

**MARCIELLY BATISTA DA SILVA**

**DESEMPENHO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES NO DIAGNÓSTICO DE  
LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA**

TERESINA

2019

**MARCIELLY BATISTA DA SILVA**

**DESEMPENHO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES NO DIAGNÓSTICO DE  
LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA**

Dissertação de Mestrado, do Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Piauí.  
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

2019

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

**S586d** Silva, Marcielly Batista da  
Desempenho de proteínas recombinante no diagnóstico de Leishmaniose  
visceral canina. / Marcielly Batista da Silva - 2019.  
90 f. : il.

Dissertação( Mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Programa de  
Pós-Graduação em Ciência Animal, Teresina, 2019.  
Orientação: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria do Socorro Pires e Cruz

1. Cão 2. Sorológico 3. ELISA 4. Calazar I. Título

**CDD 636.7**

**DESEMPENHO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES NO DIAGNÓSTICO DE  
LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA**

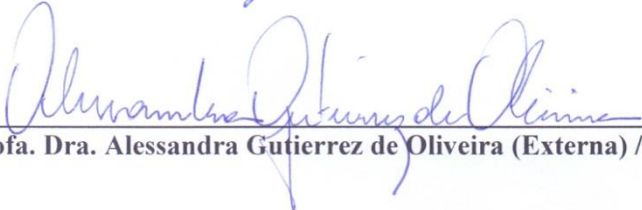
**MARCIELLY BATISTA DA SILVA**

Dissertação aprovada em: 26/03/2019

Banca Examinadora:

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

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Airton Mendes Conde Junior (Interno) / DMORF/CCS/UFPI

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Alessandra Gutierrez de Oliveira (Externa) / UFMS

*“Os sonhos existem para tornarem-se realidade.”*

*Walt Disney*

Aos meus pais **João Batista da Silva** e **Elizeth Paulo da Silva**, ao meu irmão **Marcos José Batista da Silva** e ao meu esposo **Márcio Fernandes Gomes**, pelos incentivos diários, apoio, paciência e acima de tudo pelo amor incondicional.

*Dedico*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, primeiramente, pois nada seria capaz de concluir sem seu amparo e proteção.

Meus pais, João Batista da Silva e Elizeth Paulo da Silva pelo amor, incentivo, confiança e apoio incondicional.

Meu amado irmão Marcos José Batista da Silva pelo amor, carinho e incentivo.

Meu marido Márcio Fernandes Gomes pelo amor, cumplicidade, paciência e compreensão nos momentos de ausência e cansaço.

Todos meus familiares e amigos que direto ou indiretamente me incentivaram e ajudaram neste período.

À minha orientadora Maria do Socorro Pires e Cruz pelo suporte, orientação e paciência durante esse período. E, sobretudo pela oportunidade de participar de seu grupo de pesquisa.

Ao Programa de Pós- graduação pela oportunidade de qualificação profissional;

À Universidade Federal do Piauí pela oportunidade de realizar o curso de pós-graduação.

Meus sinceros agradecimentos ao meu amigo Thiago Saraiva, sempre disposto a ajudar sem medir esforços. Obrigada pelos momentos de alegria durante as pausas para um cafezinho.

Minhas colegas de laboratório (pós-graduandos e estagiários) Leopoldo Marçal e Nailson Melo pelo apoio, troca de conhecimentos e por todos os momentos felizes na convivência diária. Em especial ao técnico do laboratório Felipe Oliveira sempre solidário e prestativo para comigo.

A todos os colaboradores do Laboratório de Sanidade Animal, Francisco Pereira, Valdirene, Francisca Brasil, Lidiane, Zé que me acolheram muito bem neste período, sempre com um sorriso no rosto.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>10</b>
1.1 Estruturação da dissertação	11
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>11</b>
<b>3. CAPÍTULO I</b>	<b>17</b>
Abstract	17
Resumo	18
Introdução	18
Materiais e Métodos	20
Resultados e Discussões	22
Agradecimentos	27
Referências	28
<b>4. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>30</b>
<b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>30</b>
<b>6. APÊNDICE</b>	<b>35</b>
Apêndice I	35
Apêndice II	36



SILVA, Marcielly Batista. **Desempenho de proteínas recombinantes no diagnóstico de leishmaniose visceral canina**. 36f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal), Programa de Pós Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2019.

## RESUMO

Proteínas recombinantes de *Leishmania infantum*, utilizadas como antígenos em teste ELISA, demonstram excelentes desempenhos de sensibilidade e especificidade no diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC) e boa capacidade de reconhecimento de anticorpos em amostras de soros de cães e de humanos. O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia da combinação de diferentes proteínas recombinantes, como a KMP-11, HSP83, LiP0, no diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral canina pelo método de ELISA. Dentre as associações proteicas utilizadas, o mix (KMP11+HSP83) apresentou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) para a maioria dos grupos testados (assintomáticos, sintomáticos e erliquiose) exceto para o grupo de animais vacinados. O desempenho no método ELISA dos mix (LiP0+HSP83); (KMP11 +LiP0); (KMP11+HSP83) não foi capaz de distinguir animais com erliquiose e vacinados dos verdadeiros positivos para LVC. O mix (KMP11+LiP0) foi o mais sensível com 78,43%, enquanto que KMP11+HSP83, o mais específico dentre os mix com 72,55%. O antígeno bruto (SLA) apresentou uma melhor sensibilidade e especificidade (90,2% e 76,47, respectivamente), superando os demais antígenos avaliados. Conclui-se que a combinação de diferentes proteínas recombinantes não resulta em desempenhos satisfatórios para o diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral canina pelo método ELISA, quanto aos obtidos com SLA.

**Palavras chave:** sorológico, ELISA, calazar, cão.

SILVA, Marcielly Batista. **Performance of recombinant proteins in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis.** 36f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal), Programa de Pós Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2019.

### ABSTRACT

Recombinant *Leishmania infantum* proteins, used as antigens in the ELISA test, demonstrate excellent sensitivity and specificity performances in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis (LVC) and good ability to recognize antibodies in samples from dogs and humans sera. The objective of this study was to evaluate the efficacy of the combination of different recombinant proteins, such as KMP-11, HSP83, LiP0, in the serological diagnosis of canine visceral leishmaniasis by the ELISA method. Among the protein associations used, the mix (KMP11 + HSP83) showed a significant difference ( $p < 0.05$ ) for most of the groups tested (asymptomatic, symptomatic and erlichia) except for the group of vaccinated animals. The performance in the ELISA method of the mix (LiP0 + HSP83); (KMP11 + LiP0); (KMP11 + HSP83) was not able to distinguish animals with erlichia and vaccinated from true positive for LVC. The mix (KMP11 + LiP0) was the most sensitive with 78.43%, whereas KMP11 + HSP83, the most specific of the mix with 72.55%. The crude antigen (SLA) showed a better sensitivity and specificity (90, 2% and 76.47, respectively), surpassing the other antigens evaluated. It was concluded that the combination of different recombinant proteins does not result in satisfactory performances for the serological diagnosis of canine visceral leishmaniasis by the ELISA method, as compared to those obtained with SLA.

**Key words:** Sorological, ELISA, calazar, dog.

## 1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses podem se manifestar desde a forma mais branda com lesões na pele e mucosas (leishmaniose tegumentar americana), até a mais grave, que atinge vísceras (leishmaniose visceral). Essas doenças estão presentes em 98 países com aproximadamente 12 milhões de infectados e 350 milhões de pessoas em risco de contrair a infecção (FIALHO, 2013).

Zoonose crônica e, frequentemente, fatal, a Leishmaniose visceral canina (LVC) é considerada pela Organização Mundial de Saúde como uma das dezessete doenças tropicais negligenciadas, representando um grave problema de saúde pública no mundo. Causada no Brasil pela espécie *Leishmania infantum*, seu principal vetor é o flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* e o cão é o principal reservatório doméstico (WHO, 2014).

Os sinais clínicos no cão são variados e dependentes da resposta imune. Infectados estes animais podem apresentar-se variando de um aparente estado sadio a um severo estágio final (BRASIL, 2013).

O aumento de casos de leishmaniose em zonas endêmicas está relacionado a vários fatores tais como: controle inadequado de vetores e reservatórios, aumento do número de casos da doença em pacientes imunodeprimidos, além das alterações climáticas, que contribuem para a disseminação do vetor (MONTALVO et al., 2012).

O reservatório doméstico da LVC é diagnosticado pelos órgãos de saúde pública no Brasil através dos seguintes testes sorológicos: imunocromatográfico rápido (triagem) e Elisa (confirmatório) (BRASIL, 2011). Para o diagnóstico canino existe uma grande variedade de métodos que utilizam diferentes antígenos. No entanto, nenhum destes é totalmente específico, dificultando o diagnóstico correto (FARIA; ANDRADE, 2012).

Frações antigênicas obtidas do parasita na forma promastigota são utilizadas em ensaios imunoenzimáticos para diagnóstico de leishmaniose visceral canina, na busca de um diagnóstico mais preciso, com antígenos específicos ou até mesmo uma combinação de diferentes antígenos em um mesmo ensaio, dando origem a um antígeno quimérico, com múltiplos epítomos com o objetivo de melhorar a sensibilidade e a especificidade do teste (SOUZA, 2005; FARIA; ANDRADE, 2012).

O presente projeto tem como objetivo avaliar a eficácia da combinação de diferentes proteínas recombinantes já descritas como a KMP-11, HSP83, LiP0, no diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral canina pelo método de ELISA, no intuito de avaliar a

sensibilidade e a especificidade não só em animais sintomáticos, como também em animais assintomáticos, vacinados contra LVC e portadores de erliquiose.

### 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 – **“Desempenho de proteínas recombinantes no diagnóstico de leishmaniose visceral canina.”**, onde foi redigido e formatado segundo as normas do periódico “Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária” e Considerações finais.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

Foram relatados em 1908 na Tunísia, no velho mundo, (NICOLLE; COMTE 1908) os primeiros casos de infecção por *Leishmania infantum* na pele de cães, sugerindo-se já desde aquela época a participação destes animais como potenciais reservatórios (ADLER; THEODOR, 1932; PARROT et al.,1930).

No novo mundo, a infecção canina por *Leishmania infantum* nas américas foi relatada no Brasil quando Chagas et al.(1937) obtiveram 4,1 % de positividade entre cães da cidade de Moju e Abaetetuba no estado do Pará. Entretanto, foi somente na década de 50 que os cães foram considerados como principal de reservatório.

Conti et al (2016) em seu estudo apresenta a LV dividida em três fases conforme o contexto histórico do país. Entre 1930 a 1950 compreende a primeira fase, de caráter endêmica e rural. A segunda fase ocorreu na década de 80, com o primeiro registro de caso urbano e a terceira fase é representada pelo elevado número de casos na áreas urbanas nacionais.

Estima-se que anualmente um milhão de novos casos e 20.000 a 30.000 mortes por leishmaniose visceral ocorram mundialmente. Destes, mais de 90% estão concentrados nos seguintes países: Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul e Sudão (WHO, 2017).

Os protozoários do gênero *Leishmania* pertencem ao filo Protista, subfilo Mastigophora, ordem Kinetoplastidae e família Trypanosomatidae. Seu corpo pode assumir a

forma de folha (promastigota) com flagelo único ou arredondado com núcleo vesicular (amastigota). São heteróxeos, ou seja, dependem de, pelo menos, dois hospedeiros para completar seu ciclo de vida, sendo um invertebrado e outro vertebrado (TAYLOR et al., 2010).

O gênero *Leishmania* tem tropismo por células do sistema fagocítico mononuclear. Podem ser encontrados em macrófagos, células da pele, baço, fígado, medula óssea, linfonodos e na mucosa nos hospedeiros vertebrados. A forma flagelada é encontrada no trato digestivo e na probóscida de vetores artrópodes (BRASIL, 2014; TAYLOR et al., 2010).

Os flebotomíneos transmissores do agente da leishmaniose visceral no Brasil pertencem à família Psychodidae, subfamília Phlebotominae e o gênero *Lutzomyia*. São mosquitos pequenos com até 5mm de comprimento, com asas lanceoladas e peças bucais são curtas a médias e adaptadas para furar e sugar. Possuem ampla distribuição nos trópicos e nos subtropicais. O seu ciclo biológico se completa entre 30 a 100 dias ou mais em climas frios, e suas formas evolutivas são: ovo, larva, pupa e adulto. Há preferência por regiões semi-áridas, de florestas e savanas (TAYLOR et al., 2010).

A transmissão do agente etiológico da LVC no Brasil se dá pela picada de fêmeas de insetos dípteros pertencentes a espécie *Lutzomyia longipalpis*. Há pouco tempo, no Estado de Mato Grosso do Sul *Lutzomyia cruzi* foi incluído como vetor desta enfermidade (GALLATI et al., 1997).

As fêmeas hematófagas apresentam atividade crepuscular e noturna, permanecendo em repouso e protegidas do vento em locais úmidos e sombreados. Sua fonte de alimentação é bem variada e pode acontecer em diversas espécies de vertebrados (BRASIL, 2014). Dentre os mamíferos, os hospedeiros naturais são tatus, preguiças, cães, gatos, ratos, humanos, macacos, gambás e cavalos (FONSECA, 2013). O hábito de manter estes animais dentro da residência pode expor humanos ao risco de adquirir a infecção (WHO, 2017).

A transmissão em animais é cíclica, ou seja, o artrópode (hospedeiro intermediário) é necessário para multiplicação e transformação do parasita na forma infectante para o hospedeiro mamífero seguinte (TAYLOR et al., 2010) que adquire a infecção através da picada de fêmeas hematófagas infectadas (WHO, 2017; BRASIL, 2015; GONTIJO;MELO, 2004).

Ao realizar repasto sanguíneo em um animal infectado são ingeridos macrófagos parasitados com a forma amastigota da *Leishmania infantum* (BRASIL, 2014), que se

modifica em promastigota, no intestino do vetor, divide-se por fissão binária e em seguida dirige-se à probóscida, de onde será inoculada em um novo hospedeiro no próximo repasto sanguíneo (TAYLOR et al., 2010).

As espécies *L. infantum* causam leishmaniose visceral zoonótica (OLIVEIRA et al., 2011). Devido à ampla distribuição geográfica do Brasil, esta enfermidade diferencia-se quanto aos aspectos geográficos, climáticos e sociais, ocorrendo em todas as regiões, destacando-se a região Nordeste como prevalente de leishmaniose visceral humana (LVH) e canina (LVC) no país (SILVA et.al., 2016; BRASIL, 2014).

A sinais clínicos encontrada em animais é linfadenomegalia, alopecia, atrofia muscular e condição corporal comprometida, além de hiporexia, onicogribose, anemia, alterações oftálmicas, cardíacas e neurológicas (Dantas-Torres et al., 2012; Feitosa et al., 2000; Wilson et al., 2012).

Contreras et al. (2019) avaliando os sinais clínicos de cães positivos para leishmaniose observou que 100% dos animais estudados possuíam afecções dermatológicas. Dentre as dermatopatias presentes nos cães, 83,3% apresentaram alopecia; 50% demonstraram lesões crostosas, descamação, hiperqueratose e seborreia.

É provável que a maioria dos cães expostos à doença em áreas endêmicas desenvolva a doença clínica ou subclínica ou adquira imunidade (TAYLOR et al., 2010). O diagnóstico adequado é um desafio para o médico veterinário, em frente a variedade de técnicas existentes (GONTIJO;MELO, 2004).

Segundo o Ministério da Saúde, o diagnóstico clínico é difícil de ser determinado devido à semelhança dos sinais clínicos da LVC com outras doenças infecciosas, e o diagnóstico laboratorial pode ser baseado em provas parasitológicas e sorológicas (BRASIL, 2014).

O diagnóstico parasitológico é confirmado com a presença de formas amastigotas intra ou extracelulares identificadas em aspirados corados por Giemsa ou Panótico de esfregaços de linfonodos, medula óssea, baço e lesões cutâneas (TAYLOR et al., 2010). As provas sorológicas atuais utilizadas em inquéritos epidemiológicos pelo Ministério da Saúde incluem o teste Imunocromatográfico Rápido (TR DPP® Leishmaniose Visceral) para triagem e Elisa como confirmatório (BRASIL, 2011).

Dentre as medidas de controle para a LVC recomendadas pelo Ministério da Saúde está a eliminação dos reservatórios com a prática da eutanásia do cão infectado, conforme a Resolução CFMV nº 714, de 20 de junho de 2002 (BRASIL, 2015; BRASIL, 2017).

É necessária a melhoria no diagnóstico da infecção, como uma padronização de técnicas, uma combinação dos testes e a avaliação da aplicabilidade de processos moleculares e parasitológicos (BELO et al., 2013).

Os imunoenaios baseados em antígenos recombinantes de *L. infantum* disponíveis comercialmente têm demonstrado sensibilidade de 100% em diferentes regiões endêmicas de doenças e evidenciado a necessidade de explorar o potencial de novas proteínas recombinantes e sua aplicabilidade no diagnóstico da LV (OLIVEIRA, 2011; GONTIJO; MELO, 2004).

A busca por métodos mais sensíveis e específicos fez surgir a partir da década de 70 muitas pesquisas que avaliam e modificam o Elisa-padrão, com a utilização de antígenos recombinantes (ALVES; BEVILACQUA, 2004).

Proteínas recombinantes são obtidas mediante expressão em bactérias ou fungos a partir da tecnologia do DNA recombinante, o mais utilizado para fins terapêuticos é o sistema de expressão da *Escherichia coli* por produzir elevadas quantidades de produtos recombinantes solúveis (TERPE, 2006).

Sua produção é vista como uma alternativa na metodologia de diferentes pesquisadores na busca por novos antígenos para o diagnóstico da LVC (FARIA, 2014). Utilizá-las como reagente para testes sorológicos, eleva a sensibilidade e a especificidade destes métodos de diagnóstico (FARAHMAND; NAHREVANIAN, 2016).

Estes antígenos recombinantes apresentam inúmeras funções no parasita, tais como: proteínas relacionadas à cinesina, proteínas do choque térmico, histonas nucleossomais, proteínas de membrana dos kinetoplastídeos, as proteínas P ribossomais, enzimas e de funções desconhecidas (SRIVASTAVA et. al., 2011).

As proteínas do choque térmico (HSP) são uma classe altamente conservada desde os seres primitivos. São sintetizadas quando células são submetidas a estresse térmico ou químico e agrupadas em famílias de acordo com suas sequências de aminoácidos e seu peso molecular (MEYER; SILVA, 1999).

São essenciais para a sobrevivência intracelular, diferenciação e virulência do parasita uma vez que, na transmissão ao mamífero, são expostas a uma série de desafios como variações de temperatura, pH e aos reativos de oxigênio dos macrófagos do hospedeiro (SHONHAI et al., 2011). Além disso, pertencem a família de proteínas cuja função é proteger a célula de estímulos tóxicos externos (BIYANI, et al., 2011), demonstrando elevada resposta de estímulo imune em mamíferos (KUMAR, et al., 2010).

Do ponto de vista do parasita, a produção de HSP está relacionada a um mecanismo de sobrevivência enquanto da perspectiva do hospedeiro, a expressão destas proteínas induz resposta imunológica, o que as torna importante para o desenvolvimento de vacinas (POLLA, 1991; MARESCA; KOBAYASHI, 1994).

São expressas por organismos pertencentes à ordem kinetoplastida: *Leishmania major*, *Trypanosoma brucei* e *Trypanosoma cruzi*. No gênero *Leishmania* sua expressão está envolvida no processo de diferenciação celular da forma promastigota para a amastigota (BENTE et al., 2003).

Encontradas nos núcleos das células de eucariotos, as histonas nucleossomais envolvem o DNA e são antígenos altamente conservados (WEBER, 2010). Tem uma elevada capacidade de conservar suas estruturas primárias, preservando sua função ao longo da escala evolutiva dos eucariotas.

É um grupo de proteínas de baixo peso molecular que se associam ao DNA de todas as células eucariotas para formar a cromatina, cuja unidade básica é formada por um nucleossoma resultante da ligação entre uma fibra de DNA a um núcleo protéico de cada uma das classes de histonas (H2A, H2B, H3 e H4). Estas quatro principais classes de histonas são antígenos reconhecidos no soro de cães acometidos por LV. (RAMIREZ et al., 2009).

A *leishmania* possui histonas, que são liberadas através da ativação de macrófagos, que destroem as amastigotas, induzindo uma forte resposta imune no hospedeiro, este tipo de resposta está associada com proteção sendo do tipo Th1 (WEBER, 2010).

Associada ao lipofosfoglicano na forma amastigota da leishmania, a proteína da membrana dos kinetoplastídeos de peso molecular 11 kDa (KMP11) reduz a produção de óxido nítrico no interior de macrófagos infectados, assegurando a sobrevivência do parasita no hospedeiro (MATOS, 2010).

Seu nível de expressão é maior na forma amastigota, embora ela ocorra também na forma promastigota. Sugere-se que esta molécula está envolvida na infectividade da forma promastigota de *leishmania*, uma vez que sua expressão é reduzida quando há perda da virulência por repetições de subculturas in vitro (CARVALHO, 2004).

Geralmente KMP11 é encontrada em associações com estruturas de membrana na superfície celular, bolso flagelar e vesículas intracelulares (MATOS, 2010). Além disso, demonstra um efeito modulador de macrófagos e resposta Th1, através da elevada produção de IL-10 (CARVALHO et al., 2003; CARVALHO, 2004)



Potente imunoestimuladora durante o processo de doença, a família de proteínas P de *Leishmania infantum*, são constituintes da grande unidade ribossomal, a qual é composta por três membros (LiP0, LiP2a e LiP2b), descritas como antígenos imunodominantes no soro de cães e humanos naturalmente infectados por *L.infantum chagasi* (SOTO et al., 1995; SKEIKY et al., 1994).

Embora a combinação de várias proteínas recombinantes demonstrem resultados com alta eficácia para o diagnóstico de LV humana e canina, faz-se necessária uma maior otimização para antígenos adequados que proporcionem um desempenho de alto rendimento (FARAHMAND; NAHREVANIAN, 2016).

### 3. CAPÍTULO I

#### **Desempenho de proteínas recombinantes no diagnóstico de leishmaniose visceral canina.**

#### **Performance of recombinant proteins in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis.**

**Marcielly Batista da Silva<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 Autónoma de 13 Madri, Madri 280049, Espanha.

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

\*Endereço para correspondência:

Marcielly Batista da Silva, 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: mciellybatista@gmail.com

#### **Abstract**

Recombinant *Leishmania infantum* proteins, used as antigens in the ELISA test, demonstrate excellent sensitivity and specificity performances in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis (LVC) and good ability to recognize antibodies in samples from dogs and humans sera. The objective of this study was to evaluate the efficacy of the combination of different recombinant proteins, such as KMP-11, HSP83, LiP0, in the serological diagnosis of canine visceral leishmaniasis by the ELISA method. Among the protein associations used, the mix (KMP11 + HSP83) showed a significant difference ( $p < 0.05$ ) for most of the groups tested (asymptomatic, symptomatic and erythemia) except for the group of vaccinated animals. The performance in the ELISA method of the mix (LiP0 + HSP83); (KMP11 + LiP0); (KMP11 + HSP83) was not able to distinguish animals with erythemia and vaccinated from true positive for LVC. The mix (KMP11 + LiP0) was the most sensitive with 78.43%, whereas KMP11 + HSP83, the most specific of the mix with 72.55%. The crude antigen (SLA) showed a better sensitivity and specificity (90, 2% and 76.47, respectively), surpassing the other antigens evaluated. It was concluded that the combination of different recombinant proteins does not result in

satisfactory performances for the serological diagnosis of canine visceral leishmaniasis by the ELISA method, as compared to those obtained with SLA.

**Key words:** Sorological, ELISA, calazar, dog.

### **Resumo**

Proteínas recombinantes de *Leishmania infantum*, utilizadas como antígenos em teste ELISA, demonstram excelentes desempenhos de sensibilidade e especificidade no diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC) e boa capacidade de reconhecimento de anticorpos em amostras de soros de cães e de humanos. O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia da combinação de diferentes proteínas recombinantes, como a KMP-11, HSP83, LiP0, no diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral canina pelo método de ELISA. Dentre as associações proteicas utilizadas, o mix (KMP11+HSP83) apresentou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) para a maioria dos grupos testados (assintomáticos, sintomáticos e erliquiose) exceto para o grupo de animais vacinados. O desempenho no método ELISA dos mix (LiP0+HSP83); (KMP11 +LiP0); (KMP11+HSP83) não foi capaz de distinguir animais com erliquiose e vacinados dos verdadeiros positivos para LVC. O mix (KMP11+LiP0) foi o mais sensível com 78,43%, enquanto que KMP11+HSP83, o mais específico dentre os mix com 72,55%. O antígeno bruto (SLA) apresentou uma melhor sensibilidade e especificidade (90,2% e 76,47, respectivamente), superando os demais antígenos avaliados. Concluiu-se que a combinação de diferentes proteínas recombinantes não resulta em desempenhos satisfatórios para o diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral canina pelo método ELISA, quanto aos obtidos com SLA.

**Palavras chave:** Proteínas recombinantes, ELISA, diagnóstico, cão.

### **Introdução**

As Leishmanioses apresentam nas Américas elevada incidência e ampla distribuição geográfica e configuram um desafio para programas nacionais e regionais, uma vez que requerem enorme esforço técnico, operacional e político para manter e cumprir as estratégias de controle destas doenças (OPAS/OMS, 2018).

Dos 96% de casos de leishmaniose visceral das Américas são reportados pelo Brasil no ano de 2016, 12.690 casos, ficando à frente de outros países como Colômbia com 10.966, Nicarágua 5.423 e Peru 7.217 casos. Além disso, no mesmo ano a taxa de letalidade por leishmanioses no Brasil chegou a 7,9 %, a maior quando comparada aos outros países (OPAS/OMS, 2018).

A cada ano, quase dois milhões de novos casos de Leishmaniose visceral são registrados no mundo (ZUBEN & DONALÍSIO, 2016). Considerada um grave problema de saúde pública, representa uma das dezessete doenças tropicais negligenciadas (SILVA, 2016).

As transformações ambientais causadas pelo homem nas últimas décadas, o desmatamento, o crescimento desordenado da cidade, a presença concomitante de leishmaniose e animais domésticos, como também habitações precárias favorecem a urbanização e distribuição da doença pelo Brasil e a emergência de novos focos e reativação de antigos. ( SOUZA & LIMA ,2018)

Atualmente as regiões Norte, Centro-Oeste e Sudeste do Brasil passaram a notificar casos com mais frequência, caracterizando uma expansão desta zoonose pelo território brasileiro devido à urbanização e elevada situação de pobreza (AGUIAR & RODRIGUES, 2017; SILVA, 2016). No entanto, as região Norte e Nordeste são responsáveis pelas maiores incidências do total de casos de leishmaniose visceral no país (BRASIL, 2018) com cerca de 84,6% dos casos registrados, deste total, no Piauí ocorreram 1.195 casos (NEGREIROS et al., 2017).

Considerada uma zoonose de evolução crônica e acometimento sistêmico, a Leishmaniose visceral, se não for tratada pode matar em 90% dos casos. As fêmeas de flebotomíneos *Lutzomyia longipalpis* no Brasil é o principal vetor e sua picada transmite a infecção aos humanos (BRASIL, 2018).

O cão (*Canis familiaris*) é a principal fonte de infecção no ambiente urbano, enquanto no ambiente silvestre, são as raposas (*Dusicyon vetulus e Cerdocyon thous*) e os marsupiais (*Didelphis albiventris*) (BRASIL, 2014).

O Ministério da Saúde recomenda várias medidas preventivas contra a LV tanto para a população humana quanto para a canina. Dirigidas aos cães destacam-se: o controle da população canina errante ; em casos de doação de animais, realizar testes e sorológicos anteriormente; fazer uso de telas em canis individuais e coletivos, utilizar coleiras impregnadas com deltametrina e a administração de vacina antileishmaniose visceral canina (BRASIL,2014).

Autorizada por meio da Nota Técnica Conjunta n° 001/2016 MAPA/MS, a droga milteforan é recomendada para o tratamento da leishmaniose visceral de cães e não configura uma medida obrigatória de prevenção e cabe ao proprietário decidir a medida mais adequada para seu animal, seu licenciamento está de acordo com a Portaria Interministerial n°1.426 de 11 de julho de 2008, que proíbe o tratamento de cães com produtos de uso humano ou não registrados no MAPA (BRASIL, 2016).

No Brasil os métodos de diagnóstico disponíveis, autorizados e recomendados pelo Ministério da Saúde possuem sensibilidade e especificidade bastante variáveis

(SOUZA, 2005; FARIA; ANDRADE, 2012; SILVA, 2015), prejudicando o diagnóstico de animais infectados e favorecendo a disseminação da doença.

Baseiam-se apenas em testes sorológicos, com o teste rápido TR DPP® (do inglês “Dual-Path Platform”) é realizada a triagem e com o método de ELISA (do inglês “Enzyme Linked Immunosorbent Assay) são confirmados os diagnósticos (BRASIL, 2011).

Para todos os animais sororreagentes, é recomendada a eutanásia, com base na Resolução n.º 714, de 20 de junho de 2002, do Conselho Federal de Medicina Veterinária (BRASIL, 2014). No entanto, esta medida profilática não é bem sucedida na prevenção da transmissão da leishmaniose no Brasil.

Os melhores desempenhos referentes à sensibilidade e à especificidade no diagnóstico da LVC são alcançados utilizando proteínas recombinantes, quando comparados com o uso de antígenos brutos (FARIA & ANDRADE, 2012) e também demonstram excelente capacidade de reconhecimento por anticorpos no soro de humanos e de cães infectados por *Leishmania sp.* (SOUZA et al., 2005).

É necessário aperfeiçoar a qualidade das ferramentas de diagnóstico dos possíveis reservatórios e buscar novos antígenos proteicos bem mais conservados em todas as fases da infecção, garantindo um ensaio bem mais específico e sensível.

O presente estudo tem como objetivo avaliar a eficácia da combinação de diferentes proteínas recombinantes já descritas como a KMP-11, HSP83, LiP0, no diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral canina pelo método de ELISA.

## **Material e Métodos**

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Microbiologia e Imunologia, do Laboratório de Sanidade Animal (LASAN), localizado no Centro de Ciências Agrárias (CCA) da Universidade Federal do Piauí, no município de Teresina-PI.

O projeto foi apreciado e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Universidade Federal do Piauí sob o protocolo N°499/18 em anexo.

O perfil clínico dos grupos estudados foi realizado de acordo com Silva et al. (2017) onde a pontuação era atribuída à quantidade de sinais clínicos aparentes e as notas somavam-se a partir da gravidade dos mesmos, a ausência de sinais clínicos recebia a pontuação zero. Os grupos de animais positivos assintomáticos foram

atribuídos os escore de até 3 pontos, enquanto o grupo sintomático foi representado por escore superior a 3 pontos. Já o grupo de cães negativos possuía escore zero.

O grupo de animais com erliquiose foi selecionado a partir do banco de dados do grupo de pesquisa, mediante positivação no Teste rápido ALERE (Erliquiose Ac Test Kit – 197 PART.: 006/15-2105DA005). As amostras de soro do grupo de cães vacinados com Leish-198 Tec® foram gentilmente cedidos por clínicas particulares de Teresina.

Foram utilizadas para este estudo 220 amostras de soro presentes no banco de dados do grupo de pesquisa. Estas amostras foram identificadas e separadas por grupo, tais como: 51 amostras de animais saudáveis, sem LVC (G1); 43 amostras de animais assintomáticos, com LVC, porém sem sinais clínicos aparentes (G2); 51 amostras de animais sintomáticos, com LVC (G3) e 24 amostras de animais sem LVC, vacinados com Leish-Tec® (G4) e 51 amostras de animais com erliquiose (G5).

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

Para determinar a concentração ideal das proteínas recombinantes (KMP11, HSP83 e Lpi0) utilizadas neste experimento, as mesmas foram testadas anteriormente pelo método ELISA com diluição. As placas foram sensibilizadas com diluições decrescentes (0,1; 0,05; 0,025; 0,125; 0,00625; 0,00312; 0,00156) das proteínas recombinantes e testadas com amostras sabidamente negativas e positivas retiradas do banco de dados do grupo de pesquisa. Após os testes, a diluição de melhor performance para cada proteína foi identificada e utilizada para produção do mix.

Para o desenvolvimento da técnica de ELISA com antígenos recombinantes de Leishmania, foram utilizadas placas de 96 poços de poliestireno de superfície MaxiSorp™ (NUNC/ Thermo Scientific), previamente sensibilizadas com os antígenos proteicos na concentração de 2µg/mL para antígeno total de Leishmania (SLA) e 0,1µg/mL para LiP0, 0,05 µg/mL para KMP11 e 0,025 µg/mL para os demais diluídos

em tampão Ureia 3M pH 8, e incubadas overnight à 4°C. Após a incubação, o conteúdo das placas foi desprezado e lavado por três vezes com 200 µl por poço de Wash Buffer – PBS-TB (PBS + 0,5% Tween 20). Em seguida foi realizado o bloqueio dos poços com 200 µl por poço de Blocking Buffer - BB (PBS-TB com 5% de leite desnatado) e cada poço incubado por 1 hora em temperatura ambiente. Após o bloqueio, as placas foram lavadas quatro vezes com 200 µl de PBS-TB (PBS + 0,5% Tween 20) por poço. Os soros caninos foram diluídos em 1:400 no BB (PBS-TB com 5% de leite desnatado), logo após, foi adicionado 100 µl em cada poço e incubado sobre agitação por 2 h. No qual realizou-se as etapas de lavagem novamente, como descrito anteriormente. Uma nova incubação foi realizada com o conjugado anti-cão marcado com peroxidase (SIGMA Nº Cat: A6792), durante 1 hora sobre agitação, numa diluição de 1:6000 em BB (PBS-TB com 5% de leite desnatado). Seguiram-se novamente etapas de lavagem. Para revelação das reações foram utilizadas OPD de 30 mg (o-phenylene diamine dihydrochloride) (Sigma Chemical Company – P7288) para cada 5 mg de OPD foi diluído em 10 ml de PBS 1x e adicionados a esta proporção 5 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, e por fim, foram adicionados 200 µl por poço, após 20 minutos em câmara escura a reação interrompida com solução de parada (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3N) com 50 µl por poço. A leitura das placas foi realizada em Espectrofotômetro com comprimento de onda de 490 nm, utilizando o software SolftMax Pro 5.0.

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

## **Resultados e Discussões**

Para avaliar o desempenho de cada mix de proteínas recombinantes de *Leishmania infantum chagasi* (KMP11+LiP0; LiP0+HSP83; KMP11+HSP83) foram calculados os pontos de corte baseados na curva ROC dos valores de densidade ótica

(DO) obtidos das amostras, a fim de se discriminar amostras positivas e negativas (**figura 1**).

O mix KMP11+Lip0 apresentou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grupos de animais sintomáticos e negativos e entre os assintomáticos e negativos. No entanto, este mix não foi capaz de discriminar o grupo de animais com erliquiose e de animais vacinados dos animais verdadeiramente positivos. Este mix também apresentou uma grande quantidade de animais falsos positivos, pois detectou vários animais sabidamente negativos como amostras positivas (**figura 1A**).

De acordo com os estudos de Moura et al. (2017), que avaliaram diferentes proteínas recombinantes de *Leishmania* sp., individualmente, através do método ELISA, a proteína recombinante KMP11, utilizando os mesmos grupos de animais do presente estudo (negativos, assintomáticos, sintomáticos, com erliquiose e vacinados para LVC), foi capaz de discriminar cães sintomáticos de todos os demais grupos e de discriminar animais assintomáticos de animais negativos, sem discriminar dos outros grupos estudados. Os autores verificaram uma reatividade com soros de animais vacinados e com erliquiose e atribuíram este fenômeno a reação cruzada, o que também pode ter acontecido no presente estudo.

A KMP-11 demonstrou boa detecção de soro de cães com LV, principalmente de cães com sintomatologia para a doença, mesmo não discriminando bem os demais grupos, concordando assim com autores que relatam que a presença da proteína está diretamente relacionada com a presença do parasita, ou seja, com o desenvolvimento da infecção.

Em estudo anterior, as proteínas ribossomais de *L. infantum* (LRP), avaliadas individualmente, apresentaram um bom desempenho, com diferença significativa entre os grupos de animais sintomáticos e negativos, assim como de assintomáticos e negativos (MOURA et al., 2017). Neste estudo, foi observado este mesmo resultado, apesar destas proteínas estarem associadas com outros antígenos.

Matos et al. (2010) demonstraram que a expressão aumentada de KMP-11 em promastigotas metacíclicas, e especialmente em amastigotas indica que esta molécula tem um papel importante na relação parasita - hospedeiro, o que a torna uma importante molécula indutora de resposta imune humoral. A associação de KMP-11 a Lip0 pode ter piorado o desempenho de KMP-11 uma vez que no estudo de MOURA et al. (2017) esta proteína teve melhor desempenho quando usada individualmente, o que não observamos neste estudo.



Em análises individuais as LRPs provenientes de *L. infantum* apresentaram sensibilidade e especificidade semelhante para cães sintomáticos em testes utilizando o antígeno bruto de leishmania, entretanto, para detecção de casos de animais com LV assintomática estes antígenos demonstraram uma maior reatividade cruzada com soro de cães com outras parasitoses (COELHO et al., 2009).

O mix constituído de KMP11 e LiP0 apresentou desempenho semelhante aos dados de Coelho et al. (2009) que observaram, utilizando a mesma técnica de ELISA, empregada neste estudo, uma discreta reatividade de proteínas ribossomais com o soro de cães vacinados com duas vacinas profiláticas de *Leishmania* licenciadas no Brasil para LVC.

Ao se utilizar o mix de LiP0+HSP83, o mesmo demonstrou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) quando se comparou os grupos de animais sintomáticos e negativos, e assintomáticos e negativos. No entanto, não foi capaz de distinguir cães negativos para a doença de cães vacinados e portadores de outras enfermidades (**figura 1B**), inclusive detectando vários animais sabidamente negativos como positivos, elevando a taxa de falso positivos.

Podemos observar que a performance do mix (LiP0+HSP83) mostra-se similar ao desempenho dos antígenos de forma individual (HSP83 e LiP0), demonstrando elevada reatividade com soros de animais vacinados e com erliquiose (MOURA et al., 2017). Celeste et al. (2014) demonstraram que proteína de choque térmico HSP83 apresentou uma elevada sensibilidade no ELISA, o que não foi observado neste estudo. Uma das razões para isso pode ter sido a associação com uma proteína lipossomal, que pode ter competido por sítios de interação com os anticorpos anti-leishmania.

O resultado obtido utilizando-se com o mix KMP11+HSP83 apresentou uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) para a maioria dos grupos testados (assintomáticos, sintomáticos e erliquiose) exceto para o grupo de animais vacinados (**figura 1C**). Entretanto, pode-se observar que este mix induziu a um grande número falso positivos entre os grupos de animais com erliquiose e de animais vacinados. Essa reatividade cruzada impacta na discriminação de animais verdadeiramente positivos de animais portadores de outras enfermidades e animais que receberam vacinação. Travi et al. (2018) afirmam que é necessário aprimorar a habilidade dos testes diagnósticos em identificar cães clinicamente saudáveis, de cães infectados e de animais vacinados.

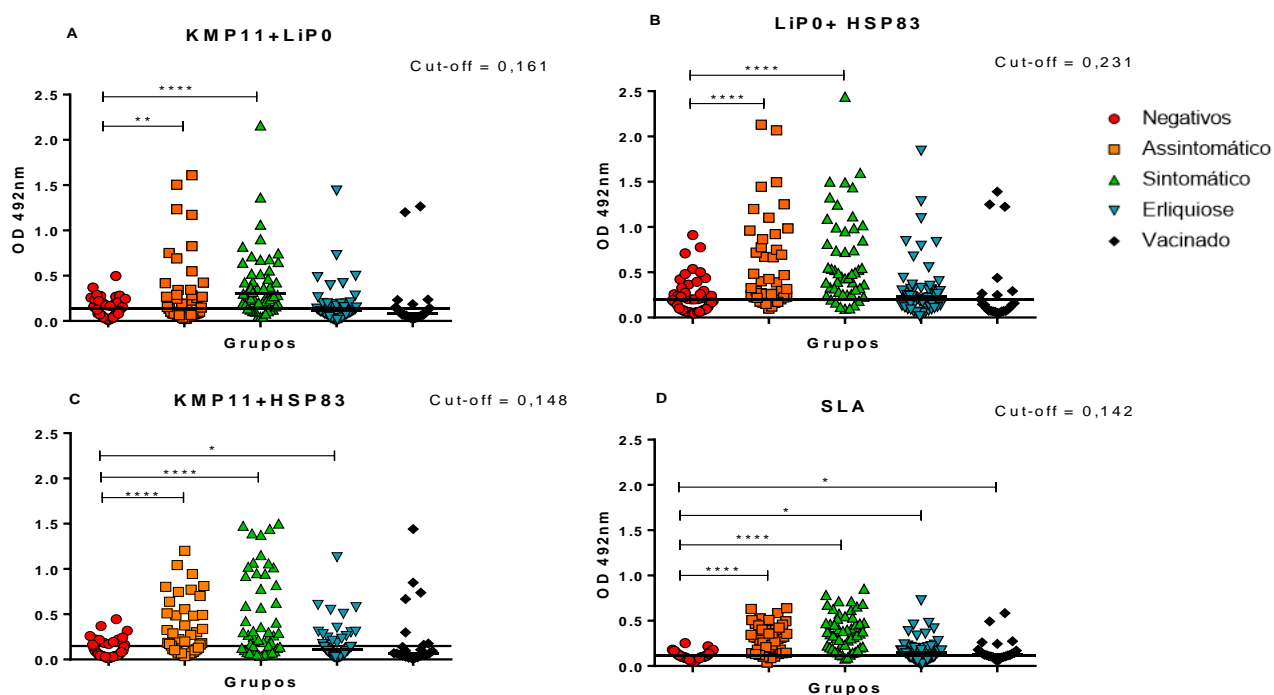
Neste experimento, o SLA (**figura 1D**) apresentou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre todos os grupos (assintomáticos, sintomáticos, erliquiose e vacinados),

demonstrando discreta reatividade para os grupos de animais com erliquiose e com animais vacinados, fato este que implica num resultado falso-positivo em testes baseados em anticorpos como o teste ELISA (LOPES et al., 2017).

Este trabalho corrobora com os estudos de Travi et al. (2018) que comprovam que a utilização de antígenos brutos em métodos sorológicos é altamente sensível para detecção de infecções subclínicas e clínicas, porém apresentam baixa especificidade. Outros trabalhos também demonstraram a existência de reações cruzadas quando se utiliza as proteínas totais de *Leishmania sp.*, com soros de animais infectados com outros patógenos alterando a sensibilidade e especificidade, e comprometendo o diagnóstico (FERREIRA et al., 2007; PORROZZI et al., 2007; ALVES et al., 2004).

Os resultados do presente estudo estão conforme os estudos de Zanette et al. (2014) que verificaram que a utilização de técnicas convencionais, com antígenos brutos, padronizadas pelos órgãos públicos levam a uma reatividade cruzada com outras enfermidades por conta da semelhança filogenética, avaliando erroneamente cães negativos como sorologicamente positivos para LVC.

Observando os mix utilizados, de uma forma geral, os três apresentaram valores de sensibilidade e especificidade variados (**Tabela 1**). KMP11+LiP0 apresentou os melhores resultados de sensibilidade (78,43%), enquanto que o KMP11+HSP83 exibiu uma sensibilidade de 62,79%, o que o caracterizou como o mix menos sensível deste estudo. Dentre os valores de especificidade, KMP11+HSP83 exibiu o maior valor dentre os três mix (72,55%), já o conjunto LIP0+HSP83 apresentou a menor especificidade, com um valor de 64,71%.



**Figura 1.** Níveis de anticorpos IgG anti-*Leishmania* sp. (sintomáticos e assintomáticos), cães com erliquiose, vacinados contra LV e cães saudios, negativos para LV. Soro de cães proveniente de áreas endêmicas para LVC foram testados com diferentes misturas de antígenos proteicos: (A) KMP11+LiP0, (B) LiP0+HSP83, (C) KMP11+HSP83, (D) SLA. 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. \* $p=0,0332$ , \*\* $p=0,0021$ , \*\*\* $p=0,0002$ , \*\*\*\* $p<0,001$ .

**Tabela 1.** Desempenho diagnóstico de antígenos recombinantes em um protocolo ELISA com soro de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum* e com soros de cães negativos para leishmaniose visceral (NLV).

Antígenos	Cães com LV (NLV + controles)		
	Sensibilidade%	Especificidade%	Likelihood ratio
KMP11+LiP0	78,43	68,63	2.500
LiP0+HSP83	74,42	64,71	2.109
KMP11+HSP83	62,79	72,55	2.287
SLA	90,20	76,47	3.833

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

O SLA foi o antígeno que apresentou uma melhor sensibilidade e especificidade (90,2% e 76,47, respectivamente), superando os demais antígenos avaliados neste estudo, entretanto o mesmo não foi capaz de distinguir com maior precisão animais infectados com *E. canis* de animais sintomáticos e assintomáticos, assim com não conseguiu diferenciar animais vacinados de animais verdadeiramente infectados.

Discordando dos resultados obtidos em estudo anterior desenvolvido pelo mesmo grupo, analisando o desempenho individual das mesmas proteínas, sugerindo que a combinação das mesmas traz prejuízo ao desempenho do ensaio (CELESTE et al., 2004; CELESTE et al., 2014; ZANETTE et al., 2014; TRAVI et al., 2018).

Assim, concluímos que a combinação de diferentes proteínas recombinantes para o uso no ensaio imunoenzimático (ELISA) não apresentou resultados tão satisfatórios quanto aos obtidos com o antígeno bruto, o que pode ter ocorrido em virtude de competição entre os antígenos pelos sítios de interação com os anticorpos anti-leishmania, fazendo com que os mesmos não sejam uma alternativa viável para o diagnóstico da LVC em área endêmica.

## Agradecimentos

Agradecemos a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida à SILVA, M. B. Ao professor doutor Manuel Soto (Departamento de Biologia Molecular Severo Ochoa, Universidade Autónoma de

Madrid) pelas proteínas recombinantes cedidas. A Laura Ramirez, pela confecção das proteínas. Ao grupo de pesquisa pelos dados cedidos e a clínica particular de Teresina Doctor Vet pela ceder as amostras para a realização deste experimento. Meu muito obrigado a todos que contribuíram pelo desenvolvimento deste trabalho.

## Referências

AGUIAR, P. F.; RODRIGUES, R. K. Leishmaniose visceral no Brasil: artigo de revisão. *Unim. Cient. Montes Claros* v. 19, n.1 -, jan./jun. 2017.

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 pública*, v. 20, n. 1, p. 259-265, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: *Ministério da Saúde*; 2014.

BRASIL. Ministério Da Agricultura, Pecuária E Abastecimento.Coordenação De Fiscalização De Produtos Veterinários-Dfip-Sda – Cpv. *PROCESSO Nº 21000.042544/2016-94.NOTA TÉCNICA Nº 11/2016*.

BRASIL. Ministério da Saúde. Nota Técnica Conjunta nº01/2011-CGDT-CGLAB/DEVIT/SVS/MS. Esclarecimento sobre substituição do protocolo diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC). Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis. *Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública*. Brasília. Ministério da Saúde. 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde.Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento deCoordenação-Geral das Doenças Transmissíveis. *Cenários da leishmaniose visceral no Brasil*.São Paulo, 22 de abril de 2018.

CELESTE. B.J, ANGEL .S.O, CASTRO .L.G, GIDLUND .M, GOTO H. Leishmania infantum heat shock protein 83 for the serodiagnosis of tegumentary leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res*.Nov;37(11):1591-3. 2004 .

CELESTE. B.J, SANCHEZ. M., RAMOS-SANCHEZ. E, CASTRO .L.G, COSTA .F.A, GOTO. H. Recombinant Leishmania infantum heat shock protein 83 for the serodiagnosis of cutaneous, mucosal, and visceral leishmaniasis. *The american journal of tropical medicine and hygiene*. 2014; 90(5):860–865.

COELHO, E.A.; RAMÍREZ, L.; COSTA, M.A.; COELHO, V.T.; MARTINS, V.T.;CHÁVEZ-FUMAGALLI, M.A.; OLIVEIRA, D.M.; TAVARES, C.A.; BONAY, P.;NIETO, C.G.; ABÁNADES, D.R.; ALONSO, C.; SOTO, M. Specific serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis using Leishmania species ribosomal protein extracts. *Clin.Vaccine Immunol.*, v. 16, n. 12, p. 1774-80, 2009.

FARIA. A. R.; ANDRADE. H M. Diagnóstico de la Leishmaniasis Visceral Canina: grandes avances tecnológicos y baja aplicación práctica. *Rev Pan-Amaz Saude*, Ananindeua , v. 3, n. 2, p. 47-57, jun. 2012 .

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.

FONSECA, A.M. *Diagnóstico de leishmaniose visceral utilizando proteínas de leishmania infantum com função desconhecida*. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciência Biológicas.2013.

LOPES. J. V. ; MICHALSKY .E. M. et all. Seroprevalence and molecular characterization of Leishmania in dogs from an endemic area of zoonotic visceral leishmaniasis in Brazil. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*.v. 5, n.( 1) ,p.70-74; Jun. 2017.

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.

MOURA, L. D. *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.

NEGREIROS.A.P.S;MEDEIROS.J.S;NASCIMENTO.W.S;JÚNIOR  
NEGREIROS.C.E.M;SILVA.R.C. Leishmaniose Visceral Na Região Nordeste: Cenário Atual. 38º CONGRESSO BRASILEIRO DA ANCLIVEPA, 2017 - RECIFE/PE.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE - OPAS/OMS.Informe Epidemiológico Da Américas. Leishmanioses. Informe de Leishmanioses Nº 6 - Fevereiro, 2018.

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.

SILVA, K. R. et al. Scoring clinical signs can help diagnose canine visceral leishmaniasis in a highly endemic area in Brazil. *Mem Inst Osw Cruz*, v. 112, n. 1, p. 53-63, Jan 2017.

SILVA, K.M. *Prospecção de novas proteínas no diagnóstico da leishmaniose visceral canina*. 2015. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal)- Programa de Pós graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2015.

SILVA.R.B.S.MENDES.R.S.et all. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral canina na zona rural do semiárido paraibano e análise de técnicas de diagnóstico. *Pesq. Vet. Bras.*; Rio de Janeiro , v. 36, n. 7, p. 625-629, jul. 2016 .

SOUZA .G ; LIMA.G.H.M.A. Eutanásia canina como medida profilática para o controle da Leishmaniose Humana: Uma Abordagem Bioética. *Evidência*, v. 18, n. 1, p. 21-39,Joaçaba. jun. 2018.

SOUZA, B., REBOUÇAS, M., OLIVEIRA, I., OLIVEIRA, L., FREITAS, D., JULIÃO, F., ALCÂNTARA, A., PAULE, B., BAURROIN-MELO, S., FRANKE, C.Comparação entre diferentes preparados protéicos de Leishmania chagasi como antígenos para ELISA indireto. *Rev. Bras. de Saúde .Prod. América do Norte*. v.5,n.1,p.31-40,2004., 5, ago. 2005.

TRAVI . B. L., SILVA A. C, TORRES.F.D, MIRO.G. Canine visceral leishmaniasis: Diagnosis and management of the reservoir living among us. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. Nº12(1) janeiro .2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Leishmaniasis.. Disponível em:> <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>>. Acesso em : 18/08/2017

ZANETTE.M.F;LIMA.V.M.F;LAURENTI.M.D;ROSSI.C.N;VIDES.J.P;VIEIRA.R.F.C;IOND O.A.W;MARCONDES.M. Serological cross-reactivity of Trypanosoma cruzi, Ehrlichia canis, Toxoplasma gondii, Neospora caninum and Babesia canis to Leishmania infantum chagasi tests in dogs. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop., Uberaba* , v. 47, n. 1, p. 105-107, Feb. 2014.

ZUBEN. A. P. B.; DONALÍSIO.M. R. Dificuldades na execução das diretrizes do Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral em grandes municípios brasileiros. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 32(6):e00087415, jun, 2016.

#### **4. 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 acreditamos que devem ser realizados novos ensaios, com o mix contendo as proteínas KMP11+HSP83, que apresentou melhores resultados neste estudo, em outras regiões para avaliar seu desempenho frente a diferentes condições.

#### **5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ADLER,S ;THEODOR.O. Investigations on Mediterranean kala-azar. VI. Canine visceral leishmaniasis. *Proceedings of the royal Society of London*, v.110, n.768, p.402-412.1932. London.

BELO, V. S., STRUCHINER, C. J., WERNECK, G. L., BARBOSA, D. S., DE OLIVEIRA, R. B., NETO, R. G. T., & DA SILVA, E. S A systematic review and meta-analysis of the factors associated with Leishmania infantum infection in dogs in Brazil. *Vet. Paras.*, v. 195, n. 1, p. 1-13, 2013.

BENTE M, HARDER S, WIESGIGL M, HEUKESHOVEN J, GELHAUS C, KRAUSE E, CLOS J BRUCHHAUS I. Developmentally induced changes of the proteome in the protozoan parasite Leishmania donovani. *Proteomics*, 3: 1811-1829, 2003.

BIYANI N, SINGH AK, MANDAL S, CHAWLA B, MADHUBALA R. Differential expression of proteins in antimony-susceptible and resistant isolates of Leishmania donovani. *Mol & Bioch Parast.* 179: 91-99, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: *Ministério da Saúde*; 2014.

BRASIL. Ministério Da Agricultura, Pecuária E Abastecimento. Coordenação De Fiscalização De Produtos Veterinários-Dfip-Sda – Cpv. PROCESSO Nº 21000.042544/2016-94. NOTA TÉCNICA Nº 11/2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Nota Técnica Conjunta nº01/2011-CGDT-CGLAB/DEVIT/SVS/MS. Esclarecimento sobre substituição do protocolo diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC). Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis. Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública. Brasília. Ministério da Saúde. 2011.

BRASIL. Sistema Único de Saúde. Gerência de Vigilância de Zoonoses e Entomologia. Guia de Orientação para Vigilância de Leishmaniose Visceral Canina (LVC). Secretaria de Estado da Saúde. Estado de Santa Catarina. 24p. 2013.

CARVALHO, J. S. M. *Caracterização de frações antigênicas de Leishmania braziliensis e avaliação da resposta imune em pacientes com Leishmaniose Tegumentar. Dissertação (mestrado)*. Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde, 2004.

CARVALHO, L.P.; SOTO, M.; JERÔNIMO, S; DONDI, B.; BACELLAR, O.; LUZ, V.; ORGE, G.O.; ALONSO, C.; JESUS, A.R.; CARVALHO, E.M. Characterization of the immune response to Leishmania infantum recombinant antigens. *Microbes and Infection*. 5:7-12, 2003.

CELESTE B.J, ARROYO SANCHEZ M.C, RAMOS-SANCHEZ E.M, CASTRO L.G, LIMA COSTA F.A, GOTO H. Recombinant Leishmania infantum heat shock protein 83 for the serodiagnosis of cutaneous, mucosal, and visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*. 2014;90(5):860-5.

CELESTE. B.J, ANGEL .S.O, CASTRO .L.G, GIDLUND .M, GOTO H. Leishmania infantum heat shock protein 83 for the serodiagnosis of tegumentary leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res*. 2004 Nov;37(11):1591-3. Epub 2004 Oct 26.

CHAGAS, E.et.al. Leishmaniose visceral americana (nova entidade mórbida do homem na América do Sul ): relatório dos trabalhos realizados pela comissão encarregada do estudo da leishmaniose visceral americana em 1936. *Mem do Instit Osw Cruz*, Rio de Janeiro , v.32, p.321- 389, 1937.

COELHO, E.A.; RAMÍREZ, L.; COSTA, M.A.; COELHO, V.T.; MARTINS, V.T.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, M.A.; OLIVEIRA, D.M.; TAVARES, C.A.; BONAY, P.; NIETO, C.G.; ABÁNADES, D.R.; ALONSO, C.; SOTO, M. Specific serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis using Leishmania species ribosomal protein extracts. *Clin. Vaccine Immunol.*, v. 16, n. 12, p. 1774-80, 2009.

CONTI, R. V., et all. Visceral leishmaniasis epidemiologic evolution in timeframes, based on demographic changes and scientific achievements in Brazil. *J Vector Borne Dis*; 53(2): 99-104, Apr-Jun de 2016.

CONTRERAS .I.K. ; MACHADO. M.A ; ROCHA.C. O. J. M; OLIVEIRA. G.R; CARVALHO F. C.G. Sinais clínicos apresentados por cães positivos para leishmaniose visceral no município de Vassouras, Rio de Janeiro. *PubVet*. v.13, n.4, a302, p.1-6, Abr., 2019.

DANTAS-TORRES. F.; SOLANO-GALLEGO. L; BANETH. G.; RIBEIRO, V. M., PAIVA-CAVALCANTI. M. & OTRANTO, D. Canine leishmaniosis in the Old and New Worlds: unveiled similarities and differences. *Trend in Paras*, 28 (12):531-538.2012.



- FARAHMAND.M; NAHREVANIAN.H. Application of Recombinant Proteins for Serodiagnosis of Visceral Leishmaniasis in Humans and Dogs. *Iran Biomed J.* 2016 Jul;20(3):128-34. Epub 2016 Feb 17.
- FARIA. A. R.; ANDRADE. H M. Diagnóstico de la Leishmaniasis Visceral Canina: grandes avances tecnológicos y baja aplicación práctica. *Rev Pan-Amaz Saude*, Ananindeua , v. 3, n. 2, p. 47-57, jun. 2012 .
- FARIA.A. R . *Produção e avaliação de duas proteínas quiméricas - pq10 e pq20- quanto à imunogenicidade e uso em imunodiagnóstico para leishmaniose visceral canina. Tese (doutorado)*. Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. 2014.
- FEITOSA. M. M.; IKEDA, F. A., LUVIZOTTO, M. C. R. & PERRI, S. H. V. Clinical aspects of dogs with visceral leishmaniasis from Araçatuba-São Paulo State (Brazil). *Clín Vet*, 5(28):36-44.2000.
- FIALHO JÚNIOR. L. C. *Abordagem proteômica para identificação de fatores de virulência em duas cepas de Leishmania infantum.Tese (Doutorado)-Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas.Universidade Federal de Minas Gerais.* 2013
- GALLATI. E.A.B; NUNES .V.L.B.; RÊGO JR. F.A; OSHIRO .E.T;CHANG.M.R. Estudo de Flebotomíneos (Diptera:Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. *Ver de S Púb* 31: 378-390,1997
- GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Rev Bras. Epid.* São Paulo, v. 7, p. 338-349, 2004.
- KUMAR. A, SISODIA. B , MISRA. P, SUNDAR. S, SHASANY. A.K, DUBE A. "Proteome mapping of overexpressed membrane-enriched and cytosolic proteins in sodium antimony gluconate (SAG) resistant clinical isolate of Leishmania donovani". In: *Br.J.Clin.Pharmacol.* 70(4): 609–617, 2010.
- LOPES. J. V. ; MICHALSKY .E. M.; SILVA.F.O.L; LIMA.A.C.VMR; AVELAR.D.M; COSTA.A.A.J;SSILVA-FRANÇA.J.C; SILVA-REGINA.S; FORTES-DIAS.C.L; DIAS.E.S. Seroprevalence and molecular characterization of Leishmania in dogs from an endemic area of zoonotic visceral leishmaniasis in Brazil. Volume 5, Issue 1, Pages 70-74; June 2017.
- MARESCA .B , KOBAYASHI GS. Hsp70 in parasites: as an inducible protective protein and as an antigen. *Experientia* 50:1067–74, 1994.
- 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.
- MEYER, T. N.; SILVA, A. L. da. Resposta celular ao estresse. *Rev. Assoc. Med. Bras* São Paulo,v.45,n.2,p.181a188.Apr.1999.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA DAS DOENÇAS TRANSMISSÍVEIS. *Esclarecimentos sobre substituição do protocolo diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC).*Nota técnica conjunta nº1/2011.
- MONTALVO, A. M. et al. Diagnostico de la Leishmaniasis: de la observacion microscopica del parasito a la deteccion del ADN. *Rev Cub Med Trop*, Habana, v. 64, n. 2, p. 108- 131, 2012.

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

NEGREIROS.A.P.S.;MEDEIROS.J.S.;NASCIMENTO.W.S.;JÚNIOR  
NEGREIROS.C.E.M.;SILVA.R.C. *Leishmaniose Visceral Na Região Nordeste: Cenário Atual*. 38º CONGRESSO BRASILEIRO DA ANCLIVEPA, 2017 - RECIFE/PE.

NICOLLE,C ; COMTE.M.Reccherches sur Kala- azar enterpises à l´ Institut Pauster de Tunis,IV. Origine canine du Kala-azar. Arch de L´Inst Paust de Tun, v.3, p.59-62, 1908.

Oliveira, G. G. S., Magalhães, F. B., Teixeira, M. C. A., Pereira, A. M., Pinheiro, C. G. M., Santos, L. R., ... de Melo Neto, O. P. Characterization of Novel *Leishmania infantum* Recombinant Proteins Encoded by Genes from Five Families with Distinct Capacities for Serodiagnosis of Canine and Human Visceral Leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* n° 85;v.6;p. 1025–1034. dez. 2011.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE - OPAS/OMS.Informe Epidemiológico Da Américas. Leishmanioses. *Informe de Leishmanioses* N° 6 - Fevereiro, 2018.

PARROT, L; DONATIEN, A; LESTOQUARD, F. Sur le développement de la leishmaniose canine visceral chez phlebotomus major var. perniciosus Newstead. *Bull de la Soc de Ptho Exot* , Paris, v.23, n.7, p.724-726, 1930.

POLLA B S. Heat shock proteins in host-parasite interactions. *Immunol. Today* 12: A38–41, 1991.

Ramírez, L.; Iborra, S.;Oliveira, C.I.;Weber, M.;Abánades, D.R.;González, V. M;Corvo, L.;Nieto, C. G;Alonso, C; Bonay, P;Barral, A. M. P.Barral Netto, M. Soto, M; Las histonas de leishmania. *Gazeta Médica da Bahia*, v.3, p. 129-133, 2009.

SHONHAI A, MAIER A G, PRZYBORSKI JM, BLATCH GL. Intracellular protozoan parasites of humans: the role of molecular chaperones in development and pathogenesis. *Protein Pept Left*. 18: 143-157. 2011.

SILVA, K. R. et al. Scoring clinical signs can help diagnose canine visceral leishmaniasis in a highly endemic area in Brazil. *Mem Inst Osw Cruz*, v. 112, n. 1, p. 53-63, Jan 2017.

SILVA, K.M. *Prospecção de novas proteínas no diagnóstico da leishmaniose visceral canina*. 2015. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal)- Programa de Pós graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2015.

SILVA. S.T. P., MARQUES. L. D. F.V., LAMOUNIER.K.C.C., CASTRO.J. M., CABRERA .G.P. B. Leishmaniose visceral humana: reflexões éticas e jurídicas acerca do controle do reservatório canino no Brasil. *Rev. Bioética y Derecho*. no.39 Barcelona. 2017.

SILVA.R.B.S.MENDES.R.S.;SANTANA.V.L.;SOUZA.H.C;RAMOS.C.P.S.;SOUZA.A.P.;AN  
DRADE.P.P.;MEL0.M. A. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral canina na zona rural do semiárido paraibano e análise de técnicas de diagnóstico. *Pesq. Vet. Bras.*; Rio de Janeiro , v. 36, n. 7, p. 625-629, jul. 2016 .

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.

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. Coadministration of the Three Antigenic *Leishmania infantum* Poly (A) Binding Proteins as a DNA Vaccine Induces Protection against *Leishmania major* Infection in BALB/c Mice. *Plos Negl Trop Dis*, v 9, n. 5, maio 2015.

SOUZA, B., REBOUÇAS, M., OLIVEIRA, I., OLIVEIRA, L., FREITAS, D., JULIÃO, F., ALCÂNTARA, A., PAULE, B., BAURROIN-MELO, S., FRANKE, C.. Comparação entre diferentes preparados protéicos de *Leishmania chagasi* como antígenos para ELISA indireto. *Rev. Bras. de Saúde .Prod. América do Norte*. v.5,n.1,p.31-40,2004., 5, ago. 2005.

SRIVASTAVA P, MEHROTRA S, TIWARY P, CHAKRAVARTY J, SUNDAR S. Diagnosis of Indian visceral leishmaniasis by nucleic acid detection using PCR. *PLoS One* 6:e19304, 2011.

TAYLOR.M.A;COOP.R.L;WALL.R.L. *Paras vet* . 3.ed. Rio de Janeiro .Editora Guanabara Koogan.2010.

TERPE K. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72, 211-222, 2006.

TRAVI . B. L., SILVA A. C, TORRES.F.D, MIRO.G. Canine visceral leishmaniasis: Diagnosis and management of the reservoir living among us. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. N°12(1) janeiro .2018.

WEBER, M. Resposta imune humana contra histonas de *Leishmania*.Centro de pesquisas Gonzalo Moniz. *Fiocruz. Bahia*. Disponível em:< <http://limilip.blogspot.com/2010/02/vacinacao-com-histonas-de-leishmania.html>>. Acesso em: 31.05.2018.

WHO 2014. Leishmaniasis. *World Health Organization*, Geneva. 2014.

WILSON, T. M., MAGALHÃES, L. F., MEDEIROS, A. A. & FURQUIM, M. E. C. Alterações macroscópicas em cães sororreagentes para *Leishmania chagasi* e sua correlação com teste parasitológico. *Vet Not Vet News*, 18(2):20-25.2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *Leishmaniasis*.. Disponível em:> <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>>. Acesso em : 18/08/2017

ZANETTE.M.F;LIMA.V.M.F;LAURENTI.M.D;ROSSI.C.N;VIDES.J.P;VIEIRA.R.F.C;IOND O.A.W;MARCONDES.M. Serological cross-reactivity of *Trypanosoma cruzi*, *Ehrlichia canis*, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Babesia canis* to *Leishmania infantum chagasi* tests in dogs. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, Uberaba , v. 47, n. 1, p. 105-107, Feb. 2014.

ZUBEN. A. P. B.; DONALÍSIO.M. R. Dificuldades na execução das diretrizes do Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral em grandes municípios brasileiros. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 32(6):e00087415, jun, 2016.

## Apêndice 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.<sup>a</sup> Ivete L. de Mendonça  
Comitê de Ética em Experimentação Animal-UFPI  
Coordenadora

## Apêndice 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: