

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS

DOUTORADO EM PESQUISA CLÍNICA EM DOENÇAS INFECCIOSAS

FLÁVIA COELHO RIBEIRO

Avaliação das
Técnicas de ELISA e “Immunoblotting” (IgG e subclasses
específicas) no diagnóstico da infecção por *Leishmania*
(*Viannia*) *braziliensis* e *Leishmania (Leishmania) chagasi*
em cães

RIO DE JANEIRO

2009

AVALIAÇÃO DAS
TÉCNICAS DE ELISA E “IMMUNOBLOTTING” (IgG E
SUBCLASSES ESPECÍFICAS) NO DIAGNÓSTICO DA
INFECÇÃO POR *Leishmania (Viannia) braziliensis* E
Leishmania (Leishmania) chagasi EM CÃES

FLÁVIA COELHO RIBEIRO

Tese apresentada ao curso de
Pesquisa Clínica em Doenças
Infecciosas do Instituto de Pesquisa
Clínica Evandro Chagas para
obtenção do grau de Doutora em
Ciências.

Orientadores: Dr. Armando de
Oliveira Schubach e Tânia Maria
Valente Pacheco

Rio de Janeiro

2009

FLÁVIA COELHO RIBEIRO

Tese apresentada ao curso de Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas para obtenção do grau de Doutora em Ciências.

Orientadores: Dr. Armando de Oliveira Shubach
Dra. Tânia Maria Valente Pacheco

Aprovada em / / .

Banca examinadora

Dra. Fátima Conceição Silva (Presidente) (IOC/ Fiocruz)

Dr. Valmir Laurentino Silva (Revisor)(ENSP/ Fiocruz)

Dra. Leonor Laura Pinto Leon (IOC/ Fiocruz)

Dr. Fabiano Borges Figueiredo (IPEC / Fiocruz)

Dra. Verônica Figueiredo do Amaral (UFF)

Dedico esta tese à minha
mãe, ao meu esposo e à
minha tia Stella pela
dedicação e apoio.

AGRADECIMENTOS

À Deus, meu grande amor, pelo cuidado e provisão e por me fazer ver que sou mais que vencedora com o sEu poder dentro de mim;

Ao meu esposo Rubens pela dedicação, carinho e compreensão neste momento tão importante da minha vida;

À minha mãe Rute, padrasto Jorge, irmão Rodrigo e cunhada Ive pelo apoio e ajuda nas horas que mais precisei;

À minha Tia Stella pela confiança e dedicação durante toda a minha caminhada acadêmica, que foram essenciais para a chegada até aqui;

Aos meus padrinhos Silvio (*In memorian*) e Célia e primas por todo amor dedicado;

Aos meus queridos padrinhos de casamento pela amizade e carinho;

Aos meus queridos amigos da Comunidade Internacional da Zona Sul pelas orações e amizade;

Ao Dr. Armando Schubach, meu orientador que com seu jeito amigo e incentivador tanto me ensinou e fez crescer;

À Dra. Fátima Madeira a chefe que com seu jeito simples e tranquilo sempre me incentivou e tanto colaborou na minha pesquisa;

À Eliame Mouta-Confort pela confiança, amizade e auxílio na minha pesquisa;

Aos amigos e colegas que ainda trabalharam e os que passaram pelo Laboratório Vigileish em especial a Tatiana e as amigas da sorologia: Andreia, Fernanda, Jamyra, Elaine, Lílian, Marta, Patrícia, Leandra e Larissa pelo companheirismo e amizade;

Aos amigos Marcelo, Suzi e Dra. Marizete da coordenação de ensino pelo apoio e carinho;

Aos amigos do Latec pela compreensão e confiança nessa nova etapa da minha vida;

Ao Dr. Valmir Laurentino pela amizade desde o momento que cheguei na Fiocruz;

À Dra. Leonor Leon pela colaboração na análise dos resultados do “Immunoblotting”;

À Gersia pelo treinamento da técnica de imunoblotting;

À Dr. Bianca Pelegrinetti e a todos da Clínica Veterinária Gato Xadrez pelo apoio e colaboração na obtenção dos soros controles saudáveis da tese;

Ao Cláudio Abbud e à todos do Hospital Veterinário Jorge Vaitsman pelo carinho e ajuda para a obtenção de amostras de soros de cães com ehrlichiose;

Aos médicos veterinários e estudantes do laboratório de pesquisa clínica em dermatozoonoses de pequenos animais, pela colaboração na obtenção do grupo de soros controle de cães com esporotricose;

Aos pesquisadores Dr. Ivano, Dr. Eugênio e Dra. Marize do laboratório de Microbiologia/ INCQS, pela colaboração nas análises das bandas no programa Gel Compar, pelo carinho e receptibilidade;

"Confia no Deus eterno de todo o seu coração e não se apóie na sua própria inteligência".

Prov. 3:5

Ribeiro, F. C. **Avaliação das Técnicas de ELISA e “Immunoblotting” (IgG e subclasses específicas) no diagnóstico da infecção por *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Leishmania (Leishmania) chagasi* em cães.** Rio de Janeiro, 2009 73 f. Tese [Doutorado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.

RESUMO

As leishmanioses são enfermidades infecciosas de importância em Saúde Pública. A identificação e retirada de cães infectados é uma medida de controle controversa. A reação de imunofluorescência, utilizada na rotina de diagnóstico, apresenta limitações quanto à sensibilidade e especificidade. Tais limitações podem implicar na manutenção de animais infectados nas áreas endêmicas ou na indicação de eutanásias desnecessárias. Por apresentarem elevadas sensibilidade e especificidade, as técnicas de ELISA e “immunoblotting” deveriam ser melhor avaliadas. A utilização de antígeno homólogo e a detecção de subclasses de IgG têm sido relatadas como alternativas para a obtenção de melhores resultados no diagnóstico sorológico. Este estudo teve como objetivo avaliar os parâmetros de acurácia de ELISA IgG e subclasses em soros de cães infectados por *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Leishmania (Leishmania) chagasi* (sintomáticos e assintomáticos) e identificar e caracterizar, por “immunoblotting”, bandas de *L. (V.) braziliensis* e de *L. (L.) chagasi* mais frequentemente reconhecidas por IgG e subclasses nesses soros. Foram estudadas 162 amostras de soro, sendo 34 de cães com leishmaniose tegumentar americana (LTA), 37 com leishmaniose visceral americana (LVA) (sintomáticos e assintomáticos), 4 com infecção mista (*Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Leishmania (Leishmania) chagasi*) e 87 amostras de soros controle de cães residentes fora de área endêmica de leishmanioses, sendo 17 cães saudáveis e 70 com doenças que necessitam diagnóstico diferencial com LTA (esporotricose 35) ou com LVA (ehrlichiose 35). As médias de densidade óptica (D.O.) obtidas para detecção de IgG nos soros de cães com LTA ou com LVA foram estatisticamente mais elevadas com os respectivos antígenos homólogos, havendo um equilíbrio da resposta humoral nos animais com infecção mista. Entretanto, a técnica não permitiu discriminar entre um caso individual de LTA e de LVA. A média de D.O. nos cães com LVA sintomáticos foi mais elevada que nos assintomáticos. IgG1 não revelou resultados promissores, com baixas médias de D.O. e reduzido reconhecimento antigênico nos cães infectados por *Leishmania* sp., independente da presença de sinais clínicos. As frequências de detecção de IgG e IgG2, tanto por ELISA quanto por “immunoblotting” foram semelhantes. Não foi observada reatividade cruzada com *L. (L.) chagasi* no “immunoblotting”. Esses resultados sugerem que a utilização de antígenos homólogos para a detecção de IgG por ELISA elevaram a acurácia do teste e que em áreas com sobreposição de transmissão de *L. (V.) braziliensis* e de *L. (L.) chagasi*, seria indicado empregar o ELISA com ambos os antígenos. Além disso, o emprego do antígeno de *L. (L.) chagasi* elevou a especificidade dos testes de ELISA e de “immunoblotting”, permitindo a discriminação entre casos de leishmaniose e controles.

Palavras-chave: 1. Leishmaniose Tegumentar Americana, 2. Leishmaniose Visceral Americana, 3. IgG subclasses, 4. Diagnóstico, 5. “Immunoblotting”, 6. Cão.

Ribeiro, F. C. **Evaluation of ELISA and immunoblotting (specific IgG and IgG subclasses) in the diagnosis of infection by *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* in dogs.** Rio de Janeiro, 2009 73 f. Tese [Doutorado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a disease of public health importance. The identification and culling of infected dogs is a controversial control measure. Immunofluorescence used for the routine diagnosis of leishmaniasis presents limited sensitivity and specificity. These limitations may imply the persistence of infected animals in endemic areas or the indication of unnecessary euthanasia. In view of their high sensitivity and specificity, ELISA and immunoblotting are techniques that should be better investigated. The use of homologous antigen and the detection of IgG subclasses have been reported as alternatives to improve the serological diagnosis. The objective of this study was to evaluate accuracy parameters of IgG and IgG subclass ELISA using sera of dogs infected with *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* (symptomatic and asymptomatic), and to identify and characterize by immunoblotting the *L. (V.) braziliensis* and *L. (L.) chagasi* bands most frequently recognized by IgG and IgG subclasses in these sera. A total of 162 serum samples were analyzed, with 34 from dogs with American cutaneous leishmaniasis (ACL), 37 with American visceral leishmaniasis (AVL) (symptomatic and asymptomatic), 4 with mixed infection (ACL and AVL), and 87 control samples obtained from dogs living outside a leishmaniasis-endemic area, including 17 healthy animals and 70 with diseases that require a differential diagnosis with ACL (sporotrichosis, n=35) or AVL (ehrlichiosis, n=35). Using the respective homologous antigens, mean optical densities for the detection of IgG in sera of dogs with ACL and AVL were significantly higher, with the observation of a balance in the humoral response in animals with mixed infection. However, the technique did not permit to discriminate between an individual case of ACL and AVL. Mean optical density was higher in symptomatic dogs with AVL compared to asymptomatic animals. IgG1 did not show promising results, with low mean optical densities and reduced antigen recognition in animals infected with *Leishmania* sp., irrespective of the presence of clinical signs. ELISA and immunoblotting presented similar frequencies of detection of IgG and IgG2. No cross-reaction with *L. (L.) chagasi* was observed upon immunoblotting. These results suggest that the use of homologous antigens for the detection of IgG by ELISA increases the accuracy of the test, and that the use of ELISA with both antigens is indicated in areas with overlapping transmission of *L. (V.) braziliensis* and *L. (L.) chagasi*. In addition, the use of *L. (L.) chagasi* antigen increased the specificity of ELISA and immunoblotting, permitting the discrimination between leishmaniasis cases and controls.

Keywords: 1.American tegumentary leishmaniasis; 2.American visceral leishmaniasis; 3.Subclass IgG; 4.Diagnosis; 5.“Immunoblotting”; 6.dogsdog.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1. ASPECTOS GERAIS DAS LEISHMANIOSES:	17
1.2- LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA (LTA) - LEISHMANIA (VIANNIA) BRAZILIENSIS.....	17
1.3- LEISHMANIOSE VISCERAL AMERICANA (LVA) - LEISHMANIA (L.) CHAGASI	18
1.4- DIAGNÓSTICO DAS LEISHMANIOSES	20
1.5. SUBCLASSES DE IGG.....	22
2. JUSTIFICATIVA.....	24
3. OBJETIVOS.....	25
3. 1. OBJETIVO GERAL	25
3. 2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
4. MÉTODOS	26
4.1. GRUPOS DE ESTUDO	26
4.2. ANTÍGENOS PARA OS ENSAIOS	27
4.3. ELISA.....	28
4.4. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE).....	28
4.5. WESTERN BLOTTING (“IMMUNOBLOTTING”)	28
4.6. ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	29
4.7. ARTIGOS.....	29
5- OUTROS RESULTADOS.....	32
5.1- ELISA (SÍNTESE DOS RESULTADOS OBTIDOS NOS ARTIGOS).....	32
5.2- “IMMUNOBLOTTING”	33
6. DISCUSSÃO.....	41
7. CONCLUSÕES	45
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

1. INTRODUÇÃO

1.1.Aspectos gerais das leishmanioses:

As leishmanioses são doenças infecciosas provocadas por protozoários do gênero *Leishmania*, que apresentam ampla distribuição mundial, estando presentes em países das Américas, Ásia, África, Oriente Médio e Europa, especialmente nas proximidades do mediterrâneo (KLAUS; FRANKENBURG, 1999, CALDAS et al. 2001). Afetam principalmente o ser humano e o cão e se apresentam como duas doenças distintas: a leishmaniose visceral, conhecida por calazar e a leishmaniose tegumentar (cutânea e mucocutânea). No Velho Mundo a leishmaniose visceral é causada principalmente por *Leishmania (Leishmania) infantum* e a leishmaniose tegumentar, também conhecida como úlcera de Delhi, por *Leishmania (Leishmania) major* e *Leishmania (Leishmania) tropica* (KLAUS; FRANKENBURG, 1999). No novo Mundo, especialmente no Brasil, a leishmaniose visceral americana (LVA) é causada por *Leishmania (Leishmania) chagasi* (sin. *L. (L.) infantum*), e a leishmaniose tegumentar americana (LTA) é causada por diferentes espécies, sendo as mais importantes *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007). Nas Américas, a transmissão ocorre através da picada de flebotomíneos do gênero *Lutzomyia*, ocasião em que *Leishmania* sp. invade macrófagos presentes nos locais. A LVA e a LTA vêm incidindo em áreas urbanas e peri-urbanas de várias cidades brasileiras, onde a pobreza, o saneamento precário e a desnutrição são comuns. Nos grandes centros urbanos os principais fatores responsáveis pelo aumento da incidência são o desflorestamento, a migração e a urbanização (MARZOCHI et al. 1994, MARZOCHI; MARZOCHI, 1994, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

1.2- Leishmaniose tegumentar americana (LTA) - *Leishmania (Viannia) braziliensis*

Originalmente descrita como uma zoonose de animais silvestres, associada secundariamente à ocupação de encostas e à aglomeração das áreas semi-urbanizadas na periferia dos centros urbanos (FALQUETO et al. 2003, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007), é distribuída em todas as regiões brasileiras, apresentando-se com um maior número de casos na Região Norte e menor na Região Sul. No Estado do Rio de Janeiro, existem relatos de transmissão da doença desde o início do século XX (ARAGÃO, 1922; NERY-GUIMARÃES, 1955 *apud* DE SOUZA et al. 2003) e a *Lutzomyia intermedia* é considerada o principal vetor (GONÇALVES et al. 2002, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007). Atualmente, a maior incidência de LTA é observada nos municípios do litoral sul (BARBOSA et al. 1999), onde se verifica a sobreposição de áreas de transmissão de LTA e de LVA.

Na região sudeste, a LTA tem como principal agente etiológico *L. (V.) braziliensis*, espécie dermatotrópica que pode infectar cães de forma assintomática ou evoluir para doença. É caracterizada pela presença de alopecia, hiperplasia de nódulos linfáticos e, principalmente, por lesão granulomatosa, crônica, única, ulcerada, com bordas elevadas em moldura, localizadas frequentemente em junções mucocutâneas e em áreas desprovidas de

pêlo (PADILLA et al. 2002, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007). As formas cutâneas devem ser diferenciadas das úlceras traumáticas, piodermites, neoplasias, tuberculose cutâneas e, principalmente, da esporotricose, a qual, além de apresentar quadro clínico similar ao da LTA, também vêm ocorrendo de forma endêmica no Estado do Rio de Janeiro (SCHUBACH et al. 2006, DOS SANTOS et al. 2007). A esporotricose é causada pelo fungo *Sporothrix schenckii*, que apesar de apresentar semelhanças clínicas e epidemiológicas com a LTA, é caracterizada por boa resposta terapêutica e bom prognóstico.

Cães são altamente suscetíveis a *L. (V.) braziliensis*. Nas áreas endêmicas é relativamente comum a presença de cães infectados (Falqueto et al., 1986; Marzochi & Marzochi, 1994). Em ambientes domiciliares na Região Sudeste, FALQUETO *et al.* (1986) observaram uma nítida relação entre a presença de cães infectados e o surgimento de novos casos humanos da doença. BARBOSA *et al.* (1999) observaram uma soro-positividade canina para LTA nas áreas estudadas, sugerindo a existência de infecção ativa, apoiando a hipótese do cão doméstico como possível reservatório da LTA. Segundo SILVA *et al.* (2001b) o cão é um importante reservatório do parasita e animais silvestres têm importância secundária na manutenção da endemia. PADILLA *et al.* (2002) sugerem que cães podem não ser os principais reservatórios, mas hospedeiros altamente suscetíveis, que possivelmente adquirem a infecção de humanos ou de reservatórios silvestres, servindo como indicadores da ocorrência de LTA humana nas casas.

Estudos prévios de REITHINGUER; DAVIES (1999) verificaram a existência de poucas evidências da atuação do cão como reservatório de transmissão doméstica de LTA, mas que sua presença no domicílio seja um fator de risco. Entretanto, REITHINGER *et al.* (2003) consideraram o cão um importante reservatório de LTA, pois verificaram que quando infectado, pode ser potencialmente infeccioso para o vetor, apresentando importante papel na manutenção da transmissão da doença. De acordo com o MINISTÉRIO DA SAÚDE (2007), apesar de existirem numerosos registros de infecção em animais domésticos, não há evidências que comprovem o papel destes animais como reservatórios de *L. (V.) braziliensis*. Por isso, não são recomendadas medidas de controle de animais domésticos com LTA, sendo a eutanásia indicada apenas quando a doença conduzir o animal ao sofrimento.

1.3- Leishmaniose Visceral Americana (LVA) - Leishmania (L.) chagasi

De acordo com o MINISTÉRIO DA SAÚDE (2006), a LVA ocorre em praticamente todas as regiões brasileiras, sendo o Nordeste a área mais acometida. A ocorrência na Região Sul do Brasil foi atualmente identificada, através de um estudo na Cidade de São Borja/RS que identificou 7 casos de cães com LVA autóctones. Em dois destes animais houve isolamento e caracterização de *L. (L.) chagasi*¹. A No município do Rio de Janeiro, a LVA surgiu no final da década de 70, nas áreas periurbanas da zona norte da cidade, especialmente na encosta do maciço da Pedra Branca (MARZOCHI et al. 1985). A transmissão realizada por *Lutzomyia longipalpis*, vetor que infesta facilmente áreas domiciliares e peridomiciliares, principalmente devido à sua adaptação a elevadas

¹ Comunicação Pessoal: Dr. Fabiano Borges Figueiredo- LAPCLIN/ DERMZOO/ IPEC/ FIOCRUZ.

temperaturas e a baixa umidade relativa (MARZOCHI et al. 1994, SILVA et al, 2001a). Apesar do predomínio de *Lutzomyia longipalpis* em altitudes acima de 100m e de *Lutzomyia intermedia* abaixo de 100m (MARZOCHI et al. 1994), tanto a LVA quanto a LTA, podem ocorrer simultaneamente em um mesmo foco (GRIMALDI et al. 1989; MADEIRA et al. 2006a; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006, 2007).

A Leishmaniose Visceral, também conhecida como Calazar, se apresenta como um crescente problema de saúde pública, pois frequentemente é fatal em humanos, quando não tratados. No continente americano, a doença tem como agente etiológico *L. (L.) chagasi*, parasita viscerotrópico, intracelular de monócitos e macrófagos de órgãos linfóides. A leishmaniose visceral canina é de evolução lenta e clinicamente pode apresentar comprometimento sistêmico, caquexia, anemia, hepatoesplenomeglia e alterações dermatológicas, além de onicogribose, conjutivite, queratoconjutivite ou mesmo permanecer sem alteração clínica (MARZOCHI et al. 1985, FRASER et al. 1991, SCHALLING et al. 2002, ALMEIDA et. al. 2005). Histologicamente caracteriza-se pela abundância de macrófagos repletos de formas amastigotas em vários sistemas do organismo. O diagnóstico diferencial inclui ehrlichiose, linfossarcoma, mieloma, seborréia, pênfigo e infecções fúngicas sistêmicas e ainda outras moléstias causadoras de proliferação do reticuloendotélio (JONES et al. 2000).

Em ambientes urbanos, o principal reservatório de LVA é o cão (*Canis familiaris*) e a infecção neste foi evidenciada pela primeira vez no Brasil por PEDROSO, 1913 *apud* BARBOSA *et al.* (1999). O parasitismo da pele sã e de vísceras pode ser intenso desde o início da infecção, fato que pode ser relevante na epidemiologia do Calazar (MARZOCHI et al. 1985, DEPLAZES et al. 1995, BARBOSA et al. 1999).

No Brasil os programas epidemiológicos e profiláticos da LVA envolvem o tratamento de casos humanos, o controle do inseto vetor e a remoção do cão infectado soropositivo, a qual é realizada desde o início da década de 60 em vários estados da federação (PALATINIK-DE-SOUSA et al. 2001). De acordo com PARANHOS-SILVA *et al.* (1996) e FALQUETO *et al.* (2003), o controle dos reservatórios (eutanásia de cães), juntamente com a detecção e tratamento de casos humanos, e controle do vetor com inseticida, reduziu a infecção humana e a morbidade drasticamente. Entretanto, existem muitas controvérsias a respeito da utilização do método de imunofluorescência indireta como critério de eliminação de cães, pois este apresenta reduzida sensibilidade e especificidade, muitas vezes incapaz de identificar cães recentemente infectados, frequentemente assintomáticos, acarretando na manutenção desses animais na área (DE PAULA et al. 2003). SAVANI et al. (2003) verificaram que apenas a sorologia não é suficiente para concluir o diagnóstico, devendo estar associada aos dados clínicos, epidemiológicos e parasitológicos. Um outro problema é a existência de um longo intervalo entre o sorodiagnóstico e a retirada do animal da área, fato que reduz a eficiência do controle (BRAGA et al. 1998). Alguns autores sugerem que, para se obter uma redução significativa na transmissão da doença e um controle efetivo, seriam requeridos uma alta proporção de cães retirados por ano, a utilização de um teste diagnóstico altamente sensível e uma rápida retirada dos cães (DYE, 1996, COURTNAY et al. 2002).

Um importante diagnóstico diferencial de LVA é a ehrlichiose canina, uma doença causada pela rickettsia *Ehrlichia canis*, a qual parasita inicialmente vacúolos de monócitos e granulócitos (RIKIHISIA, 1991, WOODY; HOSKINS, 1991), causando uma infecção sistêmica, potencialmente fatal. Esta enfermidade é caracterizada por anormalidades clínicas e hematológicas, similares as observadas em LVA, incluindo febre,

linfadenopatia, anorexia, letargia e trombocitopenia (MCDADE, 1990, MANZILLO et al. 2006, MOREIRA et al. 2003). *Ehrlichia canis* apresenta uma vasta distribuição geográfica e ocorre principalmente nas áreas tropicais e subtropicais. No Rio de Janeiro, a ehrlichiose é uma das causas mais comuns de atendimentos dos clínicos veterinários, principalmente por ter como vetor o carrapato, apresentando uma prevalência média de 26,8% em cães trombocitopênicos (MACIEIRA et al. 2005). Mesmo com as similaridades clínicas e epidemiológicas à LVA, não há indicação de eutanásia para cães infectados com *Ehrlichia canis* como medida de controle para a saúde pública. Assim, os testes utilizados para o diagnóstico de LVA devem ser capazes de diferenciar as duas infecções (SANCHEZ VISCONTI; TESOURO DIEZ, 2001).

1.4- Diagnóstico das Leishmanioses

O diagnóstico definitivo de leishmaniose requer a demonstração do parasita, seja por histopatologia, "imprint" ou pela cultura de amostras teciduais. Estes métodos comprovam a presença do parasita, mas apresentam sensibilidade variável e por vezes, a necessidade de procedimentos invasivos para obtenção das amostras. Métodos moleculares como a reação em cadeia da polimerase (PCR) têm sido desenvolvidos para a identificação das leishmanioses, devido principalmente a sua elevada sensibilidade e especificidade (CORTES et al. 2004). Entretanto, a aplicação desses métodos na rotina é limitada por não permitir a utilização em larga escala, custo elevado e ainda, ter a necessidade de profissionais especializados.

Devido às limitações desses métodos, a detecção de anticorpos, por meio de testes sorológicos constituem uma alternativa tanto para diagnóstico quanto para a realização de estudos epidemiológicos (KAR, 1995). Esses métodos se baseiam na reação antígeno-anticorpo, detectando os anticorpos presentes no soro. Dentre as técnicas utilizadas, estão a imunofluorescência indireta (IFI), o "enzyme-linked immunosorbent assay" (ELISA) e o "western blot" ("immunoblotting").

A IFI é a metodologia realizada com maior frequência no diagnóstico das leishmanioses, tanto humana quanto canina. No Brasil, a maioria dos laboratórios utiliza o "Kit" de imunofluorescência produzido por Biomanguinhos/FIOCRUZ, o qual é considerado, pelo Ministério da Saúde, o método confirmatório de referência. Apesar de ser a técnica de diagnóstico mais utilizada, a IFI apresenta limitações, principalmente devido à reduzida sensibilidade (DE PAULA et al. 2003).

O ELISA, outro método frequentemente utilizado para o diagnóstico das leishmanioses e com maior reprodutibilidade que a IFI, pode ser adaptada à utilização de antígenos purificados ou de antígenos definidos (REED et al. 1990) visto que uma das grandes responsáveis pela reatividade cruzada ocorrida nos testes sorológicos convencionais é a utilização de frações antigênicas solúveis (MANCIANTI et al. 1995). Apesar dessas vantagens, a técnica apresenta limitações, devido à ocorrência de reatividade cruzada e reduzida sensibilidade no período latente (MANCIANTI et al. 1995; COURTNEY et al. 2002). Segundo PADILLA *et al.* (2002), esse método pode ser utilizado como uma ferramenta auxiliar no diagnóstico. Segundo CALDAS *et al.* (2001), os resultados sorológicos apresentaram discordância em relação a achados clínicos e parasitológicos e até mesmo entre si, quando se utilizaram duas técnicas diferentes.

O “immunoblotting” é uma técnica altamente sensível e específica. Segundo BERRAHAL *et al.* (1996) e ISAZA (1997) é sensível para detectar a infecção assintomática, além de permitir a observação de possíveis alterações do perfil das bandas após o tratamento. A técnica pode ser realizada tanto com extratos solúveis de antígenos quanto com proteínas de membrana purificadas (GONÇALVES *et al.* 2002). É um método mais sensível e capaz de detectar infecção mais precocemente, quando comparado à IFI e ao ELISA (AISA *et al.* 1998). O “immunoblotting” permite a obtenção de informações detalhadas sobre a estrutura do parasita, sendo útil para a padronização de procedimentos diagnósticos sensíveis e específicos (GONÇALVES *et al.* 2002). Tal procedimento poderia ser uma alternativa para a realização do diagnóstico diferencial com outras enfermidades, já que possibilita identificar a presença de determinantes antigênicos comuns entre antígenos, frequentemente responsáveis pela reatividade cruzada observada na IFI e no ELISA. Adicionalmente, o “immunoblotting” pode ser usado para confirmar resultados obtidos no ELISA (DA COSTA *et al.* 1996). As frações de proteínas antigênicas reconhecidas por amostras de soro pela técnica de “immunoblotting” variam com as diferentes cepas de parasitas (JAFFE *et al.* 1990). Segundo GONÇALVES *et al.* (2002), a banda de 63Kda, foi a principal banda a ser reconhecida, identificada como uma glicoproteína (gp 63), que pertence à membrana de superfície da forma promastigota, proteína esta comum a todas as espécies de *Leishmania* sp. e que pode estar envolvida no desenvolvimento do estágio infectivo.

1.4.1- Diagnóstico de LTA

Para o diagnóstico parasitológico da LTA humana, são necessárias biopsias de fragmentos de lesão para visualização de formas amastigotas ou isolamento parasitológico de *L. (V.) braziliensis* em cultura. A imunofluorescência é a principal técnica sorológica, mas apenas ocasionalmente as amostras são reatoras, pois a concentração de anticorpos é reduzida na maioria dos casos de LTA (MARZOCHI; MARZOCHI, 1994). Segundo OLIVEIRA-NETO *et al.* (1988), a avaliação por IFI mostrou uma significativa correlação entre o título de anticorpos e a presença de lesões cutâneas ativas em cães, sendo mais altos os títulos observados nos casos de lesões múltiplas. Resultados similares foram obtidos por MENDONÇA *et al.* (1988), utilizando soros humanos. Estes autores também observaram relação entre tempo de evolução e título de anticorpos. Em pacientes com lesões recentes é frequente a negatividade sorológica (GONTIJO; DE CARVALHO, 2003).

A utilização de métodos sorológicos para o diagnóstico de LTA é controversa, devido aos baixos níveis de anticorpos séricos e a ocorrência de reações cruzadas observadas principalmente nas técnicas imunoenzimáticas, devido a sua sensibilidade mais elevada (MANCIANTI *et al.* 1995).

Utilizando o “immunoblotting”, GONÇALVES *et al.* (2002), verificaram uma sensibilidade de 84,9% e uma especificidade de 91,1%, ao considerarem o reconhecimento das bandas de *L. (V.) braziliensis* mais frequentemente reconhecidas por amostras de soro de humanos com LTA.

1.4.2- Diagnóstico de LVA

Para o exame parasitológico da LVA, utilizam-se fragmentos de pele íntegra, de vísceras e de medula óssea para visualização de formas amastigotas ou isolamento de *L. (L.) chagasi* em cultura. Frequentemente, são observadas abundantes formas amastigotas do parasita na pele íntegra de cães infectados, sintomáticos e assintomáticos (VEXANAT et al. 1994). Entretanto, também devido às limitações do exame parasitológico, a técnica recomendada pelo ministério da saúde como confirmatória é a IFI, utilizada no diagnóstico desde 1964. Para elevar a sensibilidade do método, o soro sanguíneo tem substituído o eluato de sangue colhido em papel filtro (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). Embora cães com LVA apresentem elevada concentração de anticorpos (MARZOCHI et al. 1985), a IFI realizada com eluato sanguíneo em papel de filtro, apresenta baixa sensibilidade quando comparada ao ELISA (BRAGA et al. 1998). Títulos de anticorpos acima de 1:40 são usados como critério de indicação de eutanásia. Segundo SILVA et al. (2005), cães com títulos inferiores a 1:80, podem ser assintomáticos e mesmo assim, capazes de infectarem os vetores. Por constituírem a maioria da população canina, tais animais podem ser considerados importantes fontes de infecção.

Comparado ao teste de IFI, o ELISA representa maior sensibilidade, fato importante para o controle do Calazar. De acordo com BRAGA et al. (1998), somente 35,4% dos cães infectados, detectados por ELISA, estariam sendo detectados por IFI e eliminados, indicando que possivelmente 64,5% dos cães infectados, estariam permanecendo na área propagando a infecção.

O "immunoblotting" foi considerado por SILVA et al. (2005), o método mais adequado para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC), pois permite a detecção precoce de animais infectados, além de identificar os animais que possivelmente desenvolverão a doença. Utilizando frações antigênicas de *L. (L.) chagasi*, EVANS et al. (1989) observaram que na LVA canina múltiplas bandas de antígenos foram reconhecidas pelo "immunoblotting" sendo 116 KDa, 70 KDa e de 26 KDa as mais frequentes. SILVA et al. (2005), observaram que cães infectados por *L. (L.) chagasi*, reconheceram principalmente os peptídeos de 29 e 32 kDa, sendo a banda de 68,5 kDa reconhecida somente por soros de cães sintomáticos. Tais autores sugeriram que o reconhecimento desse peptídeo possa ser utilizado como parâmetro para eliminação de cães em áreas endêmicas. Esses autores também verificaram o reconhecimento dos peptídeos de 29 e 32 kDa em 26% de cães não reatores na imunofluorescência, evidenciando sua importância para o diagnóstico precoce. AISA et al. (1998), ao considerarem as bandas antigênicas de 12, 14, 28, 30 e 46 KDa de *L. infantum* com soro de cães com Calazar, verificaram uma sensibilidade de 95,8% e uma especificidade de 100%.

1.5. Resposta imunológica no modelo canino

Na maioria de espécies de mamíferos, a IgG apresenta um número variado de subclasses. Em cães, as subclasses têm sido definidas de IgG1 a IgG4, que constituem marcadores sorológicos aplicáveis ao diagnóstico (TIZARD et al. 1998). Essas subclasses

são indicadores da resposta Th1 e Th2, estando Th1 associada à resistência com produção de IgG2 e Th2 à susceptibilidade com produção de IgG1 (PINELLI et al. 1994, DAY; MAZZA, 1995, DEPLAZES et al. 1995, DAY, 1996, BOURDOISEAU et al. 1997, PINELLI, et al. 2000). Além disso, as subclasses, cuja expressão depende da natureza e do estímulo antigênico, estão envolvidas em diferentes atividades biológicas, apresentando grande importância para o estudo de doenças infecciosas e desenvolvimento de estratégias de controle epidemiológico (SOUZA et al. 2005).

Na leishmaniose visceral tem sido caracterizado o padrão Th2, evidenciado pela marcada redução da imunidade celular e pela ativação policlonal de células B. De acordo com SOLANO-GALLEGO *et al.* (2001) a IgG1 apresenta-se em níveis mais elevados apenas na presença da doença. Segundo FERNANDEZ-PEREZ *et al.* (2003), o não reconhecimento de bandas por IgG1 indicam um bom prognóstico, podendo-se relacionar o nível de subclasses com a resposta terapêutica, sugerindo que os títulos específicos de IgG1 e IgG2 sejam indicadores mais seguros para o *status* da doença do que IgG (SOLANO-GALLEGO et al. 2001, HARRUS et al. 2001).

Em relação a LTA é mais complicado estabelecer um padrão de resposta imune devido à complexidade da enfermidade, observando-se um padrão misto de resposta Th1 e Th2, da qual o aumento da resposta é relacionado à severidade dos sinais clínicos e à concentração de parasitas nas lesões (PIRMEZ et al. 1993, SOUSA et al. 2005, BRACHELENTE et al. 2005). PEDRAS *et al.* (2003) utilizando soros de pacientes humanos com LTA, observaram um considerável aumento da especificidade quando comparado a IgG, concluindo-se que a detecção de subclasses constitui uma alternativa para o aumento da eficiência do diagnóstico sorológico de LTA.

2. JUSTIFICATIVA

Considerando-se que os testes mais utilizados no diagnóstico de rotina das leishmanioses, IFI e ELISA, possuem limitações quanto à sensibilidade e especificidade, além de não serem capazes de diferenciar a infecção por *L. (L.) chagasi* de *L. (V.) braziliensis*, tornou-se necessário a avaliação de antígenos homólogos e heterólogos e da utilização de subclasses de IgG para elevar o desempenho desses testes.

A utilização de antígeno homólogo para o diagnóstico das leishmanioses tem sido relatada por vários autores, como um procedimento adequado para a obtenção de melhores resultados. A detecção de subclasses de IgG tem sido considerada uma alternativa para a obtenção de resultados mais específicos, especialmente relacionados à presença ou ausência de sinais clínicos da doença. E ainda, ELISA e “immunoblotting” são métodos com elevada sensibilidade e especificidade que poderiam superar as limitações da IFI.

Assim, fez-se necessário este estudo, a fim de se avaliar esses parâmetros empregando os métodos de ELISA e “immunoblotting” para a detecção de IgG e subclasses com antígenos homólogos e heterólogos.

3. OBJETIVOS

3. 1. Objetivo Geral

Avaliar a acurácia do ELISA IgG total e subclasses IgG1 e IgG2 nos soros de cães infectados por *L. (V.) braziliensis* ou por *L. (L.) chagasi* (sintomáticos e assintomáticos) e identificar e caracterizar por “immunoblotting” antígenos de promastigotas de *L. (V.) braziliensis* e de *L. (L.) chagasi* reconhecidas por IgG total e subclasses.

3. 2. Objetivos Específicos

1. Avaliar a acurácia do ELISA IgG total e subclasses IgG1 e IgG2 no diagnóstico da LTA e LVA caninas;
2. Avaliar a utilidade das técnicas de ELISA IgG total e subclasses IgG1 e IgG2 no diagnóstico de infecção assintomática por *L. (L.) chagasi* em cães com sorologia IgG total positiva para *Leishmania* (IFI e ELISA);
3. Identificar e caracterizar, por “immunoblotting”, bandas antigênicas de *L. (V.) braziliensis* e de *L. (L.) chagasi* reconhecidas por IgG total e subclasses IgG1 e IgG2 presentes nos soros de cães infectados;
4. Comparar a reatividade dos soros com o ELISA e o “Immunoblotting” utilizando antígenos de *L. (V.) braziliensis* e de *L. (L.) chagasi*;
5. Verificar a aplicabilidade do “immunoblotting” como teste confirmatório e específico para o diagnóstico das leishmanioses caninas.

4. MÉTODOS

4.1. Grupos de estudo

O estudo foi composto de 162 amostras de soro de conveniência, obtidas de cães domésticos (*Canis familiaris*) cuidadosamente caracterizadas e definidas, classificadas em seis grupos. A obtenção das amostras foi aprovada no Comitê de ética da FIOCRUZ para o uso de animais (CEUA/FIOCRUZ/P-0276-05).

- 1- **Grupo de LTA (n= 34)** – Cães com LTA, residentes em áreas endêmicas do estado do Rio de Janeiro, atendidos no laboratório de pesquisa clínica em dermatozoonoses de pequenos animais. Todos os cães desse grupo apresentavam lesões cutâneas por *L. (V.) braziliensis* confirmada pelo isolamento em cultura e identificação da espécie pelo método de caracterização por isoenzimas (MADEIRA et al. 2006b). As amostras desse grupo apresentaram resultado negativo no exame micológico.
- 2- **Grupo de LVA (n=37)** – Cães de áreas endêmicas no município do Rio de Janeiro que participaram do inquérito sorológico para LVA e apresentaram resultado positivo pela IFI ($\geq 1:80$). Esses animais foram recolhidos para a eutanásia, de acordo como o programa municipal de controle de zoonoses. Em todos esses animais, a infecção por *Leishmania (L.) chagasi* foi confirmada por isolamento em cultura de diferentes vísceras e pele, seguida por caracterização da espécie por isoenzimas (MADEIRA et al. 2006b). Esse grupo foi classificado em dois subgrupos: animais sintomáticos (n=25), que apresentavam dois ou mais sinais clínicos de LVA* e assintomáticos (n=12).
- 3- **Grupo de infecção mista (n=4)**- Cães de áreas endêmicas do município do Rio de Janeiro, que participaram do inquérito sorológico para LVA e apresentaram resultado positivo na IFI ($\geq 1:80$). Estes animais foram recolhidos para a eutanásia e submetidos aos mesmos exames que o grupo de LVA. Nesses cães, foi confirmada a co-infecção por *L. (L.) chagasi* e por *L. (V.) braziliensis*, por isolamento em cultura de diferentes vísceras e pele e caracterização de ambas as espécies por isoenzimas (MADEIRA et al. 2006a).
- 4- **Grupo controle saudável (n=17)** – Cães residentes fora de área endêmica de Leishmaniose e submetidos regularmente a exames clínicos profiláticos. Esses animais não apresentavam nenhuma alteração clínica nem lesão cutânea, além de

apresentarem parâmetros hematológicos e bioquímicos (proteína, globulina, AST (TGO), ALT (TGP), albumina, uréia e creatinina) normais, e ainda resultados de exame parasitológico negativo para ehrlichiose canina.

- 5- **Grupo Controle Esporotricose (n=35)** – Cães com esporotricose, residentes em áreas não endêmicas para leishmaniose do município do Rio de Janeiro. Esses animais apresentavam lesões ulceradas de pele e foram atendidos no laboratório de pesquisa clínica em dermatozoonoses de pequenos animais, sendo submetidos aos mesmos exames do grupo de LTA. Neste grupo, o diagnóstico foi estabelecido pelo isolamento do fungo *Sporothrix schenckii* em cultura, nenhuma forma amastigota foi detectada pela análise histopatológica, e a cultura para *Leishmania* sp. foi negativa em todos animais.
- 6- **Grupo Controle Ehrlichiose (n= 35)** – Cães residentes fora de área endêmica de leishmaniose, infectados por *Ehrlichia canis*, apresentando dois ou mais sinais clínicos compatíveis com LVA*. Nesse grupo, a infecção por *E. canis* foi diagnosticada pelo exame parasitológico direto de esfregaço sanguíneo.

* Os sinais clínicos compatíveis com LVA observados no grupo de Ehrlichiose em ordem de frequência foram: ulceração de pele, descamação, adenites, emagrecimento, alopecia, hepatomegalia, esplenomegalia, onicogribose, anemia, febre, apatia e ceratoconjutivite.

4.2. Antígenos para os ensaios

Frações parcialmente solúveis, obtidas de formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903) e *L. (L.) chagasi* (MHOM/BR/74/PP75) durante a fase estacionária de crescimento, de acordo com o protocolo de BARROSO-FREITAS (2006), foram usadas como antígeno. A fase estacionária de crescimento de *L. (V.) braziliensis* foi identificada por BARROSO-FREITAS (2006) no quarto dia e a de *L. (L.) chagasi*, a partir da curva de crescimento realizada neste estudo, no quinto dia de cultivo. Os parasitas foram lavados três vezes em “phosphate-buffered saline” (PBS), pH 7,2 (5300 g, 10 min, 4°C) e ressuspensos em tampão de lise contendo inibidores de proteases. Essa mistura foi submetida aos ciclos de congelamento (gelo seco/ etanol) e descongelamento (Banho-maria 60°) e ultrassom (50/60 Hz Transsonic 310, ELMA®) para a ruptura completa dos parasitas. Após a centrifugação por 10.700 g por 10 min a 4°C, o sobrenadante foi separado e a concentração protéica foi dosada pelo método Folin Lowry (“micro-Lowry total protein determination kit, Peterson’s modification; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA”).

4.3. ELISA

O ELISA para a detecção de IgG, IgG1 e IgG2 anti- *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) chagasi* foi realizado de acordo com o método de VOLLER *et al.* (1976). Microplacas de 96 poços (Nunc Polysorp surface, USA) foram sensibilizadas por 18h a 4°C com 100µL de antígeno/ poço. Os antígenos foram diluídos em tampão carbonato-bicarbonato 0.06M, pH 9,6. O excesso de antígeno foi descartado e a placa lavada quatro vezes com PBS / 0,05% tween 20 (v/v). As amostras de soro foram diluídas em 1% de leite desnatado (Molico-Nestlé®) em PBS/0,05% tween 20 (v/v), adicionadas em duplicata e incubadas à 37°C/ 45 min em câmara úmida. As placas foram lavadas quatro vezes e incubadas à 37°C/ 45 min em câmara úmida com anti-IgG (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), IgG1 e IgG2 (Bethyl Laboratories, Inc., Montgomery, TX, USA) conjugados com peroxidase. Após quatro lavagens, a reação foi desenvolvida adicionando-se 100µL/ poço de solução de revelação (0,01g de “orthophenyldiamine” (OPD) e 10 µL de peróxido de hidrogênio 30% em tampão citrato, pH 5,0) e incubando-se por 10 min a temperatura ambiente na ausência de luz. A reação foi paralisada com 50 µL/ poço de ácido sulfúrico 1N (H₂SO₄).

A densidade ótica (D.O.) foi determinada por um leitor de ELISA (TECAN, GÊNIO/ Magellan) usando filtro de referência de 492nm e filtro diferencial de 620nm. O ponto de corte foi determinado pelo programa estatístico Medcalc, o qual considera o ponto de maior sensibilidade e especificidade na curva “Receiver Operating Characteristic” (ROC) de cada reação, incluindo todas as amostras analisadas.

As concentrações de antígeno, soro, assim como as de anti-IgG, IgG1 e IgG2 estão especificadas na metodologia de cada artigo apresentado como parte dos resultados obtidos na tese.

4.4. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)

Frações parcialmente solúveis de antígenos promastigotas de *L. (V.) braziliensis* e de *L. (L.) chagasi* (225µg/ gel), diluídas em igual volume de tampão de amostra com β-mercaptoetanol e aquecidas a 100°C por 3 min, foram separadas por eletroforese em gel de 10% poliacrilamida com lauril sulfato de sódio/ SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970), realizada de acordo com o protocolo adaptado de STUDIER (1973). O padrão de peso molecular empregado apresenta pesos entre 220 a 10kDa (Invitrogen). A eletroforese foi desenvolvida em 35mA com voltagem constante por 5 horas.

4.5. Western blotting (“Immunoblotting”)

Antígenos previamente separados por eletroforese foram transferidos para a membrana de nitrocelulose (Amersham Bioscience 0,45µm), com o auxílio de corrente elétrica (TOWBIN *et al.* 1979) em tampão de transferência no sistema de transferência de proteínas (Amersham Biosciences) at 180mA com voltagem constante, for 3 horas e meia. A eficiência da transferência de antígenos de gel para a membrana de nitrocelulose foi confirmada por meio da coloração com o corante vermelho de Ponceau por 5 min. Após a transferência, foram cortadas tiras de 0,5 cm de largura.

As tiras de nitrocelulose foram bloqueadas com 5% de leite desnatado (Molico-Nestlé®) em PBS Tween 20 (0.5%) pH 7.2 por 2 horas em temperatura ambiente e posteriormente lavadas por 30 min com tampão de lavagem (PBS pH 7.2 com tween 20 (0.05%).

Para detectar o reconhecimento antigênico, as tiras foram incubadas por 2 horas com as amostras de soro dos diferentes grupos, diluídas a 1:200 em PBS tween 20 (0.05%) pH 7.2. As tiras foram lavadas cinco vezes em tampão de lavagem e incubadas por 90 min com imunoglobulinas anti-IgG conjugado com peroxidase (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), anti-IgG1 e anti-IgG2 de cão (Bethyl Laboratories, Inc., Montgomery, TX, USA) na concentração de 1:1.000. Após cinco lavagens de 15 min, as tiras foram incubadas com a solução de revelação (0.015 g 3,3 “diaminobenzidine” (DAB) and 40µL 30% de peróxido de hidrogênio em 60ml de tampão citrato, pH 5.0) por 3 min. A reação foi paralisada com água destilada. Todas as incubações e lavagens ocorreram sob agitação e em temperatura ambiente.

4.6. Análise dos resultados

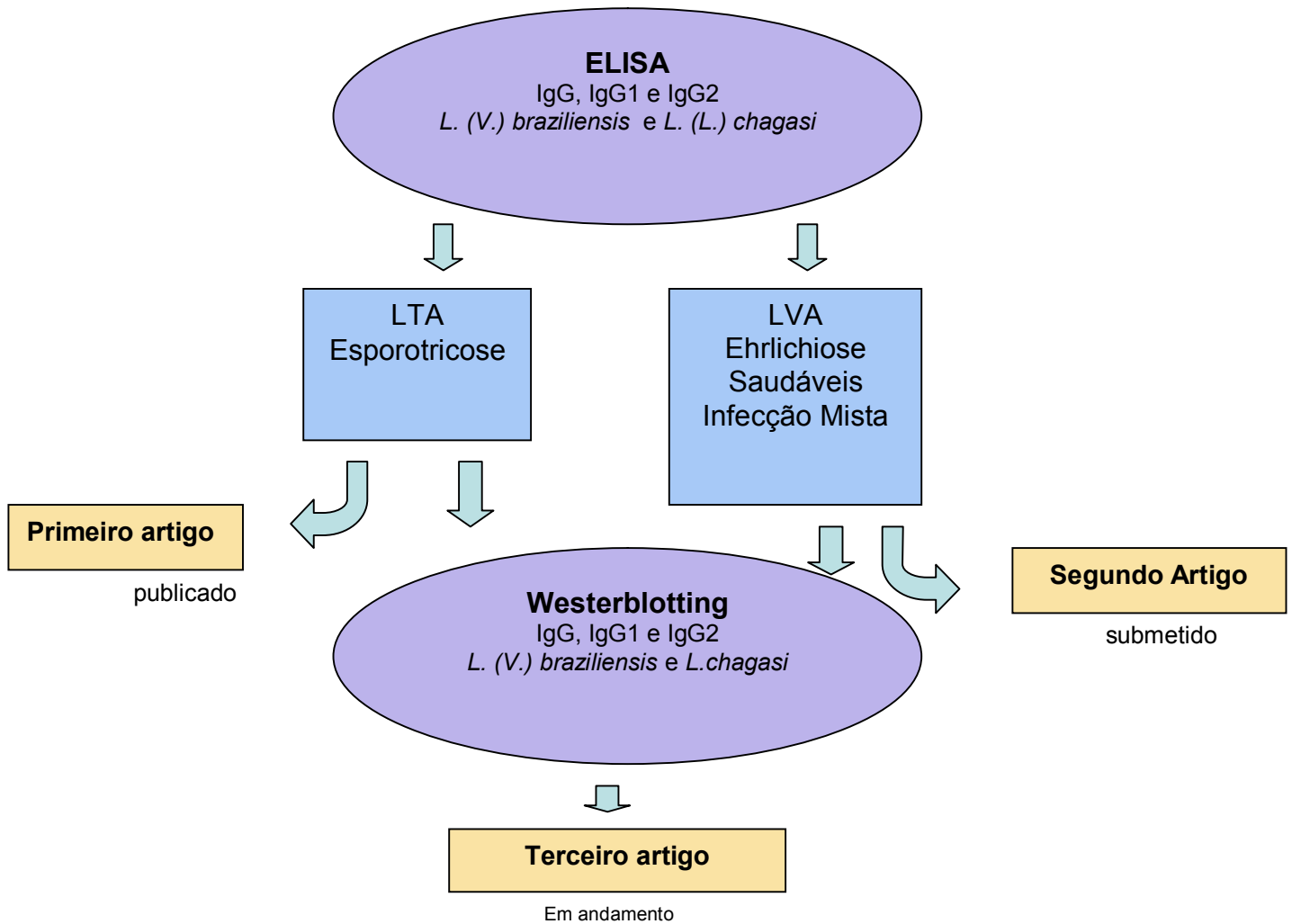
O ponto de corte para o ELISA (“cut-off”) foi determinado a partir da curva ROC, calculada com o programa estatístico Medcalc. O teste de *Spearman* não paramétrico foi usado para a comparação da posição e variação nas densidades óticas e suas eventuais correlações. As médias de D.O. foram comparadas por teste *t* de *Student* usando o pacote estatístico SPSS versão 11.0. As diferenças com *p-valor* < 0,05 foram consideradas significativas.

Os resultados de “immunoblotting” foram avaliados segundo uma análise descritiva pela presença ou ausência de reatividade e o peso molecular em kDa determinado pela comparação com o marcador de peso molecular. Os pesos moleculares das bandas antigênicas reconhecidas nesta técnica foram calculados pelo programa de análise de bandas ImageMaster®VDS Software version 2.0 (Pharmacia Biotech) e incluídos no banco de dados do pacote estatístico SPSS versão 11.0 para ser calculada a frequência das bandas em cada grupo.

4.7. Artigos

A metodologia empregada neste estudo e os resultados obtidos serão apresentados no formato de artigos científicos publicados e submetidos para publicação. Nesta seção encontram-se dois artigos com os resultados relacionados ao projeto, sendo um já publicado e outro submetido. Os resultados que comporão o terceiro artigo encontram-se no item **Outros resultados**, pois algumas análises ainda estão em andamento.

4.7.1. Fluxograma das publicações:



4.7.2. Primeiro artigo: "Use of ELISA employing *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* antigens for the detection of IgG and IgG1 and IgG2 subclasses in the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis in dogs".

Artigo publicado no periódico *Veterinary Parasitology*. 148: 200-206, 2007.

Este foi o primeiro estudo de subclasses de IgG para o diagnóstico de LTA canina empregando antígeno de *Leishmania (Viannia) braziliensis* publicado na literatura. O principal objetivo foi comparar o desempenho no diagnóstico da LTA canina empregando-se antígenos homólogos (*L. (V.) braziliensis*) e heterólogos (*L. (L.) chagasi*) para a detecção de IgG e suas subclasses IgG1 e IgG2. Foram estudados um grupo de animais infectados por *L. (V.) braziliensis* e um grupo controle constituído por animais residentes fora de área endêmica infectados por *Sporothrix schenckii* para verificar a especificidade do teste, tendo-se em vista a semelhança clínica e epidemiológica entre as duas doenças, além da ocorrência de reatividade cruzada em testes sorológicos.

Os resultados obtidos respondem parcialmente o objetivo nº 1 desta tese.

4.7.3. Segundo artigo: " Use of ELISA employing homologous and heterologous antigens for the detection of IgG and subclasses (IgG1 and IgG2) in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis

Artigo submetido ao periódico *Veterinary Immunology and Immunopathology* em 12 de Março de 2009.

O objetivo desse estudo foi semelhante ao anterior, pois também comparou o emprego antígenos homólogos e heterólogos para a detecção de IgG e suas subclasses IgG1 e IgG2, sendo que nesse caso para o diagnóstico da LVA canina. Foram estudados: um grupo de animais infectados por *L. (L.) chagasi* (sintomáticos e assintomáticos); outro de infecção mista (co-infecção *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) chagasi*) e um grupo controle de animais residentes fora de área endêmica infectados por *Ehrlichia canis*. Assim como no estudo anterior, existem muitas semelhanças clínicas e epidemiológicas entre a LVA e ehrlichiose canina.

Os resultados obtidos respondem os objetivos de nº 1 e nº 2 desta tese.

5- OUTROS RESULTADOS

5.1- ELISA (Síntese dos resultados obtidos nos artigos)

5.1.2. Comparação das médias de Densidades óticas obtidas

No grupo de LTA (primeiro artigo), as médias e os desvios-padrão das D.O. obtidas para a detecção de IgG, IgG1 e IgG2 foram: 0.761 ± 0.329 , 0.161 ± 0.141 e 0.968 ± 0.521 para antígeno de *L. (V.) braziliensis* (homólogo) e 0.348 ± 0.218 , 0.137 ± 0.066 e 0.795 ± 0.463 para antígeno de *L. (L.) chagasi*. No grupo de LVA, as médias de D.O. e os desvios-padrão para a detecção de IgG, IgG1 e IgG2 foram respectivamente: 0.811 ± 0.142 ; 0.124 ± 0.061 e 1.429 ± 0.426 , 2 quando empregado antígeno de *L. (V.) braziliensis* e 1.728 ± 0.426 ; 0.239 ± 0.253 e 1.177 ± 0.337 com antígeno homólogo (*L. (L.) chagasi*). A diferenças das médias de D.O. para a detecção de IgG foram estatisticamente mais elevadas quando empregado o antígeno homólogo nos dois grupos (p -valor= 0,00) (Gráfico 1).

No grupo de infecção mista, as médias de D.O. para a detecção de IgG se mantiveram estatisticamente semelhantes (p -valor= 0,790) quando ambos os antígenos foram empregados: $0,886 \pm 0,342$ (*L.braziliensis*) e $0,957 \pm 0,423$ (*L. (L.) chagasi*)(Gráfico 1).

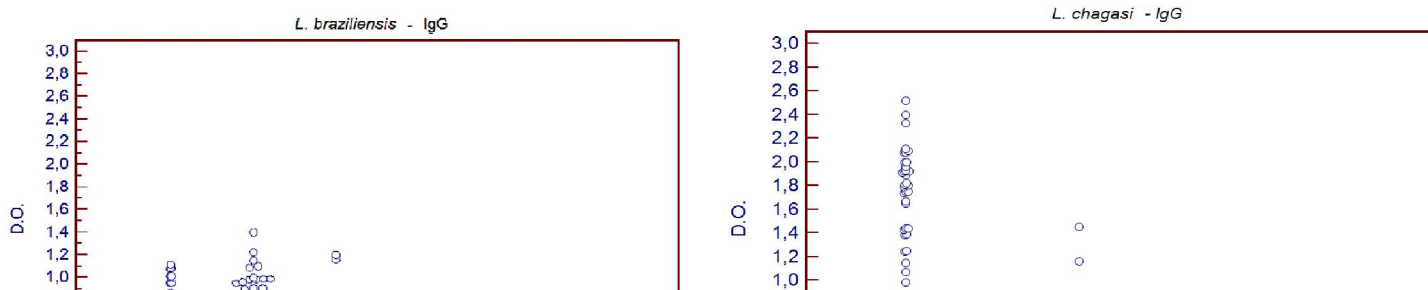
Nos grupos controles (saudáveis, esporotricose e ehrlichiose) foram obtidas baixas médias de D.O. tanto para IgG quanto para suas subclasses IgG1 e IgG2 com ambos os antígenos.

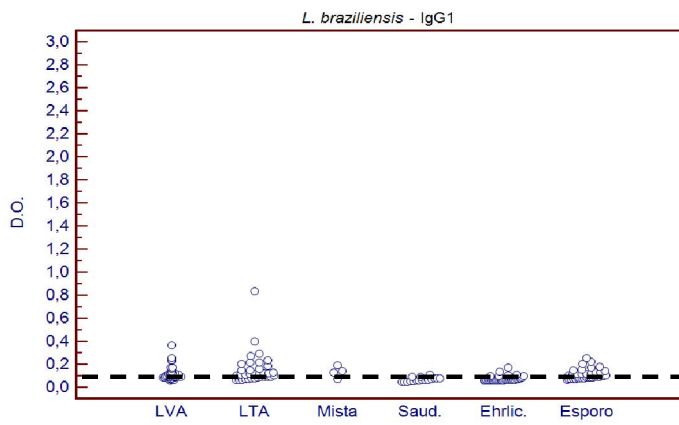
Observou-se elevada e significativa correlação de Spearman entre os valores de D.O. para a detecção de IgG e IgG2 tanto nos grupos de LTA (primeiro artigo) quanto de LVA (segundo artigo).

5.1.3. Determinação do ponto de corte (Cut-off)

Os valores de “cut-off”, determinados pela curva Roc, permitiram a melhor discriminação entre os grupos infectados por *Leishmania* sp. (LVA, LTA e Mista) e controles (saudáveis, ehrlichiose e esporotricose) para a detecção de IgG, IgG1 e IgG2 respectivamente foram: 0,21; 0,08; 0,35; 0,240; 0,08; 0,19. O valor do “cut-off” nesse caso foi diferente dos encontrados nos artigos, pois foram calculados com todas as amostras estudadas.

Gráfico 1: Gráficos de pontos referentes às densidades óticas (D.O.) obtidas por IgG, IgG1 e IgG2 das amostras dos grupos estudados, empregando antígeno de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) chagasi*.





6.2- Western blotting

6.1- Reconhecimento antigênico

5.2- "Immunoblotting"

5.2.1-Reconhecimento antigênico

As amostras de soro de todos os grupos foram testadas para a detecção de IgG e suas subclasses com antígenos homólogos e heterólogos. A reatividade dos soros de todos os grupos analisados mostrou uma variação de 315 a 10kDa na detecção de IgG e IgG2 e de 70 a 16 kDa na detecção de IgG1 de bandas de antígenos de *L. (V.) braziliensis*. Empregando antígenos de *L. (L.) chagasi*, a variação foi de 115 a 5 kDa para IgG e IgG2 e de 75 a 13kDa para a detecção de IgG1. As bandas mais reconhecidas por IgG e subclasses dos grupos de soros estudados podem ser visualizadas nas tabelas 1, 2 e 3.

Não foi verificada diferença visível na reatividade entre IgG e IgG2 (figura 1 e 3), o que não ocorreu para a detecção de IgG1 (figura 2), presente nos soros dos grupos de estudo, cujo reconhecimento de bandas ocorreu em menor frequência. Além disso, os grupos de LVA e LTA praticamente não diferiram quanto ao reconhecimento antigênico tanto por IgG quanto por IgG2, embora a intensidade das reações tenha sido menor no grupo de LTA (Figura 1 e 3). E ainda, IgG e suas subclasses de cães do grupo de LVA sintomáticos e assintomáticos reconheceram as mesmas bandas antigênicas tanto de *L. (V.) braziliensis* quanto de *L. (L.) chagasi*.

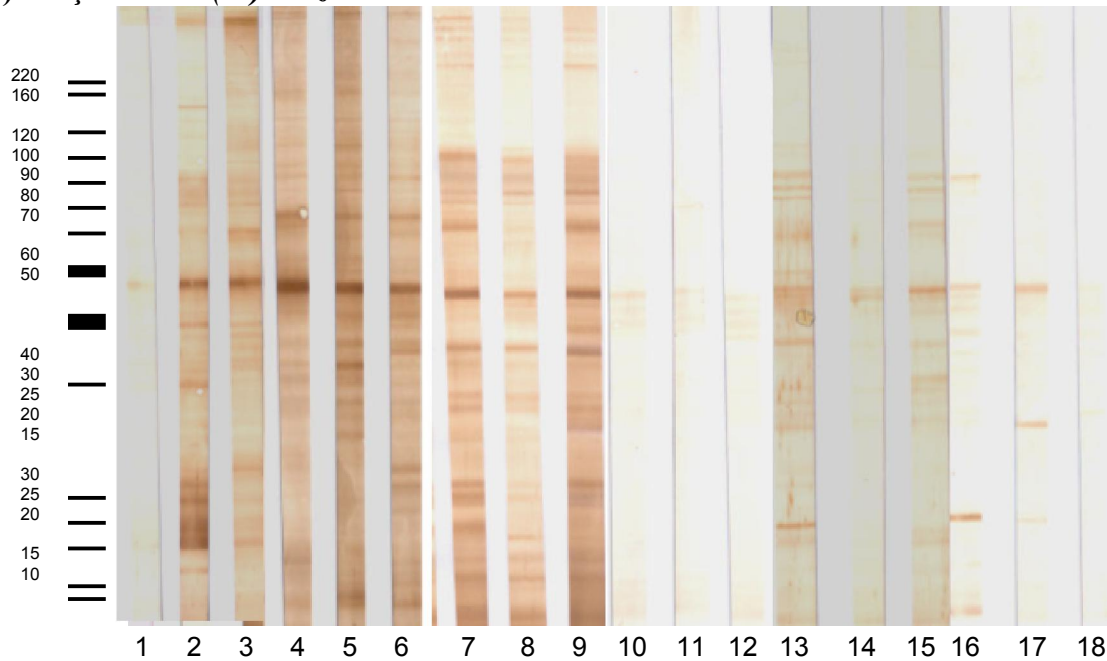
As frações antigênicas específicas de *L. (V.) braziliensis*, mais frequentemente reconhecidas por IgG e por IgG2 de cães com LVA e LTA e de maior intensidade (Figura 1 e 2) foram principalmente as pertencentes ao de intervalos de 24 a 32kDa (tabela 1 e 3). Neste intervalo, pelo menos duas bandas foram reconhecidas por todas as amostras de soro do grupo de LVA e por 91,2% do grupo de LTA, sendo reconhecidas também por IgG1. Apenas IgG e IgG2 de cães infectados por *Leishmania* sp. reconheceram as frações de 62 a 65kDa deste antígeno. O reconhecimento inespecífico foi identificado em diferentes bandas, em especial com soros de esporotricose (Tabela 1 e 3) e as frações mais reconhecidas por IgG e subclasses dos controles foram as de 60kDa e 56kDa (Tabela 1, 2 e 3).

Dentre as frações antigênicas de *L. (L.) chagasi*, reconhecidas com maior frequência por IgG, IgG1 e IgG2, presente nos soros do grupo de LVA e LTA também estão incluídas as bandas pertencentes ao intervalo de 26 a 30kDa (Tabela 1, 2 e 3), sendo verificada a reatividade para a detecção de IgG e IgG2 em todas as amostras de LVA e em 82,3% de LTA. Outra banda importante foi a de 16kDa, pois foi reconhecida exclusivamente por amostras de soro de cães infectados por *Leishmania* sp. As amostras dos grupos controle reconheceram inespecificamente poucas bandas, variando de 0,7 a 5,7% de frequência, nos grupos de animais com esporotricose e ehrlichiose, mas no grupo de cães saudáveis não foi observado o reconhecimento inespecífico (Tabela 2).

A ocorrência de reconhecimento inespecífico para detecção de IgG e IgG2 de soros controle, especialmente de amostras de soro de cães infectados por *S. schenckii* empregando antígeno de *L. (V.) braziliensis* foi frequente (figura 1A e 3A), entretanto, empregando-se antígenos de *L. (L.) chagasi*, esse reconhecimento inespecífico não foi verificado (Figura 1B e 2B).

Figura 1- “Immunoblotting” com frações antigênicas de *L. (V.) braziliensis* (A) e *L. (L.) chagasi*(B) para a detecção de IgG presente nas amostras de soros: linhas 1-3 (soro controle negativo, controle positivo de LTA, controle positivo LVA); linhas 4-6 (soros de LVA); linhas 7-9 (soros de LTA); linhas 10-12 (soros de animais saudáveis); linhas 13-15 (soros de esporotricose); linhas 16-18 (soros de ehrlichiose).

A) Frações de *L. (V.) braziliensis*:



B) Frações de *L. (L.) chagasi*:

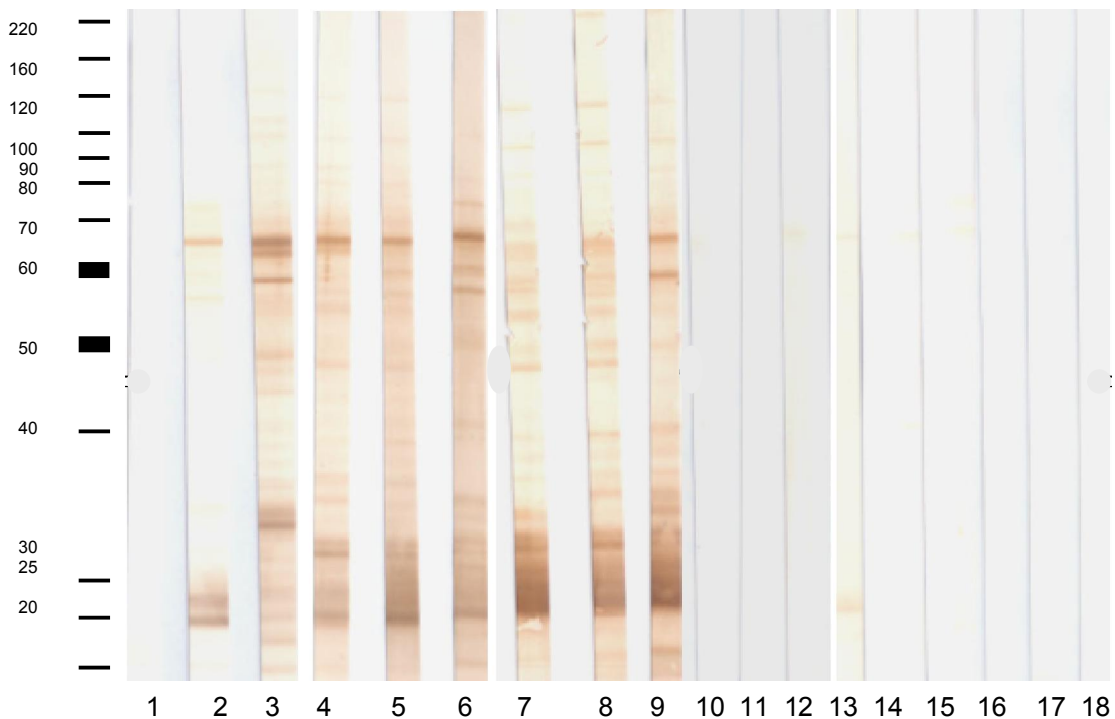


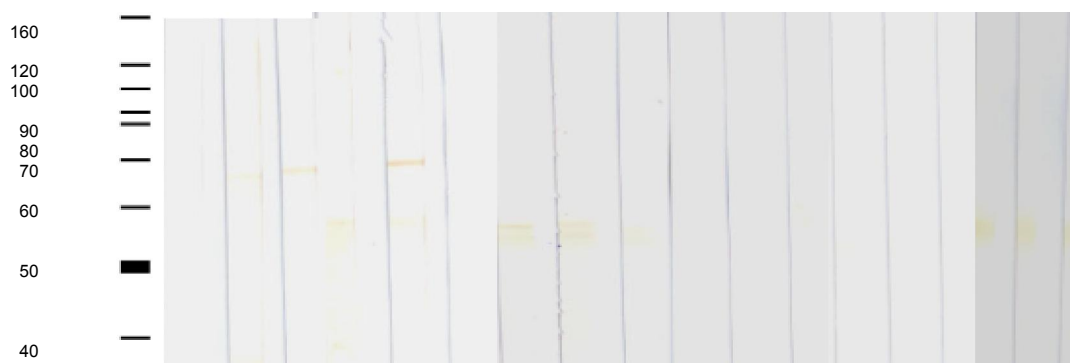
Tabela 1- Bandas mais frequentemente reconhecidas por IgG dos grupos estudados em “Western blot” com antígeno de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) chagasi*.

Figura 2- “Western blot” com frações antigênicas de *L. (V.) braziliensis* (A) e *L. (L.) chagasi*(B) para a detecção de IgG1 presente nas amostras de soros: linhas 1-3 (soro

Extrato Antigênico	Bandas (kDa)	LVA (S+A) (n=38)	LTA (n=32)	Saudáveis (n=17)	Esporotricose (n=35)	Ehrlichiose (n=3)	% de reconhecimento								
<i>L. (V.) braziliensis</i>	145	55,3	53,1	5,9	11,4	2,9									
	72	47,4	3,1	5,9	0,0	8,6									
	70	78,9	62,5	5,9	22,2	14,3									
	62 a 65	36,8	21,9	0,0	0,0	0,0									
	60	50	90,6	41,2	22,2	62,9									
	56	65,8	28,1	17,6	52,8	17,1									
	52	50	65,6	5,9	5,6	14,3									
	48 a 50	89,5	40,6	0,0	50	20									
	47	71,1	34,4	0,0	52,8	20									
	42 a 43	60,5	56,3	5,9	8,6	5,7									
	36	44,7	43,8	0,0	0,0	0,0									
	31 a 32	71,1	71,9	0,0	11,1	0,0									
	25 a 29	86,8	84,4	5,9	25	11,4									
	24	63,2	43,8	5,9	63,9	31,4									
	16	57,9	28,1	0,0	0,0	0,0									
<i>L. (L.) chagasi</i>	75	21,1	53,1	0,0	0,0	0,0									
	70	60,5	31,3	17,6	0,0	0,0									
	62 a 65	81,6	62,5	0,0	2,9	14,3									
	60	21,1	56,3	5,9	0,0	0,0									
	58	71,1	56,3	0,0	0,0	0,0									
	55	73,7	12,5	0,0	0,0	0,0									
	53	36,8	6,3	0,0	0,0	0,0									
	50	10,5	3,1	5,9	0,0	0,0									
	46 a 48	65,8	18,8	0,0	0,0	0,0									
	45	47,4	3,1	0,0	0,0	0,0									
	36	55,3	37,5	0,0	0,0	0,0									
	31	71,1	18,8	0,0	0,0	0,0									
	26 a 30	61,8	48,4	0,0	0,0	1,4									
	24	73,7	3,1	0,0	0,0	2,9									
	16	10,5	3,1	0,0	0,0	0,0									

controle negativo, controle positivo de LTA, controle positivo LVA); linhas 4-6 (soros de LVA); linhas 7-9 (soros de LTA); linhas 10-12 (soros de animais saudáveis); linhas 13-15 (soros de esporotricose); linhas 16-18 (soros de ehrlichiose).

A) Frações de *L. (V.) braziliensis*:



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18

B) Frações de *L. (L.) chagasi*:

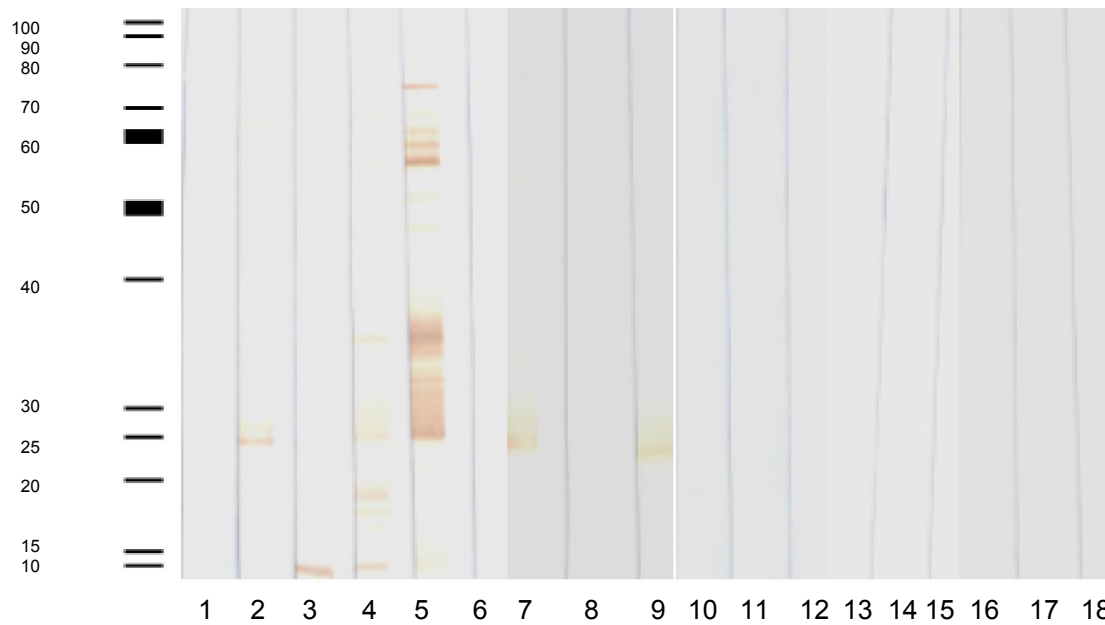
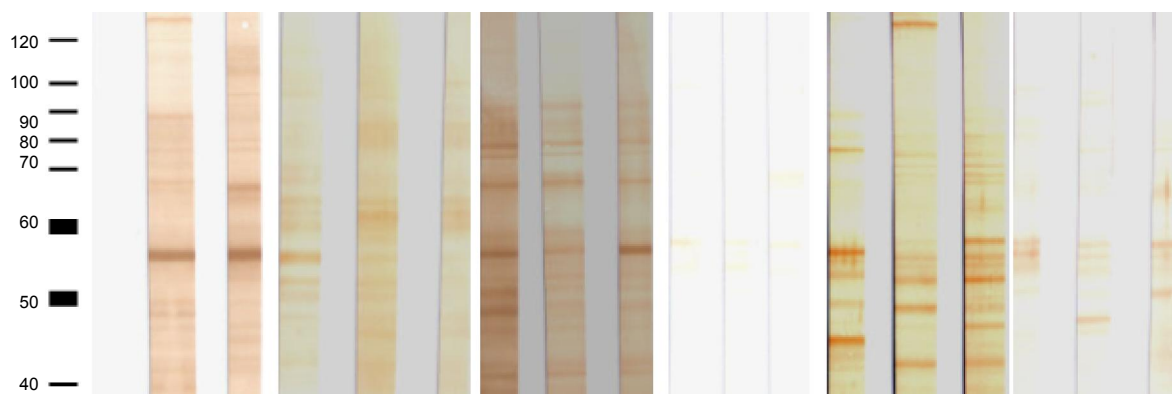


Tabela 2- Bandas mais frequentemente reconhecidas por IgG1 dos grupos estudados em “Western blot” com antígeno de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) chagasi*.

Extrato Antigênico	Bandas (kDa)	LVA (S+A) (n=38)	LTA (n=32)	Saudáveis (n=17)	Esporotricose (n=35)	Ehrlichiose (n=3)
<i>L. (V.) braziliensis</i>	70	7,9	0,0	0,0	0,0	0,0
	60	39,5	68,8	29,4	42,9	22,9
	56	31,6	18,8	0,0	0,0	22,9
	50	7,9	12,5	0,0	2,9	0,0
	40 a 43	7,9	6,3	0,0	2,9	0,0
	36	10,5	9,4	0,0	0,0	0,0
	31 a 32	7,9	12,5	0,0	0,0	0,0
	30	5,3	12,5	0,0	2,9	0,0
	25 a 29	5,3	18,8	5,9	0,0	0,0
	24	28,9	59,4	5,9	5,7	0,0
	23	34,2	12,5	0,0	0,0	0,0
	16	7,9	3,1	0,0	0,0	0,0
	<i>L. (L.) chagasi</i>	75	10,5	0,0	0,0	0,0
70		5,3	0,0	0,0	0,0	0,0
62 a 65		7,9	3,1	0,0	0,0	5,7
60		10,5	0,0	0,0	0,0	2,9
58		5,3	0,0	0,0	0,0	0,0
55		5,3	0,0	0,0	0,0	0,0
53		0,0	3,1	0,0	0,0	0,0
46 a 48		5,3	0,0	0,0	0,0	0,0
45		5,3	0,0	0,0	0,0	0,0
36		5,3	0,0	0,0	0,0	0,0
31		10,5	0,0	0,0	0,0	0,0
26 a 30		22,5	2,4	0,0	0,0	0,7
24		5,3	6,3	0,0	0,0	2,9
16		2,6	0,0	0,0	0,0	0,0

Figura 3- “Western blot” com frações antigênicas de *L. (V.) braziliensis* (A) e *L. (L.) chagasi*(B) para a detecção de IgG2 presente nas amostras de soros: linhas 1-3 (soro controle negativo, controle positivo de LTA, controle positivo LVA); linhas 4-6 (soros de LVA); linhas 7-9 (soros de LTA); linhas 10-12 (soros de animais saudáveis); linhas 13-15 (soros de esporotricose); linhas 16-18 (soros de ehrlichiose).

A) Frações de *L. (V.) braziliensis*:



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18

B) Frações de *L. (L.) chagasi*:

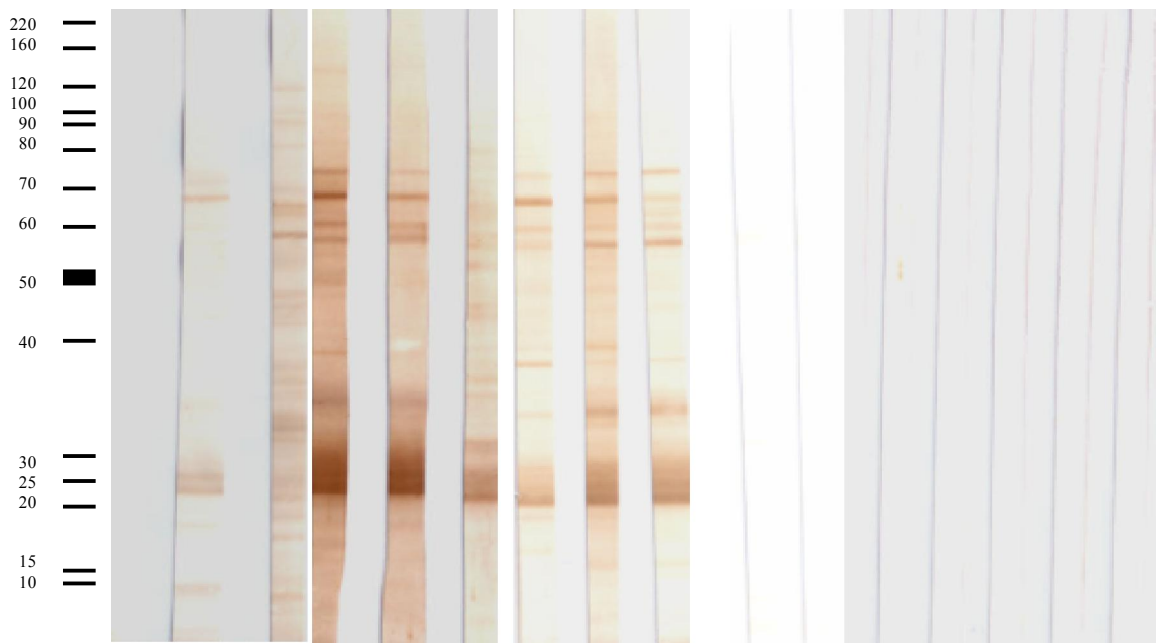


Tabela 5- Bandas mais frequentemente reconhecidas por IgG2 dos grupos estudados em “Western blot” com antígeno de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) chagasi*.

Extrato Antigênico	Bandas (kDa)	LVA (S+A) (n=38)	LTA (n=32)	Saudáveis (n=17)	Esporotricose (n=35)	Ehrlichiose (n=3)
% de reconhecimento						
<i>L. (V.) braziliensis</i>	145	34,2	59,4	0,0	13,9	2,9
	72	15,8	25	5,9	16,7	2,9
	70	55,3	68,8	0,0	25	2,9
	62 a 65	10,5	3,1	0,0	0,0	0,0
	60	57,9	31,3	0,0	5,6	5,7
	56	65,8	78,1	70,6	72,2	62,9
	52	31,6	56,3	35,3	94,4	34,3
	48 a 50	60,5	62,5	11,8	19,4	2,9
	47	50	65,6	0,0	27,8	14,3
	42 a 43	2,6	9,4	0,0	33,3	0,0
	36	15,8	43,8	0,0	5,6	0,0
	31 a 32	63,2	37,5	0,0	13,9	5,7
	25 a 29	71,1	65,6	5,9	11,1	5,7
	24	42,1	81,3	0,0	2,8	8,6
	16	57,9	16,3	0,0	19,4	5,7
<i>L. (L.) chagasi</i>	75	7,9	62,5	2,7	0,0	0,0
	70	60,5	21,9	2,7	0,0	0,0
	62 a 65	84,2	75	5,9	11,1	0,0
	60	7,9	15,6	0,0	5,7	0,0
	58	81,6	59,4	5,9	0,0	0,0
	55	60,5	65,6	0,0	0,0	0,0
	53	65,8	18,8	0,0	0,0	0,0
	46 a 48	52,6	28,1	0,0	2,8	0,0
	45	31,6	3,1	0,0	0,0	0,0
	36	13,2	3,1	0,0	0,0	5,7
	31	28,9	34,4	0,0	0,0	0,0
	26 a 30	64,5	52,4	7,3	0,0	1,4
	24	36,8	43,8	0,0	0,0	0,0
	16	18,4	3,1	0,0	0,0	0,0

6. DISCUSSÃO

No presente estudo, nós avaliamos a detecção de IgG e subclasses por ELISA e “immunoblotting”, empregando antígenos de *L. (V.) braziliensis* e de *L. (L.) chagasi* e comparamos o reconhecimento de ambos os antígenos, a fim de melhorar o desempenho dos ensaios para o diagnóstico das leishmanioses caninas e sua discriminação de outras doenças.

Nesse trabalho, o emprego do antígeno homólogo forneceu melhores resultados, tanto para o diagnóstico de LTA quanto de LVA. Foram obtidas médias de D.O. mais elevadas para a detecção de IgG, IgG1 e IgG2 quando comparada ao antígeno heterólogo. De maneira semelhante, muitos autores relataram que o emprego de antígenos homólogos tem sido um procedimento adequado para a obtenção de melhores resultados para o diagnóstico das leishmanioses, tanto para LVA canina (BALEEIRO et al. 2006) e humana (HOMMEL et al. 1978; BADARÓ et al. 1983) quanto para LTA canina (RIBEIRO et al. 2007) e humana (BARROSO-FREITAS et al. 2008). BADARÓ *et al.* (1986) demonstraram que a utilização de antígenos de *Leishmania* sp. isolados da mesma área onde os casos ocorrem, aumentou a acurácia do teste. Entretanto, DA COSTA *et al.* (1991) para o diagnóstico de LVA canina, não observaram diferença estatística na sensibilidade da reação de Imunofluorescência indireta em relação à espécie empregada como antígeno.

A sensibilidade foi calculada para o grupo de LTA, o que não ocorreu para o grupo de LVA, pois como critério de inclusão do grupo de LVA neste estudo foi ser soropositivo na imunofluorescência testada pelo programa de controle de leishmaniose do município do Rio de Janeiro. Além das médias de D.O., Foi observado que a sensibilidade também foi mais elevada, especialmente para a detecção de IgG, quando empregado antígeno homólogo, embora não significante estatisticamente. Corroborando com esses achados, THIERRY *et al.* (1991) e BARROSO-FREITAS (2008), verificaram que o emprego do antígeno heterólogo para o diagnóstico de LTA em humanos, reduz a sensibilidade dos testes sorológicos.

A sobreposição de áreas de transmissão de LVA e LTA tem sido observada em várias regiões do Município do Rio de Janeiro (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006 e 2007). Nessas áreas foram encontrados cães apresentando as duas infecções (*L. (L.) chagasi* e *L. (V.) braziliensis*) (MADEIRA et al. 2006a). No grupo de infecção mista as médias de D.O. para a detecção de IgG foram estatisticamente semelhantes empregando-se ambos os antígenos, sugerindo um equilíbrio na resposta quando existem as duas infecções. A partir desses resultados, o emprego de ambos os antígenos em áreas de infecção concomitante das duas espécies estudadas seria uma alternativa para auxiliar nas decisões quanto às medidas de controle a serem adotadas. Esses achados complementam os resultados de ELISA dos dois grupos estudados separadamente (LVA e LTA), cujos resultados obtidos foram melhores empregando o antígeno homólogo de cada grupo.

Em cães infectados com *L. infantum*, alguns autores observaram associação entre a resposta imune (Th1/Th2) e a detecção de subclasses de IgG (DEPLAZES et al. 1995, BOURDOISEAU et al. 1997) em que animais sintomáticos são caracterizados em geral, pela ausência de resposta celular e altos níveis de anticorpos e os assintomáticos possuem baixos níveis de anticorpos específicos no soro e significativa resposta linfoproliferativa (FERNÁNDEZ-PÉREZ et al. 2003). Entretanto, outros autores não concordam que as subclasses IgG1 e IgG2 sejam indicadoras de resposta Th1 e Th2 (MAZZA et al. 1993,

DAY, 2007). Essa possível diferença entre os achados pode ser explicada pelos diferentes antissoros utilizados nos estudos. A LTA humana é caracterizada, segundo SOUZA *et al.* (2005), pelo padrão misto de resposta imune (Th1 e Th2). De acordo com JUNQUEIRA PEDRAS *et al.* (2003), a detecção de subclasses de IgG representa uma alternativa para o aumento da eficácia do diagnóstico sorológico.

Na LVA, a detecção de IgG anti-*Leishmania* tem sido considerado por alguns autores, como marcador de susceptibilidade e resistência à doença, estando IgG1 associado à doença e IgG2 à infecção assintomática (DEPLAZES *et al.* 1995, BORDOISEAU *et al.* 1997, LEANDRO *et al.* 2001, SOLANO-GALEGO *et al.* 2001, NAKHAE *et al.* 2004, CARDOSO *et al.* 2007). Em contrapartida, essa associação não foi observada por QUINELL *et al.* (2003) com antissoro monoclonal.

No presente estudo, as médias de D.O. obtidas foram mais elevadas nos cães com LVA sintomáticos que nos assintomáticos, achados esses também relatados por INIESTA *et al.* (2007). Em ambos os grupos (sintomáticos e assintomáticos), IgG2 foi mais soroprevalente. Esses resultados foram similares a estudos anteriores envolvendo cães infectados com *L. infantum* (BORDOISEAU *et al.* 1997, HARRUS *et al.*, 2001, VERCAMMEM *et al.* 2002, CORDEIRO-DA-SILVA *et al.* 2003, METTLER *et al.* 2005).

A soroprevalência de IgG1 não mostrou resultados promissores, pois foi relativamente baixa em cães infectados por *Leishmania* sp. Essa baixa soroprevalência de IgG1, indica seu uso limitado para o diagnóstico de LVA e LTA. Essa limitação foi sugerida previamente por METTLER *et al.* (2005) para o diagnóstico de LVA canina. Contrapondo a esses achados, outros investigadores propuseram que essa subclasse é predominante em cães infectados por *L. (L.) chagasi* (MENDES *et al.* 2003, QUINELL *et al.* 2003).

A correlação entre os valores de D.O. para detecção de IgG e IgG1 para LTA e LVA foi baixa e não significativa. Entretanto, uma positiva e significativa correlação foi observada entre IgG e IgG2 empregando ambos os antígenos. Estudos prévios também mostraram a predominância de IgG2 durante a fase aguda e subclínica da LVA (BORDOISEAU *et al.* 1997, VERCAMMEM *et al.* 2002, CORDEIRO-DA-SILVA *et al.* 2003, METTLER *et al.* 2005).

A ehrlichiose e a esporotricose caninas são importantes diagnósticos diferenciais de LVA e LTA, respectivamente, devido aos achados clínicos e epidemiológicos similares. No Rio de Janeiro há uma elevada prevalência de cães infectados por *E. canis* (MACIEIRA *et al.* 2005) e por *Sporothrix schenckii* (SCHUBACH *et al.* 2008).

O diagnóstico sorológico tem sido utilizado para diferenciar LVA de ehrlichiose (SANCHEZ VISCONTI; TESOURO DIEZ, 2001). LLERA *et al.* (2002) não observaram reação cruzada entre soros de cães infectados por *E. canis* e *L. infantum*. Entretanto, nesse estudo, verificamos reatividade cruzada por ELISA, principalmente para a detecção de IgG1 e também pela IFI, fato também observado por FERREIRA *et al.* (2007).

Foi verificada uma taxa de 2,9% falsos-positivos no ELISA para a detecção de IgG empregando antígenos de *L. (V.) braziliensis* em cães com esporotricose. Para a discriminação entre esporotricose e LTA, de acordo com DOS SANTOS *et al.* (2007), é fundamental a demonstração do agente etiológico, devido à reatividade cruzada comumente observada nos testes sorológicos. Essa reatividade também foi observada na IFI e no ELISA empregando *L. major* em pacientes humanos com esporotricose (BARROS *et al.* 2005).

Analisando as reatividades no “immunoblotting”, foi verificado que os resultados corroboraram com os encontrados no ELISA. Observou-se que a detecção de IgG2 no “immunoblotting” não tem vantagens sobre IgG pois a reação foi similar, tanto com *L. (V.) braziliensis* quanto com *L. (L.) chagasi*. Essa observação também foi relatada por SOLANO-GALLEGOS *et al.* (2001) e FERNÁNDEZ-PÉREZ *et al.* (2003). Muitos autores relataram que IgG2 corresponde a reatividade total (BORDOISEAU *et al.* 1997, HARRUS *et al.* 2001, VERCAMMEM *et al.* 2002, CORDEIRO-DA-SILVA *et al.* 2003). Contrapondo esses achados, INIESTA *et al.* (2007) observaram que o reconhecimento de frações polipeptídicas reconhecidas entre IgG2 e IgG1 foi semelhante. E ainda, MENDES *et al.* (2003) e QUINELL *et al.* (2003) observaram que a subclasse IgG1 é predominante em animais naturalmente infectados.

A reatividade no “immunoblotting” foi semelhante nos grupos de cães com LVA e LTA para a detecção de IgG e IgG2, ou seja, identificaram as mesmas proteínas. Para BRITO *et al.* (2000), a distinção clara entre LTA e LVA também não foi possível e ainda, de acordo com VALE *et al.* (2009), as espécies de *Leishmania* apresentam uma homologia genética que varia de 69 a 90%. Entretanto, LEGRAND *et al.* (1987) descreveram a reatividade com a proteína de 72kDa de *L. (V.) braziliensis* por pacientes de LTA a qual não foi reconhecida por soros de LV. Corroborando com os achados desse estudo, VALE *et al.* (2009) observaram que a diferença entre a reatividade de animais com presença e ausência de sinais clínicos de LVA, também foi mínima. Mas contrapondo a esses achados, DA COSTA *et al.* (1996), relataram que o “immunoblotting” pode ser utilizado para diferenciar cães com LV sintomáticos de assintomáticos.

As frações de proteínas antigênicas reconhecidas por amostras de soro pela técnica de “immunoblotting” variam com as diferentes cepas de parasitas (JAFFE *et al.*, 1990). Segundo INIESTA *et al.* (2007), a infecção por *L. infantum* é caracterizada pelo reconhecimento de frações polipeptídicas de baixo peso molecular. Proteínas com peso molecular variando de 14, 16, 18, 44 e 21, 23 e 31kDa têm sido descritas em cães e humanos com LVA (NEOGY *et al.* 1992, MARY *et al.* 1992, MARTY *et al.* 1994, MARTY *et al.* 1995) e as bandas de 12 e 14kDa foram consideradas por AISA *et al.* (1998) úteis para serem detectadas antes do aparecimento dos sinais da doença. MANCIANTI *et al.* (1995), observaram que antígenos de 30 e de 73kDa foram reconhecidos por todos os soros de cães com LV.

Poucos antígenos específicos de *L. (V.) braziliensis* foram descritos na literatura (72 kDa, 47 a 54kDa, 25kDa e de 17 a 24kDa) (SILVEIRA *et al.* 2001). Segundo ALMEIDA *et al.* (2005) IgG1 e IgG2 reconheceram os polipeptídeos do antígeno de *L. (L.) chagasi* com reação mais intensa em 61 e 36kDa para IgG1 e em 26, 21, 18 e 14kDa para IgG2.

Neste estudo, as bandas mais reconhecidas foram as do grupo de 24 a 30kDa, com ambos os antígenos. Esse grupo de bandas foi característico dos infectados por *Leishmania* sp. e foi reconhecido tanto por IgG quanto por IgG2 presente quase na totalidade dos soros dos grupos de LVA e de LTA (60 a 85%). Todos os soros desses grupos reconheceram pelo menos duas bandas desse intervalo. Esse reconhecimento também foi observado com IgG1 com ambos os antígenos. Entretanto, o reconhecimento de frações de *L. (L.) chagasi* foi mais frequente no grupo de LVA. INIESTA *et al.* (2007), denominaram este grupo de bandas de 24 a 31kDa como família AG24 e o relacionaram com a presença de sintomatologia. LASRI *et al.* (2003) também observaram que os soros de cães com LV sintomáticos reagiram com a banda de 26kDa de *L. infantum*. COUVREUR *et al.* (1997) caracterizou esse grupo de bandas como uma família multi-antigênica de seis a nove

membros, que não foi identificada nos soros negativos de área endêmica (MARY et al. 1992). Alguns autores relataram que a identificação dessas frações, particularmente de 28 e 32kDa, podem ser marcadores de infecção ativa (DA COSTA et al. 1996).

Esse conjunto de proteínas foi também o mais frequentemente reconhecido por soros de cães com LTA empregando *L. (V.) braziliensis* (BRITO et al. 2000) e soros de cães com LVA empregando *L. (L.) chagasi* (EVANS et al. 1989). Os antígenos de 29 a 32 também foram reconhecidos por animais infectados soro-negativos (antes da soroconversão) (DE PAULA et al. 2003), fato que poderia colaborar para o diagnóstico precoce da infecção. Outra banda importante foi a de 16kDa, pois foi reconhecida neste estudo, apenas por amostras de animais infectados por *Leishmania* sp. MARY et al. (1992) também observaram que o reconhecimento da banda de 16kDa de *L. infantum* em pacientes de LVA foi constante e BRITO (1999) declarou que além da presença do antígeno solúvel de 27 e 30kDa isoladamente ou em combinação com outras bandas e a presença de reatividade principalmente na banda de 16kDa, também reforçam o diagnóstico.

Com antígeno de *L. (V.) braziliensis* poucas bandas foram reconhecidas por IgG e IgG2, especialmente de animais com esporotricose. GONÇALVES et al. (2002) verificaram o reconhecimento inespecífico nas bandas de 63 e 58kDa, empregando *L. (V.) braziliensis*, por amostras de soro de pacientes com Doença de Chagas e doença auto-imune. Nesse caso, as bandas mais imunorreativas nos grupos controle foram as de 56 e 60kDa. A semelhança entre o reconhecimento de frações antigênicas de *L. (V.) braziliensis* entre o grupo de LTA e de esporotricose permite o estudo de analogias antigênicas entre as espécies, para então se estudar antígenos responsáveis pela reatividade cruzada nos testes sorológicos comumente relatados na literatura (BARROS et al. 2005, DOS SANTOS et al. 2007). Além disso, a presença de alguns determinantes antigênicos semelhantes podem estar contribuindo para a reatividade cruzada e entre LTA e esporotricose.

Os achados obtidos permitem a identificação de frações antigênicas específicas para o diagnóstico de infecção por *Leishmania* sp., o que poderia contribuir para a melhoria dos métodos de diagnósticos pré-existentes. Comparando-se a reatividade de ambos os antígenos, verificou-se que com antígenos de *L. (V.) braziliensis* os resultados apresentaram uma reatividade cruzada mais elevada, detectada por IgG e IgG2 de soros controles. Desse modo, o emprego de frações de *L. (L.) chagasi* tornou o teste mais específico quando comparado ao emprego de *L. (V.) braziliensis*, sugerindo que o antígeno bruto de *L. (L.) chagasi* poderia ser utilizado para diferenciar animal infectado por *Leishmania* sp. dos que apresentam um dos diagnósticos diferenciais (esporotricose, ehrlichiose) e ainda, dos não infectados (saudáveis), tornando desnecessária a purificação antigênica para este fim.

De um modo geral, nos artigos publicados sobre o tema, a seleção das amostras não foi adequada, comprometendo a interpretação dos resultados. Neste estudo, os grupos foram cuidadosamente definidos e caracterizados, o que possibilitou maior credibilidade nos resultados encontrados.

7. CONCLUSÕES

- i. Na técnica de ELISA para o diagnóstico de LTA e LVA canina, os parâmetros de acurácia para a detecção de IgG e IgG2 foram elevados e semelhantes. Entretanto, IgG1 apresentou baixa acurácia, independentemente do antígeno empregado.
- ii. O emprego do antígeno homólogo elevou a média de densidade ótica para a detecção de IgG e melhorou o desempenho dos testes, permitindo a discriminação entre a maioria dos casos de LTA e de esporotricose, e ainda entre cães infectados por *L. (L.) chagasi* (sintomáticos e assintomáticos) e cães com ehrlichiose.
- iii. O reconhecimento antigênico por amostras de soro do grupo de cães com LTA e LVA foi semelhante, apresentando diferença apenas na intensidade da reação, independente do antígeno empregado.
- iv. A técnica de “Immunoblotting” com antígeno de *L. (L.) chagasi* apresentou bons resultados na discriminação entre casos de leishmaniose e controles, podendo ser indicada para esta finalidade.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aisa MJ, Castillejo S, Gallego M, Fisa, R, Riera MC, Colmenares M, Torras S, Roura X, Sentis J, Portus M. Diagnostic potencial of Western Blot analysis of sera from dogs with leishmaniasis in endemic áreas and significance of the pattern. *Am J Trop Med Hyg.* 1998; 58 (2): 154-159.
- Almeida MAO, Jesus EEV, Sousa-Alta MLB, Alves LC, Berne MEA, Atta, AM. Clinical e serological aspects of visceral leishmaniasis in Northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Vet Parasitol.* 2005; 127: 227- 232.
- Badaró R, Reed SG, Barral A, Orge G, Jones TC. Evaluation of the micro Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for antibodies in american visceral leishmaniasis: Antigen selection for detection of infection-specific responses. *Am J Trop Med Hyg.* 1986; 35: 72-78.
- Badaró R, Reed SG, Carvalho EM. Immunofluorescent antibody test in american visceral leishmaniasis: Sensitivity and specificity of different morphological forms of two *Leishmania* species. *Am J Trop Med Hyg.* 1983; 32: 480-484.
- Baleiro CO, Paranhos-Silva M, Dos Santos JC, Oliveira GGS, Nascimento EG, De carvalho LP, Dos-Santos WLC. Montenegro's skin reactions and antibodies against different *Leishmania* species in dogs from a visceral leishmaniosis endemic area. *Vet Parasitol* 2006; 139, 21-28.
- Barbosa GMS, Marzochi MCA, Lima GPS, Confort EM. Aspectos epidemiológicos da Leishmaniose Tegumentar Americana em cães, no município de Paraty, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Cad Saúde Públ.* 1999; 15 (3): 641-646.
- Barros MBL, Schubach AO, Franciscosconi-Do-Valle AC, Guitierrez-Galhado MC, Schubach TMP, Conceição-Silva F, Salgueiro MM, Mouta-Confort E, Reis RS, Madeira MF, Cuzzi T, Quintella LP, Passos JPS, Conceição MJ, Marzochi MCA. Positive Montenegro skin test among patients with sporotrichosis in Rio de Janeiro. *Act Trop.* 2005; 93: 41-47.
- Barroso-Freitas APT. Diagnóstico laboratorial da Leishmaniose Tegumentar causada por *Leishmania (Viannia) braziliensis* através de Reação Imunoenzimática – ELISA e da Imunofluorescência Indireta – IFI utilizando-se diferentes antígenos. Dissertação de Mestrado, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Rio de Janeiro, 2006.
- Barroso-Freitas AP, Passos SR, Mouta-Confort E, Madeira MF, Schubach AO, Santos GP, Nascimento LD, Marzochi MC, Marzochi KB. Accuracy of an ELISA and indirect immunofluorescence for the laboratory diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2009; doi:10.1016/j.trstmh.2008.12.019.*
- Berrahal F, Roze CMM, Berenguer A, Escoffier K, Lamouroux D, Dunan S. Canine Leishmaniasis: Identification of asymptomatic carriers by Polymerase Chain Reaction and Immunoblotting. *Am J Trop Med Hyg.* 1996; 55 (3): 273-277.
- Bourdoiseau G, Bonnefont C, Hoareau E, Boehringer C, Stolle T, Chabanne L. Specific IgG1 and IgG2 antibody and lymphocyte subset levels in naturally *Leishmania*

- infantum*-infected treated and untreated dogs. Vet Immunol Immunopathol. 1997; 59: 21-30.
- Braga MD, Coelho IC, Pompeu MM, Evans TG, Macaullife IT, Teixeira MJ, Lima JW. Control of canine visceral leishmaniasis: comparison of results from a rapid elimination program of serum-reactive dogs using an immunoenzyme assay and slower elimination of serum-reactive dogs using filter paper elution indirect immunofluorescence. Rev Soc Bras Med Trop. 1998; 31 (5): 419-24.
- Brito MEF. Desenvolvimento de um método diagnóstico para a leishmaniose tegumentar americana com base em Western blot de frações antigênicas de *Leishmania braziliensis*. Rev Soc Bras Med Trop. 1999; 32 (3): 313-314.
- Brito MEF, Mendonça MG, Gomes YM, Jardim ML, Abath FGC. Identification of Potentially Diagnostic *Leishmania braziliensis* Antigens in Human Cutaneous Leishmaniasis by Immunoblot Analysis. Clin Diag Lab Immunol. 2000; 7 (2): 318-321.
- Caldas AJM, Silva DRC, Pereira CCR, Nunes PMS, Silva BP, Silva AAM, Barral A, Costa JM. Infecção por *Leishmania (Leishmania) chagasi* em crianças de uma área endêmica de leishmaniose visceral americana na Ilha de São Luís- MA, Brasil. Rev Soc Bras Med trop. 2001; 35 (5): 445-451.
- Cardoso L, Schallig HDFH, Cordeiro-da-Silva A, Cabral M, Alunda JM, Rodrigues M. Anti-leishmania humoral and cellular immune responses in naturally infected symptomatic and asymptomatic dogs. Vet Immunol Immunopathol 2007; 117: 35-41.
- Cordeiro-da-Silva A, Cardoso L, Araujo N, Castro H, Tomas A, Rodrigues M, Cabral M, Vergnes B, Sereno D, Ouaisi A. Identification of antibodies to *Leishmania* silent information regulatory 2 (SIR2) protein homologue during canine natural infections: pathological implications. Immunol Lett. 2003; 86 (2): 155-62.
- Cortes S, Rolão N, Ramada J, Campino L. PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* L. Specific kinetoplastid primers. Trans Royal Soc Trop Med Hyg. 2004; 98: 12-17.
- Couvreur B, Jacquet D, Bollen A, Le Ray D. Molecular characterization of antigen 24, a specific immunodominant antigen family from *Leishmania infantum*. Parasitol. 1997; 115: 611-619.
- Da Costa CA, Genaro O, Lana M, Magalhães PA, Dias M, Michalick MSM, Melo MN, Da Costa RT, Magalhães-Rocha NM, Mayrink W. Leishmaniose visceral canina: Avaliação da metodologia sorológica utilizada em inquéritos epidemiológicos. Rev Soc Br Med Trop. 1991; 24: 21-25.
- Da Costa JMC, Neogy AB, Vouldoukis I, Silva MLS, Gentilini M, Monjour L. Antigenic components of partially purified antigens of *Leishmania donovani infantum* recognized by sera from dogs with asymptomatic or active visceral leishmaniasis. Am J Trop Med Hyg. 1996; 55 (5): 511-515.
- Day MJ. Immunoglobulin G subclass distribution in canine leishmaniasis: A review and analysis of pitfalls in interpretation. Vet Parasitol. 2007; 147: 2-8.
- Day MJ. IgG subclasses of canine anti-erythrocyte, antinuclear and anti-thyroglobin autoantibodies. Res Vet Sci. 1996; 61: 129-135.
- Day MJ, Mazza G. Tissue immunoglobulin G subclasses observed in immune-mediated dermatopathy, deep pyoderma and hypersensitivity. Res Vet Sci. 1995; 58: 82-89.

- De Paula AA, Da Silva AVM, Fernandes, O, Jansen AM. The use of immunoblot analysis in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in an endemic area of Rio de Janeiro. *J Parasitol.* 2003; 89 (4): 832-6.
- De Souza MB, Marzochi MCA, De Carvalho RW, Ribeiro PC, Pontes CS, Caetano JM, Meira AM. Ausência da *Lutzomyia longipalpis* em algumas áreas de ocorrência de leishmaniose visceral no município do Rio de Janeiro. *Cad Saúde Públ.* 2003; 19 (6): 1881-1885.
- Deplazes P, Smith NC, Arnold P, Lutz H, Eckert J. Specific IgG1 and IgG2 antibody responses of dogs to *Leishmania infantum* and other parasites. *Parasite Immunol.* 1995; 17: 451-458.
- Dos Santos IB, Schubach TM, Leme LR, Okamoto T, Figueiredo FB, Pereira SA, Quintella LP, Madeira MF, Coelho F, Reis RD, Schubach A O. Sporotrichosis- The main differential diagnosis with tegumentary leishmaniosis in dogs from Rio de Janeiro, Brazil. *Vet Parasitol.* 2007; 143: 1-6.
- Dye C. The logic of visceral leishmaniasis control. *Am J Trop Med Hyg.* 1996; 55 (2):125-30.
- Evans TG, Krug EC, Wilson ME, Vasconcelos AW, Alencar JE, Pearson RD. Evaluation of antibody responses in American Visceral Leishmaniasis by ELISA and Immunoblot. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1989; 84: 157-166.
- Falqueto A, Coura JR, Barros, GC, Grimaldi Filho G, Sassa PA, Conias VRD, Jesus AC, Alencar JTA. Participação do cão no ciclo de transmissão de Leishmaniose Tegumentar no município de Vianna, Estado do Espírito Santo, Brasil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1986; 31: 155-163.
- Falqueto A, Sessa PA, Ferreira AL, Vieira VP, Santos CB, Varejao JB, Cupolillo E, Porrozzini R, Carvalho-Paes LE, Grimaldi Junior G. Epidemiological and clinical features of *Leishmania (Viannia) braziliensis* American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in the State of Espírito Santo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2003; 98 (8): 1003-10.
- Fernandez-Perez FJ, Gómez-Muñoz MT, Mendez S, Alunda JM. Leishmania-specific lymphoproliferative responses and IgG1/IgG2 immunodetection patterns by Western blot in asymptomatic, symptomatic and treated dogs. *Act Trop.* 2003; 86 (1): 83-91.
- Ferreira EC, De Lana M, Carneiro, M, Reis, AB, Paes, DV, Da Silva ES, Schalling H, Gontijo, CMF. Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. *Vet Parasitol.* 2007; 146:235-241.
- Fraser CM, Bergeron JA, Mays A, Aiello SE. Leishmaniose Visceral. Manual Merck de Medicina Veterinária, um manual de diagnóstico, tratamento, prevenção e controle de doenças para o veterinário, 1991. Sétima edição. p. 507-508.
- Gonçalves CCM, Reiche EMV, Abreu Filho BA, Silveira TGV, Felizardo TC, Maia KR, Costacurta R, Padovesi EJ, Dias Filho BP, Jankevicius SI, Jankevicius JV. Evaluation of antigens from various *Leishmania* species in a Western Blot for diagnosis of American Tegumentary Leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 2002; 66 (1): 91-102.
- Gontijo B, Carvalho MLR. Leishmaniose tegumentar americana. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2003; 36 (1): 71- 80.
- Grimaldi G Jr, Tesh RB, McMahon-Pratt D. A Review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. *Am J Trop Med Hyg.* 1989; 41 (6): 687-725.

- Harrus S, Waner T, Ayali DS, Bark H, Jongean F, Hecht G, Baneth G. Dynamics of IgG1 and IgG2 subclass response in dogs naturally and experimentally infected with *Ehrlichia canis*. *Vet Parasitol.* 2001; 99: 63-71.
- Hommel M, Peters W, Ranque J, Quilici M, Lannotte G. The micro-ELISA technique in the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 1978; 72: 213-218.
- Iniesta L, Gállego M, Portús M. Idiotype expression of IgG1 and IgG2 in dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. *Vet Immunol Immunopathol.* 2007; 119: 189-197.
- Isaza DM, Restrepo M, Mosca W. Immunoblot analysis of *Leishmania panamensis* antigens in sera of patients with American Cutaneous Leishmaniasis. *J. Clin. Microbiol.* 1997; 35 (12): 3043-7.
- Jaffe CL, Shor R, Traw H, Passwell JH. Parasite antigens recognized by patients with cutaneous leishmaniasis. *Clin Exp Immunol.* 1990; 80: 77 – 82.
- Jones TC, Hunt RD, King NW. Moléstias causadas por protozoários. *Patologia Veterinária.* 6 ed. São Paulo: Manole, 2000. p. 559-610.
- Junqueira Pedras M, Orsini M, Castro M, Passos VM, Rabello A. Antibody subclass profile against *Leishmania braziliensis* and *Leishmania amazonensis* in the diagnosis and follow-up of mucosal leishmaniasis. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2003; 47: 477-85.
- Kar K. Serodiagnosis of Leishmaniasis. *Crit Vet Microbiol.* 1995; 21: 123-152.
- Klaus S, Frankenburg S. Cutaneous leishmaniasis in the Middle East. *Clin Dermatol.* 1999; 17:137-141.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Matur.* 1970; 227: 680-685.
- Lasri S, Sahibi H, Natami A, Rhalem A. Western blot analysis of *Leishmania infantum* antigens using sera from pentamidine-treated dogs. *Vet Immunol Immunopathol.* 2003; 91: 13-18.
- Leandro C, Santos-Gomes GM, Campino L, Romão P, Cortes S, Rolão N, Gomes-Pereira S, Riça Capela MJ, Abranches P. Cell mediated immunity and specific IgG1 and IgG2 antibody response in natural and experimental canine leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol.* 2001; 79: 273-284.
- Legrand D, Desjeux P, Le Pont F, Brénière SF, Lemestre, JL, Santoro F, Capron A. Identification of a major 72 kilodalton surface in twelvw isolates of *Leishmania braziliensis braziliensis*. *Mol Bioch Parasitol.* 1987; 24: 117-124.
- Llera, JLG, García MLL, Reinoso EM, De González R. Differential serological testing by simultaneous indirect immunofluorescent antibody test in canine leishmaniasis and ehrlichiosis. *Vet Parasitol.* 2002; 109: 185-190.
- Macieira DB, Messick JB, Cerqueira AD, Freire IM, Linhares GF, Almeida NK, Almosny NR. Prevalence of *Ehrlichia canis* infection in thrombocytopenic dogs from Rio de Janeiro, Brazil. *Vet Clin Pathol.* 2005; 34: 44-48.
- Madeira MF, Schubach AO, Schubach TMP, Pacheco RS, Oliveira FS, Pereira SA, Figueiredo FB, Baptista C, Marzochi C A. Mixed infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* in a naturally infected dog from Rio de Janeiro, Brazil. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2006 a; 100: 442-5.
- Madeira MF, Schubach AO, Schubach TMP, Pereira SA, Figueiredo FB, Baptista C, Leal CA, Melo CX, Confort EM, Marzochi C A. *Post mortem* parasitological evaluation of dogs sororeactive for *Leishmania* from Rio de Janeiro, Brazil. *Vet Parasitol.* 2006 b; 138: 366-370.

- Mancianti F, Falcone ML, Gianneli C, Poli A. Comparison between an enzyme-linked immunosorbent assay using a detergent-soluble *Leishmania infantum* antigen and indirect immunofluorescence for the diagnosis of canine leishmaniasis. *Vet Parasitol.* 1995; 59: 13- 21.
- Manzillo VF, Capiello S, Oliva G. Tick-transmitted diseases in dogs: clinic pathological findings. *Parassitologia.* 2006; 48 : 135-136.
- Marty P, Levièvre A, Quaranta JF, Rahal A, Gari-Toussaint M, Le Fichoux Y. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg.* 1994; 88 : 658-659.
- Marty P, Levièvre A, Quaranta JF, Suffia I, Eulálio M, Gari-Toussaint M, Le Fichoux Y, Kubar J. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg.* 1995; 89: 690-691.
- Mary C, Lamouroux D, Dunan S, Quilic M. Western Blot analysis of antibodies to *Leishmania infantum* antigens: Potential of 14-kD and 16-kD antigens for diagnosis and Epidemiologic Purposes. *Am J Trop Med Hyg.* 1992; 47 (6): 764-771.
- Marzochi MCA, Marzochi KBF. Tegumentary and Visceral Leishmaniasis in Brasil – Emerging Antropozoonosis and Possibilities for Their Control. *Cad Saúde Públ.* 1994; 10 (2): 359-375.
- Marzochi MCA, Marzochi KBF, Carvalho RW. Visceral Leishmaniasis in Rio de Janeiro. *Parasitol Today.* 1994; 10 (1): 37- 40.
- Marzochi MCA, Sabrosa PC, Toledo LM, Marzochi KBF, Tramontano NC, Filho FBR. Leishmaniose Visceral na cidade do Rio de Janeiro - Brasil. *Cad. Saúde Públ.* 1985; 1 (1): 5- 17.
- Mazza G, Duffus WPH, Elson CJ, Stokes CR, Wilson AD, Whiting AH. The separation and identification by monoclonal antibodies of dog IgG fractions. *J. Immunol. Met.* 1993; 161: 193-203.
- McDade JE. Ehrlichiosis – A disease of animals and humans. *J. Infect. Dis.* 1990; 161: 609-617.
- Mendes CO, De Sousa EP, Borja-Cabrera GP, Batista LMM, Dos Santos A, Parra LE, Menz I, Palatnik M, Palatnik-De- Sousa CB. IgG1/IgG2 antibody dichotomy in sera of vaccinated or naturally infected dogs with visceral leishmaniasis. *Vaccine.* 2003; 21: 2589-2597.
- Mendonça SCF, Souza WJS, Nunes MP, Marzochi MCA, Coutinho SG. Indirect Immunofluorescence test in New World Leishmaniasis: Serological Relationship. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1988; 83 (3): 347- 355.
- Mettler M, Grimm F, Capelli G, Camp H, Deplazes P. Evaluation of Enzyme-Linked Immunosorbent Assays, an Immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (Immunochromatographic-Dipstick and Gel Tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania* Infections in dogs. *J Clin Microbiol.* 2005; 43: 5515-5519.
- Ministério da Saúde. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. In: Ministério da Saúde - MS (ed), Brasília, 2006. 120 pp.
- Ministério da Saúde. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana. Ministério da Saúde - MS (ed), Brasília, 2007. 182 pp.
- Moreira SM, Bastos CV, Araújo RB, Santos M, Passos LMF. Retrospective study (1998-2001) on canine ehrlichiosis in Belo Horizonte, MG, Brazil. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 2003; 55: 141-147.

- Nakhaee A, Taheri T, Taghikhani M, Mohebbali M, Salmanian AH, Fasel N, Rafati Sima. Humoral and cellular immune responses against type I cysteine proteinase of *Leishmania infantum* are higher in asymptomatic than symptomatic dogs selected from a naturally infected population. *Vet Parasitol.* 2004; 119 :107-123.
- Neogy AB, Vouldoukis I, Silva OA, Tselentis Y, Lascombe JC, Segalen T, Rzepka D, Mounjour L. Serodiagnosis and screening of canine visceral leishmaniasis in an endemic area of Corsica: Applicability of a direct agglutination test and immunoblot analysis. *Am J Trop Med Hyg.* 1992; 47 (6): 772-777.
- Oliveira-Neto MP, Pirmez C, Rangel E, Schubach A, Grimaldi Jr G. An outbreak of American cutaneous Leishmaniasis (*Leishmania braziliensis braziliensis*) in a periurban area of Rio de Janeiro city, Brazil: Clinical and Epidemiological studies. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1988; 83 (4) :427-235.
- Padilla AM, Marco JD, Diosque P, Segura MA, Mora MC, Fernandez MM, Malchiodi EL, Basombrio MA. Canine infection and the possible role of dogs in the transmission of American tegumentary leishmaniosis in Salta, Argentina. *Vet Parasitol.* 2002; 110 (1-2): 1-10.
- Palatnik-de-Sousa CB, Dos Santos WR, Franca-Silva JC, Da Costa RT, Reis AB, Palatnik M, Mayrink W, Genaro O. Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 2001; 65 (5): 510-7.
- Paranhos-Silva M, Freitas LA, Santos WC, Grimaldi Jr G, Pontes-De-Carvalho LC, Oliveira-Dos-Santos AJ. A cross-sectional serodiagnostic survey of canine leishmaniasis due to *Leishmania chagasi*. *Am J Trop Med Hyg.* 1996; 55 (1):39-44.
- Pedras MJ, Orsini M, Castro M, Passos VMA, Rabello A. Antibody subclass profile against *Leishmania braziliensis* and *Leishmania amazonensis* in the diagnosis and follow-up of mucosal leishmaniasis. *Parasitol.* 2003; 47:477-485.
- Pinelli E, Gebhard D, Mommaas AM, Hoeiji MV, Langermans JAM, Ruitenber E J, Rutten VPMG. Infection of a canine macrophage cell line with *Leishmania infantum*: determination of nitric oxide production and anti-leishmanial activity. *Vet Parasitol.* 2000; 92: 181-189.
- Pinelli E, Killick-Kendrick R, Wagenaar J, Bernadina W, Del Real G, Ruitenber J. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infect Immun.* 1994; 62 (1): 229-35.
- Pirmez C, Yamamura M, Uyemura K, Paes-Oliveira M, Conceição-Silva F, Modin RL. Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. *J Clin Invest.* 1993; 91(4): 1265-6.
- Quinnell RJ, Courtenay O, Garcez LM, Kaye PM, Shaw MA, Dye C, Day MJ. IgG subclass responses in a longitudinal study of canine visceral leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol.* 2003; 91 (3-4): 161-8.
- Reed SG, Shreffler WG, Burns JM, Scott JM, Orge MG, Ghalib HW, Siddig M, Badaró R. An Improved Serodiagnostic Procedure for Visceral Leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 1990; 43 (6): 632- 639.
- Rikihisia Y. The tribe *Ehrlichiae* and ehrlichial diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* 1991; 4: 286-308.
- Reithinger R, Espinoza JC, DAVIES CR. The transmission dynamics of canine American cutaneous leishmaniasis in Huanuco, Peru. *Am J Trop Med Hyg.* 2003; 69 (5): 473-80.

- Reithinger R, Davies CR. Is the domestic dog (*Canis familiaris*) a reservoir host of American Cutaneous Leishmaniasis? A Critical Review of the current evidence. *Am J Trop Med Hyg.* 1999; 61 (4): 530-41.
- Ribeiro FC, Schubach AO, Mouta-Confort E, Schubach TMP, Madeira MF, Marzochi MCA. Use of ELISA employing *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* antigens for the detection of American tegumentary leishmaniasis in dogs. *Vet Parasitol.* 2007; 148: 200-206.
- Sanchez Visconti G, Tesouro Diez M.. Ehrlichiosis in: *Canis et felis*. San Román, Madrid, 2001. p. 49-56.
- Savani ES, Schimonsky BB, Camargo MC, D'auria SR. Surveillance of American visceral leishmaniasis in dogs from a non-endemic area, Brazil. *Rev Saúde Públ.* 2003; 37 (2): 260-2.
- Schalling HDFH, Schoone GJ, Beijer EGM, Kroon CCM, Hommers M, Ozbel Y, Ozensoy S, Silva ES, Cardoso LM, Da Silva ED. Development of a fast agglutination screening test (FAST) for the detection of anti-*Leishmania* antibodies in dogs. *Vet Parasitol.* 2002; 109: 1-8.
- Schubach A, Barros MB, Wanke B. Epidemic sporotrichosis. *Curr Opin. Infect. Dis.* 2008; 21: 119-21.
- Schubach TM, Schubach A, Okamoto T, Barros MB, Figueiredo FB, Cuzzi T, Pereira SA, Dos Santos IB, Almeida Paes R, Paes Leme LR, Wanke B. Canine sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: clinical presentation, laboratory diagnosis and therapeutic response in 44 cases (1998-2003). *Med Mycol.* 2006; 44 (1): 87-92.
- Silva AVM, De Paula AA, Cabrera MAA, Carreira JCA. Leishmaniose em cães domésticos: Aspectos epidemiológicos. *Cad saúde Públ.* 2005, 21 (1): 324- 328.
- Silva ES, Gontijo CM, Pacheco RS, Fiuza VO, Brazil RP. Visceral leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2001 a; 96 (3): 285-91.
- Silva ES, Roscoe EH, Arruda LQ, Gontijo CMF, Pacheco RS, Brazil RP. Leishmaniose visceral canina: Estudo clínico - epidemiológico e diagnóstico. *Rev Bras Med Vet.* 2001 b; 23 (3): 111-116.
- Silveira TGV, Suzuki E, Takahashi HK, Straus AH. Inhibition of macrophage invasion by monoclonal antibodies specific to *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigotes and characterisation of their antigens. *Int J Parasitol.* 2001; 31: 1451-1458.
- Solano-Gallego LS, Riera C, Roura XR, Iniesta L, Gallego M, Valladares JE, Fisa R, Castillejo S, Alberola J, Ferrer L, Arboix M, Portús M. *Leishmania infantum*-specific IgG, IgG1 and IgG2 antibody responses in health and ill dogs from endemic áreas Evolution in the course of infection and after treatment. *Vet Parasitol.* 2001; 96: 265-276.
- Souza MA, Da Silva AG, Afonso-Cardoso SR, Júnior SFJ, Ferreira MS. Perfil de isotipos de imunoglobulinas e subclasses de IgG na leishmaniose tegumentar americana. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2005; 38 (2): 137-141.
- Studier FW. Analysis of bacteriophage T7 early RNAs and proteins on slab gels. *J Mol Biol.* 1973; 79: 237-248.
- Thierry J, Borel E, Courrier PL, Courtois D, Mojon M. Leishmaniose cutanee sud-americaine diagnostic parasitologique et serologique par Immunofluorescence Indirecte (IFI) et Enzyme-Linked Immuno Assay (ELISA). *Méd Trop.* 1991; 51: 43-48.

- Tizard IR. Anticorpos forma solúvel de RBC. *Imunologia Veterinária, uma introdução*. 5 ed., São Paulo: Roca, 1998. p. 160-171.
- Towbin H, Staehelin T, Bordon J. Eletroforetic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Nat Acad Sci*. 1979; 76: 4350- 4354.
- Vale AM, Fujiwara, RT, Da Silva Neto, Miret JA, Alvarez DCC, Da Silva, JCF, Campos-Neto A, Reed S, Mayrink W, Nascimento E. Identification of Highly Specific and Cross-Reactive Antigens of *Leishmania* Species by Antibodies from *Leishmania (Leishmania) chagasi* Naturally infected Dogs. *Zoo Public Heath*. 2009; 56 (1): 41-8. 1.
- Vercammen F, Fernandez-Perez FJ, Amo CD, Alunda JM. Follow-up of *Leishmania infantum* naturally infected dogs treated with allopurinol: immunofluorescence antibody test, ELISA and Western blot. *Act Trop*. 2002; 84:175-181.
- Voller A, Bartlett A, Bidwell DE, Clarck MF, Adams AN. The detection of viruses by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *J Gen Virol* 1976; 33:165-7.
- Woody BJ, Hoskins JD. Ehrlichial diseases of dogs. *Vet. Clin. North Am Small Anim Pract*. 1991; 21:75-98.