishmaniasis. **BMC Vet Res**, v. 4, p. 45, 2008.

WERNECK, G. L. Expansão geográfica da Leishmaniose Visceral no Brasil. **Cad Saúde Púb**, Rio de Janeiro, v.26, n. 4, p. 644-645, abr, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Control of the leishmaniasis report of a meeting of the WHO expert committee on the control of leishmaniasis**. Geneva, 2010. Disponível em: [http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO\\_TRS\\_949\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_949_eng.pdf).

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Leishmaniasis - Epidemiological situation**. 2017. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Control of Leishmaniasis. Technical Report Series**, v. 793, p. 50-52, 1990.



ZAVERUCHA, T. V. **Vacinação murina com frações subcelulares de Leishmania amazonensis sob modulação de Mycobacterium Bovis BCG e ciclossfosfamida** [Tese]. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ; 2005.

ZIJLSTRA, E. E. et al. Kalazar: a comparative study of parasitological and methods and the direct agglutination test in diagnosis. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 85, n. 5, p. 505-7, 1992.

## Anexo I – Parecer do Comitê de Ética e Experimentação Animal



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA**  
**COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL**  
 Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil; CEP: 64049-550  
 Telefone (86) 3215-5734 \_e-mail: ceespi@ufpi.edu.br



### CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "**Proteínas recombinantes e sua eficácia no diagnóstico de leishmaniose visceral canina**", protocolo nº **092/15**, sob a responsabilidade de **MARIA DO SOCORRO PIRES E CRUZ**- que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de Pesquisa Científica- encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **Aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPI) da Universidade Federal do Piauí, em Reunião na presente data 27/11/2015.

Vigência do Projeto	Dezembro/ 2015 à Outubro/ 2016
Espécie/Linhagem	Canino/ <i>canis familiaris</i>
Nº de Animais	1000
Peso/ Idade	---
Sexo	Machos ou fêmeas
Origem	Provenientes do Hospital Veterinário Universitário (HVU) da UFPI e de outras clínicas particulares de Teresina.

Teresina, 27 de Novembro de 2015.

  
**Prof. Ivete L. de Mendonça**  
 Comitê de Ética em Experimentação Animal-UFPI  
 Coordenadora

## Anexo II – Ficha de avaliação clínica

### FICHA DE AVALIAÇÃO CLÍNICA (LVC)

Data: \_\_\_\_\_; Nome do animal: \_\_\_\_\_ RG \_\_\_\_\_  
 Prop. \_\_\_\_\_; End. \_\_\_\_\_; Fone: \_\_\_\_\_  
 Amostra: \_\_\_\_\_ Sexo: \_\_\_\_\_ Raça: \_\_\_\_\_; Idade: \_\_\_\_\_  
 Estado geral: ativo ( ) ; apático ( ) Ectoparasitas: pulgas ( ) ; Carrapatos ( ) ; Outros \_\_\_\_\_

Parâmetros clínicos	Classificação			Observações
	Normal (0)	Magro (1)	Caquético (2)	
Estado nutricional	Normal (0)	Magro (1)	Caquético (2)	
Pelagem	Bom- ótimo (0)	Regular (1)	Ruim (2)	
Unhas	Normais (0)	Aumentadas (1)		
Coloração de mucosas	Normais (0)	Pálidas (1)		
Lesão focinho/orelha	Ausente (0)	Presença (1)		
Linfonodos	Normais (0)	Aumentados (1)		
Blefarite	Ausente (0)	Presença (1)		
Conjuntivite/seratoconjuntivite	Ausente (0)	Serosa, mucosa (1)	Muco purulento (2)	
Alopecia	Ausente (0)	Presente (1)		
Sangramento	Ausente (0)	Presente (1)		
Lesão de pele	Ausente (0)	Presente (1)	Úlceras (2)	
Despigmentação de focinho	Ausente (0)	Presente (1)		
TOTAL DE PONTOS				

LÂMINAS:

CULTURA:

RIFI: