



FIOCRUZ

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**AVALIAÇÃO DE ANTÍGENOS RECOMBINANTES PRÉ-
SELECIONADOS DE *Leishmania infantum* QUANTO À
REATIVIDADE A SOROS DE CÃES VACINADOS**

RODRIGO DE ARAUJO SILVA

**Salvador – Brasil
2013**

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa**

**AVALIAÇÃO DE ANTÍGENOS RECOMBINANTES PRÉ-
SELECIONADOS DE *Leishmania infantum* QUANTO À
REATIVIDADE A SOROS DE CÃES VACINADOS**

RODRIGO DE ARAUJO SILVA
ORIENTADORA: DRA. PATRÍCIA SAMPAIO TAVARES VERAS

Dissertação apresentada
ao Curso de Pós-
Graduação em
Biotecnologia em Saúde e
Medicina Investigativa
para a obtenção do grau de
Mestre.

Salvador – Brasil
2013

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

S586a Silva, Rodrigo de Araujo
Avaliação de antígenos recombinantes pré-selecionados de *leishmania infantum*
quanto à reatividade a soros de cães vacinados [manuscrito] / Rodrigo Araújo
Silva. - 2013.
78 f.; 30 cm

Datilografado (fotocópia).

**Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de
Pesquisas Gonçalo Moniz. Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde
e Medicina Investigativa, 2013.**

Orientador: Dr^a. Rodrigo de Araujo Silva, Laboratório de Patologia e Biologia
Molecular - LPBM.

1. MAPIA 2. Vacinação 3. Diagnóstica I.Título.

CDU 615.371

**AVALIAÇÃO DE ANTÍGENOS RECOMBINANTES PRÉ-
SELECIONADOS DE *Leishmania infantum* QUANTO À
REATIVIDADE A SOROS DE CÃES VACINADOS**

Rodrigo de Araujo Silva

Folha de Aprovação

COMISSÃO EXAMINADORA

Dr^a Paula Carvalhal Lage Von Buettner Ristow - UFBA

Dr^a Cláudia Ida Brodskyn – Pesquisadora titular – CPqGM – FIOCRUZ - BA

Dr. Edson Duarte Moreira Júnior – Pesquisador titular – CPqGM – FIOCRUZ - BA

Dedico este trabalho aos meus maiores incentivadores:

Meus pais, Virginia e Laurentino, maiores incentivadores;

Minhas irmãs, Raquel e Victória, eternas amigas;

A meu pai do coração, Fernando, exemplo de vida;

A Natália, sinônimo de amor e companheirismo;

AGRADECIMENTOS

Aproveito para expressar minha eterna gratidão a todos aqueles que acreditaram em mim nesta etapa da minha vida e que me ajudaram direta ou indiretamente na realização deste trabalho, em especial...

Ao Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz pela infra-estrutura e apoio financeiro.

Ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa pelos ensinamentos.

A minha orientadora Dr^a. Patricia Veras, pela confiança em meu trabalho. Influenciando em minha formação desde a iniciação científica. Pela paciência e conhecimentos transmitidos.

A minha co-orientadora Dr^a. Deborah Fraga, pela boa vontade em atender as minhas dúvidas, pelos vários conselhos dados e principalmente por ter sido tão presente durante este período.

A Dr. Geraldo Gileno de Sá Oliveira e Dr. Lain Carlos Pontes de Carvalho que sempre estiveram dispostos a ajudar e dar sugestões enriquecedoras ao trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Patologia e Biointervenção e em especial ao LPBI-1 que, como um exemplo de união, sempre colaboraram e incentivaram no desenvolvimento desse trabalho.

Ao “Grupo cão”, que sem eles não teria desenvolvido esse trabalho. Participaram ativamente das atividades do meu projeto.

Aos colaboradores que participaram na execução deste projeto: Antônio Gomes Pinto Ferreira, Edmilson Domingues da Silva, Michel Vergner F. Sucupira, Cristiane Marques de Souza (LATED/Biomangunhos), Osvaldo P. de Melo Neto e Franklin Barbalho Magalhaes do Departamento de Microbiologia do CPqAM.

A Alvina e Constança proprietárias dos canis parceiros do projeto.

A minha família que soube entender a minha ausência, sempre me incentivou a buscar o melhor e me apoiou em minhas escolhas.

A Natália Soares pelo amor, amizade, cumplicidade e paciência nos momentos mais difíceis.

Às grandes amizades conquistadas ao longo da vida e toda a preocupação e cuidado demonstrados.

SILVA, Rodrigo de Araujo. **AVALIAÇÃO DE ANTÍGENOS RECOMBINANTES PRÉ-SELECIONADOS DE *Leishmania infantum* QUANTO À REATIVIDADE A SOROS DE CÃES VACINADOS.** Dissertação – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2013.

RESUMO

A leishmaniose visceral (LV) é atualmente um grande problema de saúde pública, tendo o cão como seu principal reservatório em áreas urbanas. O controle da enfermidade é baseado no diagnóstico e eutanásia de cães infectados por *Leishmania infantum* que apresentam soropositividade para infecção. Como tentativa de conter o aumento do número de casos de LV canina (LVC), duas vacinas comerciais vêm sendo empregadas como medida de controle. Os testes diagnósticos preconizados pelo Ministério da Saúde no Brasil para identificação da infecção em cães é o teste sorológico rápido (DPP-LVC[®]) como triagem e ELISA (EIA-Biomanguinhos) como confirmatório. Estes métodos não foram desenvolvidos para diferenciar cães vacinados e infectados. Assim, animais que se tornam sorologicamente positivos em razão da vacinação podem vir a ser eutanasiados. Sete antígenos recombinantes foram previamente selecionados a partir de bibliotecas de cDNA e DNA utilizando soros de homens e cães infectados por *L. infantum* e foram empregados no presente estudo para terem sua reatividade testada contra soros de animais vacinados, utilizando o teste de triagem *multi antigen print immunoassay* (MAPIA). Primeiramente, esses antígenos recombinantes foram produzidos a partir da transformação de *Escherichia coli* (BL21(DE3)pLysS) com construções em plasmídeo pRSET, contendo cauda de histidina. Os sedimentos bacterianos contendo os sete antígenos recombinantes previamente selecionados foram purificados por cromatografia de afinidade. No presente estudo, foi utilizado um conjunto de soros de cães sem raça definida que foram vacinados com LEISHMUNE[®] (n = 28) ou Leish-Tec[®] (n = 30) e, cumpriram os critérios de inclusão (negativos para *Leishmania* em ELISA, cultura e qPCR). Assim, foi avaliada a reatividade desses soros frente ao antígeno bruto, utilizando ELISA, e aos sete antígenos recombinantes de *L. infantum*, utilizando o MAPIA. Em relação à reatividade ao antígeno bruto, 43,3% (13/30) dos soros de cães vacinados com Leish-Tec[®] e 96,4% (27/28) dos soros de cães vacinados com LEISHMUNE[®] testaram positivo no ELISA. Além disso, em relação à reatividade aos antígenos recombinantes, 54% dos soros de cães vacinados com LEISHMUNE[®] identificaram pelo menos uma das três proteínas rLci1A, rLci2B ou rLci12A-II, enquanto que 77% dos soros de cães vacinados com Leish-Tec[®] identificaram pelo menos uma das duas proteínas rLci6A-I ou rLci12A-II. Como em estudo anterior, identificamos que rLci1A, rLci2B e rLci12A-II foram altamente reconhecidas por soros de cães infectados com LVC, as análises de positividade contra os soros de animais vacinados foram também realizadas sem considerar essas proteínas. Assim, a reatividade dos soros de cães vacinados, sem considerar as proteínas rLci1A, rLci2B e rLci12A-II, identificadas como candidatas promissoras para comporem um teste para o diagnóstico de LVC, mostrou que o conjunto formado pelos antígenos rLci6A-I, rLci7A ou rLci10A-II foram reconhecidos por 70% dos soros de cães vacinados com Leish-Tec[®] e apenas 4% de cães vacinados com LEISHMUNE[®]. Em resumo, esse conjunto de antígenos recombinantes de *L. infantum* (rLci6A-I + rLci7A + rLci10A-II) não permitiu a diferenciação dos soros de cães vacinados com LEISHMUNE[®] de cães infectados, porém, permitiram a diferenciação dos soros de cães vacinados com Leish-Tec[®] de cães infectados, empregando a técnica do MAPIA.

Palavras-chave: MAPIA, vacinação e diagnóstico.

SILVA, Rodrigo Araujo. EVALUATION OF RECOMBINANT ANTIGENS PRE-SELECTED FROM *Leishmania infantum* FOR REACTIVITY AGAINST VACCINATED DOGS SERA. Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2013.

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis is currently a major public health problem, and the dog the main reservoir in urban areas. The control of the disease is based on the diagnosis and euthanasia of all *Leishmania infantum*-infected dogs showing seropositivity to infection. In attempt to contain the increase in the number of cases of canine visceral leishmaniasis (CVL), two commercial vaccines have been employed as a measure of prophylaxis. The diagnostic tests recommended by the Brazilian Ministry of Health to identify the infection in dogs are the rapid test DPP-LVC[®] for screening and EIA-Biomanguinhos to confirm. Serological methods currently used are not able to differentiate infected from vaccinated dogs, resulting in the euthanasia of animals that become serologically positive due to vaccination. Seven recombinant antigens were previously screened from a cDNA and DNA library using sera from *Leishmania infantum*-infected human and dogs and employed in this study to have their reactivity tested against sera from vaccinated dogs using the screening test *multi antigen print immunoassay* MAPIA. Selected fragments were produced using *Escherichia coli* (BL21 (DE3) pLysS), which were transformed with plasmid constructions in pRSET with a histidine tag. The recombinant antigens were purified by affinity chromatography. Dogs tested negative for *Leishmania* in ELISA, culture and qPCR were vaccinated with LEISHMUNE[®] (n= 28) or Leish-Tec[®] (n= 30). Reactivity of serum from 58 vaccinated dogs was assessed against a set of seven recombinant antigens of *L. infantum*, using MAPIA. The results using in house ELISA diagnostic test containing crude *L. infantum* as antigen showed that 43.3% (13/30) of sera from Leish-Tec[®] vaccinated dogs and 96.4% (27/28) of sera from Leishmune[®] vaccinated dogs tested positive. In addition, it was observed that 54% of sera from Leishmune[®] vaccinated dogs identified at least one of the three proteins, rLci1A, rLci2B or rLci12A-II, whereas 77% of the sera from Leish-Tec[®] vaccinated dogs identify at least one of the two proteins, rLci6A-I or rLci12A-II. Since in a previous study we found that rLci1A, rLci2B, and rLci12A-II shown to be highly recognized by sera from dogs with CVL, analysis of positive reactivity against serum of vaccinated dogs were also performed without considering these proteins. Therefore, 70% of sera from Leish-Tec[®] vaccinated dogs recognized at least one of the recombinant proteins rLci6A-I, rLci7A or rLci10A-II. However, the percentage of sera from Leishmune[®] vaccinated dogs that recognized other recombinant proteins than rLci1A, rLci2B, and rLci12A-II did not exceed 4%. In summary, a set of recombinant antigens from *L. infantum* used in this study did not allow the differentiation of sera from LEISHMUNE[®] vaccinated dogs and those from infected dogs, however, together the recombinant antigens, rLci6A-I, rLci7A and rLci10A-II of *L. infantum* allowed the differentiation of sera from Leish-Tec[®] vaccinated dogs from those of infected dogs, employing the technique of MAPIA.

Keys word: MAPIA, vaccination and diagnostic.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figuras		Página
1	Desenho esquemático da estrutura predita das proteínas recombinantes de <i>L. infantum</i>	36
2	Organograma representativo da seleção realizada para inclusão dos cães no estudo.....	39
3	Expressão e purificação da proteína recombinante Lci2B.....	45
4	Reatividade de soros de cães vacinados às proteínas recombinantes de <i>L. infantum</i> impregnadas em fita de nitrocelulose.....	49
5	Análise eletroforética de extratos protéicos correspondentes às proteínas recombinantes de <i>L. infantum</i> purificadas por cromatografia.....	54
Tabelas		Página
1	Identificação das proteínas recombinantes de <i>L. infantum</i>	34
2	Características das proteínas recombinantes de <i>L. infantum</i>	35
3	Características da população de cães pertencentes aos canis.....	50
4	Características dos cães quanto aos resultados dos testes diagnósticos realizados.....	51
5	Conversão dos soros de cães vacinados contra LVC ao antígeno bruto de <i>L. infantum</i> utilizando ELISA.....	52
6	Clonagem, produção e purificação de proteínas recombinantes de <i>L. infantum</i>	55
7	Reatividade de soros de cães vacinados frente a proteínas recombinantes de <i>L. infantum</i> em MAPIA, após a vacinação.....	57
8	Reatividade de soros de cães vacinados com LEISHMUNE [®] frente a um painel de proteínas recombinantes de <i>L. infantum</i> utilizando MAPIA.....	59
9	Reatividade de soros de cães vacinados com Leish-Tec [®] frente a um painel de proteínas recombinantes de <i>L. infantum</i> em MAPIA.....	59
10	Reatividade de soros de cães vacinados com Leish-Tec [®] frente ao painel de proteínas recombinantes de <i>L. infantum</i> , exceto em relação as proteínas rLci1A, rLci2B e rLci12A-II, em MAPIA.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Aminoácido
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
DAT	Teste da aglutinação direta
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPP	<i>Dual-Path Plataform</i>
ELISA	ensaio imunoenzimático
FML	<i>Fucose mannose ligand</i>
IFN- γ	<i>Interferon gamma</i>
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactosídeo
LACEN	Laboratório central
LATED	Laboratório de Tecnologia Diagnóstica
LB	Luria Bertani
LV	Leishmaniose visceral
LVC	Leishmaniose visceral canina
MAPIA	<i>multi antigen print immunoassay</i>
MS	Ministério da Saúde
NNN	Neal, Novy, Nicolle
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
rLci	Proteína recombinante <i>Leishmania chagasi infantum</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS
Th	Linfócitos T auxiliaries

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1 EPIDEMIOLOGIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL.....	14
2.2 ETIOLOGIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL.....	14
2.3 CICLO BIOLÓGICO DA <i>LEISHMANIA</i>.....	15
2.4 ASPECTOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS DA LEISHMANIOSE VISCERAL.....	16
2.4.1 NO HOMEM.....	16
2.4.2 NO CÃO.....	17
2.5 CONTROLE DA LEISHMANIOSE VISCERAL.....	18
2.6 VACINA CONTRA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA.....	19
2.6.1 A LEISHMUNE [®]	21
2.6.2 A LEISH-TEC [®]	21
2.6.3 LIMITAÇÕES RELACIONADAS À VACINAÇÃO.....	22
2.7 DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA.....	22
2.7.1 DIAGNÓSTICO POR MÉTODOS PARASITOLÓGICOS.....	22
2.7.2 DIAGNÓSTICO POR MÉTODOS MOLECULARES.....	23
2.7.3 DIAGNÓSTICO POR MÉTODOS SOROLÓGICOS.....	24
2.7.3.1 DIAGNÓSTICO POR MÉTODOS SOROLÓGICOS COM EXTRATO DO PARASITO.....	24
2.7.3.2 DIAGNÓSTICO POR MÉTODOS SOROLÓGICOS COM ANTÍGENOS RECOMBINANTES.....	26
2.7.3.3 DIAGNÓSTICO POR ENSAIOS IMUNOCROMATOGRÁFICOS.....	28
2.7.3.4 TRIAGEM DE ANTÍGENOS POR <i>MULTI ANTIGEN PRINT IMUNOASSAY</i> (MAPIA).....	30
2.8 ANTÍGENOS RECOMBINANTES PREVIAMENTE SELECIONADOS.....	31
2.8.1 SELEÇÃO DOS 7 ANTÍGENOS RECOMBINANTES.....	33
3 OBJETIVO DO TRABALHO.....	37
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	38
4.1 ÉTICA.....	38
4.2 IDENTIFICAÇÃO DAS POPULAÇÕES DE CÃES.....	38
4.3 OBTENÇÃO DE SOROS.....	40

4.3.1 SOROS DE CÃES DE ÁREA ENDÊMICA PARA LVC.....	40
4.3.2 SOROS DE CÃES VACINADOS COM LEISHMUNE® OU LEISH-TEC®	40
4.4 ANTÍGENOS RECOMBINANTES.....	42
4.4.1 PRODUÇÃO DE ANTÍGENOS RECOMBINANTES.....	42
4.4.2 AVALIAÇÃO E PURIFICAÇÃO DOS ANTÍGENOS RECOMBINANTES.....	43
4.5 AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE DOS SOROS DE CÃES.....	46
4.6 LEITURA DO RESULTADO DAS REAÇÕES NAS FITAS DE NITROCELULOSE.....	47
4.7 ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	48
5 RESULTADOS.....	50
5.1 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO DE CÃES AVALIADOS.....	50
5.2 SELEÇÃO DOS CÃES PARA VACINAÇÃO COM LEISHMUNE® OU LEISH-TEC®	50
5.3 REATIVIDADE DOS SOROS DE CÃES ANTES E APÓS A VACINAÇÃO EM ELISA CONTENDO ANTÍGENO SOLÚVEL DE <i>L. infantum</i>.....	51
5.4 VERIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE <i>L. infantum</i>.....	52
5.5 REATIVIDADE DOS SOROS DE CÃES ANTES E APÓS A VACINAÇÃO FRENTE A ANTÍGENOS RECOMBINANTES DE <i>L. infantum</i> EM MAPIA.....	55
5.5.1 CAPACIDADE DOS SOROS DE CÃES APÓS A VACINAÇÃO IDENTIFICAREM ANTÍGENOS RECOMBINANTES DE <i>L. infantum</i>	55
5.5.2 CAPACIDADE DOS SOROS DE CÃES APÓS A VACINAÇÃO EM IDENTIFICAR CONJUNTOS DE ANTÍGENOS RECOMBINANTES DE <i>L. infantum</i>	58
6 DISCUSSÃO.....	60
7 CONCLUSÃO.....	66
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, a leishmaniose visceral (LV) afeta tanto o homem quanto o cão doméstico. O agente causal dessa doença é a *Leishmania infantum* (syn *chagasi*). Atualmente, vem sendo observado aumento no número de casos de LV registrados em várias regiões do país, inclusive em áreas onde, até o momento, casos de leishmaniose não haviam sido reportados. Esse aumento está associado ao crescente desmatamento ao redor dos centros urbanos, contribuindo para urbanização da doença, com sua expansão para grandes centros urbanos (JERONIMO *et al.*, 1994; MARZOCHI & MARZOCHI, 1994).

Em ambientes urbanos, o cão é o principal reservatório da doença, sendo considerado como principal fonte de infecção para o homem. Em áreas endêmicas, a prevalência da leishmaniose visceral canina (LVC) pode variar de 60% a 80% (NASCIMENTO MDO *et al.*, 2005; FALQUETO *et al.*, 2009; SUN *et al.*, 2012). A estratégia proposta pelo Ministério da Saúde (MS) para o controle da LV no Brasil tem como base diversas medidas: diagnóstico e tratamento precoce dos casos humanos, redução da população de flebotômíneos, identificação e eliminação de cães infectados (Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral, Ministério da Saúde, 2006). Como tentativa de conter o aumento do número de casos de LVC, duas vacinas comerciais vêm sendo empregadas como medida de controle. No entanto, até o momento, o MS do Brasil, não recomenda o emprego dessas vacinas, pois não existem evidências mostrando resultados satisfatórios em relação a proteção conferida contra a LVC (SVS/MS, 2006).

Dentre os testes diagnósticos para LVC disponíveis, existem testes parasitológicos, moleculares e sorológicos. Devido a maior simplicidade na execução, os testes sorológicos são os mais empregados. A realização do diagnóstico sorológico, seguida de eutanásia de cães infectados são medidas de contenção da LV, que apresentam limitações por diversas razões: a) os métodos diagnósticos atualmente empregados pelo MS são pouco sensíveis e laboriosos, até que ocorra a implementação do teste rápido em todo o país; b) há resistência ao emprego da eutanásia por parte dos proprietários de cães; c) ocorre remoção apenas parcial de animais infectados em áreas endêmicas, levando à manutenção do reservatório da infecção (BRAGA *et al.*, 1998); d) não é possível distinguir cães infectados de cães vacinados, sorologicamente positivos. Estudos utilizando ELISA contendo antígeno solúvel de *Leishmania* para quantificação

de IgG total em soros de cães vacinados ou cães com LVC assintomáticos ou sintomáticos, evidenciaram a impossibilidade de distinguir o grupo de cães vacinados dos infectados (DE AMORIM *et al.*, 2010).

Comumente os testes sorológicos utilizam extratos obtidos da cultura do parasito. No entanto, esta metodologia detecta a presença de anticorpos e estes muitas vezes reagem com proteínas semelhantes de outros parasitos, propiciando a ocorrência de resultados falso-positivos (DA COSTA *et al.*, 1991; BARBOSA-DE-DEUS *et al.*, 2002). Na tentativa de obter testes mais específicos, estudos vêm sendo desenvolvidos utilizando antígenos recombinantes do parasito em substituição ao antígeno total (KAUL *et al.*, 2000). Antígenos recombinantes quando testados em ELISA com amostras de soros de cães positivos para leishmaniose em cultura apresentaram sensibilidade variando entre 67,4% e 93,0% e especificidade de 36,4% a 97,2% e quando avaliados frente a soros de pacientes humanos com LV também foram obtidos resultados de sensibilidade e especificidade bem variáveis, e de 76,1 a 100% e 90,4 a 97,3%, respectivamente (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

No Brasil, o protocolo utilizado pelo MS para o diagnóstico de cães infectados por *Leishmania* eram RIFI (Reação de Imunofluorescência Indireta) para triagem e ELISA para confirmação. Recentemente, o MS passou a recomendar a substituição progressiva deste antigo para um novo protocolo diagnóstico, que consiste no uso do teste rápido baseado em antígeno recombinante como triagem e ELISA como confirmatório (CGDT-CGLAB, 2011).

Diversos estudos mostraram a necessidade de avaliação de antígenos recombinantes de *Leishmania* com o objetivo de desenvolver testes diagnósticos capazes de diferenciar dentre os cães avaliados, os animais infectados, os não infectados e os vacinados (SUNDAR, MAURYA, *et al.*, 2006; TAKAGI *et al.*, 2007). Nossa hipótese é que um conjunto específico de antígenos recombinantes será reconhecido por soros de animais vacinados. Antígenos recombinantes foram previamente selecionados a partir de bibliotecas de cDNA e DNA utilizando soros de homens e cães infectados por *L. infantum*. Dentre os antígenos recombinantes anteriormente selecionados em nosso laboratório, sete foram produzidos e purificados de forma eficiente e foram empregados no presente estudo para terem sua reatividade testada contra soros de animais vacinados, utilizando o teste de triagem *multi antigen print immunoassay* (MAPIA). Nesse estudo pretendemos identificar um conjunto de antígenos reconhecido por soros de animais vacinados. Estudo paralelo foi conduzido para identificação de

conjunto de antígenos reconhecido por soros de animais infectados. A futura comparação do resultado dos dois estudos permitirá a identificação de um conjunto específico de antígenos apenas reconhecido por animais vacinados.

Na seleção de antígenos candidatos para utilização em testes diagnósticos, o ensaio sorológico MAPIA vem sendo empregado, devido a sua capacidade de avaliar de forma simultânea diversos antígenos. MAPIA é uma técnica de aplicação de múltiplos antígenos em uma membrana de nitrocelulose por micro-aerossolização, permitindo a avaliação de diversos candidatos ao mesmo tempo com a mesma alíquota de soro (LYASHCHENKO *et al.*, 2000; BUDDLE *et al.*, 2010). O MAPIA será utilizado, para identificar o conjunto de antígenos recombinantes que será reconhecido por soros de animais vacinados, para que, futuramente, seja desenvolvido um teste diagnóstico multi-bandas com diferentes antígenos recombinantes, que permitirá a distinção entre animais vacinados e animais naturalmente infectados.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 EPIDEMIOLOGIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL

A leishmaniose está presente nos cinco continentes, sendo endêmica nas regiões tropical e subtropical. Estima-se que 2 milhões de novos casos humanos ocorram anualmente no mundo, dos quais, 1,5 milhões de casos são de leishmaniose cutânea e 500 mil de leishmaniose visceral. A leishmaniose apresenta características distintas de acordo com a forma clínica da doença, podendo ocorrer a forma cutânea (BAILEY & LOCKWOOD, 2007), cutâneo-mucosa e visceral (DESJEUX, 2004). Independente do tipo da leishmaniose acredita-se que o número de pessoas infectadas assintomáticas no mundo ultrapasse 12 milhões (DESJEUX & ALVAR, 2003; WHO, 2007). Em 2006, foram registrados 62 mil casos de leishmaniose, os países que apresentaram o maior número de casos foram Brasil, Colômbia, Paraguai, Venezuela, Panamá, Equador e Peru. Nestes países, ocorreram mais de 5 mil casos de LV, que é a forma mais letal da doença, sendo que o Brasil foi o país mais afetado (WHO, 2007).

Ao longo dos anos, tem sido observado um aumento do número de casos de LV no Brasil, associado ao processo de urbanização da doença. Entre os anos de 2001 a 2006, foram relatados casos de LVC em regiões onde nunca havia sido registrados casos (SVS/MS, 2006). Alguns fatores sociais são associados a maior ocorrência de LVC como: baixa renda familiar, desconhecimento do proprietário sobre o inseto vetor, a permanência do cão no quintal e a não realização do exame sorológico para LV (COURA-VITAL *et al.*, 2011).

2.2 ETIOLOGIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL

A LV é uma doença endêmica causada por protozoários pertencentes ao complexo Donovan, que, anteriormente, compreendiam as espécies *Leishmania donovani*, *Leishmania infantum* e *Leishmania chagasi* (LAINSON *et al.*, 1987). Recentemente, foi demonstrado que *L. chagasi* é geneticamente idêntica a *L. infantum*, sendo consideradas, a partir de então, como a mesma espécie do parasito (MAURICIO *et al.*, 1999; MAURICIO *et al.*, 2000; LUKES *et al.*, 2007). Embora com menor frequência, a LV pode ser causada pela *Leishmania amazonensis* (BARRAL *et al.*,

1991) e *Leishmania tropica* (ALBORZI *et al.*, 2006). No Velho Mundo, as espécies de *Leishmania* que causam a LV são *Leishmania infantum* e *L. donovani* (NICOLLE, 1908; CUNHA; CHAGAS, 1937). *L. infantum* é a espécie causadora de LV na Bacia Mediterrânea, região central e sudoeste da Ásia e *L. donovani* é causadora da doença no subcontinente indiano e na África. Na América do Sul, a espécie causadora da LV é a *L. infantum* (MAURICIO *et al.*, 1999; MAURICIO *et al.*, 2000; DESJEUX *et al.*, 2001; LUKES *et al.*, 2007).

2.3 CICLO BIOLÓGICO DA *LEISHMANIA*

O ciclo de vida da *Leishmania* é considerado heteroxênico, apresentando dois estágios em hospedeiros distintos: o flebótomo vetor (Diptera: *Phlebotominae*, espécies dos gêneros *Lutzomyia* e *Phlebotomus*) e o hospedeiro mamífero. A transmissão da *Leishmania* acontece quando formas promastigotas infectantes (metacíclicas) são regurgitadas pelas fêmeas dos insetos vetores, durante o repasto sanguíneo na pele do hospedeiro vertebrado. No hospedeiro, as promastigotas são fagocitadas por macrófagos, onde se transformam em amastigotas, formas intracelulares obrigatórias. Os flebátomos fêmeas tornam-se vetores da leishmaniose ao se alimentarem de sangue de um indivíduo infectado e ingerirem macrófagos parasitados. As formas amastigotas se transformam em promastigotas, que se desenvolvem aderidas à parede do intestino do flebátomo. Após se transformarem na forma infectante, metacíclica, os parasitos são regurgitados para o aparelho bucal onde são inoculados durante o repasto sanguíneo do flebátomo fêmea (BATES & ROGERS, 2004; MS, 2009; NEVES *et al.*, 2005).

A LV apresenta um ciclo antroponótico e um zoonótico. O ciclo antroponótico ocorre com a transmissão do parasito a partir da picada do inseto vetor de um homem infectado para outro não infectado. Excepcionalmente, a transmissão pode ocorrer através da partilha de agulhas hipodérmicas entre seres humanos infectados e não infectados. O ciclo zoonótico ocorre quando o cão ou um animal silvestre serve de reservatório para o parasito. O ciclo zoonótico é considerado endêmico em vários países da Bacia Mediterrânea, em países do Oriente Médio e no Brasil (DESJEUX *et al.*, 2001), sendo o cão considerado o principal reservatório nos casos urbanos e periurbanos (DEANE & DEANE, 1954; LAINSON *et al.*, 1987; MORENO & ALVAR, 2002). Após a infecção, o cão apresenta intenso parasitismo cutâneo, o que sugere ser a pele desses animais a fonte de infecção para flebotomíneos vetores (NUNES, 1988).

Em países do Velho Mundo, a transmissão do parasito a partir dos animais silvestres ou domésticos para o homem ocorre pela picada do flebótomo das espécies *Phlebotomus perniciosus*, *P. ariasi*, *P. perfiliewi* e *P. neglectus*. Em países do Novo Mundo, essa transmissão ocorre através da picada do flebótomo das espécies *Lutzomyia longipalpis* ou *Lutzomyia cruzi* (GRIMALDI *et al.*, 1989; GRISARD *et al.*, 2000). No Brasil a espécie *Lutzomyia longipalpis* é a principal espécie transmissora da *L. infantum*, no entanto, no estado de Mato Grosso do Sul a espécie *Lutzomyia cruzi*, também vem sendo identificada como responsável pela transmissão do parasito (LAINSON *et al.*, 1977; BRASIL, 2003).

2.4 ASPECTOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS DA LEISHMANIOSE VISCERAL

2.4.1 NO HOMEM

O desenvolvimento da infecção por *Leishmania* é influenciado pela espécie do parasito, pelas características genéticas do hospedeiro, assim como sua idade e estado nutricional. A LV pode se estabelecer nas formas assintomática, oligossintomática ou polissintomática, essa última referida como a forma clássica da LV que pode ser fatal, caso o tratamento específico não seja aplicado (MURRAY, 2005).

Geralmente, os sintomas apresentados são perda de peso, febre, sangramento espontâneo, esplenomegalia, hepatomegalia e linfadenomegalia, podendo também desenvolver anemia (DESJEUX, 2004). Além disso, pacientes com a forma clássica da enfermidade podem apresentar eritropenia, leucopenia e plaquetopenia, hipergamaglobulinemia e hipoalbuminemia (HANDMAN, 2001; GUERIN *et al.*, 2002).

Após o desenvolvimento de LV, a maioria dos pacientes recebem tratamento farmacológico específico, com antimonial pentavalente ou anfotericina B. Porém, uma parte dos pacientes não apresenta os sintomas da doença e controla a infecção (COOK, 1993). Por outro lado, parte dos pacientes morre mesmo após o tratamento (SANTOS *et al.*, 2002). Alguns pacientes podem voltar a apresentar os sinais e sintomas da doença, mesmo após a cura clínica, que pode ser decorrente de recaída ou re-infecção da doença (GANGNEUX, 1999).

Pacientes com LV apresentam no soro elevada titulação de anticorpos anti-*Leishmania* (NEOGY *et al.*, 1987). Existem fortes evidências de que essa elevada

titulação de anticorpos no soro de pacientes com LV está associada à patogênese. Altos níveis de imunoglobulinas como IgG, IgM, IgE e subclasses de IgG foram identificados em indivíduos doentes (GHOSH *et al.*, 1995; ATTA *et al.*, 1998; RYAN *et al.*, 2002; ATTA *et al.*, 2004). Além disso, já é conhecido que IgG não só não promove a proteção, como pode contribuir para a progressão da doença (MILES *et al.*, 2005).

Diferente do observado em diversos modelos murinos, os dados obtidos em pacientes com LV não demonstram existir dicotomia (Th1/Th2) entre o tipo de resposta imune dependente de células T. A associação entre expressão de citocinas como IFN- γ , IL-2 e IL-12, que estão relacionadas com resposta do tipo Th1, e a resistência à doença não foi claramente comprovada em humanos com LV (LOUZIR *et al.*, 1998; ANTONELLI *et al.*, 2004; KHALIL *et al.*, 2005). Elevados níveis de IFN- γ , IL-2, IL-4 e IL-10 foram detectados em pacientes com LV, durante a fase ativa da doença e mesmo após a cura, sugerindo a coexistência de uma resposta Th1 e Th2 nesses pacientes (CALDAS *et al.*, 2005) e que a progressão ou cura da LV é determinada pelo equilíbrio entre as duas populações de células T (SHARMA & SINGH, 2009).

2.4.2 NO CÃO

Em áreas endêmicas, as taxas de infecção por *Leishmania* em cães podem chegar a valores entre 60 a 80% (BERRAHAL *et al.*, 1996; QUINNELL *et al.*, 2001; SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2001; LACHAUD *et al.*, 2002). Entretanto, nem todos os cães apresentam doença clínica aparente e os cães doentes podem apresentar diferentes sinais clínicos com intensidades variadas (BERRAHAL *et al.*, 1996; SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2001; LEONTIDES *et al.*, 2002). Foram descritas três formas de progressão da infecção por *L. infantum*. Cerca de 46% dos cães infectados adquirem a infecção e desenvolvem a doença imediatamente, outros 44% dos cães desenvolvem a doença tardiamente e 10% dos cães infectados não a desenvolvem (LANOTTE *et al.*, 1979; POZIO *et al.*, 1981; MORENO & ALVAR, 2002). Assim como no homem, características como fatores genéticos, idade e estado nutricional também podem influenciar a progressão da LVC (MORENO *et al.*, 1999; QUINNELL *et al.*, 2003; ALVAR *et al.*, 2004).

Os achados clínicos em cães que apresentam a forma sintomática da LVC são principalmente dermatite esfoliativa, ulcerativa, nodular e pustular, linfadenomegalia, alterações nos olhos como uveíte, conjuntivite, ceratoconjuntivite seca e blefarite, além

de palidez de membranas mucosas, aumento do baço, caquexia e febre. Também podem ser observadas outras manifestações clínicas como: doença renal com proteinúria, insuficiência renal crônica, glomerulonefrite, nefrite túbulo-intersticial e amiloidose, além de lesões ósseas e articulares como poliartrite (CIARAMELLA *et al.*, 1997; FERRER, 1999; KOUTINAS *et al.*, 1999; BANETH & AROCH, 2008). Além disso, frequentemente são observadas alterações laboratoriais como eritropenia, plaquetopenia, neutrofilia, hipoalbuminemia e hipergamaglobulinemia (CIARAMELLA *et al.*, 1997; KOUTINAS *et al.*, 1999).

A maioria dos cães que desenvolve a enfermidade e que é submetida à quimioterapia específica, apresenta desaparecimento das manifestações clínicas, redução da carga parasitária e passa a exibir resposta imune celular específica. Entretanto, estes animais apresentam frequentemente recaídas após a interrupção do tratamento (MORENO *et al.*, 1999; RHALEM *et al.*, 1999; BANETH & SHAW, 2002; FRANCINO *et al.*, 2006), mesmo na ausência de re-infecção (SLAPPENDEL & TESKE, 1997). Apesar da possibilidade de controle dos sinais clínicos da doença nos animais tratados, o parasito *Leishmania* não é eliminado totalmente, e o cão continua funcionando como reservatório, o que permite que outros flebotomíneos adquiram o protozoário (ALVAR *et al.*, 1994), mantendo o ciclo de transmissão. Em animais infectados e tratados, cepas do parasito resistentes ao tratamento podem ser eventualmente selecionadas e transmitidas ao homem, causando sérios problemas para o controle da LV (GRAMICCIA *et al.*, 1992).

2.5 CONTROLE DA LEISHMANIOSE VISCERAL

Atualmente, a estratégia para o controle da LV tem como base a identificação e tratamento precoce de pacientes humanos, identificação e eliminação dos cães infectados, combate ao inseto vetor e desenvolvimento de atividades educacionais (Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral, Ministério da Saúde, 2006).

Existe dificuldade na otimização das ações de controle preconizadas pelo MS, devido a baixa identificação de cães infectados que ocorre em decorrência de diversos fatores: i) 10% dos animais apresentam a forma assintomática da LVC, ii) demora na realização do diagnóstico, iii) custo elevado das técnicas empregadas, iv) necessidade de infraestrutura para realização de ELISA e RIFI, v) falhas de sensibilidade e

especificidade dessas técnicas diagnósticas utilizadas (BADARO *et al.*, 1986; MOREIRA *et al.*, 2004; PORROZZI *et al.*, 2007; FALQUETO *et al.*, 2009). Estudos avaliaram o programa de controle para LVC, como MOREIRA e colaboradores (2004) testaram amostras de soro de cães em ELISA. Eles mostraram que entre o diagnóstico e a remoção dos cães houve menor tempo em comparação ao tempo que se leva para realização do RIFI, tendo permitido a avaliação de maior número de cães em menor tempo. Entretanto, nesse estudo, uma parte elevada dos cães testados, 43,8 a 49,8% em cada avaliação eram imigrantes e dentre estes animais 15% já tinham infecção por *Leishmania*. Além disso, durante o período do estudo não houve diminuição da taxa de incidência anual de LVC que era de 11,8 casos por 100 cães. Diferentes métodos de controle da LVC foram avaliados por DA SILVA e colaboradores (2013) frente a 144 soros de cães de área endêmica. Neste estudo foram avaliados o IFAT e ELISA contendo antígeno de *L. infantum*, IFAT e ELISA contendo antígeno de *L. major* e o ensaio imunocromatográfico. As sensibilidades dos testes serológicos foram de 93%, 100%, 73%, 60% e 93%, com as especificidades de 87%, 92%, 77%, 96% e 92% para o ensaio ELISA-*L. major*, ELISA-*L. infantum*, IFAT-*L. major*, IFAT-*L. infantum* e o ensaio imunocromatográfico, respectivamente. O ELISA-*L. infantum* apresentou os melhores resultados para o diagnóstico da LVC, mas os autores apontaram o ensaio imunocromatográfico como alternativa útil uma vez que proporciona o diagnóstico simples e rápido sem a necessidade de um laboratório especializado.

Na tentativa de diminuir o tempo entre o diagnóstico e eutanásia dos animais positivos, diminuir o custo das técnicas empregadas e estrutura necessária para o diagnóstico da LVC o MS adotou o uso do teste rápido baseado em antígeno recombinante como triagem e ELISA como confirmatório (CGDT-CGLAB, 2011). GRIMALDI e colaboradores (2012) observaram baixa sensibilidade (47%, 28/60) e elevada sensibilidade (98%, 59/60), do teste rápido baseado em antígeno recombinante preconizado pelo MS, quando avaliado frente a soros de cães assintomáticos e sintomáticos, respectivamente.

2.6 VACINA CONTRA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

Uma estratégia alternativa para o controle da LVC consiste no uso de uma vacina ou método imunoterápico eficaz (TESH, 1995; PALATNIK-DE-SOUSA *et al.*, 2009). Há mais de três décadas, pesquisadores vêm tentando desenvolver uma vacina

contra a LVC (EVANS & KEDZIERSKI, 2012). Porém, para que sua utilização seja recomendada pelo MS, a vacina contra LVC tem que prevenir a infecção canina ou a transmissão do parasito do cão para o inseto vetor, para redução da incidência da doença humana (DYE, 1996; MORENO & ALVAR, 2002).

Diversas estratégias vêm sendo utilizadas para o desenvolvimento de uma vacina capaz de induzir um perfil de resistência à LV no cão. Dentre elas, a utilização do parasita vivo ou morto, antígenos purificados, antígenos recombinantes, bactérias vivas expressando antígenos recombinantes e plasmídeos codificando antígenos (BORJA-CABRERA *et al.*, 2004; GRADONI *et al.*, 2005; NOGUEIRA *et al.*, 2005; GIUNCHETTI *et al.*, 2007; RODRIGUEZ-CORTES *et al.*, 2007; MIRO *et al.*, 2008). As vacinas que vêm sendo utilizadas para prevenção da LVC são a vacina de Ligante Fucose-Manose [(*Fucose Mannose Ligand*-FML)/saponina], comercialmente conhecida como LEISHMUNE[®] (BORJA-CABRERA *et al.*, 2002), a vacina com base em proteína A2/saponina, comercialmente conhecida como Leish-Tec[®] (FERNANDES *et al.*, 2008), além da vacina com base em fatores secretados e/ou excretados de *L. infantum*, ainda em fase de testes (LEMESRE *et al.*, 2007).

As vacinas LEISHMUNE[®] e Leish-Tec[®] vêm sendo utilizadas no Brasil. Apesar dessas duas vacinas encontrarem-se disponíveis no mercado, liberadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, o MS não recomenda sua utilização (SVS/MS, 2006). Testes utilizando modelo canino ainda não evidenciaram a eficácia da vacina em bloquear a transmissão do parasito (BORJA-CABRERA *et al.*, 2010; DE AMORIM *et al.*, 2010). Além do mais, o MS exige e recomenda a realização de estudos de fase 3 antes da liberação dessas vacinas como forma de controle da LVC no Brasil (SVS/MS, 2006).

A utilização de adjuvantes parece ter efeito potencializador da resposta a imunógenos (REY-LADINO *et al.*, 2011). As duas vacinas para LVC, LEISHMUNE[®] e Leish-Tec[®] apresentam como adjuvante em sua composição, saponina. Essa molécula é da família dos glicosídeos naturais de esteroide ou triterpeno, conhecida por ativar o sistema imune de mamíferos, estimulando linfócitos T citotóxicos contra antígenos exógenos, assim como linfócitos T CD4 do tipo Th1 (SUN *et al.*, 2009).

2.6.1 LEISHMUNE®

A vacina LEISHMUNE®, produzida pela empresa FORT DODGE, é considerada uma vacina de subunidades de *Leishmania*, produzida a partir do isolamento de um complexo glicoprotéico do extrato purificado de promastigotas de *L. donovani*, denominada FML. Esta fração é composta de 29% de açúcares neutros, 44% de carboidratos, 11% de proteína e hexosaminas. Dentre os açúcares neutros foram identificados: fucose (10%), manose (47%), glicose (30%) e galactose (12%) (PALATNIK *et al.*, 1989).

Em uma área endêmica, 26 cães foram imunizados com LEISHMUNE® e 11 meses após a vacinação, foram avaliados por imunohistoquímica em amostras de pele e não apresentaram parasitismo. Além disso, utilizando PCR, não foi detectado DNA de *Leishmania* em 29 amostras de sangue periférico e 18 amostras de linfonodo (NOGUEIRA *et al.*, 2005). Também foi avaliada a utilização da vacina LEISHMUNE® em conjunto com quimioterápicos, e observou-se a eliminação da sintomatologia clínica e da presença de DNA de *Leishmania* em amostras de linfonodo de 35 cães, 8 meses após o término da vacinação. Porém, 4,5 anos após o término do tratamento, não houve diferença entre o número de cães mortos pertencentes ao grupo que não recebeu o imunoterápico e o grupo de cães que recebeu a vacinação como tratamento (BORJA-CABRERA *et al.*, 2010).

2.6.2 A LEISH-TEC®

A vacina Leish-Tec®, produzida pela HERTAPE CALIER, é uma vacina produzida com base em antígeno recombinante. Esse antígeno é um fator de virulência de *Leishmania*, associado à capacidade de visceralização do parasito. Apesar de ter sido inicialmente identificada em *L. donovani*, o antígeno A2 é uma proteína encontrada em formas amastigotas de várias espécies de *Leishmania* (CHAREST & MATLASHEWSKI, 1994).

Promastigotas de *L. donovani knockout* para o gene que codifica a proteína A2 apresentaram baixa proliferação em macrófagos de camundongos BALB/c. Além disso, a introdução do gene A2 de *L. donovani* em *L. major* resultou no aumento significativo do tamanho do baço e do número de parasitas neste órgão em camundongos infectados.

Esses achados reforçam o papel dessa proteína na visceralização da doença (ZHANG & MATLASHEWSKI, 1997).

Em cães vacinados com Leish-Tec[®] e, posteriormente, infectados apresentaram sinais clínicos para LVC apenas 28,5% (2/7), sendo que na medula óssea e sangue periférico da maioria desses cães foi detectado DNA do parasito. Por outro lado, 71,5% (5/7) dos cães não vacinados e infectados apresentaram pelo menos um sinal clínico característico de LVC. Segundo FERNANDES e colaboradores (2008), os cães vacinados com Leish-Tec[®] avaliados por testes de ELISA e RIFI com antígeno solúvel de *Leishmania* apresentaram reatividade sorológica semelhante a cães não infectados.

2.6.3 LIMITAÇÕES RELACIONADAS À VACINAÇÃO

No momento, não há evidências que comprovem que a vacinação promova o bloqueio da transmissão da *Leishmania* do cão para o inseto vetor, uma das estratégias preconizadas pelo MS para o controle da LV. Sendo assim, o emprego de um esquema de vacinação para populações caninas pode acarretar em um problema adicional às ações de vigilância e controle da LV, já que não existem testes diagnósticos sorológicos capazes de diferenciar animais naturalmente infectados de animais vacinados (KEDZIERSKI *et al.*, 2006; SVS-MS, 2006).

Estudos realizados em Araçatuba e Belo Horizonte, relataram diminuição na incidência de cães e humanos infectados, em 3 anos após a introdução da vacina LEISHMUNE[®], e observaram que o aumento do número de cães vacinados estava relacionado à diminuição do risco de transmissão da LV para os seres humanos (PALATNIK-DE-SOUSA *et al.*, 2009). No entanto, estudos evidenciaram que não houve diferença em relação à mortalidade quando foram comparados o grupo de cães que recebeu a vacina LEISHMUNE[®], àquele que não recebeu a vacina, após 4,5 anos do término do tratamento (BORJA-CABRERA *et al.*, 2010).

2.7 DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

2.7.1 DIAGNÓSTICO POR MÉTODOS PARASITOLÓGICOS

As características clínicas da LVC são muito parecidas com as de outras doenças, pois os achados clínicos são muitas vezes confundidos com outras doenças

coendêmicas sendo, portanto, inconclusivos para o diagnóstico. A presença de manifestações clínicas de leishmaniose juntamente com a demonstração de formas amastigotas do parasita por exame microscópico de aspirado de tecidos como baço, fígado, medula óssea ou linfonodos é considerado como padrão ouro para o diagnóstico da LVC (HERWALDT, 1999; TAFURI *et al.*, 2001). Porém, a análise direta por microscopia ótica de amostras de aspirado de medula óssea ou linfonodo pode produzir resultados falso-negativos devido à baixa carga parasitária que ocorre principalmente em cães assintomáticos (CHULAY & BRYCESON, 1983), nestes animais a sensibilidade deste método é menor que 30% (SARIDOMICHELAKIS *et al.*, 2005).

Outro método de diagnóstico parasitológico é a cultura *in vitro* de fragmentos de tecidos ou aspirados em meio bifásico (PALMA & GUTIERREZ, 1991). A utilização de cultura de aspirado esplênico, linfonodo ou medula óssea aumentam a sensibilidade do teste em quase 20%, porém, a sensibilidade ainda assim é baixa, além disso, há demora na obtenção do resultado e alta frequência de contaminação durante o cultivo, justificando o uso limitado deste método no diagnóstico de rotina para LVC (ALVAR *et al.*, 2004).

2.7.2 DIAGNÓSTICO POR MÉTODOS MOLECULARES

A utilização da reação em cadeia da polimerase (PCR) melhora a sensibilidade e a especificidade do diagnóstico parasitológico da LVC. Diversos tecidos caninos, incluindo sangue, linfonodo, medula óssea e baço estão sendo usados para a detecção do parasito pela PCR (MANNA *et al.*, 2004). A sensibilidade do protocolo de PCR está correlacionada com o número de cópias presente em regiões do DNA do parasito. Porém, o tecido utilizado para o diagnóstico por PCR também pode influenciar na sensibilidade da técnica, uma vez que a carga parasitária não é igualmente distribuída em todos os tecidos. A PCR para uma região específica do DNA genômico de *L. infantum* mostrou sensibilidade de 86% em amostras de aspirado de baço ou linfonodo e sensibilidade de 92% em amostras de esfregaço da conjuntiva. No entanto, utilizando-se amostras de sangue periférico ou da fração contendo células brancas do sangue dos mesmos cães apenas 17% e 57%, respectivamente, foram positivos (STRAUSS-AYALI *et al.*, 2004). A detecção por PCR de alvos no kDNA provou ser mais sensível do que a do DNA genômico de *Leishmania* em amostras do sangue periférico de cão (LACHAUD *et al.*, 2002; NASEREDDIN *et al.*, 2006).

Apesar da elevada sensibilidade e especificidade, a utilização de métodos moleculares para o diagnóstico da LVC apresenta limitações para seu uso em inquéritos epidemiológicos pelo elevado custo, disponibilidade de reagentes e equipamentos sofisticados necessários para sua utilização (DA SILVA *et al.*, 1997). Em países como o Brasil, onde a eliminação de cães é uma importante medida para o controle da transmissão da LV, é essencial a utilização de uma técnica diagnóstica rápida, barata e precisa no diagnóstico em programas de vigilância da LV (CARVALHO *et al.*, 2002; SCALONE *et al.*, 2002). Sendo assim, esforços têm sido feitos para evitar métodos de coleta de tecidos invasivos ou técnicas diagnósticas onerosas, buscando-se abordagens sorológicas para triagem de cães em áreas endêmicas.

2.7.3 DIAGNÓSTICO POR MÉTODOS SOROLÓGICOS

2.7.3.1 DIAGNÓSTICO POR MÉTODOS SOROLÓGICOS COM EXTRATO DO PARASITO

O diagnóstico sorológico baseia-se na presença de uma resposta humoral específica contra o agente. Uma grande variedade de métodos sorológicos está disponível para o diagnóstico da LVC, apresentando variações em relação à sensibilidade e especificidade. Os testes sorológicos mais comumente empregados para o diagnóstico da doença são a RIFI e o teste de aglutinação direta (DAT), que utilizam *Leishmania* obtida de cultura como fonte de antígeno. Além disso, o elevado número de metodologias empregadas nos ensaios de RIFI e ELISA, que podem utilizar desde extrato bruto do parasito, uma fração purificada do parasito ou uma determinada proteína recombinante purificada, faz com que os valores de sensibilidade e especificidade sejam variados mesmo quando o mesmo tipo de ensaio é utilizado. As maiores desvantagens do DAT são a necessidade de múltiplas pipetagens, longo tempo de incubação e o limitado e elevado custo de produção do antígeno bruto de *Leishmania*. Além disso, cerca de 20-30% dos indivíduos saudáveis que vivem nas áreas endêmicas apresentam resultado positivo no DAT, e uma doença com sintomatologia similar pode ser confundida com LV (SUNDAR, SINGH, *et al.*, 2006; SRIVASTAVA *et al.*, 2011).

No Brasil, RIFI e ELISA de sangue colhido em papel de filtro consistem nos métodos diagnósticos que vêm sendo utilizados e, até dezembro de 2011, foram

preconizados pelo MS para identificação de cães positivos. Estas técnicas diagnósticas são pouco sensíveis e laboriosas, com identificação reduzida de cães infectados. Além disso, há atraso na entrega dos resultados pelos LACEN, o que leva à demora na retirada dos cães positivos para LVC das áreas endêmicas. Esses fatos favorecem a manutenção da fonte de transmissão da doença (BRAGA *et al.*, 1998) em áreas endêmicas. Outro ponto negativo no uso desses ensaios sorológicos no diagnóstico da LVC é a obtenção de resultados falso-positivos devido à baixa especificidade com possibilidade de ocorrência de reação cruzada com soros de cães com outras patologias, como leishmaniose tegumentar, doença de Chagas, erliquiose, babesiose ou toxoplasmose (EL AMIN *et al.*, 1986; HARITH *et al.*, 1987; DA COSTA *et al.*, 1991; BARBOSA-DE-DEUS *et al.*, 2002).

No Brasil, os testes de ELISA e RIFI produzidos por BIOMANGUINHOS/FIOCRUZ/MS eram utilizados, até pouco tempo, em LACENs para o diagnóstico da LVC. A sensibilidade e especificidade desses testes foram avaliadas utilizando amostras de sangue (soro e eluato) de cães parasitologicamente positivos em cultura de biopsia de pele. A sensibilidade e especificidade dos testes foram, respectivamente, de 100% e 96,6% para o ELISA e 100% e 65,5% para o RIFI (cut-off de 1:40). No entanto, quando amostras foram eluídas a partir de papel de filtro, o RIFI apresentou acentuada perda da sensibilidade (22,2%) e aumento da especificidade para 97,0% (FIGUEIREDO *et al.*, 2010). Outro estudo também avaliou a sensibilidade e especificidade desses mesmos kits produzidos por BIOMANGUINHOS/FIOCRUZ/MS frente a soros de cães positivos e negativos para LVC em cultura de aspirado de medula óssea. Quando testados separadamente, ambos os testes não apresentaram elevado percentual de sensibilidade, sendo de 72% (18/25) para o ELISA e 68% (17/25) para o RIFI. A especificidade obtida foi de 87,5% (14/16) para ambos os kits. Quando os testes foram realizados em paralelo, apesar da elevada sensibilidade (92,0%), foi observada uma redução na especificidade (75,0%). Por outro lado, quando realizados, consecutivamente, os ensaios mostraram uma baixa sensibilidade (48%) e uma elevada especificidade de 100% (LIRA *et al.*, 2006).

Estudo conduzido com 234 cães domiciliados, em área endêmica para LVC, avaliou a utilização do ELISA, RIFI e DAT para o diagnóstico da LVC. No estudo, cães foram avaliados parasitologicamente para presença de amastigotas de *Leishmania* em amostras de pele e punção de medula óssea. Além disso, foram incluídos no estudo cães negativos para LVC que apresentavam infecção por outro parasito (*Trypanosoma cruzi*,

Toxoplasma gondii, *Ehrlichia canis* e *L. brasiliensis*). A sensibilidade no RIFI foi de 72% e no ELISA de 95%. Porém, foi observada especificidade de 52% e 64%, respectivamente, e ambos os testes apresentaram reação cruzada com soros de cães infectados por *T. cruzi*, *E. canis* e *L. brasiliensis*. O DAT apresentou elevada sensibilidade (93%) e especificidade (95%), porém, também apresentou reação cruzada com soro de cão infectado por *E. canis* (FERREIRA EDE *et al.*, 2007).

A busca por testes com sensibilidade e especificidade elevadas é necessária para evitar a ocorrência de resultados falso negativos e falso positivos que podem levar à ocorrência de equívocos nas ações de controle, respectivamente, manutenção de cães que transmitem a doença e eutanásia desnecessária de cães saudáveis. Sendo assim, vem sendo evidenciada em diversos trabalhos, a utilização de antígenos recombinantes de *Leishmania* em ensaios de ELISA e em ensaios imunocromatográficos para diferenciar cães infectados de cães não infectados como alternativa para o diagnóstico (SUNDAR, SINGH, *et al.*, 2006; TAKAGI *et al.*, 2007).

2.7.3.2 DIAGNÓSTICO POR MÉTODOS SOROLÓGICOS COM ANTÍGENOS RECOMBINANTES

A evolução da engenharia genética e das técnicas bioquímicas tornou possível a obtenção de grandes quantidades de antígenos recombinantes de forma padronizada e reprodutível. Tentativas têm sido feitas para substituir o antígeno bruto de *Leishmania* utilizado nos testes, por proteínas recombinantes purificadas (DOS SANTOS *et al.*, 1987; KAUL *et al.*, 2000) com objetivo de aumentar a especificidade dos testes sorológicos para o diagnóstico da LVC.

A partir dos avanços tecnológicos, proteínas de *Leishmania* e seus fragmentos têm sido clonados e produzidos em bactérias para serem usados isoladamente ou em conjunto como alvo em ensaios de diagnóstico. A proteína rA2 expressa em amastigotas de *L. donovani* foi avaliada em ELISA para diagnosticar humanos e cães com resultados positivos em RIFI em áreas endêmicas no Brasil. Dentre os soros de cães positivos, com confirmação por RIFI ou teste parasitológico, 87% dos soros apresentaram anticorpos anti-rA2 em ELISA com a proteína recombinante. No entanto, apesar de não ter sido observada reação cruzada dos soros de cães com erliquiose, riquetsiose, doença de Chagas e tumor venéreo transmissível com o antígeno rA2, a utilização de soros

positivos em RIFI pode estar mascarando a sensibilidade real do teste (CARVALHO *et al.*, 2002).

Para diagnóstico de LVC, a técnica de ELISA utilizando os antígenos recombinantes rA2 de *L. donovani*, rK26 e rK39 de *L. infantum* foram comparados com o ELISA utilizando o extrato bruto do parasito, tendo como padrão ouro o RIFI. Protocolos de ELISA utilizando os antígenos rK26, rK39 e rA2 foram testados frente a soros de cães sintomáticos e apresentaram sensibilidade de 94%, 100% e 70%, respectivamente. Enquanto o ELISA com extrato bruto do parasito apresentou 88% de sensibilidade. No entanto, quando foram usados soros de cães assintomáticos na avaliação a sensibilidade foi de 66% para os antígenos rK26 e rK39, de 88% para rA2 e 30% para ELISA com extrato bruto de parasito. A especificidade dos testes foi de 90%, 85%, 96% e 87% para o ELISA contendo rK26, rK39, rA2 e extrato do parasito, respectivamente (PORROZZI *et al.*, 2007).

Em um estudo multicêntrico em cinco regiões endêmicas da Itália, foi observado que cães assintomáticos apresentaram elevados níveis de anticorpos anti-rK39. Desta forma, o ELISA com rK39 apresentou resultados similares aos obtidos no RIFI quanto ao diagnóstico de LVC, logo o ELISA com a proteína recombinante rK39 é uma alternativa ao RIFI quando um grande número de amostras forem analisadas (SCALONE *et al.*, 2002). Um outro estudo mostrou que para o diagnóstico de LVC, o ELISA utilizando rK9, rK26 e rK39, apresentou elevada sensibilidade (95%) e especificidade (100%), quando avaliado contra soros de cães parasitologicamente positivos em comparação com soros de cães parasitologicamente e sorologicamente negativos, tendo o RIFI como padrão ouro (ROSATI *et al.*, 2003).

Um ELISA utilizando a proteína quimérica rK28, composta pelos principais epítomos reativos das proteínas rK9, rK26 e rK29, foi avaliado frente a um painel de soros humanos e caninos caracterizados parasitologicamente e/ou sorologicamente positivos no RIFI. O ELISA recombinante apresentou especificidade de 99% para ambos os grupos de soros, a sensibilidade com soros de cães com LV foi de 96% e de soros humanos com LV foi de 82%, usando o RIFI como padrão ouro (BOARINO *et al.*, 2005).

Diversos estudos utilizam soros de cães sorologicamente positivos com a finalidade de avaliar o desempenho de um teste sorológico para o diagnóstico da LVC. No entanto, a utilização de painéis de soros de cães bem caracterizados, não apenas por métodos sorológicos, mas também parasitológicos e moleculares, além da utilização de

soros positivos para outras patologias, permitem a determinação da sensibilidade e especificidade reais dos testes avaliados (ALVES *et al.*, 2012).

Porém esse teste é de realização laboriosa, necessita de técnicos e aparelhos especializados (GOMES, *et al.*, 2008), acarretando demora na obtenção dos resultados. Assim, é importante o desenvolvimento de ensaios sorológicos rápidos com antígenos recombinantes que são mais práticos e podem ser aplicados de forma mais ampla e menos onerosa (LEMOS *et al.*, 2008; DE LIMA *et al.*, 2010).

2.7.3.3 DIAGNÓSTICO POR ENSAIOS IMUNOCROMATOGRÁFICOS

Ensaios sorológicos como ELISA, RIFI e DAT são menos invasivos que os ensaios parasitológicos e menos onerosos que os ensaios moleculares, porém também necessitam que as amostras sejam coletadas e enviadas aos laboratórios. Assim, no laboratório as amostras são incorporadas na rotina diagnóstica, demandando tempo para sua realização e dificultando a rapidez e agilidade na execução do diagnóstico. A utilização de ensaios imunocromatográficos como métodos de diagnóstico tem como principais vantagens: serem métodos rápidos, realizados em torno de 15 minutos, fáceis de serem executados e não requererem equipamentos caros. Desta forma, esta metodologia torna-se ideal para ser aplicada como diagnóstico de triagem para cães e humanos (DELGADO *et al.*, 2001; MOHEBALI *et al.*, 2004). Como dito anteriormente, apesar dos métodos empregados, atualmente, para o diagnóstico de cães infectados por *Leishmania* serem RIFI e ELISA, o MS recomendou a partir de dezembro de 2011 a substituição desse protocolo diagnóstico pela utilização de teste rápido imunocromatográfico com antígeno recombinante rK28 para triagem e o *kit* ELISA produzido por BIOMANGUNHOS/FIOCRUZ como confirmatório (CGDT-CGLAB, 2011).

Com elevada frequência estudos utilizam apenas soros de animais parasitologicamente positivos e soros de animais negativos de área não endêmica para avaliar os testes diagnósticos (LEMOS *et al.*, 2008). Estudos foram conduzidos na Índia e no Nepal, regiões endêmicas para LV, com o objetivo de comparar a eficácia de um teste rápido de fluxo lateral no formato *dipstick* utilizando a proteína recombinante rK39 e o DAT, frente a soros de animais parasitologicamente positivos em aspirados de medula óssea. O teste rápido apresentou sensibilidade de 93% (86/92) e o DAT 98% (89/91), e ambos os testes apresentaram 100% de especificidade (BERN *et al.*, 2000).

Em um estudo realizado em área endêmica para LVC no Irã, foi realizada a comparação da performance do *dipstick* contendo a proteína recombinante rK39 com o ensaio sorológico DAT frente a soros de cães naturalmente infectados por *L. infantum*. A sensibilidade do *dipstick* foi de 70,9% e a especificidade foi de 84,9% (MOHEBALI *et al.*, 2004). LEMOS *et al.*, (2008) também fizeram avaliaram a eficácia do *dipstick* com rK39 no diagnóstico de LVC, utilizando um painel de soros de cães parasitologicamente positivos para LVC. A sensibilidade do *dipstick* com rK39 foi de 75% entre os cães assintomáticos, 88% nos oligossintomáticos e 84% nos polissintomáticos. Nesse estudo, o ELISA frente ao antígeno bruto de *L. infantum* mostrou maior sensibilidade que o *dipstick*, pois foi observada detecção de 94% dentre os soros de cães assintomáticos e oligossintomáticos e de 95% nos polissintomáticos. Esses trabalhos mostram que apesar dos bons resultados encontrados no desempenho de testes rápidos utilizando rK39 para o diagnóstico de LVC, quando estes foram comparados com o DAT e o ELISA os resultados foram menos promissores.

Teste rápido no formato *Dual-Path Plataform* (DPP) contendo rK28 foi avaliado frente a um painel de soros de cães com LVC, cães saudáveis e cães com outras patologias (leishmaniose cutânea ou leptospirose). O teste DPP rK28 apresentou sensibilidade de 47% (28/60) e 98% (59/60), quando avaliado frente a soros de cães assintomáticos e sintomáticos, respectivamente. A especificidade observada foi elevada, sendo de 96% (3/70), ocorrendo reação falso-positiva em alguns soros de cães infectados por *L. braziliensis* (GRIMALDI *et al.*, 2012).

Um das dificuldades encontradas no diagnóstico por métodos sorológicos é a baixa sensibilidade destes testes quando soros de cães assintomáticos são utilizados. É importante salientar que, em estudos comparativos, os ensaios imunocromatográficos utilizando proteínas recombinantes apresentaram sensibilidade e especificidade semelhantes ao ELISA (CARVALHO *et al.*, 2003; LEMOS *et al.*, 2008). Esse achado reforça a possibilidade de utilização de um teste diagnóstico imunocromatográfico em campo pode ser vantajosa, devido a sua praticidade e rapidez de realização, pois os resultados são obtidos em minutos (DE LIMA *et al.*, 2010). Além disso, esses testes são mais baratos que outros ensaios sorológicos, não requerem refrigeração e estrutura de laboratório especializado ou habilidade específica para sua execução, aceita diferentes tipos de amostras e pode ser armazenado por longos períodos de tempo (BERN *et al.*, 2000; LUQUETTI *et al.*, 2003).

2.7.3.4 TRIAGEM DE ANTÍGENOS RECOMBINANTES POR *MULTI ANTIGEN PRINT IMUNOASSAY* (MAPIA)

Estudos com o objetivo de desenvolver ou aprimorar ensaios para diagnósticos vem utilizando como teste de triagem o *multi antigen print immunoassay* (MAPIA). Esse ensaio permite avaliação rápida da reatividade de soros de indivíduos infectados quanto a vários antígenos recombinantes. MAPIA consiste na utilização de tiras de membrana de nitrocelulose, onde são aplicados múltiplos antígenos por micro-aerossolização. Essas tiras quando expostas a um painel de soros com características previamente determinadas, permitem que anticorpos presentes nos soros reajam com o antígeno, sendo estes detectados. A detecção ocorre devido a marcação dos anticorpos com enzimas, que são revelados pela reação substrato/cromógeno (LYASHCHENKO *et al.*, 2000).

LYASHCHENKO e colaboradores (2000) avaliaram o desempenho de 12 antígenos previamente selecionados, de forma individual e em conjunto por MAPIA e ELISA, frente a soros de 75 pacientes com diagnóstico parasitológico para tuberculose e soros de 67 indivíduos saudáveis. O MAPIA contendo quatro antígenos recombinantes quando testado frente aos soros de pacientes com diagnóstico parasitológico apresentou sensibilidade de 56% e quando foram utilizados oito antígenos a sensibilidade subiu para 72%. Além disso, a especificidade obtida foi de 100% e de 98,5% para o MAPIA utilizando em conjunto quatro e oito antígenos recombinantes, respectivamente. No entanto, ao contrário do que foi observado no MAPIA, a sensibilidade do ELISA contendo quatro antígenos recombinantes foi de 49% e quando foram utilizados oito antígenos foi de 56%. A especificidade do ELISA independente do número de antígenos empregados manteve-se em 97%. Demonstrando assim que a utilização de um número maior de antígenos recombinantes em conjunto no ELISA não elevou a sensibilidade do teste como observado no MAPIA que apresentou sensibilidade mais elevada ao soros de pacientes com diagnóstico parasitológico para tuberculose.

A utilização de múltiplos antígenos recombinantes no MAPIA não só é capaz de aumentar a sensibilidade do teste como pode ser utilizado para detectar reações cruzadas com outros patógenos. Em estudos buscando avaliar a sensibilidade, especificidade e fatores de confusão em testes rápidos para o diagnóstico de tuberculose bovina (*Mycobacterium bovis*) em veados vermelhos (*Cervus elaphus*), o MAPIA foi utilizado para identificar antígenos que estariam promovendo reação cruzada com soros de

animais infectados por *Mycobacterium avium*. De um total de dez proteínas testadas (ESAT-6, CFP10, MPB59, MPB64, MPB70, MPB83, 16-kDa protein, 38-kDa protein, CFP10/ESAT-6 e 16-kDa protein/MPB83), apenas a proteína MPB83 foi reconhecida por soros de animais infectados por *M. avium* (BUDDLE *et al.*, 2010). Adicionalmente, o MAPIA foi utilizado para identificar antígenos que reajam com soros de texugos-euroasiáticos (*Meles meles*) naturalmente (LESELLIER *et al.*, 2008) e experimentalmente (LESELLIER *et al.*, 2009) infectados por *M. bovis*. A utilização do MAPIA mostrou-se eficiente como forma de selecionar esses antígenos para serem utilizados em teste rápido de fluxo lateral (*Lateral-Flow*) (GREENWALD *et al.*, 2003). Em resumo, o MAPIA vem se mostrando uma ferramenta rápida e prática na avaliação de múltiplos antígenos para seleção de potenciais alvos a serem utilizados em testes rápidos.

2.8 ANTÍGENOS RECOMBINANTES PREVIAMENTE SELECIONADOS

A seleção e a descrição dos antígenos recombinantes de *L. infantum* foi realizada previamente pelo grupo de Dr. Geraldo Gileno de Sá Oliveira (OLIVEIRA *et al.*, 2011). Os procedimentos realizados para seleção dos antígenos recombinantes encontram-se resumidos, em seguida. Originalmente, treze antígenos recombinantes de *L. infantum* foram selecionados com o objetivo de identificar, detectar e quantificar anticorpos específicos contra *Leishmania* em material biológico obtido de seres humanos ou de cães (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

A seleção dos antígenos recombinantes foi baseada na identificação de proteínas de *L. infantum* que foram selecionadas devido à presença de alto título de anticorpos contra *L. infantum* em amostras de sangue de humanos, que apresentavam manifestações clínicas de LV, ou de cães que exibiam infecção natural por *L. infantum*. Para essa seleção de antígenos recombinantes na biblioteca de cDNA de *Leishmania*, uma mistura de soro de quatro cães, exibindo resultado positivo na cultura para detecção de *Leishmania* e no teste de hipersensibilidade cutânea tardia (reação de Montenegro) foi preparada com volumes iguais de soro de cada animal. Para seleção de antígenos recombinantes de *Leishmania* na biblioteca genômica, amostras de soros de seres humanos, com manifestações clínicas de leishmaniose visceral e infecção confirmada pelo encontro de *Leishmania* em material aspirado de medula óssea, foram cedidas pela

Dra. Aldina Barral, do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador-Bahia.

Os antígenos rLci1A, rLci2B, rLci3A e rLci4A foram selecionados de fagos recombinantes pela reatividade com anticorpos de cães naturalmente infectados por *L. chagasi*, com infecção confirmada parasitologicamente, que apresentavam resposta imune humoral e celular específica (TEIXEIRA *et al.*, 2007 e OLIVEIRA *et al.*, 2011). Os antígenos rLci5A-I, rLci6A-I, rLci7A, rLci8A-I, rLci9A, rLci10A-II, rLci11A, rLci12A-II foram selecionados devido a sua reatividade com soros de seres humanos com leishmaniose visceral, enquanto a rLci13A foi selecionada com o soro de coelhos imunizados com antígenos de *Leishmania braziliensis*.

Dentre o conjunto de antígenos selecionados, 5 antígenos recombinantes (rLci1A, rLci2B, rLci3A, rLci4A e rLci5A-I) foram obtidos a partir de uma biblioteca de cDNA da forma amastigota de *L. chagasi*, cepa MHOM/BR2000/Merivaldo2 (BALEEIRO *et al.*, 2006) confeccionada em fago lambda, e 7 antígenos recombinantes de uma biblioteca genômica de promastigotas de *L. chagasi* (rLci6A-I, rLci7A, rLci8A-I, rLci9A, rLci10A-II, rLci11A, rLci12A-II). Além disso, um antígeno recombinante foi obtido de outra biblioteca de cDNA de *L. chagasi* (rLci13A). Os antígenos selecionados foram considerados úteis para identificar, detectar e quantificar anticorpos específicos contra *Leishmania* em material biológico obtido de seres humanos ou de cães. Após a excisão dos clones de fagos selecionados para a obtenção de plasmídeo *pBK-CMV* contendo cDNA *L. chagasi*, os treze antígenos foram caracterizados pelo sequenciamento parcial das extremidades 5' e 3' ou sequência completa de DNA dos insertos. A solicitação de patente do uso dos 13 antígenos em imunodiagnóstico, imunoterapia e vacinação foi aprovada pela Coordenação de Gestão Tecnológica (Gestec) da FIOCRUZ e pelo INPI.

Resultados obtidos por OLIVEIRA e colaboradores (2011) evidenciaram o elevado potencial de 5 desses antígenos recombinantes (rLci1A, rLci2B, rLci3A, rLci4A e rLci5A-I) para diagnosticar LVC. Esses 5 antígenos recombinantes foram avaliados em ELISA frente a um painel de 46 soros de cães naturalmente infectados por *L. infantum*, 31 soros de cães com outras patologias (demodicose, babesiose e erliquiose) e 31 soros de cães saudáveis de área não endêmica. O ELISA contendo as proteínas recombinantes rLci1A, rLci2B, rLci3A, rLci4A e rLci5A-I apresentou sensibilidade de 93%, 84%, 92%, 92%, 67% e especificidade de 89%, 76%, 85%, 96%, 100% e 95%, respectivamente.

2.8.1 SELEÇÃO DOS 7 ANTÍGENOS RECOMBINANTES

Dos treze antígenos inicialmente selecionados, sete foram utilizados nesse estudo pelo fato de terem sua produção e purificação estabelecidas a tempo de serem avaliados. A etapa de identificação e análise das características das proteínas previstas a partir do gene foi realizada, anteriormente, pela equipe de Dr. Geraldo Gileno, utilizando as sequências obtidas no sequenciamento preliminar em buscas com o programa BLAST (“Basic Local Alignment Search Tool”) contra sequências proteicas de tripanossomatídeos disponíveis nas páginas do banco de dados GeneDb (www.genedb.org – “The Wellcome Trust Institute, Pathogen Sequencing Unit”) e também no GenBank do NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov – “National Center for Biotechnology Information”) (Tabela 1). A caracterização de cada proteína recombinante selecionada foi realizada. A maioria dos genes identificados codifica para proteínas que têm em comum um alto peso molecular predito e a ocorrência em série de múltiplos motivos repetitivos, os quais variam entre as proteínas no que se refere ao comprimento e composição de aminoácidos. Isto é válido para os genes que codificam as proteínas rLci2B, rLci6A-I, rLci8A-I, rLci10A-II e rLci12A-II. As proteínas codificadas por outros três genes (rLci1A e rLci7A) têm sua função associada a eventos de estresse celular (Tabela 2 e Figura 1).

O presente trabalho buscou identificar dentre os antígenos recombinantes previamente selecionados, o conjunto destes que é reconhecido por soros de animais vacinados, para que possam, futuramente, ser utilizados em um teste diagnóstico baseado em múltiplos antígenos recombinantes capaz de diferenciar animais vacinados de animais infectados. Para isso, avaliamos a reatividade de soros de cães experimentalmente vacinados com LEISHMUNE[®] ou LEISH-TEC[®], a antígenos previamente selecionados de *L. infantum*, utilizando o teste de triagem MAPIA.

Tabela 1 – Identificação das proteínas recombinantes de *L. infantum*.

Proteína	Identificação preliminar	Peso molecular da proteína	Número de acesso no GeneDB	Número de acesso da proteína no GenBank.
rLci1A	Proteína de choque térmico HSP70	88 kDa	LinJ28_V3.3060 LinJ28_V3.2960 LinJ28_V3.3000	XP_001470324
rLci2B	N-Kinesina	40 kDa	Sequência parcial	XP_001464298 Sequência incompleta – homologia <100%.
rLci6A-I	Proteína associada ao citoesqueleto GrB4	40 kDa	LinJ26_V3.1950	XP_001470534
rLci7A	Proteína relacionada ao estresse Sti1	65 kDa	LinJ08_V3.1020	XP_001463435
rLci8A-I	Proteína hipotética com motivos repetitivos	100 kDa	LinJ32_V3.2420	XP_001467919
rLci10A-II	Proteína hipotética com motivos repetitivos	55 kDa	LinJ34_V3.2360 Sequência incompleta	XP_001468598 Sequência incompleta
rLci12A-II	Proteína hipotética com motivos repetitivos	90 kDa	LinJ29_V3.0110	XP_001466517

rLci = proteína recombinante *Leishmania chagasi/infantum*

Tabela 2 - Características das proteínas recombinantes de *L. infantum*.

Polipeptídeos recombinantes	Características
rLci1A	Apresenta 747 AA, sendo que 654 AA correspondem a região codificadora da proteína HSP70, 54 AA de uma porção UTR na extremidade 5' e 39 AA do vetor
rLci2B	Apresenta 334 AA é formada de 1 segmento de 76 AA não repetitivo, seguido de 5 domínios repetitivos de 39 AA e 1 domínio repetitivo de 22 AA associado a 41 AA do vetor
rLci6A-I	Apresenta 1317 AA, sendo 3 domínios não repetitivos, intercalados por 2 domínios repetitivos de 38 AA do vetor na extremidade
rLci7A	Contém 4 domínios não repetitivos e 5 domínios repetitivos
rLci8A-I	Corresponde a 2 domínios não repetitivos de 205 e 233 AA cada, separados por 61 segmentos repetitivos de 10 AA cada, e apresenta 36 AA do vetor na extremidade
rLci10A-II	Contém 1 domínio repetitivo de 79 AA e 1 não repetitivo de 234 AA seguido de 36 AA do vetor
rLci12A-II	Apresenta 2 domínios não repetitivos de 282 AA e 13 AA, 29 segmentos repetitivo de 8 AA cada e 1 de 7 AA, com uma região de 36 AA do vetor

AA = aminoácidos; rLci = proteína recombinante *Leishmania chagasi/infantum*

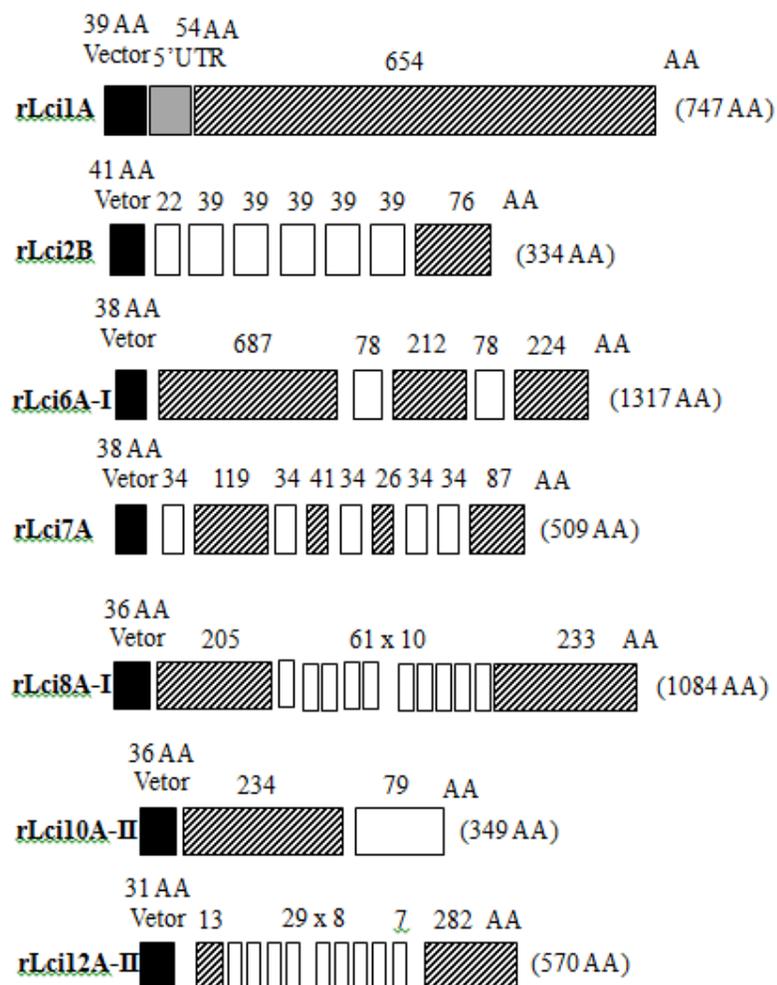


Figura 1. Desenho esquemático da estrutura predita das proteínas recombinantes de *L. infantum*. Os diversos domínios das proteínas recombinantes de *L. infantum* são mostrados: em preto esta representado o segmento contendo a cauda de 6 histidinas e uma sequência de aminoácidos pertencente ao plasmídeo vetor, em cinza está representada a porção não codificante 5'UTR do gene. De forma tracejada estão representados os segmentos não repetitivos e de branco os segmentos de domínio com motivo repetitivo. AA refere-se ao número de aminoácidos (OLIVEIRA *et al.*, 2011; PINHEIRO *et al.*, 2011).

3. OBJETIVO DO TRABALHO

Identificar a reatividade de soros de cães experimentalmente vacinados com LEISHMUNE[®] ou LEISH-TEC[®], a antígenos previamente selecionados de *L. infantum*, utilizando o teste de triagem MAPIA.

Objetivos específicos

- 1) Selecionar e vacinar com LEISHMUNE[®] ou LEISH-TEC[®] cães de área não endêmica para LVC
- 2) Testar os soros de animais vacinados quanto à reatividade aos antígenos recombinantes de *L. infantum*
- 3) Identificar antígenos recombinantes reconhecidos por soros de animais vacinados
- 4) Comparar os resultados obtidos com a avaliação dos antígenos frente a soros de animais infectados utilizando MAPIA

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1. ÉTICA

O projeto executado teve a aprovação do Comissão de Ética no Uso de Animais – CPqGM/FIOCRUZ (CEUA) sob nº 015/2009. Todos os cães incluídos no projeto foram examinados não apenas para presença de sinais clínicos para leishmaniose como também para outras infecções caninas (ver item 4.3.2). Os cães candidatos a receber a vacinação, que apresentaram resultados negativos para infecção por *Leishmania* e que apresentaram positividade para outras enfermidades, como babesiose e erliquiose, receberam tratamento conforme a patologia identificada.

4.2. IDENTIFICAÇÃO DAS POPULAÇÕES DE CÃES

Para obtenção dos soros de animais para o presente estudo, foi realizada imunização de cães com as seguintes vacinas LEISHMUNE[®] ou Leish-Tec[®]. Para isso, inicialmente foram identificadas duas populações de cães residentes em dois canis localizadas em área não endêmica para LVC nos bairros de Fazenda Coutos (Canil 1) e Periperi (Canil 2) em Salvador/BA. As duas populações juntas representaram 103 cães, sendo 67 cães pertencentes ao canil 1 e 36 cães ao canil 2.

Durante a caracterização da população de cães para o recrutamento de animais para o estudo, foram estabelecidos 5 critérios de exclusão: i) existência de alguma doença crônica, ii) agressividade, iii) sorologia positiva em ELISA frente ao antígeno solúvel de *L. infantum* ou iv) detecção da presença de DNA de *Leishmania* em qPCR ou v) detecção de formas promastigotas de *Leishmania* em cultura de aspirado esplênico. Após a caracterização da população de cães, 58 cães foram incluídos no estudo tendo sido considerados aptos a receberem uma das vacinas (item 4.3.2) (Figura 2).

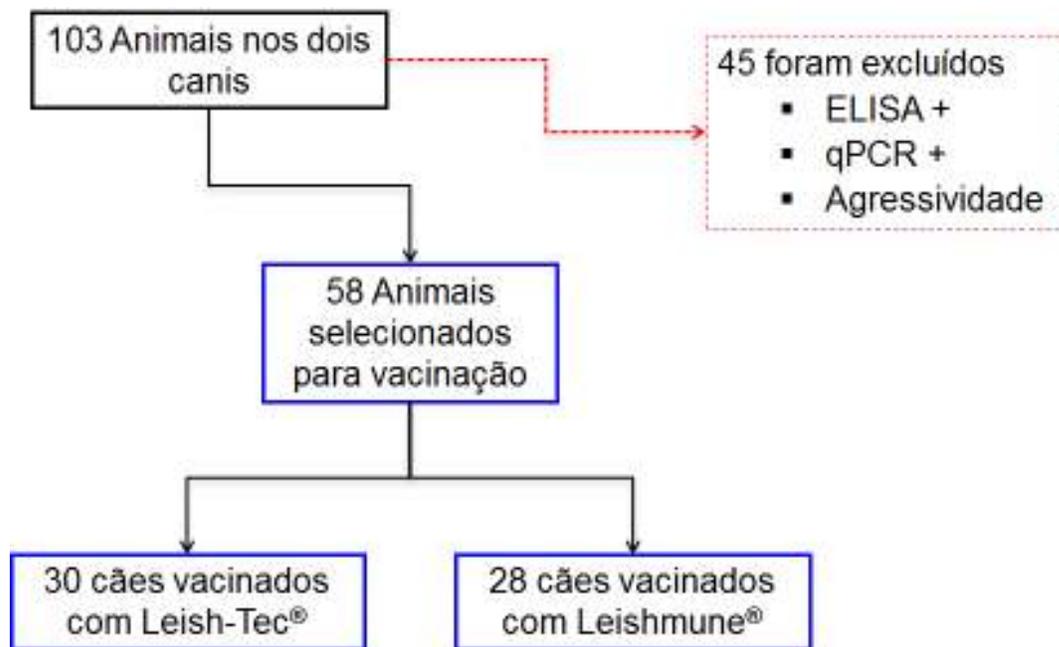


Figura 2. Organograma representativo da seleção realizada para inclusão dos cães no estudo. Amostras de sangue, soro e tecido esplênico dos cães pertencentes aos dois canis foram coletadas. Critérios de exclusão foram adotados com finalidade de assegurar a saúde dos animais e o andamento do trabalho. Os critérios adotados foram: existência de doença crônica, agressividade, sorologia positiva em ELISA frente ao antígeno solúvel de *L. infantum*, detecção da presença de DNA de *Leishmania* em qPCR ou detecção de formas promastigotas de *Leishmania* em cultura de aspirado esplênico. Da população de cães aptos a participar do estudo, 30 cães foram vacinados com Leish-Tec® e 28 cães com Leishmune®.

4.3. OBTENÇÃO DE SOROS

4.3.1. SOROS CONTROLES POSITIVOS E NEGATIVOS

Soros de cães positivos para LV foram utilizados como controle positivo (pool de 5 amostras) e soros de 2 cães sadios oriundos de área não endêmica foram utilizados como controle negativo nos ensaios de MAPIA. Esses soros foram obtidos do banco de soros montado no Laboratório de Patologia e Biointervenção, do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz - CPqGM/FIOCRUZ. Resumidamente, este banco de soros é composto por soros de cães naturalmente infectados e não infectados de áreas endêmicas da Bahia (Jequié, Dias D'Avila, Lauro de Freitas, Camaçari) e soros de cães não infectados de áreas não endêmicas usados como controle negativo (Salvador e Pelotas), além de soros de cães com infecção por outros patógenos, como *Ehrlichia canis*, *Babesia canis* e *Leishmania braziliensis*.

4.3.2. SOROS DE CÃES VACINADOS COM LEISHMUNE® OU LEISH-TEC®

Durante a caracterização das populações de cães descrita anteriormente no item 4. 2 do Material e Métodos, foram coletadas amostras biológicas (sangue, aspirado de baço) para avaliação laboratorial com testes parasitológicos, sorológicos e moleculares. Do sangue total, foi obtido soro para detecção de anticorpos anti-*Leishmania* por ELISA (BALEEIRO *et al.*, 2006). Parte da amostra de aspirado esplênico foi cultivada para isolamento de *Leishmania* em 3 ml de meio Schneider (Sigma-Aldrich), suplementado com 20% de soro bovino fetal (Gibco/Invitrogen) e 0,1% de gentamicina (Sigma-Aldrich) adicionado ao meio NNN (Neal, Novy, Nicolle), seguindo protocolo previamente descrito por Barrouin-Melo *et al.* (2006). A outra parte do aspirado esplênico, assim como amostras de sangue e soro foram aliquotadas, identificadas e mantidas a -70°C, até o momento de sua utilização.

Para o ELISA, placas de 96 poços foram sensibilizadas com 100 µl/poço por 16-18 h a 4°C com tampão de sensibilização contendo carbonato-bicarbonato 0,05 M com pH 9,6 e antígeno solúvel de *L. infantum* a 3.064 µg/µL. Entre cada etapa, foram realizadas 4 lavagens com 200 µl/poço de PBS com pH 7,2 e Tween 20 na concentração de 0,05%. Para a etapa de bloqueio foi utilizada uma solução de PBS em pH 7,2, 0,05% de Tween 20 e BSA 4mg/mL por 1 h a 37°C. Após o bloqueio, os poços foram incubados com 100 µL de soro teste (cães antes ou após a vacinação) diluído a 1:800 na solução de bloqueio por 1 h a 37°C. Após 4

lavagens com 200 µl/poço de PBS com pH 7,2 e Tween 20 na concentração de 0,05%, os poços foram incubados com 100 µL de solução contendo anticorpo secundário IgG anti-cão imunoconjugado com peroxidase diluído a 1:8000 por 1 h a 37°C. A revelação foi feita em 100 µl de solução de substrato TMB (tampão fosfato-citrato 0,05 M, 1 mg/mL de TMB em DMSO e 2 µL H₂O₂) incubado em câmara úmida, protegido da luz, por 15 minutos à temperatura ambiente. A reação foi neutralizada com 50 µl de solução neutralizante (20% de H₂SO₄ P.A. 1840g/L em água destilada). Finalmente, a densidade óptica foi medida no comprimento de onda de 450 nm em espectrofotômetro.

A extração de DNA das amostras de sangue e aspirado esplênico foram realizadas com o kit DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen), segundo as recomendações do fabricante. As amostras de DNA extraído foram utilizadas para realização de PCR: i) amostras de sangue para detecção de DNA de *Ehrlichia canis* e/ou *Babesia canis vogeli* utilizando os protocolos de BULLA *et al.* (2004) e de Sá *et al.* (2006), respectivamente. Como controle positivo de cada reação de PCR foram incluídas na reação amostras de DNA de cães sabidamente positivos para essas patologias. O controle negativo da reação consistiu de água ultra-pura, em volume igual ao de DNA. Quando o resultado da PCR foi positivo para *Ehrlichia canis* e/ou *Babesia canis*, os animais foram submetidos a tratamento específico. ii) amostras de baço para detecção de DNA de *Leishmania*, em qPCR utilizando protocolo de FRANCINO *et al.* (2006). Como controle positivo e controle negativo da reação foram utilizadas amostras de DNA do parasito e água ultra-pura, respectivamente.

Após a seleção seguindo os 6 critérios de exclusão descritos anteriormente (item 4.2), dos 103 animais que representavam a população inicial de cães, 58 animais foram considerados aptos a vacinação, estes foram divididos em dois grupos: 30 cães foram vacinados com Leish-Tec[®] (Hertape Calier Saúde Animal, <http://www.hertapecalier.com.br>) e 28 receberam a vacina LEISHMUNE[®] (Fort Dodge Saúde Animal, <http://www.fortdodge.com.br>). Os cães de cada grupo foram imunizados de acordo com as instruções do fabricante das vacinas comerciais. Durante o período de vacinação, foram realizadas três doses da vacina LEISHMUNE[®] ou Leish-Tec[®], com intervalos de 21 dias entre a aplicação das doses.

Amostras de soros dos animais vacinados foram coletadas antes da primeira dose e 10 dias após a última dose. Para identificar a ocorrência de soroconversão, foi realizado ELISA contendo antígeno bruto de *L. infantum*, nos soros de animais antes da vacinação e após a última dose da vacina (LEISHMUNE[®] ou Leish-Tec[®]).

4.4. ANTÍGENOS RECOMBINANTES

4.4.1 PRODUÇÃO DE ANTÍGENOS RECOMBINANTES

O DNA codificando cada um dos antígenos foi clonado em plasmídeo pBK-CMV (Stratagene Inc.) e subclonado em plasmídeo pRSET (Invitrogen, Carlsbad, California, EUA), adequado para superexpressão em *Escherichia coli*. Construções do plasmídeo pRSET, que já possui a sequência gênica da cauda de histidina, foram geradas contendo o inserto referente à sequência gênica de cada uma das 7 proteínas selecionadas. As construções foram feitas de forma que a cauda de histidina ficasse na extremidade amina da proteína recombinante. Para a produção das proteínas recombinantes, 100 µL de cultivo de bactéria *E. coli* BL21(DE3) pLysS (Invitrogen) quimicamente competente foram transformadas com aproximadamente 500 ng dos plasmídeos contendo os genes que codificam as proteínas de interesse.

Para efetuar o isolamento das colônias transformadas, as bactérias foram cultivadas a 37°C por 16 h, em placas de Petri contendo meio de cultura Agar LB (Luria-Bertani) [triptona a 1% (m/v, HiMedia, Mumbai, Índia), extrato de levedura a 0,5% (m/v, BD Pharmingen, San Jose, San Diego ou New Jersey, EUA), cloreto de sódio a 1% (m/v, Isofar, Duque de Caxias, Brasil) e ágar em pó a 1,5% (m/v, Himedia, Mumbai, Índia), pH 7.0] com 100 µg/mL de ampicilina (Sigma-Aldrich) e 35 µg/mL de cloranfenicol (Sigma-Aldrich). Posteriormente, as placas contendo colônias isoladas de bactérias BL21(DE3) pLysS transformadas com o plasmídeo pRSET, contendo o inserto referente ao gene da proteína de interesse, foram armazenadas a 4°C por um período de até 3 dias.

As bactérias das colônias isoladas de BL21(DE3) pLysS contendo a construção para expressão da proteína de interesse foram cultivadas em frascos Erlenmeyer de 250 mL. O cultivo foi realizado em meio contendo 50 mL de caldo de cultura LB [triptona a 1% (m/v, HiMedia, Mumbai, Índia), extrato de levedura a 0,5% (m/v, BD Pharmingen, San Jose, San Diego ou New Jersey, EUA) e cloreto de sódio a 1% (m/v, Isofar, Duque de Caxias, Brasil), pH 7.0] com 100 µg/mL de ampicilina (Sigma-Aldrich) e 35 µg/mL de cloranfenicol (Sigma-Aldrich), a 37°C, sob agitação orbital de 250 rpm, por cerca de 16 h, para a preparação do pré-inóculo. Em seguida, cada pré-inóculo de 50 mL foi ampliado para 2 frascos Erlenmeyer de 2 L contendo 500 mL de meio LB cada, cultivados a 37°C, a 250 rpm, de modo a exibir

densidade óptica a 600nm (DO_{600}) de 0,1. Após o início do cultivo, foram realizadas leituras da densidade óptica até que a DO_{600} atingisse 0,4 a 0,6 (Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia) e a produção das proteínas recombinantes pudesse ser induzida. Para induzir a expressão da proteína recombinante, isopropil- β -D tiogalactopiranosídeo (IPTG, Invitrogen) previamente diluído na concentração de 1 M, foi adicionado à suspensão bacteriana para alcançar uma concentração final de 0,1 mM. Alíquotas de 1 mL de cada cultura bacteriana foram coletadas antes e três horas após a indução com IPTG. Após três horas de incubação, cada suspensão bacteriana foi centrifugada a 6.000 X g, a 4°C, por 15 min.

Foram cultivados 32 L de caldo de cultura LB contendo bactérias BL21(DE3)pLysS transformadas com o plasmídeo pRSET associado a produção de rLci1A e 30 L para a proteína rLci2B. As bactérias BL21(DE3)pLysS transformadas com os plasmídeos pRSET contendo, individualmente, como inserto as sequências das proteínas: rLci6A-I, rLci7A, rLci8A-I, rLci10A-II ou rLci12A-II foram cultivadas em 15 L de caldo de cultura LB. Os sedimentos resultantes foram pesados, identificados e armazenados a -20°C, até o momento do uso. As alíquotas coletadas durante o cultivo foram submetidas à centrifugação à temperatura ambiente por 5 min a 12.000 X g e o sedimento foi armazenado a -20°C para posterior avaliação da produção da proteína.

4.4.2 AVALIAÇÃO E PURIFICAÇÃO DOS ANTÍGENOS RECOMBINANTES

As alíquotas de 1 mL obtidas do caldo de cultura LB contendo bactéria BL21(DE3)pLysS transformadas com o plasmídeo pRSET contendo a sequência do gene que codifica cada uma das proteínas recombinantes, antes e após a indução por IPTG, foram solubilizadas em tampão de amostra para eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE, SDS a 2% (mv), glicerol a 10% (v/v), ditioneitol (DTT) a 100 mM, 2-mercaptoetanol 5% (v/v), tris-hidroximetilaminometano (Tris) a 62,5 mM (pH 6,8) e azul de bromofenol a 0,01% (m/v)), fervidas por 10 min e, depois, avaliadas em gel SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970). As amostras dos sedimentos foram aplicadas e analisadas no gel de poliacrilamida, composto pelo gel de empilhamento com 5% de poliacrilamida e o de separação de 10 a 15% de poliacrilamida, dependendo do peso molecular da proteína. Além do marcador de peso molecular, foram aplicadas ao gel, alíquotas do lisado de bactérias *E. coli* transformadas com o pRSET sem inserto, pRSET com o inserto no tempo anterior à

indução e pRSET com inserto no tempo posterior à indução. Após a corrida, os géis foram corados por azul de Coomassie (Sigma-Aldrich) e descorados com uma solução contendo metanol 30% e ácido acético glacial 7% (Figura 3) (SAMBROOK *et al.*, 2001).

Para a purificação das proteínas recombinantes, o sedimento bacteriano foi enviado em gelo seco para o Laboratório de Tecnologia Diagnóstica (LATED) em Biomanguinhos/Fiocruz. A purificação das proteínas recombinantes foi realizada por cromatografia de afinidade, utilizando-se coluna PD-10 Desalting Workmate (Amersham Pharmacia Biotech AB, Sweden) e seguindo-se as recomendações do fabricante. O sedimento bacteriano foi ressuspenso na razão de 3 mL de tampão de ligação (Na_2HPO_4 a 20 mM, NaCl a 500 mM e imidazol a 20mM, pH 7,4) para cada 1 g de sedimento com auxílio de um agitador vortex (Labnet, Woodbridge, Nova Jersey, EUA). Em seguida, para digerir a parede bacteriana, foi adicionada lisozima (Sigma-Aldrich) em concentração final de 1 mg/mL. Cada suspensão foi incubada à temperatura ambiente por 20 min, sob agitação constante. Depois disso, visando a solubilização das membranas lipídicas, para cada 1 g de sedimento, foram acrescentados 4 mg de desoxicolato de sódio (Sigma-Aldrich) e cada suspensão foi incubada à temperatura ambiente por 30 min. Com o objetivo de fragmentar o DNA genômico bacteriano, cada suspensão foi submetida à sonicação sob gelo. A sonicação foi realizada pela aplicação de seis pulsos, com potência de 200 Watts, cada um com duração de 20 seg e intervalo de 60 seg entre cada dois pulsos consecutivos (Sonifier 250, Branson Ultrasonics Corporation, Danbury, EUA). Cada lisado bacteriano foi centrifugado a 17.000 X g, a 4°C, por 15 min. O sobrenadante e o sedimento contendo a proteína recombinante depois de solubilizados em tampão 20 mM Na_2HPO_4 , 150 mM NaCl e 20 mM imidazol, pH 8,0 com 2 M de uréia (Vetec, Duque de Caxias, Brasil) (tampão de ligação com uréia) foram passados por filtros de 0,22 μm e aplicados em colunas cromatográficas, que foram previamente equilibradas com tampão de equilíbrio (20 mM Na_2HPO_4 , 150 mM NaCl e 20 mM imidazol, pH 8,0 ou com 2 M de uréia). Posteriormente, as proteínas foram eluídas das colunas utilizando um tampão contendo Na_2HPO_4 a 20 mM, NaCl a 150 mM, imidazol a 500 mM, uréia a 2 M, pH 8,0. Durante o processo de eluição, frações de 3 mL foram obtidas e armazenadas a 4°C e alíquotas dessas frações foram analisadas por SDS-PAGE. As frações que continham cada proteína alvo com um bom grau de pureza foram misturadas. A concentração de cada proteína recombinante foi determinada utilizando o *kit DCTM Protein Assay* (Bio-Rad, Califórnia, EUA), seguindo-se recomendações do fabricante.

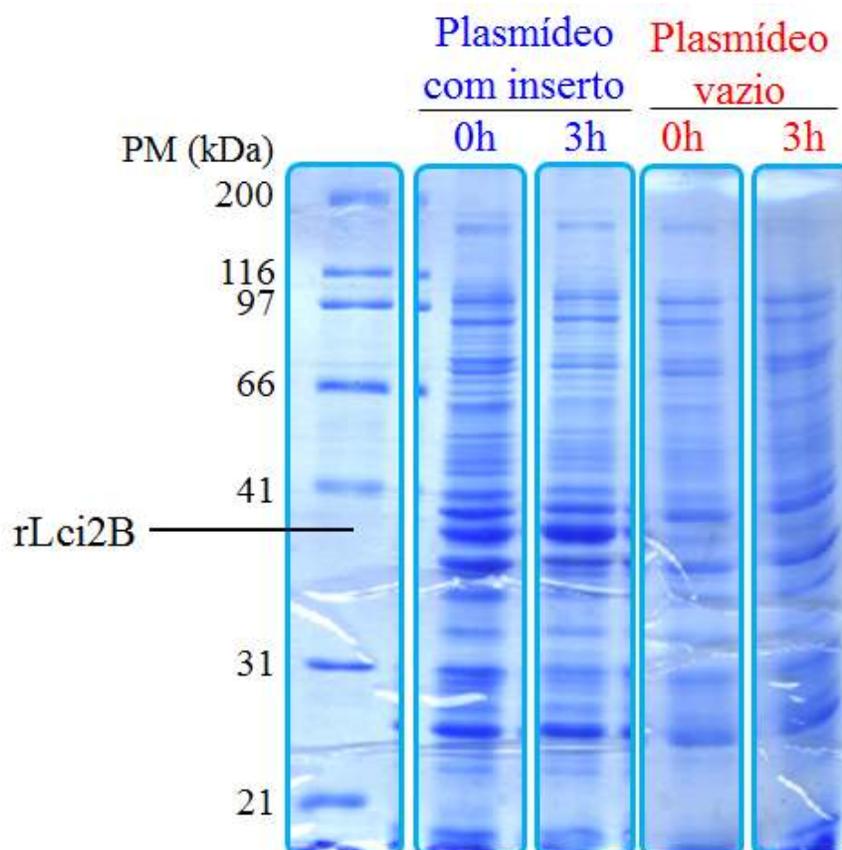


Figura 3 – Expressão e purificação da proteína recombinante Lci2B. Bactérias *E. coli* transformadas com plasmídeos contendo o gene que codifica a proteína recombinante Lci2B foram cultivadas em meio LB. A indução com IPTG ocorreu com DO_{600} do cultivo entre 0,4 e 0,6. Foram retiradas alíquotas dos cultivos no momento da indução (0h), e, após 3 h, de indução (3h). Como controle negativo foi utilizado cultivo de bactéria *E. coli* transformada com o plasmídeo sem o inserto e induzida com IPTG (Plasmídeo vazio 0h e 3h).

4.5 AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE DOS SOROS DE CÃES

O *pool* de soro de cães naturalmente infectados e os soros de cães vacinados com LEISHMUNE[®] ou Leish-Tech[®] tiveram sua reatividade avaliada frente aos 7 antígenos recombinantes de *L. infantum* previamente selecionados. Para o teste da reatividade foi utilizada a técnica do MAPIA, com fitas de papel de nitrocelulose impregnadas com os 7 antígenos. As fitas foram produzidas em parceria com BIO-MANGUINHOS. Para realização deste ensaio foram impregnadas 10 diferentes soluções, formando linhas paralelas e contínuas, em membrana de nitrocelulose *HiFlow Plus* HFB24004 (Millipore, Massachusetts, EUA) com porosidade de 10 µm. Dentre essas soluções, a primeira era uma solução contendo 0,2 mg/mL de proteína A purificada. Uma segunda solução continha lisado de *L. major* na concentração de 7,62 mg/mL. A terceira solução continha 0,29 mg/mL de uma proteína recombinante de *Trypanosoma cruzi* denominada CRA/FRA. As demais 7 soluções eram compostas separadamente pelas proteínas rLci1A (0,36 mg/mL), rLci2B (0,52 mg/mL), rLci6A-I (0,78 mg/mL), rLci7A (0,89 mg/mL), rLci8A-I (1,77 mg/mL), rLci10A-II (0,99 mg/mL) e rLci12A-II (0,87 mg/mL). As concentrações das soluções contendo as proteínas recombinantes utilizadas para impregnação dos cartões de nitrocelulose foram estabelecidas escolhendo a maior concentração solúvel da proteína recombinante após a purificação. Além disso, concentrações menores de proteínas recombinantes não foram testadas pelo fato deste trabalho estar realizando um teste de triagem e priorizarmos obter a maior reatividade possível. Após a impregnação da membrana com as diferentes soluções, essa foi cortada em tiras, de forma que cada tira apresentasse todas as dez linhas impregnadas com cada uma das soluções.

As tiras a serem utilizadas foram colocadas individualmente em cada canaleta. Foi adicionado 1.980 µL do tampão diluente de amostra/conjugado [12 mL de Tampão EIE LVC (5X) (tampão com formulação mantida em sigilo) em 48 mL de água ultra-pura acrescido de 3 g de lecitina de leite com agitação, à temperatura ambiente] em cada canaleta contendo uma tira teste. Adicionou-se, nas respectivas canaletas contendo as tiras testes e o tampão diluente, 20 µL das amostras de soros: controle positivo ou controle negativo ou de cães vacinados (diluição de 1:50). Em seguida, as tiras foram incubadas durante 30 min, com agitação, em estufa a 37°C. No final da incubação, foram realizadas três vezes a etapa de lavagem com 1 mL do tampão de lavagem PBS Tween (PBS contendo o detergente Tween na concentração de 0,05% v/v) sob agitação em estufa a 37°C durante 5 min. Após as lavagens, foi realizada

uma incubação sob agitação por 30 min a 37°C com conjugado anti-cão com peroxidase (HRP) em diluição de 1:150 em um volume final de 1 mL de tampão diluente de amostra/conjugado em cada canaleta. Após a incubação com o conjugado, as tiras foram submetidas a duas lavagens com PBS Tween e uma lavagem com PBS. Por fim, a reação foi revelada com 1 mL de solução de substrato/cromógeno (5 mg de DAB dissolvido com auxílio de uma pipeta em 19,995 μ L de PBS e acrescido de 5 μ L de peróxido de hidrogênio, preparada somente no momento do uso), sendo a incubação realizada individualmente em cada canaleta, sob agitação por um período de 3 a 5 min. De acordo com a observação da intensidade da revelação na tira do controle positivo, foi interrompida a reação aspirando a solução e lavando cada canaleta com água ultra-pura. As fitas foram secas em papel toalha deixando a parte visível da superfície da reação para cima e colocadas imediatamente ao abrigo da luz. Imediatamente após o bloqueio da revelação as fitas foram digitalizadas para obtenção das imagens para análise.

A cada bateria de aproximadamente 30 testes, foram realizados testes utilizando soros controle positivo e controle negativo (ver item 4.3.1).

4.6 LEITURA DO RESULTADO DAS REAÇÕES NAS FITAS DE NITROCELULOSE

Para análise dos resultados do ensaio de MAPIA, após a reação das tiras contendo os antígenos recombinantes impregnados no papel de nitrocelulose em presença dos soros de cães vacinados com LEISHMUNE[®] ou Leish-Tec[®], foi feita uma avaliação visual qualitativa por dois observadores independentes quanto à presença de bandas nas fitas incubadas com soros de cães vacinados, em comparação com as fitas incubadas com soros controle positivo. Quando os anticorpos presentes no soro do cão reagiram com a proteína impregnada (canaleta A1) houve o aparecimento de uma banda sendo então considerada positiva a reatividade do soro testado para uma determinada proteína e negatividade quando não foram detectadas bandas, portanto, não houve reatividade entre os anticorpos presentes no soro de cão e a proteína impregnada (canaleta A2) (Figura 4A).

4.7 ANALISE DOS RESULTADOS

Os resultados de reatividade de cada soro em relação a cada uma das proteínas avaliadas foram plotados em uma planilha e foi realizada a comparação da reatividade do soro de cada cão, antes e após, a vacinação frente a cada proteína impregnada no MAPIA.

Em relação a identificação dos antígenos recombinantes pelos soros de cães vacinados, foi considerada positiva a reação quando o soro de um cão após a vacinação passou a reconhecer um determinado antígeno (canaleta B2), que o soro desse mesmo cão antes da vacinação não reconhecia (canaleta B1) (Figura 4B).

Por fim, com o objetivo de estabelecer quais os antígenos que em conjunto são capazes de ser identificados pela maior parte dos soros testados, foi realizada uma análise combinatória da positividade considerando as proteínas em conjunto, em comparação com a positividade das proteínas individualmente. Para análise combinatória foram excluídas as proteínas que não foram reconhecidas individualmente pelos soros após a vacinação. Para esta análise também foi observado qual ou quais soros reconheciam cada proteína recombinante, uma vez que, os mesmos soros de cães após a vacinação reconheceram diversas proteínas e que algumas dessas proteínas recombinantes foram reconhecidas por um número muito baixo de soros. Esses critérios foram adotados para evitar utilizar conjuntos de proteínas recombinantes que não aumentavam o percentual de identificação por soros de cães após a vacinação. Desta forma, os melhores conjuntos de proteínas foram apresentados no item 5.5.2 dos resultados. O teste exato de Fisher foi realizado para avaliar se as diferenças na positividade dos antígenos recombinantes alcançavam significância estatística ($p < 0.05$).

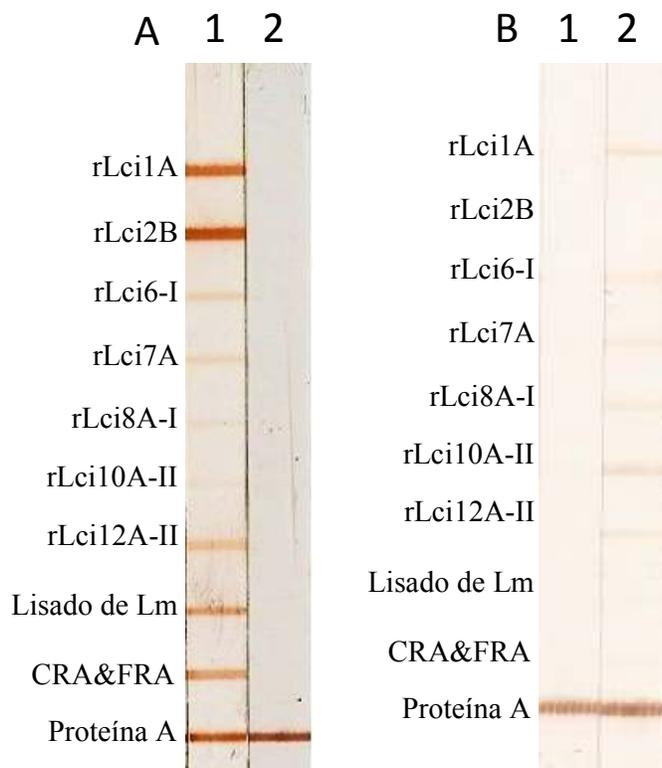


Figura 4 – Reatividade de soros de cães vacinados às proteínas recombinantes de *L. infantum* impregnadas em fita de nitrocelulose. As 7 proteínas recombinantes purificadas foram impregnadas em membrana de nitrocelulose com porosidade de 10 μm . Foram adicionados o Lisado de *L. major*, uma proteína recombinante quimérica de *T. cruzi* (CRA&FRA) e a Proteína A. Após as etapas de bloqueio das membranas, incubação com o soro de cão, lavagens com PBS Tween e incubação com conjugado anti-cão com peroxidase (HRP), a etapa de revelação foi realizada com DAB e interrompida com água ultra-pura. Como controle positivo foi utilizado um pool do soro de 5 cães residentes em área endêmica com LVC parasitologicamente confirmada (A1) e como controle negativo foi utilizado soro de um cão de área não endêmica com resultado sorológico e parasitológico negativo (A2).

5. RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO DE CÃES AVALIADOS

Foram utilizadas no estudo, duas populações de cães domiciliados em canis localizados respectivamente, nos bairros de Fazenda Coutos e Periperi, ambas as áreas não endêmicas para LVC na cidade de Salvador/BA. Os dois canis foram visitados e, inicialmente, foram identificados 103 cães para participarem do estudo. Na tabela 3 encontram-se listadas as características das populações de cães provenientes dos Canis 1 e 2, quanto ao sexo, raça e comprimento da pelagem. Dentre os cães provenientes das populações dos canis, 28 cães eram machos e 75 eram fêmeas, além disso, 14 cães tinham raça definida enquanto 89 eram sem raça definida. Em relação ao pelo, 17 cães apresentaram comprimento da pelagem média e 86 de pelagem curta.

Tabela 3 – Caracterização da população de cães pertencentes aos canis.

Característica	Canil 1	Canil 2	Total
Sexo			
Machos	21 (31,3 %)	07 (19,4 %)	28 (27,2%)
Fêmeas	46 (68,7 %)	29 (80,6 %)	75 (72,8%)
Raça			
Mestiça	58 (86,6 %)	31 (86,1 %)	89 (86,4%)
Definida	09 (13,4 %)	05 (13,9 %)	14 (13,6%)
Pelagem			
Curta	55 (82,1%)	31 (86,1%)	86 (83,5%)
Média	12 (17,9%)	05 (13,9%)	17 (16,5%)

5.2 SELEÇÃO DOS CÃES PARA VACINAÇÃO COM LEISHMUNE® OU LEISH-TEC®

Para seleção dos cães aptos a vacinação foi realizada a pesquisa de DNA de *Leishmania* por qPCR (FRANCINO *et al.*, 2006) utilizando DNA obtido a partir das amostras de aspirado esplênico. As amostras de DNA extraídas do sangue dos 103 cães identificados foram utilizadas para detecção de DNA de *Ehrlichia canis* e *Babesia canis vogeli* utilizando PCR e 33 amostras apresentaram amplificação de apenas DNA de *Ehrlichia*

canis, 13 amostras apresentaram amplificação de apenas DNA de *Babesia canis vogeli* e três amostras apresentaram amplificação de DNA dos dois patógenos (Tabela 4).

Dos 103 cães identificados para participarem do estudo, 6 cães foram excluídos durante as avaliações, pois eram idosos, apresentavam algum tipo de enfermidade crônica ou eram muito agressivos. Além disso, 5 cães foram positivos no ELISA com antígeno de *Leishmania* e, portanto, foram excluídos do estudo (Figura 2). Também foram excluídos 34 cães que tiveram DNA de *Leishmania* detectado por qPCR em amostra de baço. Os cães com resultados positivos para presença de DNA de *Ehrlichia canis* e/ou *Babesia canis vogeli* receberam o tratamento adequado para essas infecções e, após sua conclusão, foram incluídos no estudo (Tabela 4).

Dessa forma, foram considerados aptos a serem incluídos no estudo 58 dos 103 cães, aqueles animais sorologicamente negativos no ELISA, que não apresentaram crescimento de *Leishmania* na cultura de aspirado esplênico e com resultados de PCR e qPCR negativos.

Tabela 4 - Identificação e caracterização dos cães quanto aos resultados dos testes diagnósticos realizados.

Testes diagnósticos	Canil 1	Canil 2	Total
<i>ELISA para Leishmania</i>			
Positivos	02 (3,0%)	03 (8,3%)	05 (4,9%)
Negativos	65 (97,0%)	33 (91,7%)	98 (95,1%)
<i>qPCR para Leishmania</i>			
Positivos	31 (52,5%)	03 (10,0%)	34 (37,0%)
Negativos	28 (47,5%)	30 (90,0%)	58 (63,0%)
<i>PCR para Ehrlichia canis</i>			
Positivos	15 (22,4%)	18 (50%)	33 (32%)
Negativos	52 (77,6%)	18 (50%)	70 (68%)
<i>PCR para Babesia canis</i>			
Positivos	13 (19,4%)	00 (0%)	13 (12,6%)
Negativos	54 (80,6%)	36 (100%)	90 (87,4%)

5.3 REATIVIDADE DOS SOROS DE CÃES ANTES E APÓS A VACINAÇÃO POR ELISA CONTENDO ANTÍGENO SOLÚVEL DE *L. infantum*

Dentre os 28 cães que receberam as 3 doses da vacina LEISHMUNE[®], 27 (96,4%) cães soroconverteram segundo o resultado obtido no ELISA com antígeno bruto de *L. infantum*, com reatividade acima dos valores de *cut-off* e apenas 1 (3,6%) cão permaneceu

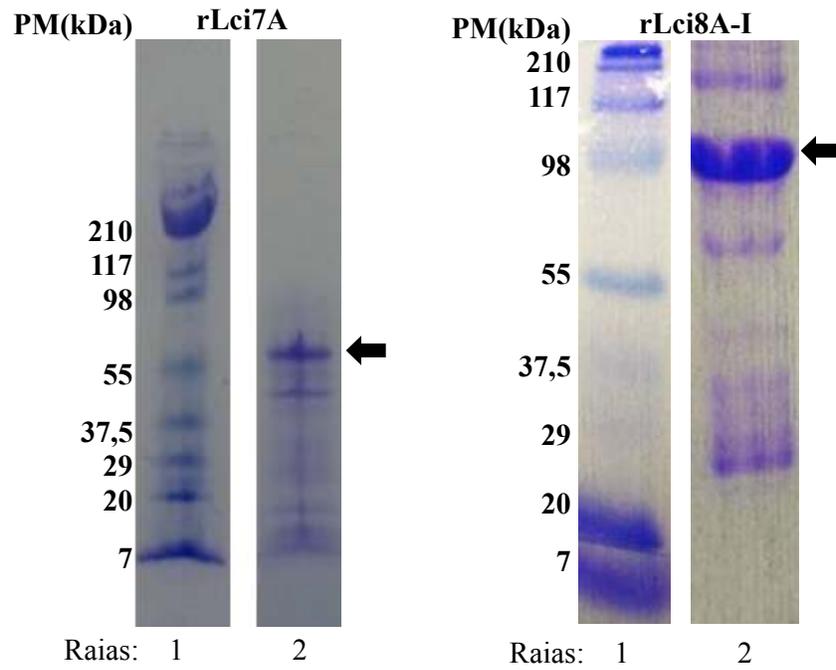
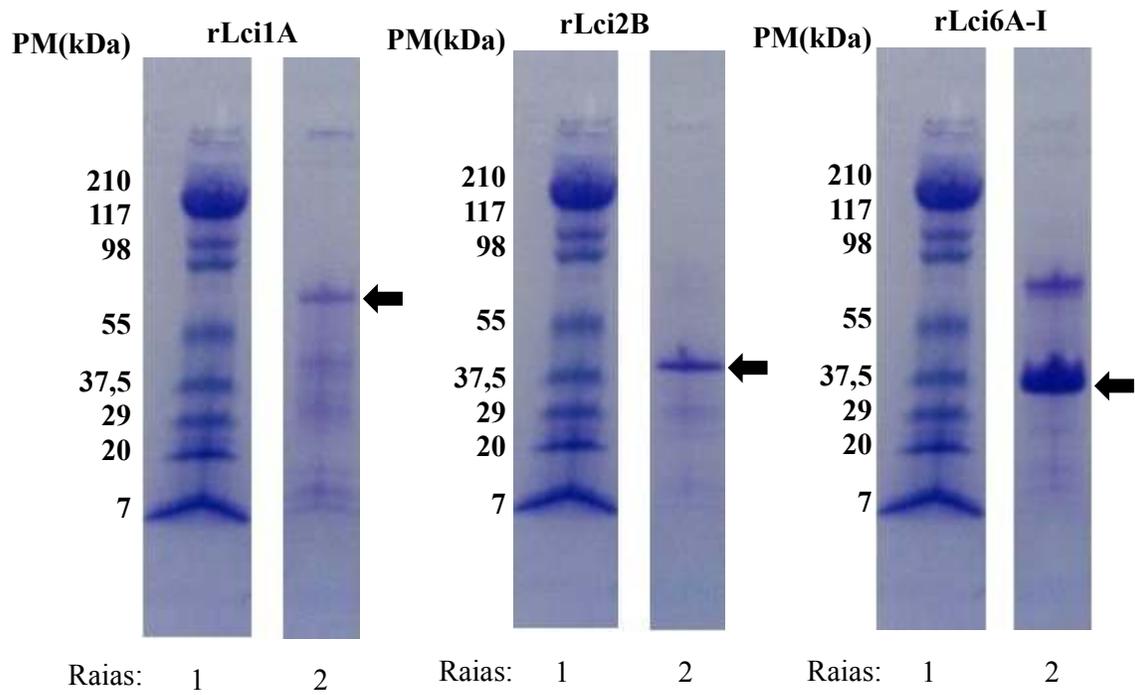
negativo. Dentre os 30 cães que receberam as três doses da vacina Leish-Tec[®], 13 (43,3%) cães apresentaram soroconversão com a reatividade acima dos valores de *cut-off* após a vacinação e 17 (56,7%) cães permaneceram negativos (Tabela 5).

Tabela 5 – Soroconversão observada em cães vacinados contra LVC em ELISA utilizando antígeno bruto de *L. infantum*

Vacinas	Positivos	Negativos	Total
Leishmune [®]	27 (96,4%)	1 (3,6%)	28 (100%)
Leish-tec [®]	13 (43,3%)	17 (56,7%)	30 (100%)

5.4 VERIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE *L. infantum*

As proteínas recombinantes purificadas foram avaliadas quanto à integridade e pureza em gel de SDS-PAGE. Os géis mostram as bandas correspondentes às proteínas recombinantes de *L. infantum* expressas em bactérias BL21(DE3)pLysS e purificadas, segundo protocolo descrito em Material e Métodos. A banda de 88 kDa corresponde à proteína rLci1A, a de 40 kDa corresponde à proteína rLci2B, uma outra proteína que também tem 40 kDa corresponde a rLci6A-I, a de 65 kDa corresponde à proteína rLci7A, 100 kDa corresponde à proteína rLci8A-I, 55 kDa corresponde à proteína rLci10A-II e 90 kDa corresponde à proteína rLci12A-II (Figura 5). As concentrações das proteínas recombinantes após a purificação foram de 0,36 mg/mL para a rLci1A, 0,52 mg/mL para a rLci2B, 0,78 mg/mL para a rLci6A-II, 0,89 mg/mL para a rLci7A, 1,77 mg/mL para a rLci8A-I, 0,99 mg/mL para a rLci10A-II, 0,87 mg/mL para a rLci12A-II (Tabela 6).



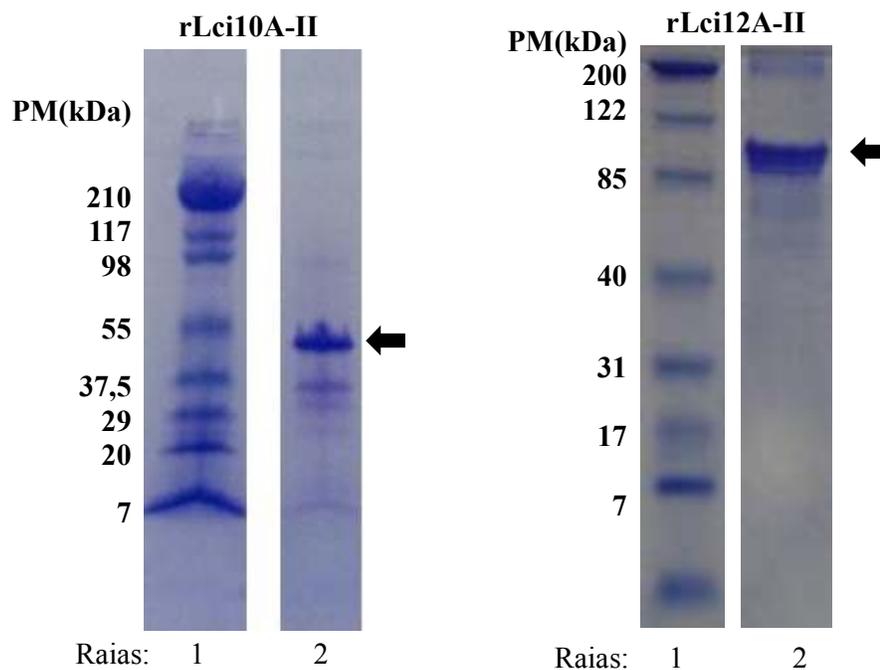


Figura 5 – Análise eletroforética de extratos protéicos correspondentes às proteínas recombinantes de *L. infantum* purificadas por cromatografia. Proteínas recombinantes purificadas por cromatografia de afinidade e analisadas por gel de poliacrilamida a 25% contendo SDS-PAGE. Avaliação da purificação por SDS-PAGE: marcador de peso molecular (raia 1) e amostra da proteína recombinante purificada (raia 2). As setas indicam as bandas correspondentes ao extrato das proteínas recombinantes de interesse após o processo de purificação.

Tabela 6 – Clonagem, produção e purificação de proteínas recombinantes de *L. infantum*

Proteína	Plasmídeo	Quantidade produzida (L)	Quantidade de proteína purificada (mg/mL)
rLci1A	pRSET B-rLci1A	32	0,36
rLci2B	pRSET B-rLci2B	30	0,52
rLci6A-I	pRSET C-rLci6A-I	15	0,78
rLci7A	pRSET C-rLci7A	15	0,89
rLci8A-I	pRSET B-rLci8A-I	15	1,77
rLci10A-II	pRSET B-rLci10A-II	15	0,99
rLci12A-II	pRSET B-rLci12A-II	15	0,87

rLci = Proteína recombinante de *Leishmania chagasi infantum*

5.5 REATIVIDADE DOS SOROS DE CÃES ANTES E APÓS A VACINAÇÃO FRENTE A ANTÍGENOS RECOMBINANTES DE *L. infantum* EM MAPIA

Para identificar antígenos recombinantes de *L. infantum* que são reconhecidos apenas por soros de cães vacinados, para futuramente compor um teste no formato DPP multi-bandas, sete proteínas (rLci1A, rLci2B, rLci6A-I, rLci7A, rLci8A-I, rLci10A-II e rLci12A-II) foram selecionadas (Item 2.8.1) e avaliadas no MAPIA frente ao soro de cães, antes e após a vacinação.

5.5.1 CAPACIDADE DOS SOROS DE CÃES APÓS A VACINAÇÃO IDENTIFICAREM ANTÍGENOS RECOMBINANTES DE *L. infantum*

Dos 28 soros de cães vacinados com LEISHMUNE[®], 36% passaram a reconhecer as proteínas rLci1A e 25% a proteína rLci12A-II após a vacinação. Soros de 11% dos cães passaram a reconhecer a proteína rLci2B, enquanto que apenas 4% dos soros desses animais passaram a detectar as proteínas rLci6A-I, rLci7A e rLci8A-I. Nenhum dos soros avaliados apresentaram reatividade à proteína rLci10A-II.

Uma pequena proporção (4%) dos soros obtidos de cães após a vacinação com LEISHMUNE[®], apresentaram reatividade à proteína CRA/FRA e uma proporção alta (57%) apresentaram reatividade ao lisado de *L. major* (Tabela 7).

Dos soros obtidos de 30 cães após a vacinação com Leish-Tec[®], 47% passaram a apresentar reatividade à proteína rLci1A, 53% à proteína rLci6A-I, 50% à proteína rLci7A e 53% à proteína rLci8A-I, 60% à proteína rLci10A-II, e 73% à proteína rLci12A-II. Nenhum dos soros desses animais vacinados com Leish-Tec[®] apresentou reatividade frente à proteína rLci2B.

Em relação à proteína CRA/FRA, 3% dos soros de cães reagiram, após a vacinação com Leish-Tec[®] e 13% dos soros de cães apresentaram reatividade frente ao lisado de *L. major*, após a imunização (Tabela 7). Os resultados obtidos nesse estudo foram comparados com um estudo desenvolvido, em paralelo em nosso laboratório, que teve como objetivo identificar do conjunto das sete proteínas recombinantes aquelas que seriam reconhecidas por soros de cães naturalmente infectados. Uma proporção de 69% e 74% dos 39 soros de cães naturalmente infectados, apresentou reatividade às proteínas rLci1A e rLci2B. Por outro lado, apenas 3%, 8% e 8% reagiram com as proteínas rLci6A-I, rLci8A-I e rLci10A-II, respectivamente. As proteínas rLci7A e rLci12A-I foram reconhecidas por, respectivamente, 21% e 33% dos soros dos cães naturalmente infectados (Tabela 7).

Tabela 7 – Reatividade de soros de cães vacinados frente a proteínas recombinantes de *L. infantum* em MAPIA, após a vacinação

Vacina	Proteínas recombinantes							Lisado Lm	CRA&FRA
	rLci1A	rLci2B	rLci6A-I	rLci7A	rLci8A-I	rLci10A-II	rLci12A-II		
Leishmune [®]	10/28(36%)	3/28(11%)	1/28(4%)	1/28(4%)	1/28(4%)	0/28 (0%)	7/28(25%)	16/28(57%)	1/28(4%)
Leish-Tec [®]	14/30(47%)	0/30(0%)	16/30(53%)	15/30(50%)	16/30(53%)	18/30(60%)	22/30(73%)	4/30(13%)	1/30(3%)
Cães positivos para LVC	27/39(69%)	29/39(74%)	1/39(3%)	8/39(21%)	3/39(8%)	3/39(8%)	13/39(33%)	31/39(79%)	16/39 (41%)

Lm = *L. major*; rLci = Proteína recombinante de *Leishmania chagasi infantum*

5.5.2 CAPACIDADE DOS SOROS DE CÃES APÓS A VACINAÇÃO EM IDENTIFICAR CONJUNTOS DE ANTÍGENOS RECOMBINANTES DE *L. infantum*

Dos soros de cães vacinados com LEISHMUNE[®] ou Leish-Tec[®], 54% e 77% respectivamente, apresentaram reatividade após a vacinação a pelo menos uma das proteínas recombinantes.

Da análise da reatividade dos soros de cães após a vacinação com LEISHMUNE[®] às proteínas recombinantes em duplas, os valores mais expressivos foram obtidos em relação ao reconhecimento das proteínas rLci1A e rLci12A-II por 50% e das proteínas rLci1A e rLci2B por 43% dos soros. Em seguida, foram avaliadas combinações com três proteínas, tendo sido observado que rLci1A, rLci2B e rLci12A-II foram as proteínas mais expressivamente reconhecidas por 54% dos soros dos cães vacinados com LEISHMUNE[®] (Tabela 8).

Em relação aos soros de cães vacinados com Leish-Tec[®], a análise combinatória revelou que a proteína rLci12A-II, em associação com a rLci1A, ou com a rLci7A ou ainda com rLci10A-II foram detectadas por 73% dos soros. Além disso, a combinação da proteína rLci12A-II com a rLci6A-I ou a rLci8A-I foi identificada por 77% dos soros de cães vacinados (Tabela 9).

Em seguida, retiramos da análise os resultados obtidos em relação às proteínas recombinantes rLci1A, rLci2B e rLci12A-II, pois em estudo paralelo realizado em nosso laboratório foi demonstrado que elas foram reconhecidas por soros de cães com LVC, e dessa forma não poderia ser utilizadas para diferenciar cães vacinados de cães naturalmente infectados. Dessa forma, realizando a análise combinatória, considerando apenas os demais antígenos (rLci6A-I, rLci7A, rLci8A-I e rLci10A-II), o conjunto das proteínas rLci6A-I, rLci7A e rLci8A-I foi identificado por 63% dos soros de cães após a vacinação com Leish-Tec[®]. Além disso, a combinação das proteínas rLci6A-I, rLci8A-I e rLci10A-II foi identificada por uma proporção similar de soros de cães vacinados (63%). Finalmente, as combinações de três proteínas: rLci6A-I, rLci7A e rLci10A-II ou rLci7A, rLci8A-I e rLci10A-II ou ainda rLci6A-I, rLci7A, rLci8A-I e rLci10A-II foram identificadas pela maior parte dos soros de cães após a vacinação (70%), embora não tenha sido identificada diferença estatística entre essas proporções (Tabela 10).

Tabela 8 – Reatividade dos soros de cães vacinados com LEISHMUNE[®] frente a um painel de proteínas recombinantes de *L. infantum* em MAPIA

Vacina	Proteínas recombinantes		
	rLci1A + rLci12A-II	rLci1A + rLci2B	rLci1A + rLci2B + rLci12A-II
Leishmune [®]	14/28 (50%)	12/28 (43%)*	15/28 (54%)**

rLci = Proteína recombinante *Leishmania chagasi infantum*;

* $p < 0,05$ quando comparado com a proteína recombinante rLci2B;

** $p < 0,01$ quando comparado com a proteína recombinante rLci2B;

Tabela 9 – Reatividade dos soros de cães vacinados com Leish-Tec[®] frente a um painel de proteínas recombinantes de *L. infantum* em MAPIA

Vacina	Proteínas recombinantes				
	rLci1A + rLci12A-II	rLci7A + rLci12A-II	rLci10A-II + rLci12A-II	rLci6A-I + rLci12A-II	rLci8A-I + rLci12A-II
Leish-Tec [®]	22/30 (73%)	22/30 (73%)	22/30 (73%)	23/30 (77%)	23/30 (77%)

rLci = Proteína recombinante *Leishmania chagasi infantum*

Tabela 10 – Reatividade dos soros de cães vacinados com Leish-Tec[®] frente ao painel de proteínas recombinantes de *L. infantum*, exceto as proteínas rLci1A, rLci2B e rLci12A-II, em MAPIA

Vacina	Proteínas recombinantes				
	rLci6A-I + rLci7A + rLci8A-I	rLci6A-I + rLci7A + rLci10A-II	rLci6A-I + rLci8A-I + rLci10A-II	rLci7A + rLci8A-I + rLci10A-II	rLci6A-I + rLci7A + rLci8A-I + rLci10A-II
Leish-Tec [®]	19/30 (63%)	21/30 (70%)	19/30 (63%)	21/30 (70%)	21/30 (70%)

rLci = Proteína recombinante *Leishmania chagasi infantum*

6 DISCUSSÃO

O objetivo do presente estudo foi selecionar conjuntos de antígenos recombinantes de *L. infantum* que sejam identificados por soros de animais vacinados com LEISHMUNE[®] ou Leish-Tec[®]. Para isso, neste trabalho foi avaliada a reatividade do soro de cães vacinados frente a antígenos recombinantes de *L. infantum* utilizando uma técnica de triagem chamada de MAPIA.

Atualmente, os testes recomendados pelo MS para o diagnóstico da LVC são o teste rápido imunocromatográfico (DPP) para triagem e o teste ELISA como confirmatório, que são dois *kits* comerciais produzidos por Biomanguinhos (CGDT-CGLAB, 2011). O teste rápido utiliza o antígeno recombinante rK28 e o ELISA utiliza o antígeno bruto de *L. major*. No entanto, nenhum desses dois testes consegue diferenciar o cão vacinado do cão naturalmente infectado, acarretando na prática a eutanásia de animais que se tornam sorologicamente positivos em razão da vacinação.

No presente estudo, utilizando ELISA como teste diagnóstico, mostramos que soros de animais vacinados apresentavam reatividade ao antígeno solúvel de *L. infantum* três semanas após a última dose da vacina. Dentre os cães vacinados com Leish-Tec[®], 43,3% (Tabela 05) dos soros destes animais apresentaram resultado positivo em ELISA frente ao antígeno solúvel de *L. infantum*. Esse achado está em desacordo com os descritos por FERNANDES e colaboradores (2008) que avaliaram 7 cães vacinados com Leish-Tec[®] em ELISA contendo extrato total de promastigotas de *L. infantum* e observaram níveis baixos de densidade ótica, 8 meses após a vacinação. Essa discordância pode estar relacionada ao número de animais utilizados nos estudos, ou devido a diferenças no tempo de avaliação da resposta humoral. Em relação à reatividade dos soros de cães vacinados com LEISHMUNE[®] avaliada no ELISA utilizando antígeno bruto de *Leishmania*, 96,4% (Tabela 5) apresentaram positividade após três semanas da última dose da vacina. Resultados semelhantes aos nossos foram apresentados por AMORIM e colaboradores (2010), que avaliaram a reatividade de soros de 30 cães vacinados com LEISHMUNE[®] e, posteriormente, infectados com *L. infantum* e 30 cães apenas vacinados com LEISHMUNE[®], em ELISA frente a antígeno solúvel de *Leishmania*. Esses autores evidenciaram que os soros dos cães que foram apenas vacinados com LEISHMUNE[®] apresentaram valores de absorbância elevados, acima do *cut-off* e similares aos dos soros de cães vacinados e infectados com *L. infantum*. AMORIM e

colaboradores (2010) mostraram que a distinção entre a positividade de soros de cães naturalmente infectados e cães vacinados com LEISHMUNE[®] só foi observada quando o ELISA com antígeno solúvel de *Leishmania* foi realizado para detecção da subclasse IgG1 de imunoglobulinas. SILVA e colaboradores (2001) avaliaram por ELISA a resposta humoral ao antígeno FML, que é a fração glicoproteica do extrato purificado de promastigotas de *L. donovani* que compõe a vacina LEISHMUNE[®], de 58 cães que receberam a vacina LEISHMUNE[®] em comparação com 59 cães controle que receberam salina durante a vacinação. Da mesma forma, BORJA-CABRERA e colaboradores (2002) avaliaram 44 cães que receberam a vacina LEISHMUNE[®] e 41 cães que receberam salina. Utilizando o teste de ELISA contendo FML, que está presente na formulação da LEISHMUNE[®], a soroconversão foi detectada entre 88 a 97% dos animais, tendo sido possível diferenciar cães infectados de cães vacinados (SILVA *et al.*, 2001; BORJA-CABRERA *et al.*, 2002; AMORIM *et al.*, 2010). Como dito acima, os testes diagnósticos, atualmente, preconizados pelo MS e aplicados nos LACEN para LVC são o DPP Biomanguinhos e o ELISA, que utilizam como fonte de antígeno, respectivamente, a proteína recombinante rK28 e o extrato solúvel de *L. major*, para identificar a presença de anticorpos anti-*Leishmania* em soros de cães de área endêmica. Entretanto, esses testes ainda não tinham sido avaliados frente a um painel de soros de cães vacinados. ELISAs similares ao realizado pelo MS não se mostraram capazes de diferenciar esses animais (AMORIM *et al.*, 2010). É inviável a realização de mais de um teste ELISA nos LACEN, um com extrato solúvel para o diagnóstico de LVC e outro com antígenos vacinais para diferenciar cães vacinados de cães infectados. Nossos resultados e os dados disponíveis na literatura sugerem que a vacinação com LEISHMUNE[®] induz à produção de anticorpos que não são capazes de serem diferenciados em testes diagnósticos com antígeno total do parasito. Os nossos resultados utilizando o ELISA, em conjunto com os dados da literatura, reforçam o que já vem sendo discutido na literatura (AMORIM *et al.*, 2010) que consiste na importância em desenvolver-se um teste capaz de diferenciar soros de cães vacinados dos de cães infectados. O DPP Biomanguinhos foi desenvolvido em uma plataforma que possibilita a utilização de múltiplos antígenos recombinantes. Novos antígenos recombinantes poderão ser identificados e inseridos no teste, permitindo a diferenciação entre cães vacinados e infectados.

Os antígenos recombinantes utilizados no teste de triagem MAPIA no presente estudo foram previamente selecionados a partir de uma biblioteca genômica de promastigotas de *L. infantum* e uma biblioteca de cDNA de *Leishmania* e, posteriormente, clonados em nosso laboratório (OLIVEIRA *et al.*, 2011). Estudos prévios evidenciaram elevada reatividade de soros de cães com LVC e de pacientes com LV às proteínas recombinantes de *L. infantum* selecionadas, utilizando ELISA (OLIVEIRA *et al.*, 2011). A nossa estratégia consistiu em utilizar sete dos 13 antígenos que mostraram, em estudo anterior realizado por OLIVEIRA e colaboradores (2011), resultados variáveis em relação ao reconhecimento por soros de cães naturalmente infectados (rLci1A, rLci2B, rLci6A-I, rLci7A, rLci8A-I, rLci10A-II e rLci12A-II) para avaliação frente a soros de animais vacinados contra LVC.

Para realizar este estudo, utilizamos o teste MAPIA que vem mostrando ser eficaz para triagem de antígenos no desenvolvimento de testes diagnósticos como descrito por WATERS e colaboradores (2005) que demonstraram que o MAPIA foi eficaz na identificação de antígenos por soros de renas (*Rangifer tarandus*) para o diagnóstico da infecção por *M. bovis*. GREENWALD e colaboradores (2003) também utilizaram essa mesma estratégia para avaliar antígenos com potencial de compor um teste rápido no formato de fluxo-lateral para o diagnóstico de texugos infectados por *M. bovis*. Enquanto que, HANDALI e colaboradores (2010) utilizaram com sucesso o MAPIA para comparar o desempenho de antígenos recombinantes de *Taenia solium* quanto ao reconhecimento por soros de cisticercose e teníase.

Os resultados obtidos utilizando soros de cães naturalmente infectados frente a sete proteínas recombinantes foram obtidos de um estudo que está sendo realizado em paralelo no nosso laboratório. Estudos realizados por SOUZA e colaboradores (2012) evidenciaram que ELISA contendo individualmente as proteínas recombinantes rLci1A e rLci2B apresentaram elevada sensibilidade e especificidade frente a soros de cães infectados por *L. infantum*, sugerindo a possível utilização dessas proteínas no diagnóstico da LVC. Além disso, os resultados preliminares do estudo que está sendo desenvolvido em paralelo em nosso laboratório, mostraram que as proteínas recombinantes rLci1A, rLci2B, rLci12A-II apresentaram elevada sensibilidade e especificidade frente a um painel de soros de cães com LVC. Sendo assim, decidimos analisar os resultados sem utilizar as proteínas rLci1A, rLci2B, rLci12A-II, que são candidatas promissoras à composição de um teste diagnóstico para LVC,

e que não permitiriam a diferenciação de cães vacinados e cães naturalmente infectado por *Leishmania*. Analisando os resultados com os demais antígenos, o maior percentual de soroconversão foi de 70% para soros de cães vacinados com Leish-Tec[®]. Esses soros reconheceram pelo menos uma das proteínas recombinantes rLci6A-I, rLci7A e rLci10A-II (Tabela 10). Em relação aos soros de cães vacinados com LEISHMUNE[®], o percentual de soros que reconheceram pelo menos uma das proteínas recombinantes (rLci6A-I, rLci7A, rLci8A-I e rLci10A-II) foi baixo (4%), pois a maioria dos soros reconheceu as proteínas excluídas da análise. Além disso, os 4% dos soros de cães vacinados com LEISHMUNE[®] que reconheceram uma das outras proteínas recombinantes, representa apenas um soro que reconheceu todas as proteínas. Com exceção da rLci2B, que não foi reconhecida por nenhum dos soros de cães vacinados com Leish-Tec[®] e por apenas 11% (3/28) dos soros de cães vacinados com LEISHMUNE[®], as outras proteínas recombinantes (rLci1A e rLci12A-II) selecionadas para serem utilizadas no diagnóstico da LVC foram reconhecidas por um percentual de pelo menos 47% dos soros de cães após a vacinação. Sugerindo assim que, soros de cães vacinados para LVC podem apresentar reatividade a antígenos recombinantes de *L. infantum* avaliados em MAPIA, comprovando a dificuldade em diferenciar estes animais vacinados daqueles verdadeiramente infectados por *Leishmania*. A identificação de uma ou mais proteínas recombinantes que sejam reconhecidas apenas por soros de cães vacinados seria fundamental para desenvolver um teste diagnóstico multi-bandas, que tenha uma cobertura mais ampla e consiga diferenciá-los.

As duas vacinas comerciais utilizadas nos cães avaliados diferem em suas composições, porém as duas utilizam saponina como adjuvante. FERNANDES e colaboradores (2008) evidenciaram que cães vacinados com Leish-Tec[®] apresentavam baixa presença de IgG total, subclasse IgG1 e IgG2 contra antígeno solúvel de *L. infantum* sugerindo que a imunização com a vacina em questão resulta em uma resposta imune específica. Por outro lado, cães vacinados com LEISHMUNE[®] apresentaram não só elevada presença de IgG total e subclasse IgG2 contra antígeno solúvel de *L. infantum* como também ativação de linfócitos T CD8+ e linfócitos B CD21+ (BORJA-CABRERA *et al.*, 2008; AMORIM *et al.*, 2010). Era de se esperar que houvesse maior reatividade dos soros de cães vacinados com LEISHMUNE[®] às proteínas recombinantes utilizadas no presente estudo já que ela é composta por um complexo glicoproteico purificado à partir de extrato de

promastigotas de *Leishmania*, quando comparada com a reatividade dos soros de cães vacinados com Leish-Tec[®], vacina baseada na proteína recombinante A2 de *L. donovani*. De forma surpreendente, no presente estudo foi observada uma maior reatividade dos soros de cães vacinados com Leish-Tec[®] aos antígenos recombinantes, quando comparada à reatividade dos soros de cães vacinados com LEISHMUNE[®]. Desta forma, foi realizado o BLAST para verificar se existiria similaridade entre as sequências codificadoras das proteínas recombinantes e a sequência da proteína A2 de *L. donovani*. No entanto, nenhuma das sete proteínas recombinantes avaliadas apresentou similaridade com a proteína presente na vacina Leish-Tec[®]. Essa maior reatividade pode estar ocorrendo pelo fato da proteína A2 ser uma das proteínas de *L. donovani* mais envolvidas na visceralização da doença e os antígenos recombinantes utilizados no presente estudo terem sido previamente selecionados utilizando soro de pacientes humanos e cães com LV.

Diversos estudos vêm utilizando o MAPIA não somente como ferramenta para selecionar antígenos recombinantes, como também para avaliar a reação cruzada de soros com antígenos de outros patógenos. Assim, BUDDLE e colaboradores (2010) buscando o desenvolvimento de um teste diagnóstico para tuberculose bovina em veados vermelhos (*Cervus elaphus*), utilizaram o MAPIA para avaliar a possibilidade de ocorrência de reação cruzada com soros de animais infectados por *Mycobacterium avium* ou vacinados contra a paratuberculose e antígenos recombinantes de *Mycobacterium bovis*. De forma similar, no presente estudo utilizando como ferramenta o MAPIA, além da reatividade dos soros de animais com LVC contra antígeno bruto de *L. major*, foi avaliada a reatividade cruzada a dois antígenos recombinantes de *T. cruzi* (CRA/FRA). Nossos resultados evidenciaram que mais da metade (57%) dos soros de cães imunizados com LEISHMUNE[®] passaram a reagir com antígenos do lisado de *L. major* presentes no MAPIA. Porém, apenas 13% dos soros de cães vacinados com Leish-Tec[®] apresentaram alguma reatividade ao lisado de *L. major* no MAPIA. Além disso, o percentual de soros de cães que, após a vacinação, passaram a reagir com a banda contendo as proteínas recombinantes CRA/FRA foi de 4% e 3% para LEISHMUNE[®] e Leish-Tec[®] respectivamente (Tabela 7). Os resultados indicam que a imunização com as vacinas em questão induzem a uma resposta gênero específica, uma vez que os soros dos cães após a vacinação reagem com antígenos do lisado de *L. major*, porém

não induzem a reação cruzada com antígenos recombinantes de *T. cruzi* presentes na membrana do MAPIA.

O MAPIA consiste em um teste de triagem e por esta razão as etapas de purificação dos antígenos recombinantes compreenderam apenas passagem dos extratos proteicos em colunas de afinidade níquel-sefarose. A análise por SDS-PAGE das proteínas recombinantes após a purificação evidenciou a presença de uma banda com o peso molecular esperado para a proteína recombinante expressa em todas as amostras, porém, também foi observada a presença de bandas contaminantes no extrato de algumas proteínas purificadas (Figura 5). Essas bandas podem ter sido geradas por proteólise, que pode ter ocorrido durante a produção dessas proteínas ou durante a lise e purificação do sedimento bacteriano. TEIXEIRA (2011) utilizou inibidores de proteases durante a etapa de lise e purificação do sedimento bacteriano e observou degradação de parte da proteína recombinante expressa, sugerindo que houve proteólise durante a etapa de cultivo bacteriano. Além do mais, é possível que na etapa de indução da expressão por IPTG pode ter ocorrido alteração da expressão da proteína recombinante de interesse. Em testes preliminares realizados no laboratório foi estabelecido o período de 3h como melhor intervalo para manter a bactéria expressando a proteína recombinante de interesse, porém para evitar a degradação da proteína expressa pode ser alterado o protocolo de produção dos antígenos com redução do tempo de indução, tendo em vista que a proteólise pode influenciar no desempenho da avaliação dos antígenos.

Em sumário, os resultados mostraram a possibilidade dos antígenos rLci6A-I, rLci7A e rLci10A-II identificarem cães vacinados com Leish-Tec[®], mas não com LEISHMUNE[®]. Esses achados indicam que é necessária a seleção e avaliação de outras proteínas recombinantes de *L. infantum* para compor um teste rápido capaz de diferenciar cães vacinados de cães infectados.

7 CONCLUSÃO

O conjunto de antígenos recombinantes de *L. infantum* utilizados nesse estudo não permitiu a diferenciação dos soros de cães vacinados com LEISHMUNE[®] de cães infectados, empregando a técnica do MAPIA.

Os antígenos recombinantes (rLci6A-I, rLci7A e rLci10A-II) de *L. infantum* utilizados em conjunto nesse estudo permitiu a diferenciação dos soros de cães vacinados com Leish-Tec[®] de cães infectados, empregando a técnica do MAPIA.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBORZI, A.; RASOULI, M.; SHAMSIZADEH, A. Leishmania tropica-isolated patient with visceral leishmaniasis in southern Iran. **Am J Trop Med Hyg**, vol 74, 2, 306-7, 2006.
- ALVAR, J.; CANAVATE, C.; MOLINA, R.; MORENO, J.; NIETO, J. Canine leishmaniasis. **Adv Parasitol**, vol 57, 1-88, 2004.
- ALVAR, J.; MOLINA, R.; SAN ANDRES, M.; TESOURO, M.; NIETO, J.; VITUTIA, M.; GONZALEZ, F.; SAN ANDRES, M. D.; BOGGIO, J.; RODRIGUEZ, F.; ET AL. Canine leishmaniasis: clinical, parasitological and entomological follow-up after chemotherapy. **Ann Trop Med Parasitol**, vol 88, 4, 371-8, 1994.
- ALVES, A. S.; MOUTA-CONFORT, E.; FIGUEIREDO, F. B.; OLIVEIRA, R. V.; SCHUBACH, A. O.; MADEIRA, M. F. Evaluation of serological cross-reactivity between canine visceral leishmaniasis and natural infection by Trypanosoma caninum. **Res Vet Sci**, vol 93, 3, 1329-33, 2012.
- ANTONELLI, L. R.; DUTRA, W. O.; ALMEIDA, R. P.; BACELLAR, O.; GOLLOB, K. J. Antigen specific correlations of cellular immune responses in human leishmaniasis suggests mechanisms for immunoregulation. **Clin Exp Immunol**, vol 136, 2, 341-8, 2004.
- ATTA, A. M.; COLOSSI, R.; SOUSA-ATTA, M. L.; JERONIMO, S. M.; NASCIMENTO, M. D.; BEZERRA, G. F.; ORGE, G.; CARVALHO, E. M. Antileishmanial IgG and IgE antibodies recognize predominantly carbohydrate epitopes of glycosylated antigens in visceral leishmaniasis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, vol 99, 5, 525-30, 2004.
- ATTA, A. M.; D'OLIVEIRA; CORREA, J.; ATTA, M. L.; ALMEIDA, R. P.; CARVALHO, E. M. Anti-leishmanial IgE antibodies: a marker of active disease in visceral leishmaniasis. **Am J Trop Med Hyg**, vol 59, 3, 426-30, 1998.
- BADARO, R.; JONES, T. C.; LORENCO, R.; CERF, B. J.; SAMPAIO, D.; CARVALHO, E. M.; ROCHA, H.; TEIXEIRA, R.; JOHNSON, W. D., JR. A prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. **J Infect Dis**, vol 154, 4, 639-49, 1986.
- BAILEY, M. S.; LOCKWOOD, D. N. Cutaneous leishmaniasis. **Clin Dermatol**, vol 25, 2, 203-11, 2007.
- BALEEIRO, C. O.; PARANHOS-SILVA, M.; DOS SANTOS, J. C.; OLIVEIRA, G. G.; NASCIMENTO, E. G.; DE CARVALHO, L. P.; DOS-SANTOS, W. L. Montenegro's skin reactions and antibodies against different Leishmania species in dogs from a visceral leishmaniosis endemic area. **Vet Parasitol**, vol 139, 1-3, 21-8, 2006
- BANETH, G.; SHAW, S. E. Chemotherapy of canine leishmaniosis. **Vet Parasitol**, vol 106, 4, 315-24, 2002.

BARBOSA-DE-DEUS, R.; DOS MARES-GUIA, M. L.; NUNES, A. Z.; COSTA, K. M.; JUNQUEIRA, R. G.; MAYRINK, W.; GENARO, O.; TAVARES, C. A. Leishmania major-like antigen for specific and sensitive serodiagnosis of human and canine visceral leishmaniasis. **Clin Diagn Lab Immunol**, vol 9, 6, 1361-6, 2002.

BARRAL, A.; PEDRAL-SAMPAIO, D.; GRIMALDI JUNIOR, G.; MOMEN, H.; MCMAHON-PRATT, D.; RIBEIRO DE JESUS, A.; ALMEIDA, R.; BADARO, R.; BARRAL-NETTO, M.; CARVALHO, E. M.; ET AL. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that Leishmania amazonensis produces a wide spectrum of clinical disease. **Am J Trop Med Hyg**, vol 44, 5, 536-46, 1991.

BERN, C.; JHA, S. N.; JOSHI, A. B.; THAKUR, G. D.; BISTA, M. B. Use of the recombinant K39 dipstick test and the direct agglutination test in a setting endemic for visceral leishmaniasis in Nepal. **Am J Trop Med Hyg**, vol 63, 3-4, 153-7, 2000.

BERRAHAL, F.; MARY, C.; ROZE, M.; BERENGER, A.; ESCOFFIER, K.; LAMOUREUX, D.; DUNAN, S. Canine leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting. **Am J Trop Med Hyg**, vol 55, 3, 273-7, 1996.

BOARINO, A.; SCALONE, A.; GRADONI, L.; FERROGLIO, E.; VITALE, F.; ZANATTA, R.; GIUFFRIDA, M. G.; ROSATI, S. Development of recombinant chimeric antigen expressing immunodominant B epitopes of Leishmania infantum for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. **Clin Diagn Lab Immunol**, vol 12, 5, 647-53, 2005.

BORJA-CABRERA, G. P.; CORREIA PONTES, N. N.; DA SILVA, V. O.; PARAGUAI DE SOUZA, E.; SANTOS, W. R.; GOMES, E. M.; LUZ, K. G.; PALATNIK, M.; PALATNIK DE SOUSA, C. B. Long lasting protection against canine kala-azar using the FML-QuilA saponin vaccine in an endemic area of Brazil (Sao Goncalo do Amarante, RN). **Vaccine**, vol 20, 27-28, 3277-84, 2002.

BORJA-CABRERA, G. P.; CRUZ MENDES, A.; PARAGUAI DE SOUZA, E.; HASHIMOTO OKADA, L. Y.; DE, A. T. F. A.; KAWASAKI, J. K.; COSTA, A. C.; REIS, A. B.; GENARO, O.; BATISTA, L. M.; PALATNIK, M.; PALATNIK-DE-SOUSA, C. B. Effective immunotherapy against canine visceral leishmaniasis with the FML-vaccine. **Vaccine**, vol 22, 17-18, 2234-43, 2004.

BORJA-CABRERA, G. P.; SANTOS, F. N.; BAUER, F. S.; PARRA, L. E.; MENZ, I.; MORGADO, A. A.; SOARES, I. S.; BATISTA, L. M.; PALATNIK-DE-SOUSA, C. B. Immunogenicity assay of the Leishmune vaccine against canine visceral leishmaniasis in Brazil. **Vaccine**, vol 26, 39, 4991-7, 2008.

BORJA-CABRERA, G. P.; SANTOS, F. N.; SANTOS, F. B.; TRIVELLATO, F. A.; KAWASAKI, J. K.; COSTA, A. C.; CASTRO, T.; NOGUEIRA, F. S.; MOREIRA, M. A.; LUVIZOTTO, M. C.; PALATNIK, M.; PALATNIK-DE-SOUSA, C. B. Immunotherapy with

the saponin enriched-Leishmune vaccine versus immunochemotherapy in dogs with natural canine visceral leishmaniasis. **Vaccine**, vol 28, 3, 597-603, 2010.

BRAGA, M. D.; COELHO, I. C.; POMPEU, M. M.; EVANS, T. G.; MACAULLIFE, I. T.; TEIXEIRA, M. J.; LIMA, J. W. [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**, vol 31, 5, 419-24, 1998.

BRAZ, R. F.; NASCIMENTO, E. T.; MARTINS, D. R.; WILSON, M. E.; PEARSON, R. D.; REED, S. G.; JERONIMO, S. M. The sensitivity and specificity of *Leishmania chagasi* recombinant K39 antigen in the diagnosis of American visceral leishmaniasis and in differentiating active from subclinical infection. **Am J Trop Med Hyg**, vol 67, 4, 344-8, 2002.

BUDDLE, B. M.; WILSON, T.; DENIS, M.; GREENWALD, R.; ESFANDIARI, J.; LYASHCHENKO, K. P.; LIGGETT, S.; MACKINTOSH, C. G. Sensitivity, specificity, and confounding factors of novel serological tests used for the rapid diagnosis of bovine tuberculosis in farmed red deer (*Cervus elaphus*). **Clin Vaccine Immunol**, vol 17, 4, 626-30, 2010.

CALDAS, A.; FAVALI, C.; AQUINO, D.; VINHAS, V.; VAN WEYENBERGH, J.; BRODSKYN, C.; COSTA, J.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A. Balance of IL-10 and interferon-gamma plasma levels in human visceral leishmaniasis: implications in the pathogenesis. **BMC Infect Dis**, vol 5, 113, 2005.

CARVALHO, F. A.; CHAREST, H.; TAVARES, C. A.; MATLASHEWSKI, G.; VALENTE, E. P.; RABELLO, A.; GAZZINELLI, R. T.; FERNANDES, A. P. Diagnosis of American visceral leishmaniasis in humans and dogs using the recombinant *Leishmania donovani* A2 antigen. **Diagn Microbiol Infect Dis**, vol 43, 4, 289-95, 2002.

CARVALHO, S. F.; LEMOS, E. M.; COREY, R.; DIETZE, R. Performance of recombinant K39 antigen in the diagnosis of Brazilian visceral leishmaniasis. **Am J Trop Med Hyg**, vol 68, 3, 321-4, 2003.

CHARREST, H.; MATLASHEWSKI, G. Developmental gene expression in *Leishmania donovani*: differential cloning and analysis of an amastigote-stage-specific gene. **Mol Cell Biol**, vol 14, 5, 2975-84, 1994.

CHULAY, J. D.; BRYCESON, A. D. Quantitation of amastigotes of *Leishmania donovani* in smears of splenic aspirates from patients with visceral leishmaniasis. **Am J Trop Med Hyg**, vol 32, 3, 475-9, 1983.

CIARAMELLA, P.; OLIVA, G.; LUNA, R. D.; GRADONI, L.; AMBROSIO, R.; CORTESE, L.; SCALONE, A.; PERSECHINO, A. A retrospective clinical study of canine

leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **Vet Rec**, vol 141, 21, 539-43, 1997.

COOK, G. C. Leishmaniasis: some recent developments in chemotherapy. **J Antimicrob Chemother**, vol 31, 3, 327-30, 1993.

COURA-VITAL, W.; MARQUES, M. J.; VELOSO, V. M.; ROATT, B. M.; AGUIAR-SOARES, R. D.; REIS, L. E.; BRAGA, S. L.; MORAIS, M. H.; REIS, A. B.; CARNEIRO, M. Prevalence and factors associated with *Leishmania infantum* infection of dogs from an urban area of Brazil as identified by molecular methods. **PLoS Negl Trop Dis**, vol 5, 8, e1291, 2011.

COURTENAY, O.; QUINNELL, R. J.; GARCEZ, L. M.; SHAW, J. J.; DYE, C. Infectiousness in a cohort of Brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. **J Infect Dis**, vol 186, 9, 1314-20, 2002.

DA COSTA, C. A.; GENARO, O.; DE LANA, M.; MAGALHAES, P. A.; DIAS, M.; MICHALICK, M. S.; MELO, M. N.; DA COSTA, R. T.; MAGALHAES-ROCHA, N. M.; MAYRINK, W. [Canine visceral leishmaniasis: evaluation of the serologic method used in epidemiologic studies]. **Rev Soc Bras Med Trop**, vol 24, 1, 21-5, 1991.

DA SILVA, A. R.; VIANA, G. M.; VARONIL, C.; PIRES, B.; NASCIMENTO MDO, D.; COSTA, J. M. [Visceral leishmaniasis (kala-azar) on Ilha de Sao Luis, Maranhao. Brazil: its evolution and outlook]. **Rev Soc Bras Med Trop**, vol 30, 5, 359-68, 1997.

DA SILVA, D. A.; MADEIRA, M. DE F.; ABRANTES, T. R.; FILHO, C. J.; FIGUEIREDO F. B. Assessment of serological tests for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Vet J**. 195(2):252-3. 2013.

DE AMORIM, I. F.; FREITAS, E.; ALVES, C. F.; TAFURI, W. L.; MELO, M. N.; MICHALICK, M. S.; DA COSTA-VAL, A. P. Humoral immunological profile and parasitological statuses of Leishmune vaccinated and visceral leishmaniasis infected dogs from an endemic area. **Vet Parasitol**, vol 173, 1-2, 55-63, 2010.

DE LIMA, V. M.; FATTORI, K. R.; MICHELIN ADE, F.; DA SILVEIRA NETO, L.; VASCONCELOS RDE, O. Comparison between ELISA using total antigen and immunochromatography with antigen rK39 in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Vet Parasitol**, vol 173, 3-4, 330-3, 2010.

DEANE, L. M.; DEANE, M. P. [Dogs naturally infected by *Leishmania donovani* in Ceara]. **Hospital (Rio J)**, vol 45, 6, 703-7, 1954.

DELGADO, O.; FELICIANGELI, M. D.; CORASPE, V.; SILVA, S.; PEREZ, A.; ARIAS, J. Value of a dipstick based on recombinant RK39 antigen for differential diagnosis of American visceral leishmaniasis from other sympatric endemic diseases in Venezuela. **Parasite**, vol 8, 4, 355-7, 2001.

- DESJEUX, P. Leishmaniasis. **Nat Rev Microbiol**, vol 2, 9, 692, 2004.
- DESJEUX, P.; PIOT, B.; O'NEILL, K.; MEERT, J. P. [Co-infections of leishmania/HIV in south Europe]. **Med Trop (Mars)**, vol 61, 2, 187-93, 2001.
- DOS SANTOS, J. I.; MORGADO, M. G.; GALVAO-CASTRO, B. Human visceral leishmaniasis: analysis of the specificity of humoral immune response to polypeptides of *Leishmania donovani* chagasi. **Am J Trop Med Hyg**, vol 37, 2, 263-70, 1987.
- EL AMIN, E. R.; WRIGHT, E. P.; ABDEL RAHMAN, A. M.; KOLK, A.; LAARMAN, J. J.; PONDMAN, K. W. Serodiagnosis of Sudanese visceral and mucosal leishmaniasis: comparison of ELISA--immunofluorescence and indirect haemagglutination. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, vol 80, 2, 271-4, 1986.
- EVANS, K. J.; KEDZIERSKI, L. Development of Vaccines against Visceral Leishmaniasis. **J Trop Med**, vol 2012, 892817, 2012.
- FALQUETO, A.; FERREIRA, A. L.; DOS SANTOS, C. B.; PORROZZI, R.; DA COSTA, M. V.; TEVA, A.; CUPOLILLO, E.; CAMPOS-NETO, A.; GRIMALDI, G., JR. Cross-sectional and longitudinal epidemiologic surveys of human and canine *Leishmania infantum* visceral infections in an endemic rural area of southeast Brazil (Pancas, Espirito Santo). **Am J Trop Med Hyg**, vol 80, 4, 559-65, 2009.
- FERNANDES, A. P.; COSTA, M. M.; COELHO, E. A.; MICHALICK, M. S.; DE FREITAS, E.; MELO, M. N.; LUIZ TAFURI, W.; RESENDE DDE, M.; HERMONT, V.; ABRANTES CDE, F.; GAZZINELLI, R. T. Protective immunity against challenge with *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein. **Vaccine**, vol 26, 46, 5888-95, 2008.
- FERREIRA EDE, C.; DE LANA, M.; CARNEIRO, M.; REIS, A. B.; PAES, D. V.; DA SILVA, E. S.; SCHALLIG, H.; GONTIJO, C. M. Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. **Vet Parasitol**, vol 146, 3-4, 235-41, 2007.
- FIGUEIREDO, F. B.; MADEIRA, M. F.; NASCIMENTO, L. D.; ABRANTES, T. R.; MOUTA-CONFORT, E.; PASSOS, S. R.; SCHUBACH, T. M. Canine visceral leishmaniasis: study of methods for the detection of IgG in serum and eluate samples. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, vol 52, 4, 193-6, 2010.
- FRANCINO, O.; ALTET, L.; SANCHEZ-ROBERT, E.; RODRIGUEZ, A.; SOLANO-GALLEGO, L.; ALBEROLA, J.; FERRER, L.; SANCHEZ, A.; ROURA, X. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. **Vet Parasitol**, vol 137, 3-4, 214-21, 2006.

GANGNEUX, J. P. [Treatment of visceral leishmaniasis: recent modalities]. **Presse Med**, vol 28, 37, 2057-66, 1999.

GHOSH, A. K.; DASGUPTA, S.; GHOSE, A. C. Immunoglobulin G subclass-specific antileishmanial antibody responses in Indian kala-azar and post-kala-azar dermal leishmaniasis. **Clin Diagn Lab Immunol**, vol 2, 3, 291-6, 1995.

GIUNCHETTI, R. C.; CORREA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O. A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; ROATT, B. M.; DE OLIVEIRA AGUIAR-SOARES, R. D.; DE SOUZA, J. V.; DAS DORES MOREIRA, N.; MALAQUIAS, L. C.; MOTA E CASTRO, L. L.; DE LANA, M.; REIS, A. B. Immunogenicity of a killed *Leishmania* vaccine with saponin adjuvant in dogs. **Vaccine**, vol 25, 44, 7674-86, 2007.

GOMES, Y. M.; PAIVA CAVALCANTI, M.; LIRA, R. A.; ABATH, F. G.; ALVES, L. C. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: biotechnological advances. **Vet J**, vol 175, 1, 45-52, 2008.

GRADONI, L.; FOGLIA MANZILLO, V.; PAGANO, A.; PIANTEDOSI, D.; DE LUNA, R.; GRAMICCIA, M.; SCALONE, A.; DI MUCCIO, T.; OLIVA, G. Failure of a multi-subunit recombinant leishmanial vaccine (MML) to protect dogs from *Leishmania infantum* infection and to prevent disease progression in infected animals. **Vaccine**, vol 23, 45, 5245-51, 2005.

GRAMICCIA, M.; GRADONI, L.; ORSINI, S. Decreased sensitivity to meglumine antimoniate (Glucantime) of *Leishmania infantum* isolated from dogs after several courses of drug treatment. **Ann Trop Med Parasitol**, vol 86, 6, 613-20, 1992.

GREENWALD, R.; ESFANDIARI, J.; LESELLIER, S.; HOUGHTON, R.; POLLOCK, J.; AAGAARD, C.; ANDERSEN, P.; HEWINSON, R. G.; CHAMBERS, M.; LYASHCHENKO, K. Improved serodetection of *Mycobacterium bovis* infection in badgers (*Meles meles*) using multiantigen test formats. **Diagn Microbiol Infect Dis**, vol 46, 3, 197-203, 2003.

GRIMALDI, G., JR.; TESH, R. B.; MCMAHON-PRATT, D. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. **Am J Trop Med Hyg**, vol 41, 6, 687-725, 1989.

GRIMALDI, G., JR.; TEVA, A.; FERREIRA, A. L.; DOS SANTOS, C. B.; PINTO, I. S.; DE-AZEVEDO, C. T.; FALQUETO, A. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP(R) CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, vol 106, 1, 54-9, 2012.

GRISARD, E. C.; STEINDEL, M.; SHAW, J. J.; ISHIKAWA, E. A.; CARVALHO-PINTO, C. J.; EGER-MANGRICH, I.; TOMA, H. K.; LIMA, J. H.; ROMANHA, A. J.; CAMPBELL, D. A. Characterization of *Leishmania* sp. strains isolated from autochthonous cases of human

cutaneous leishmaniasis in Santa Catarina State, southern Brazil. **Acta Trop**, vol 74, 1, 89-93, 2000.

GUERIN, P. J.; OLLIARO, P.; SUNDAR, S.; BOELAERT, M.; CROFT, S. L.; DESJEUX, P.; WASUNNA, M. K.; BRYCESON, A. D. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. **Lancet Infect Dis**, vol 2, 8, 494-501, 2002.

HANDALI, S.; KLARMAN, M.; GASPARD, A. N.; NOH, J.; LEE, Y. M.; RODRIGUEZ, S.; GONZALEZ, A. E.; GARCIA, H. H.; GILMAN, R. H.; TSANG, V. C.; WILKINS, P. P. Multiantigen print immunoassay for comparison of diagnostic antigens for *Taenia solium* cysticercosis and taeniasis. **Clin Vaccine Immunol**, vol 17, 1, 68-72, 2010.

HANDMAN, E. Leishmaniasis: current status of vaccine development. **Clin Microbiol Rev**, vol 14, 2, 229-43, 2001.

HARITH, A. E.; KOLK, A. H.; KAGER, P. A.; LEEUWENBURG, J.; FABER, F. J.; MUIGAI, R.; KIUGU, S.; LAARMAN, J. J. Evaluation of a newly developed direct agglutination test (DAT) for serodiagnosis and sero-epidemiological studies of visceral leishmaniasis: comparison with IFAT and ELISA. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, vol 81, 4, 603-6, 1987.

HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. **Lancet**, vol 354, 9185, 1191-9, 1999.

JERONIMO, S. M.; OLIVEIRA, R. M.; MACKAY, S.; COSTA, R. M.; SWEET, J.; NASCIMENTO, E. T.; LUZ, K. G.; FERNANDES, M. Z.; JERNIGAN, J.; PEARSON, R. D. An urban outbreak of visceral leishmaniasis in Natal, Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, vol 88, 4, 386-8, 1994.

KAUL, P.; MALLA, N.; KAUR, S.; MAHAJAN, R. C.; GANGULY, N. K. Evaluation of a 200-kDa amastigote-specific antigen of *L. donovani* by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the diagnosis of visceral leishmaniasis. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, vol 94, 2, 173-5, 2000.

KHALIL, E. A.; AYED, N. B.; MUSA, A. M.; IBRAHIM, M. E.; MUKHTAR, M. M.; ZIJLSTRA, E. E.; ELHASSAN, I. M.; SMITH, P. G.; KIENY, P. M.; GHALIB, H. W.; ZICKER, F.; MODABBER, F.; ELHASSAN, A. M. Dichotomy of protective cellular immune responses to human visceral leishmaniasis. **Clin Exp Immunol**, vol 140, 2, 349-53, 2005.

KOUTINAS, A. F.; POLIZOPOULOU, Z. S.; SARIDOMICHELAKIS, M. N.; ARGYRIADIS, D.; FYTIANOU, A.; PLEVRAKI, K. G. Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989-1996). **J Am Anim Hosp Assoc**, vol 35, 5, 376-83, 1999.

LACHAUD, L.; CHABBERT, E.; DUBESSAY, P.; DEREURE, J.; LAMOTHE, J.; DEDET, J. P.; BASTIEN, P. Value of two PCR methods for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis and the detection of asymptomatic carriers. **Parasitology**, vol 125, Pt 3, 197-207, 2002.

LAINSON, R.; RYAN, L.; SHAW, J. J. Infective stages of *Leishmania* in the sandfly vector and some observations on the mechanism of transmission. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, vol 82, 3, 421-4, 1987.

LANOTTE, G.; RIOUX, J. A.; PERIERES, J.; VOLLHARDT, Y. [Ecology of leishmaniasis in the south of France. 10. Developmental stages and clinical characterization of canine leishmaniasis in relation to epidemiology. (author's transl)]. **Ann Parasitol Hum Comp**, vol 54, 3, 277-95, 1979.

LEMESRE, J. L.; HOLZMULLER, P.; GONCALVES, R. B.; BOURDOISEAU, G.; HUGNET, C.; CAVALEYRA, M.; PAPIEROK, G. Long-lasting protection against canine visceral leishmaniasis using the LiESAp-MDP vaccine in endemic areas of France: double-blind randomised efficacy field trial. **Vaccine**, vol 25, 21, 4223-34, 2007.

LEMOS, E. M.; LAURENTI, M. D.; MOREIRA, M. A.; REIS, A. B.; GIUNCHETTI, R. C.; RAYCHAUDHURI, S.; DIETZE, R. Canine visceral leishmaniasis: performance of a rapid diagnostic test (Kalazar Detect) in dogs with and without signs of the disease. **Acta Trop**, vol 107, 2, 205-7, 2008.

LEONTIDES, L. S.; SARIDOMICHELAKIS, M. N.; BILLINIS, C.; KONTOS, V.; KOUTINAS, A. F.; GALATOS, A. D.; MYLONAKIS, M. E. A cross-sectional study of *Leishmania* spp. infection in clinically healthy dogs with polymerase chain reaction and serology in Greece. **Vet Parasitol**, vol 109, 1-2, 19-27, 2002.

LESELLIER, S.; CORNER, L.; COSTELLO, E.; SLEEMAN, P.; LYASHCHENKO, K.; GREENWALD, R.; ESFANDIARI, J.; SINGH, M.; HEWINSON, R. G.; CHAMBERS, M.; GORMLEY, E. Antigen specific immunological responses of badgers (*Meles meles*) experimentally infected with *Mycobacterium bovis*. **Vet Immunol Immunopathol**, vol 122, 1-2, 35-45, 2008.

LESELLIER, S.; CORNER, L.; COSTELLO, E.; SLEEMAN, P.; LYASHCHENKO, K. P.; GREENWALD, R.; ESFANDIARI, J.; GLYN HEWINSON, R.; CHAMBERS, M.; GORMLEY, E. Immunological responses following experimental endobronchial infection of badgers (*Meles meles*) with different doses of *Mycobacterium bovis*. **Vet Immunol Immunopathol**, vol 127, 1-2, 174-80, 2009.

LIRA, R. A.; CAVALCANTI, M. P.; NAKAZAWA, M.; FERREIRA, A. G.; SILVA, E. D.; ABATH, F. G.; ALVES, L. C.; SOUZA, W. V.; GOMES, Y. M. Canine visceral leishmaniosis: a comparative analysis of the EIE-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos and the IFI-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos kits. **Vet Parasitol**, vol 137, 1-2, 11-6, 2006.

LOUZIR, H.; MELBY, P. C.; BEN SALAH, A.; MARRAKCHI, H.; AOUN, K.; BEN ISMAIL, R.; DELLAGI, K. Immunologic determinants of disease evolution in localized cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major*. **J Infect Dis**, vol 177, 6, 1687-95, 1998.

LUKES, J.; MAURICIO, I. L.; SCHONIAN, G.; DUJARDIN, J. C.; SOTERIADOU, K.; DEDET, J. P.; KUHL, K.; TINTAYA, K. W.; JIRKU, M.; CHOCHOLOVA, E.; HARALAMBOUS, C.; PRATLONG, F.; OBORNIK, M.; HORAK, A.; AYALA, F. J.; MILES, M. A. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. **Proc Natl Acad Sci U S A**, vol 104, 22, 9375-80, 2007.

LUQUETTI, A. O.; PONCE, C.; PONCE, E.; ESFANDIARI, J.; SCHIJMAN, A.; REVOLLO, S.; ANEZ, N.; ZINGALES, B.; RAMGEL-ALDAO, R.; GONZALEZ, A.; LEVIN, M. J.; UMEZAWA, E. S.; FRANCO DA SILVEIRA, J. Chagas' disease diagnosis: a multicentric evaluation of Chagas Stat-Pak, a rapid immunochromatographic assay with recombinant proteins of *Trypanosoma cruzi*. **Diagn Microbiol Infect Dis**, vol 46, 4, 265-71, 2003.

LYASHCHENKO, K. P.; SINGH, M.; COLANGELI, R.; GENNARO, M. L. A multi-antigen print immunoassay for the development of serological diagnosis of infectious diseases. **J Immunol Methods**, vol 242, 1-2, 91-100, 2000.

MANNA, L.; VITALE, F.; REALE, S.; CARACAPPA, S.; PAVONE, L. M.; MORTE, R. D.; CRINGOLI, G.; STAIANO, N.; GRAVINO, A. E. Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniasis. **Vet Parasitol**, vol 125, 3-4, 251-62, 2004.

MARZOCHI, M. C.; MARZOCHI, K. B. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil: emerging anthroponosis and possibilities for their control. **Cad Saude Publica**, vol 10 Suppl 2, 359-75, 1994.

MAURICIO, I. L.; HOWARD, M. K.; STOTHARD, J. R.; MILES, M. A. Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. **Parasitology**, vol 119 (Pt 3), 237-46, 1999.

MAURICIO, I. L.; STOTHARD, J. R.; MILES, M. A. The strange case of *Leishmania chagasi*. **Parasitol Today**, vol 16, 5, 188-9, 2000.

MILES, S. A.; CONRAD, S. M.; ALVES, R. G.; JERONIMO, S. M.; MOSSER, D. M. A role for IgG immune complexes during infection with the intracellular pathogen *Leishmania*. **J Exp Med**, vol 201, 5, 747-54, 2005.

MIRO, G.; CARDOSO, L.; PENNISI, M. G.; OLIVA, G.; BANETH, G. Canine leishmaniasis--new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. **Trends Parasitol**, vol 24, 8, 371-7, 2008.

MOHEBALI, M.; TARAN, M.; ZAREI, Z. Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic dipstick rk39 test and direct agglutination. **Vet Parasitol**, vol 121, 3-4, 239-45, 2004.

MOREIRA, E. D., JR.; MENDES DE SOUZA, V. M.; SREENIVASAN, M.; NASCIMENTO, E. G.; PONTES DE CARVALHO, L. Assessment of an optimized dog-culling program in the dynamics of canine *Leishmania* transmission. **Vet Parasitol**, vol 122, 4, 245-52, 2004.

MORENO, J.; ALVAR, J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. **Trends Parasitol**, vol 18, 9, 399-405, 2002.

MORENO, J.; NIETO, J.; CHAMIZO, C.; GONZALEZ, F.; BLANCO, F.; BARKER, D. C.; ALVA, J. The immune response and PBMC subsets in canine visceral leishmaniasis before, and after, chemotherapy. **Vet Immunol Immunopathol**, vol 71, 3-4, 181-95, 1999.

MURRAY, H. W. Prevention of relapse after chemotherapy in a chronic intracellular infection: mechanisms in experimental visceral leishmaniasis. **J Immunol**, vol 174, 8, 4916-23, 2005.

NASCIMENTO MDO, D.; SOUZA, E. C.; DA SILVA, L. M.; LEAL PDA, C.; CANTANHEDE KDE, L.; BEZERRA, G. F.; VIANA, G. M. [Prevalence of infection by *Leishmania chagasi* using ELISA (rk39 and CRUDE) and the Montenegro skin test in an endemic leishmaniasis area of Maranhao, Brazil]. **Cad Saude Publica**, vol 21, 6, 1801-7, 2005.

NASEREDDIN, A.; EREQAT, S.; AZMI, K.; BANETH, G.; JAFFE, C. L.; ABDEEN, Z. Serological survey with PCR validation for canine visceral leishmaniasis in northern Palestine. **J Parasitol**, vol 92, 1, 178-83, 2006.

NEOGY, A. B.; NANDY, A.; GHOSH DASTIDAR, B.; CHOWDHURY, A. B. Antibody kinetics in kala-azar in response to treatment. **Ann Trop Med Parasitol**, vol 81, 6, 727-9, 1987.

NOGUEIRA, F. S.; MOREIRA, M. A.; BORJA-CABRERA, G. P.; SANTOS, F. N.; MENZ, I.; PARRA, L. E.; XU, Z.; CHU, H. J.; PALATNIK-DE-SOUSA, C. B.; LUVIZOTTO, M. C. Leishmune vaccine blocks the transmission of canine visceral leishmaniasis: absence of *Leishmania* parasites in blood, skin and lymph nodes of vaccinated exposed dogs. **Vaccine**, vol 23, 40, 4805-10, 2005.

NUNES, E. D. [Brazil: the physician-patient relation and its social determinants]. **Educ Med Salud**, vol 22, 2, 153-68, 1988.

OLIVEIRA, G. G.; MAGALHAES, F. B.; TEIXEIRA, M. C.; PEREIRA, A. M.; PINHEIRO, C. G.; SANTOS, L. R.; NASCIMENTO, M. B.; BEDOR, C. N.; ALBUQUERQUE, A. L.; DOS-SANTOS, W. L.; GOMES, Y. M.; MOREIRA, E. D., JR.; BRITO, M. E.; PONTES DE

CARVALHO, L. C.; DE MELO NETO, O. P. Characterization of novel *Leishmania infantum* recombinant proteins encoded by genes from five families with distinct capacities for serodiagnosis of canine and human visceral leishmaniasis. **Am J Trop Med Hyg**, vol 85, 6, 1025-34, 2011.

PALATNIK-DE-SOUSA, C. B.; SILVA-ANTUNES, I.; MORGADO ADE, A.; MENZ, I.; PALATNIK, M.; LAVOR, C. Decrease of the incidence of human and canine visceral leishmaniasis after dog vaccination with Leishmune in Brazilian endemic areas. **Vaccine**, vol 27, 27, 3505-12, 2009.

PALATNIK, C. B.; BOROJEVIC, R.; PREVIATO, J. O.; MENDONCA-PREVIATO, L. Inhibition of *Leishmania donovani* promastigote internalization into murine macrophages by chemically defined parasite glycoconjugate ligands. **Infect Immun**, vol 57, 3, 754-63, 1989.

PALMA, G.; GUTIERREZ, Y. Laboratory diagnosis of *Leishmania*. **Clin Lab Med**, vol 11, 4, 909-22, 1991.

PORROZZI, R.; SANTOS DA COSTA, M. V.; TEVA, A.; FALQUETO, A.; FERREIRA, A. L.; DOS SANTOS, C. D.; FERNANDES, A. P.; GAZZINELLI, R. T.; CAMPOS-NETO, A.; GRIMALDI, G., JR. Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays based on crude and recombinant leishmanial antigens for serodiagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania infantum* visceral infections in dogs. **Clin Vaccine Immunol**, vol 14, 5, 544-8, 2007.

POZIO, E.; GRADONI, L.; BETTINI, S.; GRAMICCIA, M. Leishmaniasis in Tuscany (Italy): VI. Canine leishmaniasis in the focus of Monte Argentario (Grosseto). **Acta Trop**, vol 38, 4, 383-93, 1981.

QUINNELL, R. J.; COURTENAY, O.; GARCEZ, L. M.; KAYE, P. M.; SHAW, M. A.; DYE, C.; DAY, M. J. IgG subclass responses in a longitudinal study of canine visceral leishmaniasis. **Vet Immunol Immunopathol**, vol 91, 3-4, 161-8, 2003.

QUINNELL, R. J.; COURTENAY, O.; SHAW, M. A.; DAY, M. J.; GARCEZ, L. M.; DYE, C.; KAYE, P. M. Tissue cytokine responses in canine visceral leishmaniasis. **J Infect Dis**, vol 183, 9, 1421-4, 2001.

REY-LADINO, J.; ROSS, A. G.; CRIPPS, A. W.; MCMANUS, D. P.; QUINN, R. Natural products and the search for novel vaccine adjuvants. **Vaccine**, vol 29, 38, 6464-71, 2011.

RHALEM, A.; SAHIBI, H.; LASRI, S.; JAFFE, C. L. Analysis of immune responses in dogs with canine visceral leishmaniasis before, and after, drug treatment. **Vet Immunol Immunopathol**, vol 71, 1, 69-76, 1999.

RODRIGUEZ-CORTES, A.; OJEDA, A.; LOPEZ-FUERTES, L.; TIMON, M.; ALTET, L.; SOLANO-GALLEGO, L.; SANCHEZ-ROBERT, E.; FRANCINO, O.; ALBEROLA, J. Vaccination with plasmid DNA encoding KMPII, TRYP, LACK and GP63 does not protect

dogs against *Leishmania infantum* experimental challenge. **Vaccine**, vol 25, 46, 7962-71, 2007.

ROSATI, S.; ORTOFFI, M.; PROFITI, M.; MANNELLI, A.; MIGNONE, W.; BOLLO, E.; GRADONI, L. Prokaryotic expression and antigenic characterization of three recombinant *Leishmania* antigens for serological diagnosis of canine leishmaniasis. **Clin Diagn Lab Immunol**, vol 10, 6, 1153-6, 2003.

RYAN, J. R.; SMITHYMAN, A. M.; RAJASEKARIAH, G. H.; HOCHBERG, L.; STITELER, J. M.; MARTIN, S. K. Enzyme-linked immunosorbent assay based on soluble promastigote antigen detects immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies in sera from cases of visceral and cutaneous leishmaniasis. **J Clin Microbiol**, vol 40, 3, 1037-43, 2002.

SANTOS, M. A.; MARQUES, R. C.; FARIAS, C. A.; VASCONCELOS, D. M.; STEWART, J. M.; COSTA, D. L.; COSTA, C. H. Predictors of an unsatisfactory response to pentavalent antimony in the treatment of American visceral leishmaniasis. **Rev Soc Bras Med Trop**, vol 35, 6, 629-33, 2002.

SARIDOMICHELAKIS, M. N.; MYLONAKIS, M. E.; LEONTIDES, L. S.; KOUTINAS, A. F.; BILLINIS, C.; KONTOS, V. I. Evaluation of lymph node and bone marrow cytology in the diagnosis of canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*) in symptomatic and asymptomatic dogs. **Am J Trop Med Hyg**, vol 73, 1, 82-6, 2005.

SCALONE, A.; DE LUNA, R.; OLIVA, G.; BALDI, L.; SATTA, G.; VESCO, G.; MIGNONE, W.; TURILLI, C.; MONDESIRE, R. R.; SIMPSON, D.; DONOGHUE, A. R.; FRANK, G. R.; GRADONI, L. Evaluation of the *Leishmania* recombinant K39 antigen as a diagnostic marker for canine leishmaniasis and validation of a standardized enzyme-linked immunosorbent assay. **Vet Parasitol**, vol 104, 4, 275-85, 2002.

SHARMA, U.; SINGH, S. Immunobiology of leishmaniasis. **Indian J Exp Biol**, vol 47, 6, 412-23, 2009.

SLAPPENDEL, R. J.; TESKE, E. The effect of intravenous or subcutaneous administration of meglumine antimonate (Glucantime) in dogs with leishmaniasis. A randomized clinical trial. **Vet Q**, vol 19, 1, 10-3, 1997.

SOLANO-GALLEGO, L.; MORELL, P.; ARBOIX, M.; ALBEROLA, J.; FERRER, L. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. **J Clin Microbiol**, vol 39, 2, 560-3, 2001.

SRIVASTAVA, P.; DAYAMA, A.; MEHROTRA, S.; SUNDAR, S. Diagnosis of visceral leishmaniasis. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, vol 105, 1, 1-6, 2011.

STRAUSS-AYALI, D.; JAFFE, C. L.; BURSHTAIN, O.; GONEN, L.; BANETH, G. Polymerase chain reaction using noninvasively obtained samples, for the detection of *Leishmania infantum* DNA in dogs. **J Infect Dis**, vol 189, 9, 1729-33, 2004.

SUN, H. X.; XIE, Y.; YE, Y. P. Advances in saponin-based adjuvants. **Vaccine**, vol 27, 12, 1787-96, 2009.

SUN, K.; GUAN, W.; ZHANG, J. G.; WANG, Y. J.; TIAN, Y.; LIAO, L.; YANG, B. B.; CHEN, D. L.; CHEN, J. P. Prevalence of canine leishmaniasis in Beichuan County, Sichuan, China and phylogenetic evidence for an undescribed *Leishmania* sp. in China based on 7SL RNA. **Parasit Vectors**, vol 5, 1, 75, 2012.

SUNDAR, S.; MAURYA, R.; SINGH, R. K.; BHARTI, K.; CHAKRAVARTY, J.; PAREKH, A.; RAI, M.; KUMAR, K.; MURRAY, H. W. Rapid, noninvasive diagnosis of visceral leishmaniasis in India: comparison of two immunochromatographic strip tests for detection of anti-K39 antibody. **J Clin Microbiol**, vol 44, 1, 251-3, 2006.

SUNDAR, S.; SINGH, R. K.; MAURYA, R.; KUMAR, B.; CHHABRA, A.; SINGH, V.; RAI, M. Serological diagnosis of Indian visceral leishmaniasis: direct agglutination test versus rK39 strip test. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, vol 100, 6, 533-7, 2006.

TAFURI, W. L.; DE OLIVEIRA, M. R.; MELO, M. N. Canine visceral leishmaniasis: a remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil. **Vet Parasitol**, vol 96, 3, 203-12, 2001.

TAKAGI, H.; ISLAM, M. Z.; ITOH, M.; ISLAM, A. U.; SAIFUDDIN EKRAM, A. R.; HUSSAIN, S. M.; HASHIGUCHI, Y.; KIMURA, E. Short report: production of recombinant kinesin-related protein of *Leishmania donovani* and its application in the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. **Am J Trop Med Hyg**, vol 76, 5, 902-5, 2007.

TESH, R. B. Control of zoonotic visceral leishmaniasis: is it time to change strategies? **Am J Trop Med Hyg**, vol 52, 3, 287-92, 1995.

ZHANG, W. W.; MATLASHEWSKI, G. Loss of virulence in *Leishmania donovani* deficient in an amastigote-specific protein, A2. **Proc Natl Acad Sci U S A**, vol 94, 16, 8807-11, 1997.