Thaís Bruna Ferreira da Silva

**Avaliação da reatividade de antígenos de formas
amastigotas de *Leishmania (Leishmania) infantum*
chagasi no sorodiagnóstico da leishmaniose visceral
canina**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Fisiopatologia Experimental
Orientadora: Profa. Dra. Márcia Dalastra
Laurenti

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 1 de novembro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

**São Paulo
2018**

Thaís Bruna Ferreira da Silva

**Avaliação da reatividade de antígenos de formas
amastigotas de *Leishmania (Leishmania) infantum*
chagasi no sorodiagnóstico da leishmaniose visceral
canina**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Fisiopatologia Experimental
Orientadora: Profa. Dra. Márcia Dalastra
Laurenti

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 1 de novembro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

**São Paulo
2018**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Silva, Thaís Bruna Ferreira da
Avaliação da reatividade de antígenos de formas
amastigotas de Leishmania (Leishmania) infantum
chagasi no sorodiagnóstico da leishmaniose visceral
canina / Thaís Bruna Ferreira da Silva. -- São
Paulo, 2018.
Dissertação (mestrado) -- Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Fisiopatologia Experimental.
Orientadora: Márcia Dalastra Laurenti.

Descritores: 1. Testes sorológicos 2. Leishmaniose
visceral 3. Cães 4. Técnicas imunoenzimáticas
5. Western blot 6. Leishmania infantum

USP/FM/DBD-116/18

Responsável: Kátia Maria Bruno Ferreira - CRB-8/6008

Dedicatória

À minha mãe, Roseany Ferreira

por me dar amor, ajudar e apoiar tornando meus sonhos possíveis, obrigada, você foi fundamental para tornar possível mais este sonho. “O tempo não para”.

À minha irmã Gabriela

por me ajudar com sua boa vontade e dedicação.

Aos meus irmãos Thiago e Gustavo

por todo incentivo e paciência.

À minha família, em especial Tita, Vó Nalda, Tio Jean e Bruna

por facilitarem minha vida, sempre prontas para ajudar no que fosse preciso.

Ao meu companheiro Thiago Somera e sua família

por me incentivar, apoiar, colaborar.

À Aline e Nathalia

por me apoiarem desde o início em tudo, obrigada irmãs.

Ao meu pai

por ser fundamental durante a minha graduação

Aos amigos e colegas de profissão

por entenderem meus momentos e ausência, apoiar e ouvir meus desabaços e medos.

Aos amigos do LIM50, vocês foram fundamentais.

Agradecimentos

À Profa. Dra. Márcia Dalastra Laurenti

por me aceitar, ensinar, ser paciente e humana, pela dedicação e confiança, obrigada, muito orgulho de ter sido sua aluna por todos esses anos.

À Thaíse Tomokane

por toda amizade, disposição em ajudar, por todos ensinamentos e paciência ao longo desses anos, obrigada, você foi peça chave para este acontecimento.

Ao médico veterinário Fabio Batista

por todo companheirismo, ensinamentos, amizade e trabalho em equipe durante as coletas em campo.

Ao Prof. Dr. Felipe Passero

por todo ensinamento e dedicação.

À medica veterinária Juliana doutoranda no LIM50

por seus recursos em tornar possível este trabalho.

Aos doutores do LIM50-FMUSP, Carlos Corbertt, Claudia Gomes, Vânia da Matta e aos amigos e funcionários Lia Negrão e Edson Tadeu.

Aos amigos do LIM50, Karen, Eduardo, Ana Carolina, Carmen, Gabriela, Kadir, Wilfredo, Jéssica.

Ao programa de Fisiopatologia Experimental – FMUSP

Ao programa de bolsa da CAPES

E a todos que colaboraram indiretamente ou diretamente para tornar este trabalho possível.

“Ser forte não significa exercitar os músculos. Significa encontrar seu próprio brilho sem fugir, vivendo ativamente com a natureza selvagem de uma maneira própria. Significa ser capaz de aprender, ser capaz de defender o que sabemos. Significa se manter e viver”.

Mulheres que correm com os lobos
Clarissa Pinkola Estés

Normalização adotada

Esta dissertação ou tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de símbolos	
Lista de abreviaturas e siglas	
Lista de Figuras	
Lista de Tabelas	
Resumo	
Summary	
1. INTRODUÇÃO.....	2
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	7
2.1. Leishmaniose Visceral Americana	7
2.2. Epidemiologia e distribuição geográfica.....	9
2.3. Morfologia e ciclo biológico	13
2.4. Imunidade na Leishmaniose Visceral Canina	14
2.5. Leishmaniose Visceral Canina.....	17
2.6. Métodos de diagnóstico	20
3. JUSTIFICATIVA.....	28
4. OBJETIVOS.....	31
4.1. Objetivo geral.....	31
4.2. Objetivos Específicos.....	31
5. MATERIAL E MÉTODOS	34
5.1. Casuística	34
5.2. Parasitos.....	35
5.2.1. Obtenção de formas promastigotas	36
5.2.2. Obtenção de formas amastigotas purificadas	36
5.2.3. Obtenção de formas amastigotas axênicas	37
5.3. Produção de antígenos totais para reação de ELISA	38
5.4. ELISA para avaliar a reatividade dos soros para antígenos totais de formas promastigotas e amastigotas de <i>L. (L.) infantum chagasi</i>	38
5.5. Western blot.....	40
5.6. Análise estatística	41
6. RESULTADOS	44

6.1. Características morfológicas dos parasitos empregados como antígeno no ELISA.....	44
6.1.1. Microscopia ótica	44
6.1.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	47
6.2. Determinação do ponto de corte (cut-off) para os ensaios de ELISA empregando os diferentes antígenos.....	50
6.3. ELISA–PRO	53
6.4. ELISA–AXE.....	53
6.5. ELISA–AMA.....	54
6.6. Avaliação da concordância e correlação entre os testes de ELISA	57
6.7. Avaliação do desempenho dos testes em relação aos grupos clínicos ...	61
6.8. Análise do Western Blot.....	65
6.8.1. Ensaio de Western Blot realizado com antígeno total <i>de Leishmania (L.) infantum chagasi</i> na forma promastigota.....	65
6.8.2. Ensaio de Western Blot realizado com antígeno total <i>de Leishmania (L.) infantum chagasi</i> na forma amastigota axênica.....	68
6.8.3. Ensaio de Western Blot realizado com antígeno total <i>de Leishmania (L.) infantum chagasi</i> na forma amastigota purificada de baço de hamster cronicamente infectado.....	71
7. DISCUSSÃO.....	84
8. CONCLUSÕES.....	96
9. ANEXOS.....	98
9.1. ANEXO A.....	98
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	100

Lista de Símbolos

%	por cento
µg	microgramas
µg/mL	microgramas por mililitro
µL	microlitros
CO ₂	Dióxido de carbono
g	Aceleração da gravidade
h	horas
H ₂ O ₂	Peroxido de hidrogênio
KHCO ₃	Bicarbonato de potássio
M	mols por litro
mL	mililitros
mm	milímetros
mM	milimolar
NH ₄ Cl	Cloreto de amónio
°C	graus Celsius
U	unidades
V	volume
α	alfa
β	beta
γ	gama

Lista de Abreviaturas e Siglas

ALT	Alanina transaminase
AST	Aspartato transaminase
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação em Animais
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade ótica
DTH	Teste de hipersensibilidade tardia
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática (do inglês: Enzyme Linked Immunosorbent Assay)
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IA	Infecção assintomática
IFA	Teste de imunofluorescência indireta
IFN	Interferon
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
III	Infecção inicial indeterminada
IL	Interleucina
IS	Infecção sintomática
ISO	Infecção subclínica oligossintomática
ISR	Infecção subclínica residente
<i>L. (L.)</i>	<i>Leishmania (Leishmania)</i>
LIM50	Laboratório de Patologia de Moléstias Infecciosas
LV	Leishmaniose visceral
LVA	Leishmaniose visceral americana
LVC	Leishmaniose visceral canina
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
NO	Óxido nítrico
PBS	Tampão salina fosfato
PBS-T	Tampão salina fosfato com Tween-20
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico

PNPP	p-nitrofenil fosfato
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
ROC	Curva de características operacionais (do inglês: Receiver Operating Characteristic Curve)
SFM	Sistema fagocítico mononuclear
Th	T auxiliar (do inglês: T helper)
TNF	Fator de necrose tumoral
TR-DPP	Teste Rapido - Plataforma Dual Path
UE	Unidades de ELISA
VPN	Valor preditivo negativo
VPP	Valor preditivo positivo

Lista de Figuras

Figura 1 - Mapa geográfico global ilustrando o índice de novos casos de leishmaniose visceral por região no ano de 2013. Fonte: OMS, 2015.....	9
Figura 2 – Número de mortes e letalidade por leishmaniose visceral na América Latina de 2012 a 2014. Fonte: OMS, 2016.	10
Figura 3 – Mapa de densidade dos casos de leishmaniose visceral na América Latina 2001 a 2014. Fonte: OMS, 2016.	11
Figura 4 – Mapa de incidência por 100.000 habitantes na América Latina 2001 a 2014. Fonte: OMS, 2016.	12
Figura 5 – Ciclo biológico das leishmanias. Fonte: Center for Disease Control.....	14
Figura 6 – Espectro clínico e imunológico da infecção canina por <i>Leishmania (Leishmania) infantum chagasi</i> . Fonte: Coura-Vital <i>et al.</i> , 2011 – Trends in Parasitology.	16
Figura 7 – Fotomicrografia mostrando formas promastigotas de <i>Leishmania (L.) infantum chagasi</i> obtidas de cultura em fase estacionária de crescimento. Coloração de Giemsa.	45
Figura 8 – Fotomicrografia mostrando formas amastigotas axênicas de <i>Leishmania (L.) infantum chagasi</i> , obtidas de cultura no quarto dia, segunda passagem. Coloração de Giemsa.	46
Figura 9 – Fotomicrografia mostrando formas amastigotas do parasito intra e extracelulares em imprint de baço de hamster infectado cronicamente com <i>Leishmania (L.) infantum chagasi</i> . Coloração de Giemsa.....	46
Figura 10 – Fotomicrografia mostrando formas amastigotas de <i>Leishmania (L.) infantum chagasi</i> purificadas do baço de hamster cronicamente infectados com o parasito. Coloração de Giemsa.	47
Figura 11 - Fotomicrografia eletrônica mostrando forma promastigota de <i>Leishmania (L.) infantum chagasi</i> obtida de cultura em fase estacionária de crescimento. Coloração de Uranila, tetróxido de ósmio e citrato de chumbo.	48

- Figura 12** – Fotomicrografia eletrônica mostrando forma amastigota axênica de *Leishmania (L.) infantum chagasi*, obtidas de cultura no quarto dia, segunda passagem. Coloração de Uranila, tetróxido de ósmio e citrato de chumbo..... 49
- Figura 13** – Fotomicrografia eletrônica mostrando forma amastigota axênica de *Leishmania (L.) infantum chagasi*, obtida de cultura no quarto dia, segunda passagem. Coloração de Uranila, tetróxido de ósmio e citrato de chumbo..... 49
- Figura 14** – Fotomicrografia eletrônica mostrando forma amastigota de *Leishmania (L.) infantum chagasi* purificadas do baço de hamster cronicamente infectados com o parasito. Coloração de Uranila, ósmio e citrato de chumbo. 50
- Figura 15** – Gráfico mostrando a curva ROC para os ensaios de ELISA utilizando os antígenos totais oriundos de lisado de formas promastigotas (PRO), amastigotas axênicas (AXE) e amastigotas purificadas (AMA), indicando a distância (d) para cada antígeno. 51
- Figura 16** – Gráfico em dot-plot mostrando a distribuição e em box-plot mostrando a mediana, média, valor máximo e valor mínimo em Unidades de ELISA (UE) dos títulos de anticorpos anti-*Leishmania* IgG nos soros de cães com diagnóstico parasitológico positivo pela pesquisa de DNA de *Leishmania* pela PCR, empregando antígeno total de formas promastigotas (PRO), amastigotas axênicas (AXE) e amastigotas purificadas (AMA) de *L. (L.) infantum chagasi*. A linha tracejada indica o ponto de corte para cada reação de ELISA. 55
- Figura 17** – Gráfico em dot-plot mostrando a distribuição e em box mostrando a mediana, média, valor máximo e valor mínimo em Unidades de ELISA (EU) dos títulos de anticorpos anti-*Leishmania* IgG nos soros de cães com diagnóstico parasitológico negativo pela pesquisa de DNA de *Leishmania* pela PCR, empregando antígeno total de formas promastigotas (PRO), amastigotas axênicas (AXE) e amastigotas purificadas (AMA) de *L. (L.)*

infantum chagasi. A linha tracejada indica o ponto de corte para cada reação de ELISA. 56

Figura 18 – Gráfico em dot-plot mostrando a distribuição e em box mostrando a mediana, média, valor máximo e valor mínimo em Unidades de ELISA (UE) dos títulos de anticorpos anti-*Leishmania* IgG nos soros de cães com outras enfermidades, empregando antígeno total de formas promastigotas, ELISA-PRO (A), amastigotas axênicas, ELISA-AXE (B) e amastigotas purificadas, ELISA-AMA (C) de *Leishmania (L.) infantum chagasi*. A linha tracejada indica o ponto de corte para cada reação de ELISA. 56

Figura 19 - Gráfico mostrando a distribuição entre resultados concordantes e discordantes no teste ELISA em Unidades de ELISA (UE) dos títulos de anticorpos anti-*Leishmania* IgG nos soros de cães com diagnóstico parasitológico negativo e positivo pela pesquisa de DNA de *Leishmania* (PCR), empregando antígeno total de formas promastigotas (ELISA-PRO) e amastigotas axênicas (ELISA-AXE) de *Leishmania (L.) infantum chagasi*. 58

Figura 20 – Gráfico mostrando a distribuição entre resultados concordantes e discordantes no teste ELISA em Unidades de ELISA (EU) dos títulos de anticorpos anti-*Leishmania* IgG nos soros de cães com diagnóstico parasitológico negativo e positivo pela pesquisa de DNA de *Leishmania* (PCR), empregando antígeno total de formas promastigotas (ELISA-PRO) e amastigotas purificadas (ELISA-AMA) de *Leishmania (L.) infantum chagasi*..... 59

Figura 21 – Gráfico mostrando a distribuição entre resultados concordantes e discordantes no teste ELISA em Unidades de ELISA (EU) dos títulos de anticorpos anti-*Leishmania* IgG nos soros de cães com diagnóstico parasitológico negativo e positivo pela pesquisa de DNA de *Leishmania* (PCR), empregando antígeno total de formas amastigota purificada (ELISA-AMA) e amastigotas axênicas (ELISA-AXE) de *Leishmania (L.) infantum chagasi*..... 61

Figura 22- Gráfico em dot-plot mostrando a distribuição e em box mostrando a mediana, média, valor máximo e valor mínimo em Unidades de

ELISA (UE) dos títulos de anticorpos anti-*Leishmania* nos soros de cães com diagnóstico parasitológico positivo pela pesquisa de DNA de *Leishmania* pela PCR sintomáticos e assintomáticos, e controle negativo parasitologicamente para leishmaniose empregando antígeno total de formas promastigotas de *Leishmania (L.) infantum chagasi*. * = $p < 0,05$ e *** = $p < 0,0001$ 62

Figura 23 - Gráfico em dot-plot mostrando a distribuição e em box mostrando a mediana, média, valor máximo e valor mínimo em Unidades de ELISA (UE) dos títulos de anticorpos anti-*Leishmania* nos soros de cães com diagnóstico parasitológico positivo pela pesquisa de DNA de *Leishmania* pela PCR sintomáticos e assintomáticos, e controle negativo parasitologicamente para leishmaniose empregando antígeno total de formas amastigotas axênicas de *Leishmania (L.) infantum chagasi*. *** = $p < 0,0001$ 63

Figura 24 – Gráfico em dot-plot mostrando a distribuição e em box mostrando a mediana, média, valor máximo e valor mínimo em Unidades de ELISA (EU) dos títulos de anticorpos anti-*Leishmania* nos soros de cães com diagnóstico parasitológico positivo pela pesquisa de DNA de *Leishmania* pela PCR sintomáticos e assintomáticos, e controle negativo parasitologicamente para leishmaniose empregando antígeno total de formas amastigotas purificadas de *Leishmania (L.) infantum chagasi*. ** = $p < 0,001$ e *** = $p < 0,0001$ 64

Figura 25 – Ensaio de Western Blot realizado com antígeno total de *Leishmania (L.) infantum chagasi* na forma promastigota. A primeira faixa (PM) refere-se ao padrão molecular seguida das amostras de soros de cães infectados assintomáticos (amostras 1, 2, 5 e 7), sintomáticos (amostras 3, 4, 6 e 8) e soros de cães sadios, não infectados (amostras 9 e 10)..... 66

Figura 26 – Dendograma de comparação do padrão de bandas na reação de Western Blot utilizando como antígeno, o lisado de formas promastigotas de *Leishmania (L.) infantum chagasi*. Soros de cães com leishmaniose visceral assintomáticos com DO alta no ELISA

(amostras 1 e 2), sintomáticos com DO alta no ELISA (amostras 3 e 4), assintomáticos com DO baixa no ELISA (amostras 5 e 7) sintomáticos com DO baixa no ELISA (amostras 6 e 8), e soros de cães sadios (amostras 9 e 10). Abaixo está a escala de similaridade, sendo 0 sem similaridade e 1,0 similaridade máxima.

..... 67

Figura 27 – Ensaio de Western Blot realizado com antígeno total de *Leishmania (L.) infantum chagasi* na forma amastigota axênica. Amostra de soros de cães infectados assintomáticos (amostras 1, 2, 5 e 7), sintomáticos (amostras 3, 4, 6 e 8) e soros de cães sadios, não infectados (amostras 9, 10 e 11) e a primeira faixa o padrão de peso molecular (PM). 69

Figura 28 – Dendograma de comparação do padrão de bandas na reação de Western Blot utilizando como antígeno, o lisado de formas amastigotas axênicas de *Leishmania (L.) infantum chagasi*. Soros de cães com leishmaniose visceral assintomáticos com DO alta no ELISA (amostras 1 e 2), sintomáticos com DO alta no ELISA (amostras 3 e 4), assintomáticos com DO baixa no ELISA (amostras 5) sintomáticos com DO baixa no ELISA (amostras 6 e 8), e soros de cães sadios (amostras 9, 10 e 11). Abaixo está a escala de similaridade, sendo 0 sem similaridade e 1,0 similaridade máxima..... 70

Figura 29 – Ensaio de Western Blot realizado com antígeno total de *Leishmania (L.) infantum chagasi* na forma amastigota purificada. A primeira faixa (PM) refere-se ao padrão molecular seguida das amostras de soros de cães infectados assintomáticos (amostras 1, 2, 5 e 7), sintomáticos (amostras 3, 4, 6 e 8) e soros de cães sadios, não infectados (amostras 9, 10 e 11)..... 72

Figura 30 – Dendograma de comparação do padrão de bandas na reação de Western Blot utilizando como antígeno, o lisado de formas amastigotas de *Leishmania (L.) infantum chagasi* purificadas de baço de hamster cronicamente infectado. Soros de cães com leishmaniose visceral assintomáticos com DO alta no ELISA

(amostras 1 e 2), sintomáticos com DO alta no ELISA (amostras 3 e 4), assintomáticos com DO baixa no ELISA (amostras 5 e 7) sintomáticos com DO baixa no ELISA (amostras 6 e 8), e soros de cães sadios (amostras 9, 10 e 11). Abaixo está a escala de similaridade, sendo 0 sem similaridade e 1,0 similaridade máxima.

..... 74

Lista de tabelas

- Tabela 1-** Valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e acurácia para o teste de ELISA empregando como antígeno formas promastigotas (PRO), amastigotas axênicas (AXE) e amastigotas purificadas (AMA) de *L. (L.) infantum chagasi*. 52
- Tabela 2 –** Valores observados do teste Kappa para o teste de ELISA feito com antígeno bruto oriundo de promastigotas (ELISA-PRO) e amastigotas axênicas (ELISA-AXE) de *Leishmania (L.) infantum chagasi* em soros de cães sabidamente positivos e negativos para leishmaniose. 57
- Tabela 3 –** Valores observados do teste Kappa para o teste de ELISA feito com antígeno bruto oriundo de promastigotas (ELISA-PRO) e amastigotas purificadas (ELISA-AMA) de *Leishmania (L.) infantum chagasi* em soros de cães sabidamente positivos e negativos para leishmaniose. 59
- Tabela 4 –** Valores observados do teste Kappa para o ensaio de ELISA feito com antígeno bruto oriundo de amastigotas axênicas (ELISA-AXE) e amastigotas purificadas (ELISA-AMA) de *L. (L.) infantum chagasi* em soros de cães sabidamente positivos e negativos para leishmaniose. 60
- Tabela 5 –** Número absoluto e percentagem de casos positivos e negativos pelo ELISA-PRO, ELISA-AXE e ELISA-AMA nos soros de animais sintomáticos e assintomáticos com diagnóstico parasitológico positivo pela pesquisa de DNA do parasito por PCR. 64
- Tabela 6 –** Matriz de similaridade entre o padrão de bandas dos diferentes soros na reação de Western Blot utilizando como antígeno, o lisado de formas promastigotas de *Leishmania (L.) infantum chagasi*, sendo que quanto mais próximo de 1,0 e mais próximo

a cor vermelha maior é a similaridade entre os soros, quanto mais próximo do 0 e da cor verde menor é a similaridade..... 68

Tabela 7 – Matriz de similaridade entre o padrão de bandas dos diferentes soros na reação de Western Blot utilizando como antígeno, o lisado de formas amastigotas axênicas de *Leishmania (L.) infantum chagasi*, sendo que quanto mais próximo de 1,0 e mais próximo a cor vermelha maior é a similaridade entre os soros, quanto mais próximo do 0 e da cor verde menor é a similaridade. 71

Tabela 8 – Matriz de similaridade entre o padrão de bandas dos diferentes soros na reação de Western Blot utilizando como antígeno, o lisado de formas amastigotas de *Leishmania (L.) infantum chagasi* purificadas de baço de hamster cronicamente infectado, sendo que quanto mais próximo de 1,0 e mais próximo a cor vermelha maior é a similaridade entre os soros, quanto mais próximo do 0 e da cor verde menor é a similaridade..... 75

Tabela 9 – Frequência e similaridade de bandas reconhecidas entre os soros na reação de Western Blot utilizando como antígeno, o lisado de formas promastigotas de *Leishmania (L.) chagasi*, onde 0 = ausência de banda e 1 = presença de banda. 77

Tabela 10 – Similaridade e porcentagem de ocorrência da banda reconhecida entre os soros na reação de Western Blot utilizando como antígeno, o lisado de formas promastigotas de *Leishmania (L.) infantum chagasi*. 78

Tabela 11 – Frequência e similaridade de bandas reconhecidas entre os soros na reação de Western Blot utilizando como antígeno, o lisado de formas amastigotas axênicas de *Leishmania (L.) infantum chagasi*, onde 0 = ausência de banda e 1 = presença de banda. 79

Tabela 12 – Similaridade e porcentagem de ocorrência da banda reconhecida entre os soros na reação de Western Blot utilizando como antígeno, o lisado de formas amastigotas axênicas de *Leishmania (L.) infantum chagasi*. 80

Tabela 13 – Frequência e similaridade de bandas reconhecidas entre os soros na reação de Western Blot utilizando como antígeno, o lisado de formas amastigotas de *Leishmania (L.) infantum chagasi* purificadas de baço de hamster cronicamente infectado, onde 0 = ausência de banda e 1 = presença de banda..... 81

Tabela 14 – Similaridade e porcentagem de ocorrência da banda reconhecida entre os soros na reação de Western Blot utilizando como antígeno, o lisado de formas amastigotas de *Leishmania (L.) infantum chagasi* purificadas de baço de hamster cronicamente infectado 82

Resumo

Silva TBF. *Avaliação da reatividade de antígenos de formas amastigotas de Leishmania (Leishmania) infantum chagasi no sorodiagnóstico da leishmaniose visceral canina* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018

Devido ao largo espectro de manifestações na leishmaniose visceral canina (LVC), o exame clínico não é capaz de confirmar o diagnóstico, já que muitos dos sinais clínicos não são exclusivos da LVC, tornando-se imprescindível o diagnóstico laboratorial para confirmação da infecção por *L. (L.) infantum chagasi*. A sorologia tem sido a primeira escolha para o diagnóstico da leishmaniose canina; porém, a diversidade de técnicas empregadas e de antígenos tem levado a resultados conflitantes. O emprego de formas promastigotas e amastigotas do parasito tem boa concordância no sorodiagnóstico de LVC pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), porém o teste com amastigotas mostrou-se mais sensível sem perda da especificidade. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o desempenho do ELISA no sorodiagnóstico da LVC empregando antígeno total bruto de formas amastigotas provenientes de cultura axênica (ELISA-AXE) e amastigotas purificadas de tecido de animal experimental cronicamente infectado (ELISA-AMA) comparando com o desempenho do ELISA feito com antígeno total bruto de formas promastigotas (ELISA-PRO) de *L. (L.) infantum chagasi*. Foram avaliados 115 soros de cães parasitologicamente positivos para a pesquisa de DNA de *Leishmania* por PCR, domiciliados a pelo menos 2 anos em municípios com alta transmissão de leishmaniose visceral, classificados em sintomáticos (n=67) e assintomáticos (n=48) de acordo com sinais clínicos e exames laboratoriais. Como controle, foram utilizados 81 soros de cães parasitologicamente negativos oriundos do município sem transmissão comprovada de leishmaniose visceral e 13 soros de cães com outras enfermidades. Os resultados não mostraram diferença significativa em sensibilidade, especificidade, valores preditivos e acurácia entre os testes ELISA-AXE, ELISA-AMA e ELISA-PRO, com forte correlação e concordância entre os três antígenos testados. O ensaio de Western Blot mostrou reatividade para proteínas de diferentes pesos moleculares, entre 14 a 178kDa dependendo da fonte de antígeno. Os resultados mostraram desempenho semelhantes nos testes de ELISA com amastigotas axênicas, amastigotas purificadas e promastigotas como fonte de antígeno para sorologia da leishmaniose canina. A ampla e diversificada reatividade no Western Blot com poucas bandas altamente específicas sugere o emprego de quimeras de antígenos de diferentes pesos moleculares oriundos tanto de formas amastigotas como de formas promastigotas do parasito no diagnóstico da LVC.

Descritores: testes sorológicos; leishmaniose visceral; cães; técnicas imunoenzimáticas; western blot; *Leishmania infantum*.

Summary

Silva TBF. *Evaluation of the reactivity of antigens of amastigotes forms of Leishmania (Leishmania) infantum chagasi in the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis* [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2018.

Due to the wide spectrum of manifestations in canine visceral leishmaniasis (CVL), clinical exam is not able to confirm the diagnosis, since many of the signs and symptoms are not exclusive of CVL, making it imperative that the laboratory diagnosis for infection confirmation by *L. (L.) infantum chagasi*. Since the direct search involves invasive material collection, time-consuming and expensive; the serology has been the first choice for diagnosis of canine leishmaniasis. However, the diversity of techniques employed and antigens have led to conflicting results in both diagnostic routine and applied research. Since the use of promastigotes and amastigotes of *L. (L.) infantum chagasi* have good agreement on serum diagnosis of CVL by reaction of Indirect Immunofluorescence (RIFI), despite the amastigote test proved more sensitive without loss of specificity. The main objective of this study was to evaluate and compare the performance of ELISA in the CVL using crude total antigen of axenic amastigote and promastigote culture, and purified amastigote from experimental chronically infected animal tissue of *L. (L.) infantum chagasi*. One hundred and fifty-five sera from dogs residing on areas with high disease incidence were evaluated by PCR and diagnosed positive for *Leishmania*, these were used as positive control on the present study. The animals were examined clinically and in accordance with the characteristic clinical signs of visceral leishmaniasis and laboratory tests, then were classified into 2 groups: symptomatic (n=67) and asymptomatic (n=48) animals. As negative control, eighty-one sera were used from dogs parasitologically negative by PCR in real time from the municipality without proven transmission of visceral leishmaniasis. The results showed no significant difference in sensitivity, specificity, predictive values and accuracy between ELISA-AXE, ELISA-AMA and ELISA-PRO, with strong correlation and concordance between the three antigens tested. The Western Blot assay showed reactivity for proteins of different molecular weights ranging from 14 to 178kDa depending on the antigen source. The results showed similar performance in the ELISA tests with axenic amastigotes, purified amastigotes and promastigotes as source of antigen for serology of canine leishmaniasis. The broad and diverse reactivity in Western Blot with few highly specific bands suggests the use of antigen chimeras of different molecular weights derived from both amastigote and promastigote forms of the parasite in the diagnosis of LVC.

Descriptors: serologic tests; leishmaniasis, visceral; dogs; immunoenzyme techniques; blotting, western; *Leishmania infantum*.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças parasitárias causadas por diferentes espécies de protozoário do gênero *Leishmania* que são transmitidas durante o repasto sanguíneo do inseto vetor da ordem Diptera, subfamília Phlebotominae. Com poucas exceções, as leishmanioses são doenças de transmissão zoonóticas, envolvendo animais domésticos e silvestres como reservatórios. Dependendo da espécie do parasito, do padrão genético e da resposta imunológica do hospedeiro vertebrado, podemos ter diferentes tipos de manifestação clínica no homem, como: leishmaniose cutânea, muco-cutânea e a visceral (OPAS_OMS, 2014).

A leishmaniose visceral americana (LVA) é uma zoonose causada por protozoário *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* cuja transmissão entre hospedeiros vertebrados ocorre principalmente por meio da picada do inseto vetor *Lutzomyia longipalpis* (DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2006). No homem, a doença pode causar febre irregular, emagrecimento, diarreia, tosse, hepatoesplenomegalia, micropoliadenomegalia e pancitopenia. Importante salientar que a maioria dos casos da doença quando não tratada, pode levar ao óbito (CRESCENTE *et al.*, 2009).

A leishmaniose visceral (LV) é considerada uma das sete mais importantes endemias mundiais, segundo a Organização Mundial de Saúde (OPAS_OMS, 2014). Nas Américas, a LV é endêmica em 12 países, sendo subdividido em países com transmissão esporádicas, transmissão estável e transmissão em expansão. O Brasil mostra as maiores taxas de letalidade causada pela doença (OPAS_OMS, 2014).

O cão (*Canis familiaris*) é considerado o principal reservatório doméstico, apresentando alta competência na transmissão do protozoário para o vetor natural (GUARGA *et al.*, 2000; LAURENTI *et al.*, 2013). A leishmaniose visceral canina (LVC) causa grande variedade de sinais clínicos, incluindo febre intermitente, letargia, onicogribose, emaciação, hepatoesplenomegalia, linfadenopatia, emagrecimento, anemia e lesões cutâneas, dentre elas: descamação, alopecia, dermatite pustular e dermatose ulcerativa. Em estágios mais avançados, problemas locomotores, diarreia, alopecia periocular, epistaxe, uveíte, osteosinovite, artrosinovite, e paresia dos membros posteriores podem ser também observados (FEITOSA *et al.*, 2000). Devido ao largo espectro de manifestações, o diagnóstico clínico não é capaz de confirmar a doença, já que muitos dos sinais e sintomas não são exclusivos da LVC, sobrepondo-se aos de outras doenças caninas, como babesiose, erliquiose e demodicose (FEITOSA *et al.*, 2000; GOMES *et al.*, 2008).

A infecção canina tem papel bastante relevante epidemiologicamente, pois, além de ser mais prevalente que a infecção humana, apresenta grande número de animais assintomáticos albergando parasitos, com potencial de transmitir a doença (LAURENTI *et al.*, 2013). Além disto, a doença canina, geralmente, precede a ocorrência da doença humana, sendo que ambas coexistem em todos os focos conhecidos (DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2006).

Fator agravante é que a maioria dos cães infectados não apresenta sinais clínicos, desta forma, torna-se imprescindível o diagnóstico laboratorial para confirmação da doença ou da infecção por *L. (L.) infantum chagasi*. Dentre os métodos laboratoriais para o diagnóstico da infecção temos os sorológicos e os parasitológicos. Os métodos sorológicos detectam a presença de anticorpos

anti-*Leishmania* no soro e desta forma são considerados métodos indiretos de diagnóstico. Dentre eles, os mais empregados são o ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), RIFI (Reação de Imunofluorescência Indireta) e o teste rápido DPP® (Dual Path Platform), recentemente implantado pelo Programa de Controle da Leishmaniose Visceral no Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). Os métodos parasitológicos detectam a presença do parasito, de seu material antigênico ou DNA e desta forma são considerados métodos diretos e padrão ouro no diagnóstico laboratorial. Dentre eles, podemos citar a pesquisa direta do parasito em esfregaço de punção aspirativa de órgãos linfoides corado por corantes hematológicos, pesquisa do parasito em cortes histológicos de biópsias processadas por técnicas usuais de histologia, corados por hematoxilina-eosina ou pela reação de imunoistoquímica; e a pesquisa de DNA do parasito por reação em cadeia da polimerase (PCR) (ASCHAR *et al.*, 2016; LAURENTI, 2009).

Uma vez que a pesquisa direta do parasito envolve coleta de material invasiva, a metodologia é trabalhosa e pode ter custos elevados; a sorologia tem sido a primeira escolha para o diagnóstico da leishmaniose canina. Porém, a diversidade de técnicas empregadas e de antígenos tem levado a resultados conflitantes tanto na rotina diagnóstica como na pesquisa aplicada. Fernández-/pérez e colaboradores em 1999 mostraram que a RIFI empregando formas promastigotas e amastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* no sorodiagnóstico de LVC tem boa concordância, porém o teste com amastigotas foi mais sensível sem perda da especificidade. Considerando o bom desempenho da RIFI no sorodiagnóstico da LVC empregando formas amastigotas de *Leishmania* como fonte de antígeno, o principal objetivo deste estudo foi avaliar o desempenho do

teste imunoenzimático de ELISA, teste semi-automatizado e de alta sensibilidade, no sorodiagnóstico da LVC empregando antígeno total bruto de formas amastigotas oriundas de cultura axênica e de tecido de animal experimental cronicamente infectado, comparando com o desempenho do teste de ELISA feito com antígeno total bruto de formas promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*.

REVISÃO DA LITERATURA

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Leishmaniose Visceral Americana

A infecção humana por *L. (L.) infantum chagasi* é comumente relacionada a um estado clínico-patológico conhecido como leishmaniose visceral americana (LVA), que representa um estado excepcional em indivíduos imunologicamente susceptíveis à infecção e que evolui, de forma progressiva para a doença ativa (PEARSON; SOUSA, 1996). Entretanto, hoje é amplamente sabido que a maioria dos indivíduos infectados em área endêmica apresenta resistência clínico-imunológica contra a infecção e que a LVA é apenas a ponta do *iceberg* nesta interação com o agente infeccioso (CRESCENTE *et al.*, 2009). Neste sentido, trabalhos feitos no Nordeste do Brasil utilizando testes de hipersensibilidade tardia (DHT) e sorológico (ELISA), como provas imunológicas para comprovar a infecção por leishmania, possibilitaram reconhecer duas formas sintomáticas em indivíduos infectados, a LVA clássica e a forma oligossintomática, e um estado assintomático em indivíduos imunologicamente resistentes (BADARÓ; DUARTE, 1996). Mais recentemente, estudos utilizando de forma combinada a reação de hipersensibilidade tardia (DHT) e a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), baseada no uso de antígeno espécie-específico de *L. (L.) infantum chagasi*, e associada ao estado clínico dos indivíduos infectados, permitiu a identificação de um espectro clínico-imunológico mais amplo da infecção humana por *L. (L.) infantum chagasi*, entre eles: 1) Infecção Assintomática (IA) (DTH^{+/++++}, RIFI⁻), 2) Infecção Sintomática

(IS= LVA) e 3) Infecção Subclínica Oligossintomática (ISO), ambas com o mesmo perfil imune (DTH⁻, RIFI⁺⁺⁺/++++), 4) Infecção Subclínica Resistente (ISR) (DTH^{+/++++}, RIFI^{+/++}) e, 5) Infecção Inicial Indeterminada (III) (DTH⁻, RIFI^{+/++}). (CRESCENTE *et al.*, 2009; SILVEIRA *et al.*, 2010).

No tocante a esse espectro, cabe dizer que o perfil IA está sustentado por forte expressão de hipersensibilidade tardia (DTH^{+/++++}, RIFI⁻), a qual está ligada ao caráter genético de resistência contra a infecção, enquanto o perfil SI (=LVA), ao contrário, está ligado ao caráter genético de susceptibilidade à infecção, com inibição da hipersensibilidade tardia e forte expressão da imunidade humoral (DTH⁻, RIFI⁺⁺⁺/++++), além de elevada produção de IL-6 e IL-10 (RAMOS *et al.*, 2016). Os perfis ISO e ISR representam uma expressão genética “borderline” de susceptibilidade (DTH⁻, RIFI⁺⁺⁺/++++) e resistência (DTH^{+/++++}, RIFI^{+/++}), respectivamente; o primeiro (ISO), com manifestação inicial de susceptibilidade (febre, astenia, palidez e esplenomegalia moderada), porém, com evolução espontânea para cura clínica após período de dois a três meses (GAMA *et al.*, 2004). O segundo (ISR), assintomático, representa um estágio evolutivo no sentido do polo de resistência da infecção (perfil IA). Por último, o perfil III, o de maior interesse no sentido da vigilância epidemiológica da infecção, embora assintomático, representa um estágio inicial da infecção ainda indefinido do ponto de vista imune-genético (DTH⁻, RIFI^{+/++}), com chances de evoluir para o polo de resistência (perfil IA) ou para o polo de suscetibilidade (IS=LVA) da infecção. Por essa razão, parece ter grande importância em termos da vigilância epidemiológica da infecção, já que 3-5% desses casos, apresentam níveis detectáveis de IgM evoluem para infecção sintomática, a LVA (DO RÉGO LIMA *et al.*, 2014).

2.2. Epidemiologia e distribuição geográfica

A leishmaniose visceral está presente em 76 países no mundo, onde 35 mostram coinfeção com HIV. Por ano acontecem 0,2 a 0,4 milhões de novos casos (Figura 1), com 20.000 a 40.000 mortes. A maioria dos casos, cerca de 90%, acontecem na Índia, Bangladesh, Sudão, Sul do Sudão, Brasil e Etiópia.

Figura 1 - Mapa geográfico global ilustrando o índice de novos casos de leishmaniose visceral por região no ano de 2013. Fonte: OMS, 2015

A leishmaniose visceral na América Latina está presente em 12 países, que são epidemiologicamente classificados em países com transmissão esporádica como Costa Rica, Guatemala, Honduras, Nicarágua, Bolívia e México, países com transmissão estável ou controlada como Colômbia e Venezuela e países com transmissão em expansão como Argentina, Brasil e Paraguai, de acordo com a Organização Mundial da Saúde. Entre o período de 2001 a 2014 foram

registrados um total de 48.720 casos de leishmaniose visceral com média anual de 3.480 casos, sendo que 96,42% (46.976) estão concentrados no Brasil. Observa-se uma tendência estável de casos entre os anos de 2004 a 2012, no entanto, a partir do ano de 2009 ocorreu incremento de casos nos países do Cone Sul e redução nos países Andinos representados por Venezuela e Colômbia. A partir de 2012 foram registradas 654 mortes causadas por leishmaniose visceral, com letalidade média de 6,6% (Figura 2).

Figura 2 – Número de mortes e letalidade por leishmaniose visceral na América Latina de 2012 a 2014. Fonte: OMS, 2016.

A densidade dos casos (por 50 km²) de leishmaniose visceral é baixa na maioria dos países das Américas e em alguns países a presença da doença chega a ser nula. Porém, no Brasil, ocorre alta densidade dos casos de leishmaniose visceral, principalmente nas regiões do nordeste e centro-oeste. E

em outras regiões a densidade é baixa, porém não nula, salvo alguns estados brasileiros (Figura 3).

Figura 3 – Mapa de densidade dos casos de leishmaniose visceral na América Latina 2001 a 2014. Fonte: OMS, 2016.

Em relação a incidência por 100.000 habitantes, no geral, nos países das Américas, ela fica entre média e baixa. Somente no Brasil, nas regiões norte, nordeste e centro-oeste é que a incidência fica entre baixa e muito intensa (Figura 4).

Figura 4 – Mapa de incidência por 100.000 habitantes na América Latina 2001 a 2014. Fonte: OMS, 2016.

2.3. Morfologia e ciclo biológico

Morfologicamente, o protozoário do gênero *Leishmania* apresenta-se sob duas formas distintas: a forma amastigota (esférica ou ovoide, com núcleo arredondado, cinetoplasto e aflagelada); geralmente, são encontradas no interior das células do sistema fagocítico mononuclear (SFM) do hospedeiro vertebrado, principalmente no macrófago e, dentro dessas células sobrevivem e se multiplicam até romperem a membrana celular do macrófago sendo fagocitadas por novas células do SFM. No homem, essas células parasitadas são encontradas em órgãos do sistema linfóide, como, medula óssea, baço, fígado e linfonodos. Também podendo acometer outros órgãos e tecidos, como os rins, placa de Peyer no intestino, pulmões e pele. As formas promastigotas vivem no tubo digestório médio e anterior de dípteros da subfamília Phlebotominae, pertencentes ao gênero *Lutzomyia* – no Novo mundo, e *Phlebotomus* – no Velho mundo, que é o hospedeiro invertebrado do parasito, livres ou aderidas à parede do epitélio do intestino.

O ciclo biológico deste parasito é considerado heteróximo (Figura 5). O ciclo biológico no flebotomíneo vetor inicia-se quando a fêmea se alimenta de um hospedeiro vertebrado infectado, e ao realizar o repasto sanguíneo leva algumas células parasitadas, como macrófagos e monócitos, para o interior de seu intestino. No interior do estômago do vetor, essas células se rompem e liberam os parasitos na forma amastigota que sofrem processos de divisão, multiplicação e diferenciação até chegarem a promastigotas, alongadas, com núcleo arredondado, cinetoplasto e flagelo. O vetor, com as formas

promastigotas livres, realiza um novo repasto sanguíneo, inoculando as formas promastigotas metacíclicas para o hospedeiro vertebrado. No interior deste hospedeiro, as formas promastigotas são rapidamente internalizadas em células do SFM, principalmente nos macrófagos, onde transformam-se em amastigotas, facilitando sua sobrevivência. Após transformação para amastigotas, começa o processo de divisão binária até que a membrana da célula parasitada se rompe liberando as formas amastigotas que serão fagocitadas por novas células.

Figura 5 – Ciclo biológico das leishmanias. Fonte: *Center for Disease Control*.

2.4. Imunidade na Leishmaniose Visceral Canina

As formas promastigotas inoculadas na pele do cão por meio do vetor são fagocitadas pelas células monocíticas, podendo ser destruídas ou escapar da lise e proliferar em seu interior. Esta etapa é crucial para o desenvolvimento da

resposta imune do hospedeiro (KONTOS; KOUTINAS. 1993). A leishmania por ser um parasito intracelular obrigatório, a defesa imunológica dependerá da ativação do complexo principal de histocompatibilidade II (MHC II) e da atividade das células T que, por sua vez, é determinada pela produção de citocinas que as subdivide as células em T auxiliares 1 (Th-1) e células T auxiliares 2 (Th-2) (QUINNELL *et al.*, 2001). Uma resposta efetiva contra o parasito baseia-se em uma resposta Th-1 que consiste na produção de citocinas, como IL-2, IFN- γ e TNF- α , que, dentre diversas ações, ativa macrófagos, e consequentemente a produção de metabólitos tóxicos derivados do oxigênio e nitrogênio levam a destruição dos parasitos (QUINNELL *et al.*, 2001). Porém, a maioria dos cães desenvolve preferencialmente resposta imune celular do tipo Th-2, inefetiva contra o parasito, pois, é caracterizada pela produção das citocinas IL-4 e IL-10 que são anti-inflamatórias e imunossupressoras permitindo a multiplicação de parasito dentro do macrófago e sua disseminação (Figura 6). Paralelamente também há aumento da proliferação e ativação de linfócitos B, que são responsáveis por promoverem uma alta produção de anticorpos específicos e inespecíficos sem ação no controle da doença (SLAPPENDEL; FERRER 1990).

Após a fagocitose da forma promastigota, os monócitos e as células dendríticas liberam IL-12 que estimulam os linfócitos TCD4⁺ a secretarem IFN- γ que age em sinergismo com o TNF- α para atividade antiparasitária (CUNNINGHAM 2002; TUON *et al.*, 2008). Componentes da saliva do inseto vetor, como maxadilan, encontrado somente na saliva dos *Lutzomyia longipalpis*, causa vasodilatação, inibe a produção de óxido nítrico (NO), peróxido de hidrogênio (H₂O₂), consideradas moléculas leishmanicidas, e TNF- α , favorecendo a sobrevivência do parasito dentro da célula. Além disto, favorecem

a elevação dos níveis de IL-10, prostaglandina E e IL-6 que desvia a resposta imune para o polo de suscetibilidade, não protetora (LAURENTI 2009). A resposta Th-1 está mais relacionada com um quadro de doença assintomática nos cães. Após a fagocitose das promastigotas pela célula hospedeira, ocorre uma ativação celular com a liberação de IL-12 e IL-18 que já direcionam a resposta imune celular para o polo Th-1 com a produção de IFN- γ e TNF- α citocinas indutoras de inflamação. Estas citocinas induzem o recrutamento de mais macrófagos para o sítio de infecção induzindo-os a produzirem citocinas pró-inflamatórias, como: IL-12, IL-1 α , IL-1 β , IL-6 e IL-18 (ETTINGER; WILSON, 2008).

Porém, dentre as formas polares de suscetibilidade e resistência, há um grande número de animais em área endêmica de transmissão com resposta imune intermediária, entre um polo e outro, muitas vezes assintomáticos, com baixos níveis de anticorpos, representando problema considerável para o diagnóstico da doença (COURA-VITAL, 2011).

Figura 6 – Espectro clínico e imunológico da infecção canina por *Leishmania* (*Leishmania infantum chagasi*). Fonte: Coura-Vital et al., 2011 – *Trends in Parasitology*.

2.5. Leishmaniose Visceral Canina

A patogênese da leishmaniose visceral canina induzida pela *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*, nas nossas condições ambientais, ainda necessita de estudos mais aprofundados, pois a maior parte da literatura refere-se à patogênese da doença causada pela *L. (L.) infantum* em condições experimentais ou na infecção natural nos países do Mediterrâneo, ou ainda por analogia, a estudos da medicina humana (PALTRINIERI *et al.*, 2010; SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2011). Em cães, a leishmania coloniza quase todos os órgãos, em contraste com o que ocorre em seres humanos, nos quais o parasito está total ou quase totalmente restrito ao sistema hematopoiético (BERRAHAL *et al.*, 1996).

A defesa imunológica do cão dependerá da atividade das células T, podendo ser mediada por uma resposta Th-1 ou Th-2. A maioria dos cães desenvolvem uma resposta Th-2, inefetiva contra o parasito. Por conta desta resposta imunológica, ocorre a proliferação de linfócitos B que promovem uma alta produção de anticorpos específicos e inespecíficos, porém, estes anticorpos não têm ação no controle da doença no animal (SLAPPENDEL; FERRER 1990).

Em cães, o diagnóstico clínico isolado da doença não é suficiente para detectar animais positivos, devido ao largo espectro de sinais clínicos, que vai de animais assintomáticos a casos em estágio avançado da doença (FEITOSA *et al.*, 2000). A leishmaniose visceral canina causa grande variedade de sinais clínicos, incluindo febre intermitente, letargia, onicogrifose, emaciação, hepatoesplenomegalia, alterações do apetite variado, anemia, linfadenopatia e

lesões cutâneas, dentre elas: descamação, alopecia, dermatite pustular, dermatose ulcerativa, entre outras (BURACCO *et al.*, 1997; FERRER *et al.*, 1988, 1995; LONGSTAFFE *et al.*, 1983; TURREL; POOL 1982). Outros sintomas são observados como problemas locomotores (TURREL; POOL 1982), diarreia, alopecia periocular, epistaxe (LONGSTAFFE *et al.*, 1983), uveíte (GARCÍA-ALONSO *et al.*, 1996), osteosinovite, artrosinovite (BURACCO *et al.*, 1997) e paresia de posteriores (ROSA; OLIVEIRA, 1997).

Em cães, o parasito acomete, principalmente, as células da medula óssea, linfonodos, baço, fígado, pulmões, intestino e pele (ASHFORD *et al.*, 1995). As alterações histopatológicas viscerais encontradas na LVC são similares às descritas na doença humana (KEENAN *et al.*, 1984), embora as lesões cutâneas presentes na maioria dos cães infectados não sejam descritas na doença humana causada pela *L. (L.) infantum chagasi*.

Os órgãos linfoides são os principais alvos na doença, uma vez que o parasito acomete, principalmente, as células do Sistema Fagocítico Mononuclear. Os linfonodos encontram-se, frequentemente, enfartados, com perilinfoadenite, hipertrofia dos cordões e dos folículos, intensa fibrose, seios dilatados e hiperplasia de macrófagos (ALENCAR, 1959). População reduzida de linfócitos e proliferação de macrófagos nas áreas paracorticais e cordões medulares, hiperplasia folicular e plasmocitose intensa foram também observadas (KEENAN *et al.*, 1984; MOREIRA *et al.*, 2007).

A esplenomegalia nem sempre está presente, ou pode ser discreta, moderada ou intensa (ALENCAR, 1959). Outra alteração frequentemente encontrada é a periesplenite. O baço apresenta uma diminuição de linfócitos na bainha linfoide periarteriolar e proliferação de macrófagos nesta região;

hiperplasia folicular e aumento da polpa vermelha com agregados de macrófagos e plasmócitos (KEENAN *et al.*, 1984; MOREIRA *et al.*, 2007; TAFURI *et al.*, 2001).

Na medula óssea, pode-se observar aumento na celularidade, decorrente da proliferação de macrófagos, que podem ou não conter parasitos (KEENAN *et al.*, 1984). A hipoplasia medular, principalmente de células brancas, associada à identificação de macrófagos parasitados foi referida por Tafuri e colaboradores (2001) (TAFURI *et al.*, 2001).

O fígado, geralmente, encontra-se aumentado de volume (ALENCAR, 1959), apresentando um infiltrado linfoplasmocitário e hiperplasia das células de Küpffer (KEENAN *et al.*, 1984), porém sendo raro o achado do parasito (DUARTE *et al.*, 1988). Geralmente, ocorre uma hepatite difusa acompanhada de reação inflamatória exsudativa com infiltrado linfoplasmocitário nos espaços portais (MOREIRA *et al.*, 2007; TAFURI *et al.*, 2001).

Outro órgão bastante acometido na LVC é o rim, no qual além de uma nefrite intersticial com a presença ou não de parasitos, se observa também a presença de um quadro de glomerulonefrite pela deposição de imunocomplexos ou células inflamatórias (DUARTE *et al.*, 1986). Histologicamente, foi observado um aumento de células T CD4⁺ que foi correlacionada com a resposta imune celular envolvida na patogênese da glomerulonefrite da LVC (COSTA *et al.*, 2000).

O pulmão é um tecido também acometido na LVC. Um quadro de pneumonite intersticial caracterizado pela expansão do septo alveolar por células ou tecido de cicatrização tem sido observado no homem, no cão naturalmente infectados, e em roedor experimentalmente infectados por *L. infantum*, sendo

que as alterações histológicas observadas estão relacionadas com o tempo de evolução da infecção (DUARTE *et al.*, 1986).

Quando se refere ao padrão histopatológico observado na pele de cães com leishmaniose visceral, a ocorrência de dermatite mononuclear perivascular superficial ou profunda é frequentemente observada (ROSSI *et al.*, 2016). No que se refere à ocorrência de parasitismo cutâneo e sua possível correlação com a imagem histológica cutânea de cães infectados, há sugestão de que o tipo de infiltrado inflamatório presente na pele de animais infectados pode refletir o perfil da resposta imunitária sistêmica do hospedeiro contra o parasito; desta forma, este infiltrado pode ser considerado um marcador morfológico de susceptibilidade ou resistência do hospedeiro à infecção. Alguns relatos sugeriram também que pode haver uma relação entre os sintomas clínicos e as imagens histológicas da pele (FIGUEIREDO *et al.*, 2010).

2.6. Métodos de diagnóstico

Devido ao largo espectro de manifestações da leishmaniose canina, o diagnóstico clínico não é capaz de confirmar a doença, uma vez que os sinais clínicos não são exclusivos da LVC, sobrepondo-se aos de outras doenças caninas (FEITOSA *et al.*, 2000) . Somado a isto, a maioria dos cães infectados podem não apresentar sinais clínicos, tornando-se imprescindível o diagnóstico laboratorial para comprovar a infecção por *L. (L.) infantum chagasi*.

Dentre os métodos empregados para o diagnóstico da LVC temos os parasitológicos, considerados métodos diretos de diagnóstico e os sorológicos,

considerados indiretos. O exame parasitológico é considerado o teste-ouro no diagnóstico da infecção. A observação direta de formas amastigotas do parasito em esfregaços de aspirado de órgãos linfoides, pele ou sangue corados por corantes hematológicos é uma forma simples e relativamente rápida para confirmar o diagnóstico da enfermidade. Sua especificidade é boa, mas a sensibilidade depende do grau do parasitismo, do tipo de material biológico coletado, do seu processamento, da coloração, além do observador (FERRER *et al.*, 1988).

Quando o parasitismo é intenso, o exame direto apresenta vantagens, mas quando a presença de formas amastigotas nos tecidos é baixa, especialmente nos animais assintomáticos, o diagnóstico parasitológico por tal método torna-se difícil e duvidoso. Este problema pode ser solucionado com a utilização de técnicas mais sensíveis para a detecção de parasitos, tais como a reação de imunistoquímica e a reação em cadeia da polimerase – PCR (MOREIRA *et al.*, 2007).

A PCR é baseada na amplificação de oligonucleotídeos que formam uma sequência conhecida do parasito, sua especificidade é muito boa, mas a sensibilidade pode variar de acordo com o material coletado e processado (FARIA; ANDRADE. 2012). Uma vantagem da PCR em tempo real é que quantifica o DNA do parasito amplificado em diferentes amostras, ao contrário do PCR convencional que fornece apenas resultados qualitativos. Contudo, estes métodos ainda não se aplicam a rotina diagnóstica da LVC, pois são de alto custo e dependem de laboratórios bem equipados (ASCHAR *et al.*, 2016).

O diagnóstico parasitológico pode também ser estabelecido por meio da detecção do parasito por cultivo em meios específicos. Biópsias ou punções

aspirativas de diferentes órgãos ou tecidos são colocadas em meios de cultivo, nos quais formas amastigotas do parasito, transformam-se em formas promastigotas podendo ser observadas em microscopia de contraste de fase. O crescimento das formas promastigotas leva de 4 a 6 dias, desta forma, a leitura das culturas é feita semanalmente, sendo que, após a terceira ou quarta semana de observação, o resultado final já pode ser concluído. Como os meios de cultivo são ricos, a falta de adequação na esterilidade durante o processo da coleta de material e semeadura nos meios pode levar ao crescimento de bactérias e fungos que impedem o crescimento de *Leishmania*, diminuindo, assim, a sensibilidade do teste. Embora as culturas sejam úteis para o isolamento e identificação do parasito, elas são pouco utilizadas na rotina diagnóstica (LAURENTI. 2009).

Ainda dentre os métodos diretos para o diagnóstico da LVC, temos o exame histopatológico de tecidos, em biópsias de pele ou vísceras empregando cortes histológicos parafinados corados pela Hematoxilina-Eosina, Giemsa, entre outras. As formas sugestivas de amastigotas de *Leishmania* podem ser observadas no interior de macrófagos e a confirmação deve ser feita por imunoistoquímica, que é bastante sensível quando comparada a técnica de histoquímica convencional (TAFURI *et al.*, 2004).

A detecção de anticorpos circulantes anti-*Leishmania* utilizando técnicas sorológicas constitui-se em um instrumento bastante importante no diagnóstico da LVC, uma vez que emprega material biológico de coleta não invasiva e processa um grande número de amostras simultaneamente. Animais doentes desenvolvem resposta imune humoral e produzem altos títulos de IgG anti-*Leishmania* sendo facilmente detectáveis pelos testes sorológicos (FERRER *et*

al., 1988). O grande problema encontra-se nos animais infectados e assintomáticos que muitas vezes, pelo próprio reflexo da resposta imune predominante do tipo Th1, fazem baixos títulos de anticorpos difíceis de serem detectados por métodos rotineiros. Além disto, a soroconversão ocorre, aproximadamente, três meses após a infecção, período este, que pelos exames sorológicos o animal pode não ser detectado como infectado. Desta forma, os testes sorológicos devem ser interpretados com cautela, uma vez que não são 100% sensíveis e específicos, e falham em detectar cães infectados no período pré-patente da doença (FERRER *et al.*, 1995).

Uma das desvantagens de testes sorológicos é a possibilidade de reações cruzadas com outros tripanossomatídeos que podem infectar cães (ALVES *et al.*, 2012). Estudo desenvolvido por Zanette *et al.*, 2014 mostrou reatividade cruzada com 64,3% das amostras de *Trypanosoma cruzi* e 7,7% das amostras de *Ehrlichia canis* utilizando o teste de ELISA com antígeno total de formas promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*. Já na RIFI, a reatividade cruzada ocorreu com soros de *Trypanosoma cruzi* em 42,9% e *Toxoplasma gondii* em 50% dos casos; e no teste imunocromatográfico Kalazar Detect™ reação cruzada ocorreu em 7,7% dos soros de *Ehrlichia canis*, 10% dos soros de *Toxoplasma gondii* e 12,5% dos soros de *Neospora canium*, mostrando que em todos os testes sorológicos avaliados houve reações cruzadas com outras enfermidades.

Muitos testes sorológicos podem ser utilizados, entre eles a reação de fixação de complemento, reação de aglutinação direta, reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e teste imunoenzimático (ELISA) com diferentes modificações, *western blot*, entre outras. Porém, os testes sorológicos

TR-DPP e ELISA representam os principais instrumentos usados no sorodiagnóstico da leishmaniose visceral canina no Brasil, uma vez que tem sido empregado no Programa Nacional e Estadual de Controle da Leishmaniose Visceral para identificação de reservatórios infectados (GRIMALDI et al., 2012). Entretanto, apesar da doença estar associada, habitualmente, a apenas uma espécie de parasito, a *L. (L.) infantum chagasi*, o que, teoricamente, deveria facilitar a padronização de um antígeno específico para ser usados nesses testes, ainda hoje, não existe um consenso na literatura especializada quanto ao emprego de um antígeno para o uso no sorodiagnóstico da leishmaniose visceral humana e canina

O teste de ELISA pode apresentar, dependendo do antígeno empregado, uma sensibilidade que varia entre 80% e 99,5% e uma especificidade entre 81% e 100% (MANCIANTI et al., 1995; MANCIANTI; PEDONESE; POLI, 1996). A sensibilidade e especificidade deste método dependem do tipo de antígeno empregado e de mudanças no protocolo. As técnicas que utilizam antígenos totais são limitadas em termos de especificidade, por apresentar reações cruzadas não somente com tripanossomatídeos, mas, também, com organismos filogeneticamente distantes (ZANETTE et al., 2014). A utilização de antígenos recombinantes ou purificados melhoram a sensibilidade e a especificidade da técnica (SCALONE et al., 2002). Moreira e colaboradores (2007) empregando antígeno específico, lisado total de formas promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*, no ensaio de ELISA para o diagnóstico sorológico de cães positivos parasitologicamente, mostraram sensibilidade de 87,8% para cães sintomático, 68,0% para cães oligossintomáticos e 95,7% para cães assintomáticos; e especificidade de 100%. A reação de ELISA mostrou boa correlação com o

diagnóstico parasitológico, principalmente quando técnicas de imunomarcção foram utilizadas. Já Zanette e colaboradores em 2014 mostraram sensibilidade de 94,0% e especificidade de 84,4% para o ensaio de ELISA utilizando também antígeno específico, em cães naturalmente infectados por *L. (L.) infantum chagasi* com boa concordância com o diagnóstico parasitológico. Porém reações cruzadas foram observadas com doença de Chagas, erliquiose e coinfeção por erliquiose e babesiose.

Dependendo do antígeno empregado e das condições da RIFI, sua sensibilidade pode variar entre 90 e 100% e a especificidade entre 80% a 100% (MANCIANTI *et al.*, 1995; MANCIANTI; PEDONESE; POLI. 1996). Zanette e colaboradores (2014) trabalhando com 50 cães parasitologicamente positivos mostraram sensibilidade de 98% e especificidade de 91% para a RIFI utilizando como antígeno promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*, e ótima concordância com o diagnóstico parasitológico ($Kappa=0,893$). Infelizmente, reatividade cruzada foi observada com soros de cães chagásicos e com soros de cães com toxoplasmose (ZANETTE *et al.*, 2014).

Na tentativa de aperfeiçoar os testes sorológicos empregados no programa de controle da leishmaniose visceral, Silva e colaboradores (2009) trabalharam com amostras de soro em papel de filtro colhidas de cães de área endêmica para leishmaniose visceral com diagnóstico clínico e parasitológico positivo. A RIFI foi avaliada quantitativamente, pelo número de formas promastigotas marcadas, nas diluições de 1/20, 1/40, 1/80 e 1/160 utilizando-se o kit comercial produzido por BioManguinhos e um ensaio *in house* utilizando promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*. O ensaio *in house* com os soros mostrou-se capaz de separar todos os verdadeiros negativos dos verdadeiros positivos e apontou para uma

eficiência de 60 a 76% para o kit comercial. Quando se comparou os resultados da RIFI do kit comercial empregada em soros e papel de filtro, observou-se que o melhor ponto de corte para o papel de filtro seria a diluição de 1/80, o que, seguramente, diminuiria o número de falsos positivos.

A comparação da RIFI utilizando formas promastigotas ou amastigotas no diagnóstico e acompanhamento de casos de LVC por *Leishmania infantum* mostrou boa concordância, porém o teste com amastigotas foi mais sensível sem perda da especificidade, resultando em um diagnóstico mais precoce nos animais assintomáticos (FERNÁNDEZ-PÉREZ *et al.*, 1999).

Em uma investigação soroepidemiológica para LVC no Estado do Pará, a RIFI com formas amastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* obtidas por aposição de fragmentos de baço de hamster infectado cronicamente mostrou-se negativa em todas as amostras, porém 8,5% e 4,2% das amostras foram positivos pela RIFI e ELISA com antígenos *L. major*-like (BioManguinhos), respectivamente. Considerando que na área estudada não há ocorrência de leishmaniose visceral humana e canina, ao contrário da situação da leishmaniose tegumentar que tem elevada incidência, concluiu-se que a RIFI com amastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* foi mais específica, e que a soropositividade encontrada com os kits RIFI e ELISA produzidos por BioManguinhos representaria reações falso-positivas com o soro de cães infectados com leishmânias dermatrópicas (JESUS *et al.*, 2003).

Seguimentos clonados de genes do parasito têm sido usados para produzir proteínas recombinantes, e muitas destas proteínas, sozinhas ou combinadas, têm sido usadas como antígenos em ensaios para o diagnóstico sorológico. Carvalho e colaboradores (2002) utilizaram o antígeno recombinante A2 de *L.*

donovani no diagnóstico sorológico da LVC em áreas endêmicas do Brasil e mostraram a detecção de anticorpos anti-A2 por ELISA em 93,3% dos cães sintomáticos e em 90% dos animais assintomáticos com infecção parasitológica confirmada. Não foi encontrada reação cruzada significativa com soro de cães com outras doenças comuns sugerindo o seu uso no diagnóstico da LVC no Novo Mundo, dada o seu alto desempenho, inclusive na população assintomática.

Por sua vez, o antígeno recombinante rK39 tem sido um dos mais empregados na sorologia (BADARÓ *et al.*, 1996) mostraram positividade em 100% dos cães com sintomatologia usando ELISA com antígeno rK39, sugerindo sua utilização como marcador de doença ativa. O teste rápido com rK39 (Kalazar Detect™) é capaz de detectar com sensibilidade crescente cães assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos, embora em menor proporção que o ELISA com antígeno bruto homólogo (LEMOS *et al.*, 2008). Neste sentido, Quinnell *et al.*, 2013 verificaram que a sensibilidade desse teste rápido varia em função do tempo passado desde o momento da infecção e do estado clínico dos cães. A sensibilidade em detectar cães positivos assintomáticos foi de apenas 33%, elevando-se para 77% nos cães sintomáticos e para 89% nos polissintomáticos.

Outro antígeno recombinante já testado refere-se ao rK26, que mostrou alta sensibilidade no ELISA detectando 96% de cães sintomáticos e 66% dos animais assintomáticos (PORROZZI *et al.*, 2007). Comparativamente, o teste rápido imunocromatográfico com rK26 é menos sensível em relação ao teste com rK39, mas o uso combinado destes antígenos aumenta a sensibilidade, mostrando a existência de reatividades complementares de tais antígenos (DA COSTA *et al.*, 2003).

3. JUSTIFICATIVA

Embora haja um grande esforço na busca de antígenos que possam discriminar cães infectados por *L. (L.) i. chagasi* daqueles com outras patologias, e que tenham alta reatividade com imunoglobulinas tanto de cães assintomáticos como de sintomáticos, os antígenos até o momento empregados nas diferentes técnicas sorológicas ainda não atingiram totalmente estes objetivos.

Inúmeras razões podem estar por trás disso, entre elas, o próprio curso da infecção por *L. (L.) i. chagasi*, bastante heterogêneo, onde uma parte dos animais progride rapidamente para a doença ativa, apresentando altos títulos de anticorpos, outros que apresentam prolongada infecção subpatente antes da doença, que mostram títulos crescentes ao longo da progressão de quadros mais brandos até muito graves, e aqueles que permanecem assintomáticos ou espontaneamente se recuperam, que mostram títulos baixos ou soroconvertem para negativo (FALQUETO *et al.*, 2009; OLIVA *et al.*, 2006; PALTRINIERI *et al.*, 2010; SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2011). No entanto, a sensibilidade de um teste diagnóstico não depende apenas da intensidade da resposta imune individual de cada indivíduo e do estágio em que se encontra este indivíduo após a infecção, como também dos antígenos usados e da própria sensibilidade do método empregado (FALQUETO *et al.*, 2009; MIRÓ *et al.*, 2008; PORROZZI *et al.*, 2007; SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2001).

Embora a combinação de diferentes antígenos recombinantes seja uma das melhores estratégias para detectar a infecção por *L. (L.) infantum chagasi* nos seus diferentes estágios, a tecnologia para produção de tais antígenos é sofisticada e não acessível à vários locais e centros onde ocorre a transmissão do parasito. Os testes rápidos comerciais com antígenos recombinantes, tais como Kalazar Detect e TR-DPP, não contemplam ainda as características de um teste desejado (BADARÓ *et al.*, 1996; GRIMALDI *et al.*, 2012). Já a produção de antígenos a partir de cultura é bem mais fácil e menos dispendiosa, e vem sendo usado por vários grupos de pesquisadores. Nota-se, no entanto, que antígenos de formas amastigotas são menos usados do que promastigotas; e bons resultados com eles foram alcançados, especialmente quando empregados na RIFI (JESUS *et al.*, 2003). Os antígenos obtidos a partir de formas amastigotas do parasito foram muito pouco explorados nas reações imunoenzimáticas (ELISA), sendo estas consideradas mais sensíveis e específicas que a RIFI (MENDONÇA, 2016), merecendo assim ser mais investigadas. Além disto, após o estabelecimento da infecção por *Leishmania*, são as formas amastigotas que estão sendo constantemente expostas ao sistema imunológico do hospedeiro, esperando-se assim uma maior reatividade para antígenos oriundos desta forma parasitária.

OBJETIVOS

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Avaliar a reatividade de soros de cães com e sem sinais clínicos naturalmente infectados por *L. (L.) infantum chagasi* a antígenos brutos totais de formas amastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* e comparar com o desempenho de antígenos brutos totais de formas promastigotas do parasito, no sorodiagnóstico da leishmaniose canina através da técnica ELISA.

4.2. Objetivos Específicos

1. Determinar o melhor ponto de corte para as reações de ELISA feitas com antígeno total de formas promastigotas, amastigotas de cultura axênica e amastigotas purificadas de baço de hamster cronicamente infectado por *L. (L.) infantum chagasi*.
2. Determinar a sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo e acurácia para os testes de ELISA empregando as três diferentes fontes de antígeno.
3. Avaliar a concordância dos resultados e a correlação entre os testes de ELISA empregando as três diferentes fontes de antígeno.

4. Comparar os resultados obtidos no ELISA empregando antígenos de formas amastigotas do parasito com aquele que emprega formas promastigotas como fonte antigênica, em animais infectados sintomáticos e assintomáticos.
5. Determinar antígenos de maior reatividade para soros de cães, sintomáticos e assintomáticos, infectados com *L. (L.) infantum chagasi* por Western Blot.

MATERIAL E MÉTODOS

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Casuística

Foram empregados 115 soros de cães parasitologicamente positivos para a pesquisa de DNA de *Leishmania* por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) em tempo real em punção aspirativa de linfonodo, swab de conjuntiva, swab bucal ou sangue total periférico, domiciliados a pelo menos 2 anos em municípios com alta prevalência de leishmaniose visceral, entre eles: Andradina, Araçatuba, Bauru, Campinas, Presidente Prudente no Estado de São Paulo, Camaçari no Estado da Bahia, Belo Horizonte no Estado de Minas Gerais e Brasília no Distrito Federal. Os animais foram analisados clinicamente e de acordo com os sinais clínicos característicos de leishmaniose visceral (dermatite, alopecia, hiperqueratose, onicogribose, linfadenomegalia, esplenomegalia, hepatomegalia, emaciação, conjuntivite, uveíte, blefarite, entre outros) e exames laboratoriais (proteínas totais, albumina, globulina, AST, ALT, creatinina e uréia) foram classificados em 2 grupos: animais sintomáticos (n=67) e assintomáticos (n=48). Estes soros pertencem à soroteca do Laboratório de Patologia de Moléstias Infecciosas (LIM50) do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Como controle negativo, foram utilizados 81 soros de cães parasitologicamente negativos por PCR em tempo real em biópsias de vísceras ou em sangue periférico, oriundos do município sem transmissão comprovada

de leishmaniose visceral, como São Paulo (SP) e Alfenas (MG). Ainda foram empregados 13 soros de animais com outras enfermidades, entre elas: doença de Chagas (n = 7), toxoplasmose (n = 5) e neosporose (n = 1), para melhor avaliar os parâmetros de especificidade, sensibilidade e acurácia dos testes sorológicos.

Todos os procedimentos para contenção dos animais e coleta de material biológico foram realizados de acordo com as diretrizes do Colégio Brasileiro de Experimentação em Animais (COBEA). O protocolo de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética de uso Animal da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo sob protocolo de número 044/15 (ANEXO A).

5.2. Parasitos

Para o presente estudo foi utilizado parasito da espécie *L. (L.) infantum chagasi* (MHOM/BR/72/cepa46), cedido gentilmente pelo Prof. Wilson Mayrink, que isolou o parasito a partir de punção aspirativa de medula óssea de paciente com leishmaniose visceral no estado de Minas Gerais. O parasito foi caracterizado por isoenzimas e anticorpos monoclonais no Instituto Evandro Chagas, Belém (PA), Brasil.

5.2.1. Obtenção de formas promastigotas

Hamsters cronicamente infectados com o parasito foram sacrificados em câmara de CO₂, o baço retirado e macerado assepticamente para isolamento de *L. (L.) infantum chagasi*. A expansão de formas promastigotas foi feita a 25° C, em meio Schneider suplementado com 10 % de soro fetal bovino, 1 % de L-glutamina, 100 µg/mL e 100 UI/mL de estreptomicina/penicilina. Na fase estacionária de crescimento em cultura, entre o quinto e sexto dia, as formas promastigotas oriundas da terceira a quinta passagem em cultura foram lavadas por três vezes com tampão salina-fosfato 0,15 M, pH 7,2 (PBS) a 1620 g, 10 min, 4° C. O *pellet* contendo os parasitos foi congelado a -80° C para posterior preparo do antígeno a ser empregado na reação sorológica de ELISA.

5.2.2. Obtenção de formas amastigotas purificadas

Hamsters cronicamente infectados com o parasito foram sacrificados em câmara de CO₂, e o baço retirado e macerado assepticamente. Para remoção das hemácias, a suspensão celular foi incubada por um período de 2 minutos em solução de tampão de lise de hemácias (155 mM NH₄Cl 10 mM KHCO₃ 1 mM EDTA), a reação foi interrompida com tampão PBS, após este processo foi realizado uma centrifugação a 180 g, 10 min, 4° C para descarte do sobrenadante. Em seguida, a suspensão celular foi passada por agulhas finas

(30×0,8 mm e 13×0,38 mm) 3 a 5 vezes para auxiliar a ruptura das células e a liberação das formas amastigotas do parasito. Após este processo foi realizado uma centrifugação diferencial, primeiro a 405 g, 10 min, 4° C, sendo o *pellet* que continha os debris celulares descartado; e depois o sobrenadante foi centrifugado a 3645 g, 10 min, 4° C para obtenção do *pellet* contendo as formas amastigotas do parasito. Este *pellet* foi congelado a -80° C até o preparo do antígeno a ser empregado na reação de ELISA.

5.2.3. Obtenção de formas amastigotas axênicas

As culturas de *L. (L.) infantum chagasi* na forma promastigota foram mantidas a 25° C, em meio 199 suplementado com 10 % de soro fetal bovino, por quatro dias, até a fase logarítmica. Após esse período as culturas foram transferidas para o meio 199 suplementado com 25 % de soro fetal bovino, em uma concentração de 1×10^8 parasitos por mL, incubados a 37° C (5 % CO₂) por 16-24 horas. Após este período, os parasitos foram centrifugados a 3645 g, em temperatura ambiente por 10 minutos e ressuspensos em meio suplementado com 10 mM de succinato/Tris, pH 5,5 e incubados por 5 dias a 37° C (5 % CO₂) para diferenciação em amastigotas. As culturas foram mantidas com repiques a cada cinco dias na proporção de 1 parte da cultura para 2 partes de meio de cultura de acordo com Saar *et al.*, 1998. Após a diferenciação (3 a 5 repiques), as formas amastigotas axênicas foram lavadas por três vezes com PBS estéril a 3645 g, 10 minutos, 4° C. O *pellet* contendo os parasitos foi congelado a -80° C

para posterior preparo do antígeno a ser empregado na reação sorológica de ELISA.

5.3. Produção de antígenos totais para reação de ELISA

Formas promastigotas, amastigotas purificadas e amastigotas axênicas de *L. (L.) infantum chagasi* congeladas em freezer -80°C foram descongeladas em temperatura ambiente e congeladas em nitrogênio líquido por 3 vezes para a lise dos parasitos e liberação de antígenos totais. Após este procedimento, seguiu-se a determinação da concentração de proteínas pelo método de Bradford (Bio-rad, USA). Os antígenos foram aliquotados e estocados a -80°C até o uso.

5.4. ELISA para avaliar a reatividade dos soros para antígenos totais de formas promastigotas e amastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*

A otimização da reação de ELISA foi feita através da titulação em bloco, usando combinações diversas de concentração do antígeno e diluição de soros sabidamente positivos e negativos para leishmaniose. Concluiu-se, que a melhor concentração do antígeno a ser utilizada era de 10 µg/mL e uma diluição para os soros de 1:400, porque foram as que melhor separaram os soros positivos

dos negativos. Posteriormente, o conjugado foi também titulado, obtendo-se como melhor diluição de uso, a diluição de 1:2000.

Microplacas de poliestireno de fundo plano de 96 poços foram sensibilizadas com 100 µL de antígeno total de formas promastigotas, amastigotas purificadas e amastigotas axênicas de *L. (L.) infantum chagasi* na concentração de 10 µg/mL do antígeno, diluídas em tampão carbonato-bicarbonato 0,1 M pH 9,5 e incubadas em câmara úmida durante a noite a 4° C. Após lavagem das placas com PBS 0,15 M pH 7,2 contendo 0,05 % de Tween-20 (PBS-T), as placas foram bloqueadas com solução de leite em pó desnatado a 10 % em PBS-T e incubadas em câmara úmida durante 2 horas a 37° C. As placas foram lavadas novamente três vezes com PBS-T e as amostras dos soros testes, assim como dos soros controles positivo e negativo, foram adicionadas à placa, em duplicata, na diluição de 1:400 em PBS-T e incubadas a 37° C durante 1 hora em câmara úmida. As placas foram lavadas três vezes com PBS-T e o conjugado anti-IgG de cão ligado a fosfatase alcalina (Bethyl, USA) foi adicionado na diluição de 1:2000 em PBS-T, sendo as placas incubadas a 37° C, durante 45 minutos em câmara úmida. Após este período, as placas foram novamente lavadas três vezes com PBS-T e o revelador contendo o substrato e o cromógeno [1,0 mg/mL de pNPP (Sigma, USA), em tampão carbonato-bicarbonato 0,1 M pH 9,5] foi adicionado e incubado à temperatura ambiente por 30 minutos. A reação foi interrompida com NaOH 3 M, sendo a leitura da absorbância feita em filtro de 405 nm. O resultado obtido em densidade óptica (DO) foi convertido em Unidades de ELISA (UE) considerando o soro controle positivo como um calibrador e arbitrariamente estabelecido em 100 UE (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2014). O ponto de corte (*cut-off*) foi estabelecido

pela curva ROC (curva de características operacionais, do inglês: Receiver Operating Characteristic Curve) utilizando o programa GraphPad Prism 5.0.

5.5. Western blot

Para detectar e caracterizar antígenos de maior e menor reatividade oriundo das formas amastigotas axênicas e purificadas, assim como das formas promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*, empregamos a técnica de Western Blot (WB) e soros de cães com leishmaniose visceral de alta e baixa reatividade no ELISA e controles, soros de animais sadios.

Gel de poliacrilamida 12% *TGX™ FastCast™* (Bio-Rad) foi preparado da seguinte maneira: o primeiro gel com resolver A, resolver B, TEMED e 10% APS (Persulfato de amônio), o segundo gel com *stacker* A, *stacker* B, TEMED e 10% de APS. Depois de polymerizados adicionamos o marcador molecular *Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™* (Bio-Rad) para determinar os pesos moleculares das bandas de proteínas a serem encontradas, e os diferentes antígenos (PRO, AXE e AMA) na concentração de 1,256 mg/mL de proteína, o equivalente a aproximadamente 40µg por poço. Após a corrida de eletroforese de proteínas, as bandas oriundas de antígeno total de promastigota, amastigota axênica e purificada foram transferidas simultaneamente para mini membranas de PVDF (Bio-Rad) pelo sistema de transferência *Trans-blot Turbo* (Thermo Fisher Scientific) sob 25 V, 1,3 A por 10 minutos. As membranas foram separadas em fitas, colocadas em canaletas e bloqueadas com leite em pó (Molico® - Nestlé)

10 % dissolvido em PBS por 1 hora a 37° C. As fitas foram lavadas três vezes com PBS incubadas a 4° C overnight (em constante agitação) com soros positivos e negativos para leishmaniose visceral na diluição de 1:400. O anticorpo secundário conjugado com peroxidase foi diluído 1:2000 em leite em pó 5 % dissolvido em PBS; sendo 600 µL adicionados em cada canaleta, seguido de incubação por 1:30 horas em constante agitação e temperatura ambiente. Após este período as canaletas foram lavadas por 3 vezes com PBS. A revelação foi feita por colorimetria utilizando o kit Opti-4CN TM Substrate (Bio-Rad), com incubação por 30 minutos, sendo que após a revelação das bandas a reação foi interrompida com água milli-Q por 15 minutos.

As membranas de Western Blot foram digitalizadas, e posteriormente, analisadas utilizando o programa CLIQs 1D PRO (TotalLab, Reino Unido), definindo os *lanes* e as bandas de forma personalizada e assim, comparando-as ao padrão de peso molecular sendo possível estimar o peso aproximado de cada banda. Com o programa, também foi possível comparar os diferentes padrões de bandas e gerar dendogramas e matrizes para identificar as relações entre as amostras.

5.6. Análise estatística

A curva ROC (Receiver Operator Characteristic Curve) foi empregada no presente estudo para definir o ponto de corte das reações de ELISA determinando o melhor equilíbrio entre sensibilidade e especificidade.

O programa GraphPad Prism 5.0 foi utilizado para determinar a sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo e acurácia dos testes de ELISA empregando os diferentes antígenos.

Utilizamos o teste Kappa no programa BioEstat 5.3, para determinar a intensidade de concordância, onde, $K=0$, significa que não há concordância e $K \neq 0$, significa que há concordância entre os métodos, e quanto mais próximo de 1, melhor a concordância.

Utilizamos o programa GraphPad Prism 5.0 para realizar o teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov para os ensaios utilizando diferentes antígenos. E para verificar se havia correlação entre os resultados dos testes, realizamos o teste de correlação de Spearman.

Para verificar diferenças entre os grupos clínicos sintomático e assintomático, utilizamos o teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de comparação de Dunns no software GraphPad Prism 5.0.

Os gráficos foram construídos no programa Origin 8.0.

RESULTADOS

6. RESULTADOS

6.1. Características morfológicas dos parasitos empregados como antígeno no ELISA

A morfologia das formas parasitárias empregadas para produção de antígenos para o ELISA foi observada através da microscopia ótica convencional e microscopia eletrônica de transmissão, com o objetivo de avaliar a integridade e viabilidade dos parasitos empregados nos diferentes testes sorológicos.

6.1.1. Microscopia de luz

Na Figura 7 podemos observar formas promastigotas (PRO) do parasito com seu corpo fusiforme, núcleo e cinetoplasto evidentes e flagelo longo, aspecto morfológico característico de formas PRO em fase estacionária de crescimento em cultivo. A Figura 8 mostra as características morfológicas de formas amastigotas axênicas (AXE) em cultivo, de aspecto ovoide com núcleo e cinetoplasto presentes e ausência de flagelo. A Figura 9, representada por *imprint* de baço de hamster cronicamente infectado por *Leishmania (L.) infantum chagasi*, observamos formas amastigotas (AMA) do parasito intra e extracitoplasmáticas com suas características morfológicas preservadas (núcleo, cinetoplasto e limite citoplasmático integro); e na Figura 10 podemos

observar formas AMA purificadas do tecido esplênico de hamster infectados com manutenção de sua estrutura morfológica avaliado e visualizado por microscopia ótica de luz.

Figura 7 – Fotomicrografia mostrando formas promastigotas de *Leishmania (L.) infantum chagasi* obtidas de cultura em fase estacionária de crescimento. Coloração de Giemsa.

Figura 8 – Fotomicrografia mostrando formas amastigotas axênicas de *Leishmania (L.) infantum chagasi*, obtidas de cultura no quarto dia, segunda passagem. Coloração de Giemsa.

Figura 9 – Fotomicrografia mostrando formas amastigotas do parasito intra e extracelulares em *imprint* de baço de hamster infectado cronicamente com *Leishmania (L.) infantum chagasi*. Coloração de Giemsa.

Figura 10 – Fotomicrografia mostrando formas amastigotas de *Leishmania (L.) infantum chagasi* purificadas do baço de hamster cronicamente infectados com o parasito. Coloração de Giemsa.

6.1.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Através da microscopia eletrônica de transmissão podemos observar formas PRO com seu corpo alongado, núcleo (N) e cinetoplasto (C) evidente, mitocôndria (M), inclusões lipídicas (IL) e corpos eletrodensos (CE) caracterizando integridade da membrana celular do parasito (Figura 11). A Figura 12 e a Figura 13 mostram aspectos ultraestruturais da forma AXE, onde podemos observar integridade do núcleo (N), bolsa flagelar (BF) com flagelo (F) mostrando a estrutura dos microtúbulos, mitocôndria (M), corpos eletrodensos (CE), cinetoplasto (C) e membrana celular (MC) preservada. A Figura 14 mostra uma forma AMA com estrutura nuclear (N) preservada e evidente, mitocôndria

(M), flagelo (F) e conjunto de microtúbulos (MT) responsável por manter o arcabouço e a integridade da membrana celular do parasito.

Figura 11 - Micrografia eletrônica mostrando forma promastigota de *Leishmania (L.) infantum chagasi* obtida de cultura em fase estacionária de crescimento, onde: C = cinetoplasto, N = núcleo, IL = inclusão lipídica, M = mitocôndria e CE = corpos eletrodensos. Contrastação de Uranila, tetróxido de ósmio e citrato de chumbo.

Figura 12 – Micrografia eletrônica mostrando forma amastigota axênica de *Leishmania* (*L.*) *infantum chagasi*, obtidas de cultura no quarto dia, segunda passagem, onde: N = núcleo, CE = corpos eletrodensos, BF = bolsa flagelar, F = flagelo, MC = membrana celular. Contrastação de Uranila, tetróxido de ósmio e citrato de chumbo.

Figura 13 – Micrografia eletrônica mostrando forma amastigota axênica de *Leishmania* (*L.*) *infantum chagasi*, obtida de cultura no quarto dia, segunda passagem, onde: N = núcleo, BF = bolsa flagelar, F = flagelo, M = mitocôndria, MC = membrana celular. Contrastação de Uranila, tetróxido de ósmio e citrato de chumbo.

Figura 14 – Micrografia eletrônica mostrando forma amastigota de *Leishmania (L.) infantum chagasi* purificadas do baço de hamster cronicamente infectados com o parasito, onde: N = núcleo, F = flagelo, M = mitocôndria, MT = microtúbulos. Contrastação de Uranila, ósmio e citrato de chumbo.

6.2. Determinação do ponto de corte (cut-off) para os ensaios de ELISA empregando os diferentes antígenos

A relação entre sensibilidade e especificidade de um teste diagnóstico normalmente é antagônica. Assim, construímos a curva ROC (Receiver Operator Characteristic Curve) para cada ensaio empregado no presente estudo no intuito de definir o ponto de corte para determinar o melhor equilíbrio entre essas variáveis (Figura 15).

A curva ROC é uma representação gráfica construída com valores decimais de sensibilidade - verdadeiros positivos (eixo y) e de especificidade -

falso positivos (eixo x) em função de um conjunto de valores contínuos de pontos de corte que, no presente estudo, variaram entre 0 e 100 EU.

Com o gráfico já traçado, foi possível calcularmos a distância entre cada curva e o ponto onde a sensibilidade e especificidade fossem iguais a 1 (100%), ou seja, a ideal. O ponto de corte (*cut-off*) que determinou a menor distância (d) da curva em relação ao ponto ideal (1) foi o escolhido, visto ser aquele que determina o melhor balanço entre os valores de sensibilidade e especificidade, otimizando assim cada ensaio (Figura 15).

Através da curva ROC também foi possível calcular a área sob a curva (a), medida essa que permite comparar o desempenho dos testes sorológicos de forma eficaz (Tabela 1).

Figura 15 – Gráfico mostrando a curva ROC para os ensaios de ELISA utilizando os antígenos totais oriundos de lisado de formas promastigotas (PRO), amastigotas axênicas (AXE) e amastigotas purificadas (AMA), indicando a distância (d) para cada antígeno.

O ponto de corte escolhido para o ELISA com antígeno oriundo de lisado de formas promastigotas (ELISA-PRO) foi 13,75 UE [distância (d) = 0,1706] (Figura 15) e a área sob a curva (A) = 0,9345 (Tabela 1).

O ponto de corte utilizado para o ELISA que empregou como antígeno o lisado de formas amastigotas axênicas (ELISA-AXE) foi 9,5 UE [distância (d) = 0,2061] (Figura 15) e a área sob a curva (A) = 0,916 (Tabela 1).

O ponto de corte utilizado para o ELISA feito com antígeno de lisado de formas amastigotas teciduais (ELISA-AMA) foi 24,93 UE [distância (d) = 0,2564] (Figura 15) e a área sob a curva (A) = 0,8781 (Tabela 1).

Tabela 1- Valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e acurácia para o teste de ELISA empregando como antígeno formas promastigotas (PRO), amastigotas axênicas (AXE) e amastigotas purificadas (AMA) de *L. (L.) infantum chagasi*.

	Antígeno		
	PRO (IC 95%)	AXE (IC 95%)	AMA (IC 95%)
Área sob a curva	0,9345 (0,9001-0,9689)	0,9160 (0,8770-0,9550)	0,8781 (0,8318-0,9244)
Sensibilidade	0,8522 (0,7739-0,9115)	0,8696 (0,7940-0,9251)	0,7913 (0,7056-0,8615)
Especificidade	0,9149 (0,8392-0,9625)	0,8404 (0,7505-0,9078)	0,8511 (0,7628-0,9161)
Valor Preditivo +	0,9245 (0,8567-0,9669)	0,8696 (0,7940-0,9251)	0,8667 (0,7864-0,9251)
Valor Preditivo -	0,8350 (0,7489-0,9008)	0,8404 (0,7505-0,9078)	0,7692 (0,6764-0,8462)
Acurácia	0,8804 (0,8359-0,9241)	0,8565 (0,8130-0,9070)	0,8182 (0,7679-0,8721)
Falso-positivo (Erro tipo 1)	0,0851 (0,0375-0,1608)	0,1596 (0,0922-0,2495)	0,1489 (0,0839-0,2373)
Falso-negativo (Erro tipo 2)	0,1478 (0,0885-0,2261)	0,1304 (0,7488-0,2060)	0,2087 (0,1385-0,2944)

6.3. ELISA-PRO

Dos 115 soros de cães positivos na PCR para *Leishmania*, 98 foram positivos e 17 negativos no ELISA-PRO (Figura 16). Em relação aos 94 soros de cães parasitologicamente negativos para leishmaniose, 86 foram negativos e 17 positivos no ELISA-PRO (Figura 17). Dos soros de cães com outras enfermidades testados no ELISA-PRO, somente um soro de animal infectado por *Neospora canis* foi positivo também neste teste (Figura 18A). Estes resultados refletiram em sensibilidade de 0,8522, especificidade de 0,9149, valor preditivo positivo (VPP) de 0,9245, valor preditivo negativo (VPN) de 0,8350 e acurácia de 0,8804 para o ELISA-PRO (Tabela 1).

6.4. ELISA-AXE

Do total de 115 soros de cães positivos considerando o teste parasitológico para leishmaniose, 100 foram positivos e 15 foram negativos (Figura 16). Considerando os soros negativos na PCR para *Leishmania*, do total de 94 animais, 79 foram negativos e 15 foram positivos para o ELISA-AXE (Figura 17). Dos soros de outras enfermidades testados no ELISA-AXE, somente um soro de animal infectado por *Neospora canis* foi positivo neste teste (Figura 18B). Estes resultados refletiram em uma sensibilidade de 0,8696,

especificidade de 0,8404, valor preditivo positivo de 0,8696, valor preditivo negativo de 0,8404 e acurácia 0,8565 (Tabela 1).

6.5. ELISA-AMA

Dos 115 soros de cães positivos para a pesquisa de DNA de *Leishmania* pela PCR, 91 foram positivos e 24 negativos no teste de ELISA-AMA (Figura 16). Em relação aos animais negativos parasitologicamente para leishmaniose, dos 94 soros, 80 foram negativos e 24 foram positivos para este teste (Figura 17). Dos soros de outras enfermidades testados no ELISA-AMA, dois soros de cães com doença de Chagas e um soro de cão com neosporose foram também positivos no ELISA-AMA (Figura 18C). Estes resultados refletiram em sensibilidade de 0,7913, especificidade de 0,8511, valor preditivo positivo de 0,8667, valor preditivo negativo de 0,7692 e acurácia de 0,8182 (Tabela 1).

Figura 16 – Gráfico em dot-plot mostrando a distribuição e em box-plot mostrando a mediana, média, valor máximo e valor mínimo em Unidades de ELISA (UE) dos títulos de anticorpos anti-*Leishmania* IgG nos soros de cães com diagnóstico parasitológico positivo pela pesquisa de DNA de *Leishmania* pela PCR, empregando antígeno total de formas promastigotas (PRO), amastigotas axênicas (AXE) e amastigotas purificadas (AMA) de *L. (L.) infantum chagasi*. A linha tracejada indica o ponto de corte para cada reação de ELISA.

Figura 17 – Gráfico em dot-plot mostrando a distribuição e em box mostrando a mediana, média, valor máximo e valor mínimo em Unidades de ELISA (UE) dos títulos de anticorpos anti-*Leishmania* IgG nos soros de cães com diagnóstico parasitológico negativo pela pesquisa de DNA de *Leishmania* pela PCR, empregando antígeno total de formas promastigotas (PRO), amastigotas axênicas (AXE) e amastigotas purificadas (AMA) de *L. (L.) infantum chagasi*. A linha tracejada indica o ponto de corte para cada reação de ELISA.

Figura 18 – Gráfico em dot-plot mostrando a distribuição e em box mostrando a mediana, média, valor máximo e valor mínimo em Unidades de ELISA (UE) dos títulos de anticorpos anti-*Leishmania* IgG nos soros de cães com outras enfermidades, empregando antígeno total de formas promastigotas, ELISA-PRO (A), amastigotas axênicas, ELISA-AXE (B) e amastigotas purificadas, ELISA-AMA (C) de *Leishmania (L.) infantum chagasi*. A linha tracejada indica o ponto de corte para cada reação de ELISA.

6.6. Avaliação da concordância e correlação entre os testes de ELISA

A concordância entre os testes ELISA-PRO e ELISA-AXE foi de 85,17% (discordância = 14,83%), sendo concordantes 95/115 soros sabidamente positivos para leishmaniose e 83/94 soros sabidamente negativos para ambos os antígenos. Em relação aos resultados discordantes, 11 soros mostraram-se positivos no ELISA-PRO e negativos no ELISA-AXE; e 20 soros foram negativos no ELISA-PRO e positivos no ELISA-AXE (Tabela 2). O teste de correlação de Spearman mostrou uma correlação positiva forte entre o teste ELISA-PRO e o ELISA-AXE com um valor de $r = 0,759$ e $p < 0,0001$ (Figura 19). Os resultados do teste Kappa entre o ELISA-PRO e o ELISA-AXE estão apresentados na Tabela 2, mostram um valor de Kappa de 0,7029 com $p < 0,0001$, evidenciando uma boa concordância entre os testes sorológicos feitos com o antígeno de PRO e AXE.

Tabela 2 – Valores observados do teste Kappa para o teste de ELISA feito com antígeno bruto oriundo de promastigotas (ELISA-PRO) e amastigotas axênicas (ELISA-AXE) de *Leishmania (L.) infantum chagasi* em soros de cães sabidamente positivos e negativos para leishmaniose.

		ELISA-PRO	
		+	-
ELISA-AXE	+	95 (45,45 %)	20 (9,57 %)
	-	11 (5,26 %)	83 (39,71 %)
Concordância		0,8517	
Kappa		0,7029	
Conclusão		Boa	
p (unilateral)		< 0,0001

Figura 19 - Gráfico mostrando a distribuição entre resultados concordantes e discordantes no teste ELISA em Unidades de ELISA (EU) dos títulos de anticorpos anti-*Leishmania* IgG nos soros de cães com diagnóstico parasitológico negativo e positivo pela pesquisa de DNA de *Leishmania* (PCR), empregando antígeno total de formas promastigotas (ELISA-PRO) e amastigotas axênicas (ELISA-AXE) de *Leishmania (L.) infantum chagasi*.

Em relação à concordância entre os testes ELISA-PRO e ELISA-AMA pudemos observar uma concordância de 81,34% (discordância = 18,66%). Sendo concordantes para resultados positivos 86/115 soros e para resultados negativos 84/94 soros. Em relação aos resultados discordantes, 20 soros mostraram-se positivos para o teste ELISA-PRO e negativos para o ELISA-AMA, e 19 soros foram negativos para ELISA-PRO e positivos para o ELISA-AMA (Tabela 3). O teste de correlação de Spearman mostrou uma correlação positiva forte entre o ELISA-PRO e o ELISA-AMA com valor de $r = 0,755$ e $p < 0,0001$ (Figura 20). Os resultados do teste Kappa para estes antígenos estão apresentados na Tabela 3 e mostram uma concordância de 0,8134, com kappa de 0,6268 e $p < 0,0001$, refletindo uma boa concordância entre o ELISA-PRO e o ELISA-AMA.

Tabela 3 – Valores observados do teste Kappa para o teste de ELISA feito com antígeno bruto oriundo de promastigotas (ELISA-PRO) e amastigotas purificadas (ELISA-AMA) de *Leishmania (L.) infantum chagasi* em soros de cães sabidamente positivos e negativos para leishmaniose.

		ELISA-PRO	
		+	-
ELISA-AMA	+	86 (41,15 %)	19 (9,09 %)
	-	20 (9,57 %)	84 (40,19 %)
Concordância		0,8134	
Kappa		0,6268	
Conclusão		Boa	
p (unilateral)		< 0,0001

Figura 20 – Gráfico mostrando a distribuição entre resultados concordantes e discordantes no teste ELISA em Unidades de ELISA (EU) dos títulos de anticorpos anti-*Leishmania* IgG nos soros de cães com diagnóstico parasitológico negativo e positivo pela pesquisa de DNA de *Leishmania* (PCR), empregando antígeno total de formas promastigotas (ELISA-PRO) e amastigotas purificadas (ELISA-AMA) de *Leishmania (L.) infantum chagasi*.

Em relação a concordância entre os testes ELISA-AMA e ELISA-AXE observamos uma concordância de 80,86% (discordância = 19,14%). Foram concordantes 90/115 soros para resultados positivos e 79/94 soros para resultados negativos nestes testes de ELISA; enquanto 25 soros se mostraram positivos no ELISA-AXE e negativos no ELISA-AMA; e 15 soros foram negativos

no ELISA-AXE e positivos no ELISA-AMA (Tabela 4). O teste de correlação de Spearman mostrou uma correlação positiva forte entre os testes de ELISA-PRO e ELISA-AXE com valor de $r = 0,703$ e $p < 0,0001$ (Figura 21). Os resultados do teste Kappa para estes antígenos estão apresentados na Tabela 4 e mostram uma concordância de 0,8086, com valor de kappa de 0,617 e $p < 0,0001$, apontando para uma boa concordância entre o ELISA-AXE e o ELISA-AMA.

Tabela 4 – Valores observados do teste Kappa para o ensaio de ELISA feito com antígeno bruto oriundo de amastigotas axênicas (ELISA-AXE) e amastigotas purificadas (ELISA-AMA) de *L. (L.) infantum chagasi* em soros de cães sabidamente positivos e negativos para leishmaniose.

		ELISA-AXE	
		+	-
ELISA-AMA	+	90 (43,06 %)	15 (7,18 %)
	-	25 (11,96 %)	79 (37,8 %)
Concordância		0,8086	
Kappa		0,617	
Conclusão		Boa	
p (unilateral)		< 0,0001

Figura 21 – Gráfico mostrando a distribuição entre resultados concordantes e discordantes no teste ELISA em Unidades de ELISA (EU) dos títulos de anticorpos anti-*Leishmania* IgG nos soros de cães com diagnóstico parasitológico negativo e positivo pela pesquisa de DNA de *Leishmania* (PCR), empregando antígeno total de formas amastigota purificada (ELISA-AMA) e amastigotas axênicas (ELISA-AXE) de *Leishmania (L.) infantum chagasi*.

6.7. Avaliação do desempenho dos testes em relação aos grupos clínicos

Em relação aos grupos clínicos, sintomático ($n = 67$) e assintomático ($n = 48$), todos os testes ELISA-PRO, ELISA-AXE e ELISA-AMA mostraram melhor desempenho no diagnóstico sorológico dos animais sintomáticos quando comparados aos assintomáticos (Tabela 5), diagnosticando um maior número de animais e com títulos sorológicos mais elevados.

Para o antígeno preparado com formas PRO, 89,55% (60/67) dos animais sintomáticos foram positivos, enquanto 79,17% (38/48) dos assintomáticos mostraram títulos de anticorpos acima do *cut-off* da reação ($p < 0.05$). Para este teste tiveram reação falso negativa em 10,45% (7/67) nos animais sintomáticos e 20,83% (1/48) nos animais assintomáticos (Figura 22).

Figura 22- Gráfico em dot-plot mostrando a distribuição e em box mostrando a mediana, média, valor máximo e valor mínimo em Unidades de ELISA (UE) dos títulos de anticorpos anti-*Leishmania* nos soros de cães com diagnóstico parasitológico positivo pela pesquisa de DNA de *Leishmania* pela PCR sintomáticos e assintomáticos, e controle negativo parasitologicamente para leishmaniose empregando antígeno total de formas promastigotas de *Leishmania (L.) infantum chagasi*. * = $p < 0,05$ e *** = $p < 0,0001$.

Em relação ao teste de ELISA-AXE, 94,03% (63/67) dos animais sintomáticos foram positivos, enquanto que apenas 55,22% (37/48) dos assintomáticos mostraram títulos de anticorpos acima do *cut off* da reação ($p < 0.0001$). Para este teste, reação falso negativa foi observada somente em 5,97% (4/67) dos animais sintomáticos e 20,09% (11/48) dos animais assintomáticos (Figura 23).

Figura 23 - Gráfico em dot-plot mostrando a distribuição e em box mostrando a mediana, média, valor máximo e valor mínimo em Unidades de ELISA (UE) dos títulos de anticorpos anti-*Leishmania* nos soros de cães com diagnóstico parasitológico positivo pela pesquisa de DNA de *Leishmania* pela PCR sintomáticos e assintomáticos, e controle negativo parasitologicamente para leishmaniose empregando antígeno total de formas amastigotas axênicas de *Leishmania (L.) infantum chagasi*. *** = $p < 0,0001$

Para o teste de ELISA-AMA, 85,07% (57/67) dos animais sintomáticos foram positivos, enquanto somente 70,83% (34/48) dos assintomáticos mostraram títulos de anticorpos acima do *cut off* da reação ($p < 0.001$). Para este teste, 14,93% (10/67) dos animais sintomáticos mostraram reação falso negativa e 29,17% (14/48) dos animais assintomáticos (Figura 24).

Figura 24 – Gráfico em dot-plot mostrando a distribuição e em box mostrando a mediana, média, valor máximo e valor mínimo em Unidades de ELISA (EU) dos títulos de anticorpos anti-*Leishmania* nos soros de cães com diagnóstico parasitológico positivo pela pesquisa de DNA de *Leishmania* pela PCR sintomáticos e assintomáticos, e controle negativo parasitologicamente para leishmaniose empregando antígeno total de formas amastigotas purificadas de *Leishmania (L.) infantum chagasi*. ** = $p < 0,001$ e *** = $p < 0,0001$

Tabela 5 – Número absoluto e percentagem de casos positivos e negativos pelo ELISA-PRO, ELISA-AXE e ELISA-AMA nos soros de animais sintomáticos e assintomáticos com diagnóstico parasitológico positivo pela pesquisa de DNA do parasito por PCR.

		ELISA-PRO	ELISA-AXE	ELISA-AMA
Sintomático (n = 67)	POS	60 (89,55%)	63 (94,03%)	57 (85,07%)
	NEG	7 (10,45%)	5 (5,97%)	10 (14,93%)
Assintomático (n = 48)	POS	38 (79,17%)	37 (55,22%)	34 (70,83%)
	NEG	10 (20,83%)	11 (16,42%)	14 (29,17%)

6.8. Análise do Western Blot

A reação de Western Blot (WB) foi analisada com as imagens digitalizadas das membranas de Western Blot, e posteriormente, utilizando o software CLIQs 1D PRO (TotalLab, Reino Unido), definiu-se as faixas e as bandas de forma personalizada e assim, comparou-se ao padrão de peso molecular, sendo possível estimar o peso molecular aproximado de cada banda. Com o software, também foi possível comparar os diferentes padrões de bandas e gerar dendogramas e matrizes para identificar as relações e similaridades entre as amostras.

6.8.1. Ensaio de Western Blot realizado com antígeno total de *Leishmania (L.) infantum chagasi* na forma promastigota.

A Figura 25 mostra a detecção de bandas de diferentes pesos moleculares na reação de imunoblotting em soros de cães infectados assintomáticos com altos títulos de anticorpos, denominados, DO alta no ELISA (amostras 1 e 2), soros de cães infectados sintomáticos com DO alta no ELISA (amostras 3 e 4), soros de cães infectados assintomáticos com baixos títulos de anticorpos, denominados, DO baixa no ELISA (amostras 5 e 7), soros de cães infectados sintomáticos com DO baixa no ELISA (amostras 6 e 8) e soros de cães sadios (amostras 9 e 10), sendo a primeira faixa de padrão de peso molecular (PM).

Figura 25 – Ensaio de Western Blot realizado com antígeno total de *Leishmania (L.) infantum chagasi* na forma promastigota. A primeira faixa (PM) refere-se ao padrão molecular seguida das amostras de soros de cães infectados assintomáticos (amostras 1, 2, 5 e 7), sintomáticos (amostras 3, 4, 6 e 8) e soros de cães saudáveis, não infectados (amostras 9 e 10).

A comparação por similaridade entre os grupos mostrou que a frequência de reconhecimento de bandas foi similar entre os soros sintomáticos com alto título de anticorpos, seguido dos soros de animais assintomáticos com alto título de anticorpos. Ambos os grupos com DO alta no ELISA (assintomáticos e sintomáticos) mostraram uma similaridade bastante significativa entre si, como pode ser observado no dendograma abaixo (Figura 26) e na matriz de similaridade (Tabela 6). De um modo geral, a comparação entre os resultados

obtidos para o grupo de cães infectados e não infectados mostraram pouca similaridade, exceto pelo soro de animal infectado assintomático com DO baixa no ELISA (amostra 5) que mostrou similaridade com o grupo controle, não infectado.

Figura 26 – Dendrograma de comparação do padrão de bandas na reação de Western Blot utilizando como antígeno, o lisado de formas promastigotas de *Leishmania (L.) infantum chagasi*. Soros de cães com leishmaniose visceral assintomáticos com DO alta no ELISA (amostras 1 e 2), sintomáticos com DO alta no ELISA (amostras 3 e 4), assintomáticos com DO baixa no ELISA (amostras 5 e 7) sintomáticos com DO baixa no ELISA (amostras 6 e 8), e soros de cães sadios (amostras 9 e 10). Abaixo está a escala de similaridade, sendo 0 sem similaridade e 1,0 similaridade máxima.

Tabela 6 – Matriz de similaridade entre o padrão de bandas dos diferentes soros na reação de Western Blot utilizando como antígeno, o lisado de formas promastigotas de *Leishmania (L.) infantum chagasi*, sendo que quanto mais próximo de 1,0 e mais próximo a cor vermelha maior é a similaridade entre os soros, quanto mais próximo do 0 e da cor verde menor é a similaridade.

Matriz de Similaridade	Assinto DO Alta 2	Sinto DO Alta 3	Sinto DO Alta 4	Assinto DO Baixa 5	Assinto DO Baixa 7	Sinto DO Baixa 6	Sinto DO Baixa 8	Sadio 9	Sadio 10
Assinto DO Alta 1	0,78	0,83	0,73	0,47	0,58	0,67	0,48	0,35	0,44
Assinto DO Alta 2		0,77	0,67	0,29	0,48	0,76	0,56	0,29	0,40
Sinto DO Alta 3			0,91	0,30	0,59	0,81	0,58	0,30	0,38
Sinto DO Alta 4				0,19	0,57	0,71	0,56	0,19	0,27
Assinto DO Baixa 5					0,27	0,40	0,33	0,50	0,67
Assinto DO Baixa 7						0,55	0,32	0,40	0,38
Sinto DO Baixa 6							0,74	0,40	0,38
Sinto DO Baixa 8								0,33	0,46
Sadio 9									0,67

6.8.2. Ensaio de Western Blot realizado com antígeno total de *Leishmania (L.) infantum chagasi* na forma amastigota axênica.

A Figura 27 mostra a detecção de bandas de diferentes pesos moleculares na reação de imunoblotting em soros de cães infectados assintomáticos com DO alta no ELISA (amostras 1 e 2), soros de cães infectados

sintomáticos com DO alta no ELISA (amostras 3 e 4), soros de cães infectados assintomáticos com DO baixa no ELISA (amostras 5 e 7), soros de cães infectados sintomáticos com DO baixa no ELISA (amostras 6 e 8) e soros de cães sadios (amostras 9, 10 e 11), sendo a primeira faixa de padrão de peso molecular (PM).

Figura 27 – Ensaio de Western Blot realizado com antígeno total de *Leishmania (L.) infantum chagasi* na forma amastigota axênica. Amostra de soros de cães infectados assintomáticos (amostras 1, 2, 5 e 7), sintomáticos (amostras 3, 4, 6 e 8) e soros de cães sadios, não infectados (amostras 9, 10 e 11) e a primeira faixa o padrão de peso molecular (PM).

A comparação por similaridade entre as amostras mostrou pouca similaridade entre os soros de cães sadios, negativos para leishmaniose visceral, mesmo assim foram colocados em uma chave isolada no dendograma (Figura

28). Já os soros de cão sintomático com DO alta no ELISA (amostra 4) e assintomático com DO baixa (amostra 6) mostraram grande similaridade entre si, porém baixa similaridade com os outros soros de cães infectados, sintomáticos e assintomáticos. Os soros de cão sintomático com DO alta (amostra 3) e assintomáticos com DO alta (amostra 2) mostraram alta similaridade, seguidos assintomáticos com DO alta (amostra 1), sintomático com DO baixa (amostra 6) e sintomático DO baixa (amostra 8) como podemos observar no dendograma abaixo (Figura 28) e na matriz de similaridade (Tabela 7).

Figura 28 – Dendograma de comparação do padrão de bandas na reação de Western Blot utilizando como antígeno, o lisado de formas amastigotas axênicas de *Leishmania (L.) infantum chagasi*. Soros de cães com leishmaniose visceral assintomáticos com DO alta no ELISA (amostras 1 e 2), sintomáticos com DO alta no ELISA (amostras 3 e 4), assintomáticos com DO baixa no ELISA (amostras 5) sintomáticos com DO baixa no ELISA (amostras 6 e 8), e soros de cães saudáveis (amostras 9, 10 e 11). Abaixo está a escala de similaridade, sendo 0 sem similaridade e 1,0 similaridade máxima.

Tabela 7 – Matriz de similaridade entre o padrão de bandas dos diferentes soros na reação de Western Blot utilizando como antígeno, o lisado de formas amastigotas axênicas de *Leishmania (L.) infantum chagasi*, sendo que quanto mais próximo de 1,0 e mais próximo a cor vermelha maior é a similaridade entre os soros, quanto mais próximo do 0 e da cor verde menor é a similaridade.

Matriz de similaridade	Assinto DO Alta 2	Sinto DO Alta 3	Sinto DO Alta 4	Assinto DO baixa 5	Sinto DO baixa 6	Sinto DO baixa 7	Sadio 8	Sadio 9	Sadio 10
Assinto DO Alta 1	0,73	0,67	0,27	0,27	0,64	0,60	0,14	0,12	0,00
Assinto DO Alta 2		0,84	0,21	0,21	0,54	0,50	0,00	0,29	0,11
Sinto DO Alta 3			0,25	0,25	0,70	0,48	0,00	0,33	0,13
Sinto DO Alta 4				1,00	0,36	0,22	0,00	0,00	0,00
Assinto DO baixa 5					0,36	0,22	0,00	0,00	0,00
Sinto DO baixa 6						0,63	0,00	0,00	0,00
Sinto DO baixa 7							0,00	0,00	0,00
Sadio 8								0,40	0,00
Sadio 9									0,40

6.8.3. Ensaio de Western Blot realizado com antígeno total de *Leishmania (L.) infantum chagasi* na forma amastigota purificada de baço de hamster cronicamente infectado.

A Figura 29 mostra a detecção de bandas de diferentes pesos moleculares na reação de imunoblotting em soros de cães infectados assintomáticos com DO alta no ELISA (amostras 1 e 2), soros de cães infectados

sintomáticos com DO alta no ELISA (amostras 3 e 4), soros de cães infectados assintomáticos com DO baixa no ELISA (amostras 5 e 7), soros de cães infectados sintomáticos com DO baixa no ELISA (amostras 6 e 8) e soros de cães sadios (amostras 9, 10 e 11), sendo a primeira faixa de padrão de peso molecular (PM).

Figura 29 – Ensaio de Western Blot realizado com antígeno total de *Leishmania (L.) infantum chagasi* na forma amastigota purificada. A primeira faixa (PM) refere-se ao padrão molecular seguida das amostras de soros de cães infectados assintomáticos (amostras 1, 2, 5 e 7), sintomáticos (amostras 3, 4, 6 e 8) e soros de cães sadios, não infectados (amostras 9, 10 e 11).

A comparação por similaridade entre todas as amostras mostrou similaridade máxima entre as amostras 10 e 11 (soro de cães sadios) e estas por sua vez, similaridade mínima, quase zero com todas as outras amostras. A

amostra 9, soro de cães sadio também, mostrou boa similaridade com a amostra 5, soro de animal infectado assintomático com DO baixa no ELISA e baixa similaridade com os demais soros. As amostras 3 e 4, soros de cães sintomáticos que apresentam DO alta no ELISA mostraram alta similaridade entre si, seguido pelas amostras 6 e 8, soros de cães sintomáticos com DO baixa no ELISA, amostras 1 e 2, soros de cães assintomáticos com DO alta no ELISA, e amostra 7, soro de cão assintomáticos com DO baixa no ELISA, como mostra o dendograma abaixo (Figura 30) e a matriz de similaridade (Tabela 8). As variáveis mostraram-se bastante separadas, colocando uma chave somente de negativos, outra de negativo com um assintomático de DO baixa, outra de assintomáticos de DO alta e baixa incluindo 1 soro de cão sintomático de DO baixa e outra chave com sintomáticos de DO alta e baixa, como mostra o dendograma (Figura 30).

Figura 30 – Dendrograma de comparação do padrão de bandas na reação de Western Blot utilizando como antígeno, o lisado de formas amastigotas de *Leishmania (L.) infantum chagasi* purificadas de baço de hamster cronicamente infectado. Soros de cães com leishmaniose visceral assintomáticos com DO alta no ELISA (amostras 1 e 2), sintomáticos com DO alta no ELISA (amostras 3 e 4), assintomáticos com DO baixa no ELISA (amostras 5 e 7) sintomáticos com DO baixa no ELISA (amostras 6 e 8), e soros de cães saudáveis (amostras 9, 10 e 11). Abaixo está a escala de similaridade, sendo 0 sem similaridade e 1,0 similaridade máxima.

Foi construída uma matriz com o objetivo de analisar as bandas pela frequência e similaridade. Analisando as membranas do teste WB realizado com antígeno de *Leishmania (L.) infantum chagasi* na forma promastigota observamos que a banda de peso molecular aproximado de 30 kDa foi reconhecida por 87,5% das amostras positivas para leishmaniose visceral, de animais sintomáticos e assintomáticos, que mostraram alta e baixa DO no ELISA. Não foi reconhecida somente por um soro assintomático de DO baixa no ELISA. Esta mesma banda também não foi reconhecida por nenhum soro sabidamente negativo, de cães saudáveis.

A banda de peso molecular aproximado a 50 kDa foi reconhecida por 75% dos soros positivos para leishmaniose visceral, sendo que somente em um soro de cão infectado assintomático de DO baixa no ELISA e um soro de cão sintomático de DO baixa no ELISA não a reconheceram. O mesmo aconteceu com as bandas de peso molecular aproximado de 15 kDa e 17 kDa que foram reconhecidas por 75% dos casos positivos para leishmaniose visceral, sendo que somente dois soros assintomáticos com DO baixa não a reconheceram. Os soros positivos para leishmaniose visceral com DO alta reconheceram uma banda de aproximadamente 29 kDa. Todos os soros de cães saudáveis e um soro de cão com leishmaniose visceral assintomático com DO baixa reconheceram uma banda com aproximadamente 67 kDa (Tabelas 9 e 10).

Tabela 9 – Frequência e similaridade de bandas reconhecidas entre os soros na reação de Western Blot utilizando como antígeno, o lisado de formas promastigotas de *Leishmania (L.) chagasi*, onde 0 = ausência de banda e 1 = presença de banda.

Peso molecular da banda (kDa) Média ± Desvio Padrão	Assinto DO Alta 1	Assinto DO Alta 2	Sinto DO Alta 3	Sinto DO Alta 4	Assinto DO Baixa 5	Assinto DO Baixa 7	Sinto DO Baixa 6	Sinto DO Baixa 8	Sadio 9	Sadio 10
195,59 ± 2,08	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
178,24 ± 9,83	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0
137,92 ± 10,57	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0
104,33 ± 6,15	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0
88,56 ± 5,22	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1
78,14 ± 3,79	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1
73,39 ± 2,63	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1
67,19 ± 1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1
59,45 ± 3,27	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0
49,88 ± 1,44	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0
46,71 ± 0,42	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0
43,9 ± 0,92	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0
37,15 ± 1,21	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1
32,33 ± 1,31	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0
30,65 ± 0,6	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0
28,68 ± 0,34	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
25,27 ± 0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
20,59 ± 0,84	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0
16,79 ± 0,5	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0
14,45 ± 0,45	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0

Tabela 10 – Similaridade e porcentagem de ocorrência da banda reconhecida entre os soros na reação de Western Blot utilizando como antígeno, o lisado de formas promastigotas de *Leishmania (L.) infantum chagasi*.

Peso molecular da banda (kDa) Média ± Desvio Padrão	Positivos (n = 8)	Sintomáticos (n = 4)	Assintomáticos (n = 4)	DO Alta (n = 4)	DO baixa (n = 4)	Negativos (n = 2)
195,59 ± 2,08	25,0%	50,0%	0,0%	50,0%	0,0%	0,0%
178,24 ± 9,83	62,5%	100,0%	25,0%	75,0%	50,0%	0,0%
137,92 ± 10,57	75,0%	75,0%	75,0%	100,0%	50,0%	50,0%
104,33 ± 6,15	50,0%	75,0%	25,0%	50,0%	50,0%	0,0%
88,56 ± 5,22	75,0%	100,0%	50,0%	75,0%	75,0%	100,0%
78,14 ± 3,79	75,0%	50,0%	100,0%	75,0%	75,0%	100,0%
73,39 ± 2,63	87,5%	100,0%	75,0%	100,0%	75,0%	50,0%
67,19 ± 1	25,0%	25,0%	25,0%	0,0%	50,0%	100,0%
59,45 ± 3,27	37,5%	0,0%	75,0%	25,0%	50,0%	0,0%
49,88 ± 1,44	75,0%	75,0%	75,0%	100,0%	50,0%	0,0%
46,71 ± 0,42	37,5%	50,0%	25,0%	75,0%	0,0%	0,0%
43,9 ± 0,92	50,0%	50,0%	50,0%	75,0%	25,0%	0,0%
37,15 ± 1,21	62,5%	50,0%	75,0%	100,0%	25,0%	50,0%
32,33 ± 1,31	62,5%	100,0%	25,0%	50,0%	75,0%	0,0%
30,65 ± 0,6	87,5%	100,0%	75,0%	100,0%	75,0%	0,0%
28,68 ± 0,34	50,0%	50,0%	50,0%	100,0%	0,0%	0,0%
25,27 ± 0	12,5%	25,0%	0,0%	25,0%	0,0%	0,0%
20,59 ± 0,84	25,0%	25,0%	25,0%	25,0%	25,0%	0,0%
16,79 ± 0,5	75,0%	100,0%	50,0%	100,0%	50,0%	0,0%
14,45 ± 0,45	75,0%	100,0%	50,0%	100,0%	50,0%	0,0%

Analisando as membranas do teste WB realizado com antígeno de *Leishmania (L.) infantum chagasi* na forma amastigota axênica, uma banda de peso molecular de aproximadamente 65 kDa foi reconhecida por 100% dos casos positivos para leishmaniose visceral e nenhum dos casos negativos, animais saudáveis. A banda de aproximadamente 199 kDa foi reconhecida por 85,7% dos casos positivos para leishmaniose visceral, somente não foi reconhecida por um soro de cão infectado sintomático com DO baixa. As bandas de peso molecular de aproximadamente 27 kDa, 16 kDa e 14 kDa foram

reconhecidas por 71,4% dos casos positivos, só não foram reconhecidas por um soro de cão infectado sintomático com DO alta e um soro de cão infectado assintomático com DO baixa. Não houve nenhuma banda reconhecida somente por soros sabidamente negativos (Tabela 11 e 12).

Tabela 11 – Frequência e similaridade de bandas reconhecidas entre os soros na reação de Western Blot utilizando como antígeno, o lisado de formas amastigotas axênicas de *Leishmania (L.) infantum chagasi*, onde 0 = ausência de banda e 1 = presença de banda.

Peso molecular da banda (kDa) Média ± Desvio Padrão	Assinto DO Alta 1	Assinto DO Alta 2	Sinto DO Alta 3	Sinto DO Alta 4	Assinto DO Baixa 5	Sinto DO Baixa 6	Sinto DO Baixa 7	Sadio 8	Sadio 9	Sadio 10
213,75 ± 0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
198,96 ± 2,66	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
165,39 ± 0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
94,19 ± 1,1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1
82,09 ± 1,18	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0
77,52 ± 1,03	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0
70,99 ± 1,68	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0
64,9 ± 1,29	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
46,52 ± 1,48	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0
43,32 ± 0,34	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
40,93 ± 0,62	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0
37 ± 0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
34,48 ± 0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
32,24 ± 0,31	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
29,97 ± 0,7	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0
26,8 ± 0,29	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0
24,39 ± 0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
22,92 ± 0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
19,84 ± 0,42	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0
16,06 ± 0,23	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0
13,91 ± 0,3	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0

Tabela 12 – Similaridade e porcentagem de ocorrência da banda reconhecida entre os soros na reação de Western Blot utilizando como antígeno, o lisado de formas amastigotas axênicas de *Leishmania (L.) infantum chagasi*.

Peso molecular da banda (kDa) Média ± Desvio Padrão	Positivos (n = 7)	Sintomáticos (n = 4)	Assintomáticos (n = 3)	DO Alta (n = 4)	DO baixa (n = 3)	Negativos (n = 3)
213,75 ± 0	14,3%	25,0%	0,0%	0,0%	33,3%	0,0%
198,96 ± 2,66	85,7%	75,0%	100,0%	100,0%	66,7%	0,0%
165,39 ± 0	14,3%	0,0%	33,3%	25,0%	0,0%	0,0%
94,19 ± 1,1	28,6%	25,0%	33,3%	50,0%	0,0%	66,7%
82,09 ± 1,18	28,6%	25,0%	33,3%	50,0%	0,0%	33,3%
77,52 ± 1,03	14,3%	0,0%	33,3%	25,0%	0,0%	66,7%
70,99 ± 1,68	42,9%	25,0%	66,7%	50,0%	33,3%	0,0%
64,9 ± 1,29	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	0,0%
46,52 ± 1,48	57,1%	50,0%	66,7%	75,0%	33,3%	0,0%
43,32 ± 0,34	42,9%	25,0%	66,7%	75,0%	0,0%	0,0%
40,93 ± 0,62	71,4%	75,0%	66,7%	75,0%	66,7%	0,0%
37 ± 0	14,3%	0,0%	33,3%	25,0%	0,0%	0,0%
34,48 ± 0	14,3%	0,0%	33,3%	25,0%	0,0%	0,0%
32,24 ± 0,31	42,9%	25,0%	66,7%	75,0%	0,0%	0,0%
29,97 ± 0,7	57,1%	50,0%	66,7%	75,0%	33,3%	0,0%
26,8 ± 0,29	71,4%	75,0%	66,7%	75,0%	66,7%	0,0%
24,39 ± 0	28,6%	25,0%	33,3%	50,0%	0,0%	0,0%
22,92 ± 0	14,3%	25,0%	0,0%	0,0%	33,3%	0,0%
19,84 ± 0,42	28,6%	25,0%	33,3%	50,0%	0,0%	33,3%
16,06 ± 0,23	71,4%	75,0%	66,7%	75,0%	66,7%	0,0%
13,91 ± 0,3	71,4%	75,0%	66,7%	75,0%	66,7%	0,0%

Analisando as membranas do teste WB realizado com antígeno de *Leishmania (L.) infantum chagasi* na forma amastigota purificada as bandas de peso molecular aproximado de 62 e 66 kDa foram reconhecidas por 87,5% das amostras positivas para leishmaniose, somente não foram reconhecidas por um dos soros de cão assintomáticos com DO baixa. A banda de aproximadamente 118 kDa foi reconhecida em 66,6% dos casos negativos, enquanto que a banda de aproximadamente 102 kDa foi reconhecida por todos os soros positivos e por

um dos soros negativos para leishmaniose visceral. As bandas de peso molecular de aproximadamente 14kDa, 16kDa e 29 kDa foram reconhecidas por 75% dos soros positivos sintomáticos para leishmaniose visceral (tabela 13 e 14).

Tabela 13 – Frequência e similaridade de bandas reconhecidas entre os soros na reação de Western Blot utilizando como antígeno, o lisado de formas amastigotas de *Leishmania (L.) infantum chagasi* purificadas de baço de hamster cronicamente infectado, onde 0 = ausência de banda e 1 = presença de banda

Peso molecular da banda (kDa) Média ± Desvio Padrão	Assinto DO Alta 1	Assinto DO Alta 2	Sinto DO Alta 3	Sinto DO Alta 4	Assinto DO Baixa 5	Assinto DO Baixa 7	Sinto DO Baixa 6	Sinto DO Baixa 8	Sadio 9	Sadio 10	Sadio 11
118,24 ± 5,79	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
101,97 ± 4,81	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
83,01 ± 1,58	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0
76,19 ± 0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
65,71 ± 0,71	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0
61,89 ± 0,47	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0
49,45 ± 0,75	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0
45,07 ± 0,48	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0
42,79 ± 0,64	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
40,01 ± 0,22	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0
36,09 ± 0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
29,43 ± 0,38	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0
16,31 ± 0,33	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0
13,52 ± 0,34	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0

Tabela 14 – Similaridade e porcentagem de ocorrência da banda reconhecida entre os soros na reação de Western Blot utilizando como antígeno, o lisado de formas amastigotas de *Leishmania (L.) infantum chagasi* purificadas de baço de hamster cronicamente infectado

Peso molecular da banda (kDa) Média ± Desvio Padrão	Positivos (n = 8)	Sintomáticos (n = 4)	Assintomáticos (n = 4)	DO Alta (n = 4)	DO baixa (n = 4)	Negativos (n = 3)
118,24 ± 5,79	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	66,7%
101,97 ± 4,81	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	33,3%
83,01 ± 1,58	62,5%	100,0%	25,0%	75,0%	50,0%	0,0%
76,19 ± 0	12,5%	25,0%	0,0%	0,0%	25,0%	0,0%
65,71 ± 0,71	87,5%	100,0%	75,0%	100,0%	75,0%	0,0%
61,89 ± 0,47	87,5%	100,0%	75,0%	100,0%	75,0%	0,0%
49,45 ± 0,75	25,0%	25,0%	25,0%	0,0%	50,0%	33,3%
45,07 ± 0,48	37,5%	50,0%	25,0%	50,0%	25,0%	0,0%
42,79 ± 0,64	25,0%	25,0%	25,0%	50,0%	0,0%	0,0%
40,01 ± 0,22	62,5%	75,0%	50,0%	100,0%	25,0%	0,0%
36,09 ± 0	12,5%	25,0%	0,0%	25,0%	0,0%	0,0%
29,43 ± 0,38	37,5%	75,0%	0,0%	50,0%	25,0%	0,0%
16,31 ± 0,33	37,5%	75,0%	0,0%	50,0%	25,0%	0,0%
13,52 ± 0,34	37,5%	75,0%	0,0%	50,0%	25,0%	0,0%

DISCUSSÃO

7. DISCUSSÃO

O cão é considerado o principal reservatório doméstico do parasito, participando ativamente da cadeia epidemiológica de transmissão ao homem nos centros urbanos (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2001). Nas áreas endêmicas, a infecção canina é mais prevalente que a humana, além disto há grande contingente de animais assintomáticos que albergam parasitos apresentando potencial para transmitir a doença, levando a uma atenção maior para a doença canina em relação a humana (LAURENTI *et al.*, 2013; MARZOCHI *et al.*, 1985). Decorrente disto, os programas de controle da leishmaniose visceral têm focado seus esforços principalmente no diagnóstico e eliminação de cães positivos.

A partir da inoculação das formas promastigotas do parasito na pele dos animais pelos flebotomíneos, alguns animais montam uma resposta imune celular efetiva contra o parasito que consiste na produção de citocinas inflamatórias que ativam macrófagos a produzir metabólitos tóxicos levando a lise do parasito (QUINNELL *et al.*, 2001). Estes animais controlam a multiplicação de parasitos, produzem baixos títulos de anticorpos, podendo permanecer assim por longos períodos de sua vida; enquanto que a grande maioria dos animais infectados desenvolve uma resposta imune celular inefetiva contra o parasito, caracterizada pela produção de citocinas anti-inflamatórias que inibem a produção de metabólitos tóxicos pela célula hospedeira permitindo a disseminação de formas amastigotas do parasito por todos os tecidos do cão. Este tipo de resposta imune está associado a proliferação e ativação de linfócitos B que promovem uma alta produção de anticorpos (BATISTA *et al.*, 2016; SLAPPENDEL; FERRER. 1990).

Somados a isto, o diagnóstico clínico da doença não é efetivo para detectar animais positivos, devido ao largo espectro de sinais clínicos, que vai de animais assintomáticos a casos em estágio avançado da doença (CAMARGO; LANGONI, 2006; FEITOSA *et al.*, 2000); sinais clínicos estes que não são exclusivos da leishmaniose visceral canina. Assim, o diagnóstico da doença é um grande desafio para os programas de controle da doença.

O diagnóstico laboratorial da leishmaniose visceral canina se baseia em métodos parasitológicos e sorológicos. Apesar de discordâncias entre alguns autores, o exame parasitológico é considerado, ainda, o teste-ouro para o diagnóstico da doença. Porém, a detecção de anticorpos circulantes anti-*Leishmania* utilizando técnicas sorológicas constitui-se em um instrumento importante no diagnóstico da LVC; entretanto, os testes sorológicos devem ser interpretados com cautela, uma vez que não são 100% sensíveis e específicos, e falham em detectar cães infectados no período pré patente da doença (FERRER *et al.*, 1995; LAURENTI, 2009).

Embora haja um grande esforço na busca de antígenos que possam discriminar cães infectados por *L. (L.) i. chagasi* daqueles com outras patologias, e que tenham alta reatividade com imunoglobulinas tanto de cães assintomáticos como de sintomáticos, os antígenos até o momento empregados nas diferentes técnicas sorológicas ainda não atingiram totalmente estes objetivos. O próprio curso da infecção por *L. (L.) i. chagasi*, bastante heterogêneo, onde uma parte dos animais progride rapidamente para a doença ativa, apresentando altos títulos de anticorpos, outros que apresentam prolongada infecção sub patente antes da doença, que mostram títulos crescentes ao longo da progressão de quadros mais brandos até muito graves, e aqueles que permanecem

assintomáticos ou espontaneamente se recuperam, que mostram títulos baixos ou soroconvertem para negativo (OLIVA *et al.*, 2006). Assim como os antígenos empregados nos ensaios sorológicos, a própria sensibilidade do método empregado (PORROZZI *et al.*, 2007) são fatores que interferem nos resultados obtidos.

A utilização de antígeno estágio-espécie específico, formas amastigotas de leishmania, empregando a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) mostrou excelente especificidade no diagnóstico da leishmaniose visceral canina na região norte do Brasil (JESUS *et al.*, 2003). O estudo mostrou que em área de transmissão de leishmaniose tegumentar no estado do Pará, a RIFI feita com amastigota de *L. (L.) infantum chagasi* resultou em resultado negativo para todos os soros de cão testados, enquanto o ELISA e a RIFI Biomanguinhos, ambos testes que empregam antígenos de *L. major* mostraram resultados falso positivos.

Deste modo, o principal objetivo do presente estudo foi avaliar antígenos preparados com formas amastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* no ensaio automatizado de ELISA, metodologia de maior sensibilidade que a RIFI e semi automatizada, para o sorodiagnóstico da leishmaniose visceral canina, correlacionando com antígeno preparado com formas promastigotas da mesma espécie do parasito, rotineiramente empregado por diferentes laboratórios. Foram empregadas duas fontes de antígenos, uma com formas amastigotas purificada de lesão de baço de hamster cronicamente infectado e outra, com formas amastigotas oriundas de cultura axênica segundo protocolo de SAAR e colaboradores (1998). A integridade e a viabilidade da grande maioria dos parasitos foram avaliadas por morfologia, através de microscopia de luz

convencional em esfregaços corados pelo Giemsa e microscopia eletrônica de transmissão. Ambas formas amastigotas, purificadas e de cultura axênica, assim como as promastigotas empregadas como fonte antigênica mostraram aspectos morfológicos compatíveis com integridade celular, apresentando núcleo e cinetoplasto evidentes e preservação da membrana celular.

A reação de ELISA empregando as fontes de antígenos oriundas de formas amastigotas de leishmania, purificada e de cultura axênica, foi feita baseada na padronização para formas promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*, rotineiramente empregada pelo no Laboratório de Patologia de Moléstias Infecciosas (LIM-50) no diagnóstico da enfermidade canina (LAURENTI *et al.*, 2014). Para o cálculo do ponto de corte (*cut off*) das reações de ELISA, assim como para o cálculo da sensibilidade e especificidade dos ensaios foi utilizada a curva ROC. Esta ferramenta tem sido bastante empregada e considerada uma importante ferramenta para descrever estas variáveis em ensaios sorológicos (MARTINEZ; LOUZADA-NETO; PEREIRA, 2003).

Os resultados obtidos a partir das curvas ROC mostraram semelhança no ponto de corte entre os três ensaios de ELISA e nenhuma diferença estatística significativa em sensibilidade, especificidade, valores preditivos e acurácia entre ELISA-AXE, ELISA-AMA e ELISA-PRO, embora o ELISA-PRO tenha alcançado valores pouco mais expressivos para os parâmetros analisados. Desta forma, considerando buscar um método de diagnóstico mais apurado para o diagnóstico da LVC, procurando evitar falsos resultados positivos e negativos, no sentido de evitar uma eutanásia desnecessária assim como a permanência de animais infectados e fonte de infecção em uma determinada área endêmica, respectivamente, melhores valores preditivos tanto positivos quanto negativos

foram encontrados no ELISA-PRO refletindo em uma acurácia pouco melhor para este teste. Vale ressaltar que Vercammen *et al.*, 2002 também mostraram resultados comparáveis para a ambos os estágios do ciclo de vida do parasito, promastigotas e amastigotas, na reação de imunofluorescência indireta.

Quando analisadas as médias, medianas e desvios padrão das unidades de ELISA (UE) entre as três fontes antigênicas utilizadas, não foi observada nenhuma diferença estatística significativa para o grupo dos animais parasitologicamente positivos e negativos. Porém, o antígeno preparado a partir de formas promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* detectou um número mais expressivo de soros sabidamente positivos e um número menos expressivo de soros sabidamente negativos. Além disto, mostrou uma dispersão maior dos resultados quando plotados em UE, discriminando melhor os títulos de anticorpos anti-*Leishmania*. Já o antígeno preparado a partir de formas amastigotas axênicas de *L. (L.) infantum chagasi* apresentou uma reatividade mais acentuada com soros sabidamente negativos, refletindo em um número de falsos positivos mais expressivos. Embora estas pequenas diferenças tenham sido notadas, importante salientar que nenhuma diferença estatística significativa foi encontrado entre as três fontes antigênicas quer seja para os soros positivos ou negativos; e boa concordância e forte correlação foi observada entre os três antígenos empregados.

Considerando os grupos clínicos, pudemos observar nos testes de ELISA com os diferentes antígenos testados, que os títulos sorológicos em UE mais elevados foram encontrados no grupo sintomático, corroborando estudos clássicos que associam os altos títulos de anticorpos anti-*Leishmania* com a gravidade da doença (CIARAMELLA, 2003; INIESTA; GÁLLEGO; PORTÚS,

2005; PINELLI *et al.*, 1994). Nos soros de animais sintomáticos, embora sem diferença estatística significativa entre os testes de ELISA empregando as diferentes fontes antigênicas testadas, o antígeno preparado a partir de formas amastigotas axênicas detectou o maior número de cães sabidamente positivos (91,03%), enquanto o antígeno preparado a partir de formas promastigotas apontou um melhor desempenho no grupo assintomático, detectando 79,17% dos casos sabidamente positivos. Porém, vale ressaltar que o teste de ELISA preparado com o antígeno de formas amastigotas axênicas, seguido pelo teste de ELISA preparado com o antígeno de formas amastigotas purificadas mostraram um número mais elevado de resultados falso positivos, apontando para uma eficiência mais reduzida dos ensaios.

Importante salientar, que soros de cães com outras enfermidades foram também testados como controle das nossas reações, e como já relatado na literatura, reações cruzadas foram observadas (KRAWCZAK *et al.*, 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2010; ZANETTE *et al.*, 2014), o que comprometeu a especificidade dos testes. O ELISA-AXE e o ELISA-PRO mostraram reatividade cruzada com o soro de cão com neosporose, e o ELISA-AMA mostrou reatividade cruzada não só com o soro de cão com neosporose como também com dois soros de cão com doença de Chagas.

A literatura mostra que o método ELISA deve ser o teste indicado para o diagnóstico sorológico porque permite a reação com grande número de amostras ao mesmo tempo, tem elevada sensibilidade e não é de custo elevado sugerindo bom custo e benefício (BEVILACQUA; ALVES, 2004; DE ASSIS *et al.*, 2010; LAURENTI, 2009; MELO, 2004). Porém, quando se trata de sensibilidade e

especificidade alguns destes mesmos estudos sugerem a necessidade de mais pesquisas afins de buscar um antígeno padrão de melhor desempenho e que mostre bons resultados de especificidade, sensibilidade e valores preditivos, melhorando a acurácia do teste.

Embora haja um grande esforço na busca de antígenos que possam discriminar cães infectados por *Leishmania (L.) infantum chagasi* daqueles com outras patologias, e que tenham alto desempenho na indução de anticorpos em cães assintomáticos e sintomáticos, os antígenos até o momento empregados nas diferentes técnicas sorológicas ainda não atingiram tais metas (ALVES *et al.*, 2012; DA SILVA *et al.*, 2013; GRIMALDI *et al.*, 2012; LAURENTI *et al.*, 2014). Uma das razões refere-se ao próprio curso da infecção, bastante heterogêneo, onde uma parte dos animais progride rapidamente para a doença ativa, apresentando altos títulos de anticorpos, outros que apresentam prolongada infecção subpatente antes da doença, que mostram títulos crescentes ao longo da progressão de quadros mais brandos até muito graves, e aqueles que permanecem assintomáticos ou espontaneamente se recuperam, que mostram títulos baixos ou soroconvertem para negativo (FALQUETO *et al.*, 2009; OLIVA *et al.*, 2006; PALTRINIERI *et al.*, 2010; SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2011). É necessário também ressaltar que diferentes antígenos são reconhecidos de forma diferente nos diferentes estágios da infecção. Estudos com o uso combinado de diferentes antígenos com imunorreatividades complementares reforçam que esta seria a boa estratégia para atingir máxima sensibilidade na detecção dos cães em todos os seus estágios de infecção (BOARINO *et al.*, 2005; DA COSTA *et al.*, 2003; FONSECA *et al.*, 2014; FRAGA *et al.*, 2014; PORROZZI *et al.*, 2007). Neste sentido, realizamos um ensaio piloto com o teste

de Western Blot empregando as três diferentes fontes antigênicas utilizadas no ELISA na tentativa de identificar as bandas de maior reatividade com soros de cães sintomáticos e assintomáticos, com altos e baixos títulos sorológicos no ELISA, com potencial para futura caracterização e produção na forma de recombinantes para utilização em ensaios sorológicos.

No teste de Western Blot realizado com antígenos da forma promastigota de *Leishmania (L.) infantum chagasi*, 3 bandas nos chamaram a atenção. Uma banda com o peso molecular de aproximadamente 178 kDa foi encontrada em 62,5% de todos os soros positivos testados, estando presente em 100% dos soros de cães sintomáticos, o que pode significar um bom marcador para este grupo clínico. Outra banda de aproximadamente 50 kDa foi encontrada em 75% dos casos positivos, sendo 75% dos casos sintomáticos e 75% dos assintomáticos; e a banda de peso molecular de aproximadamente 16 kDa também presente em 75% dos soros positivos, sendo visualizada em 100% dos casos sintomáticos. Nossos achados corroboram com os estudos de Mancianti *et al.*, 1995 que demonstraram que bandas de 16, 18, 26, 33, 50 e 117 kDa foram frequentemente reativas com grande proporção de soros de cães infectados com leishmaniose visceral; embora as bandas de 30 e 73 kDa tenham sido reconhecidas por todos os soros positivos independente do título sorológico. De maneira similar Fernández-Pérez *et al.*, 2003 demonstraram que a banda de 73 kDa era reconhecida por 100% de todos os soros de cães sintomáticos e assintomáticos. Já os nossos resultados mostraram que esta banda embora reconhecida por 87,5 % dos soros de cães infectados, 100 % dos sintomáticos e 75 % dos assintomáticos, também era reconhecida por 50 % dos soros controle, provenientes de animais sadios, de maneira similar a Ferrer *et al.*, 1995

que mostra reatividade com esta banda quando utiliza soros de cães sadios habitantes de área não endêmica. Uma banda bastante promissora, com aproximadamente 13 kDa, observada em um grande número de soros positivos como descrito por outros autores (DE PAULA *et al.*, 2003; FERRER *et al.*, 1995; MANCIANTI *et al.*, 1995; VARGAS-DUARTE *et al.*, 2009), foi também observada em nosso estudo em 75 % dos casos positivos, sendo 100 % nos soros de cães sintomáticos. Nenhuma dessas bandas citadas em nossos achados foi reconhecida por soros de cães sadios.

No teste de Western blot realizado com antígeno de formas amastigotas axênicas uma banda de peso molecular de aproximadamente 198 kDa foi reconhecida em 85,7% dos soros de cães infectados, sendo 100% detectada quando soro de cães infectados assintomáticos foram empregados, o que sugere que poderia ser um bom marcador para este grupo clínico. Outra banda com aproximadamente 64 kDa foi reconhecida em 100% dos soros de cães infectados, sintomáticos e assintomáticos, e nenhum dos controles sadios, sugerindo ser um excelente marcador de doença. Esta banda parece referir-se a glicoproteína de 63 kDa, presente de forma abundante nas formas amastigotas do parasito e já empregada em diferentes protocolos tanto para imunização como para diagnóstico (HSIAO *et al.*, 2008). Bandas com aproximadamente 14, 16, 26 e 40 kDa também foram reconhecidas por um menor número de soros de cães infectados (71,4 %). Apesar de resultados promissores terem sido encontrados com as bandas de 29 e 32 kDa, nossos resultados não apontaram isto, sendo que a banda de 29 kDa foi detectada por 57,1 % e a banda de 32 kDa por 42,9 % dos soros de cães infectados. de Paula e colaboradores em

2003 mostraram que todos animais portadores de formas amastigotas do parasito reconheceram antígenos com 29 e 32 kDa e o mesmo ocorreu para cães soronegativos que precedeu a soroconversão; assim os autores sugeriram que estes antígenos poderiam ser explorado para fins diagnósticos e estudos epidemiológicos.

No teste de western blot feito com formas amastigotas purificadas, bandas de peso molecular aproximado entre 61 e 65 kDa foram reconhecidas por 87,5 % dos soros de cães infectados e a banda com aproximadamente 40 kDa foi reconhecida em 62,5% dos casos positivos. Embora a banda de aproximadamente 101 kDa ter sido reconhecida por 100% dos soros de cães infectados, 33% dos soros controle, de cães não infectados, também a reconheceram. Apesar dos resultados promissores para as bandas de 29 e 32 kDa (DE PAULA *et al.*, 2003), como discutido previamente, somente 37,5 % dos soros de cães infectados detectaram a banda de 29 kDa e nenhum soro reconheceu a banda de 32 kDa quando formas amastigotas purificadas foram empregadas.

A família de proteínas A2 presente abundantemente no citoplasma de formas amastigotas de *L. donovani* e não nas formas promastigotas, mostra proteínas de peso molecular que variam entre 42 a 100 kDa (CHAREST; ZHANG; MATLASHEWSKI, 1996). Estas proteínas foram reconhecidas por 90% dos soros de pacientes com leishmaniose visceral ativa, sugerindo que elas são altamente antigênicas (GHEDIN *et al.*, 1997). Neste intervalo de peso molecular, quando antígenos oriundos de formas amastigotas foram empregadas no nosso estudo, várias proteínas puderam ser detectadas; em especial uma de

aproximadamente 65 kDa detectada por 100% dos soros de cães infectados e 0% dos soros de cães não infectados quando formas amastigotas axênicas foram empregadas, e uma proteína de aproximadamente 102 kDa detectada da mesma maneira por soros sabidamente positivos e negativos para LVC quando formas amastigotas purificadas foram empregadas.

Levando em conta o desempenho das três fontes antigênicas no ensaio de Western blot observamos que o antígeno preparado com a forma promastigota de *L. (L.) infantum chagasi* mostrou-se mais reativa, pois um maior número de bandas pode ser identificada por soros de animais infectados quando comparado ao teste que empregou formas amastigotas axênicas e purificadas do parasito, de acordo com resultados previamente obtidos por Hsiao e colaboradores em 2008.

CONCLUSÕES

8. CONCLUSÕES

Nossos resultados com os testes de ELISA empregando formas amastigotas axênicas, amastigotas purificadas e promastigotas como fonte de antígeno para sorologia da leishmaniose canina mostraram desempenho semelhantes; sendo assim, de acordo com a praticidade no preparo, menor custo e a abundância de literatura correlata há sugestão para que o teste sorológico de ELISA seja feito com antígeno de formas promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*.

A reatividade no Western Blot de bandas de diferentes pesos moleculares nas diferentes fontes de antígeno empregadas no teste, poucas 100% reativas para soros de animais infectados sem reatividade em soros de animais saudáveis, algumas predominantes em animais sintomáticos outras em assintomático, sugere o emprego de quimeras de antígenos de diferentes pesos moleculares oriundos tanto de formas amastigotas como de formas promastigotas do parasito no diagnóstico da LVC.

ANEXOS

9. ANEXOS

9.1. ANEXO A

MEDICINA
USP
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

A CEUA da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 11/03/2015, APROVOU o Protocolo de Pesquisa nº 044/15 intitulado: "Avaliação da reatividade de antígenos de formas amastigotas de Leishmania (Leishmania) infantum chagasi no sorodiagnóstico da leishmaniose visceral canina" que utilizará materiais coletados do pp 2391/2011 aprovado em 12/04/12 pela CEUA-FMVZ, apresentado pelo Departamento de Patologia.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a CEUA-FMUSP, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais - Lei Nº 11.794 -8 de outubro de 2008).

Pesquisador (a) Responsável: Márcia Dalastra Laurenti
Pesquisador (a) Executante: Thais Bruna Ferreira da Silva

CEUA-FMUSP, 11 de Março de 2015

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

Comissão de Ética no Uso de Animais da FMUSP
e-mail: ceua.fm@usp.br

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALENCAR, J. **Calazar canino. Contribuição para o estudo da epidemiologia do calazar no Brasil.** [s.l.] Impr. Oficial, 1959.

ALVES, A. S. et al. Evaluation of serological cross-reactivity between canine visceral leishmaniasis and natural infection by *Trypanosoma caninum*.

Research in veterinary science, v. 93, n. 3, p. 1329–33, 2012.

ASCHAR, M. et al. Value of the oral swab for the molecular diagnosis of dogs in different stages of infection with *Leishmania infantum*. **Veterinary Parasitology**, v. 225, p. 108–113, 2016.

ASHFORD, D. A. et al. Comparison of the polymerase chain reaction and serology for the detection of canine visceral leishmaniasis. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 53, n. 3, p. 251–5, 1995.

BADARÓ, R. et al. rK39: a cloned antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral leishmaniasis. **The Journal of infectious diseases**, v. 173, n. 3, p. 758–61, 1996.

BADARÓ, R.; DUARTE, M. I. S. Leishmaniose Visceral (Calazar). In: **Veronesi R, Focaccia R. Tratado de infectologia.** São Paulo: Editora Atheneu, 1996. p. 1234–59.

BATISTA, L. F. DA S. et al. Canine antibody response to *Lutzomyia longipalpis* saliva in endemic area of visceral leishmaniasis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, n. 3, p. 361–4, [s.d.].

BERRAHAL, F. et al. Canine leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 55, n. 3, p. 273–7, 1996.

BEVILACQUA, P. D.; ALVES, W. A. Reflexões sobre a qualidade do

diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997.

Cadernos de Saúde Pública, v. 20, n. 1, p. 259–265, 2004.

BOARINO, A. et al. Development of Recombinant Chimeric Antigen Expressing Immunodominant B Epitopes of *Leishmania infantum* for Serodiagnosis of Visceral Leishmaniasis. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 12, n. 5, p. 647–653, 2005.

BURACCO, P. et al. Osteomyelitis and arthrosynovitis associated with *Leishmania donovani* infection in a dog. **The Journal of small animal practice**, v. 38, n. 1, p. 29–30, 1997.

CAMARGO, L. B.; LANGONI, H. Impact of leishmaniasis on public health. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 12, n. 4, p. 527–548, 2006.

CARVALHO, F. A. A. et al. Diagnosis of American visceral leishmaniasis in humans and dogs using the recombinant *Leishmania donovani* A2 antigen. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 43, n. 4, p. 289–95, 2002.

CHAREST, H.; ZHANG, W. W.; MATLASHEWSKI, G. The developmental expression of *Leishmania donovani* A2 amastigote- specific genes is post-transcriptionally mediated and involves elements located in the 3'-untranslated region. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 29, p. 17081–17090, 1996.

CIARAMELLA, P. Canine leishmaniasis: clinical and diagnostic aspects. **Compend Contin Educ Prac Vet**, v. 25, n. 5, 2003.

COSTA, F. A. et al. CD4(+) T cells participate in the nephropathy of canine visceral leishmaniasis. **Braz J Med Biol Res**, v. 33, n. 12, p. 1455–1458, 2000.

COURA-VITAL, W. Estudo epidemiológico prospectivo em cães assintomáticos infectados por *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* e identificação de biomarcadores de infecção. **Universidade Federal de Minas Gerais**, p. 169, 2011.

CRESCENTE, J. A. B. et al. A cross-sectional study on the clinical and immunological spectrum of human *Leishmania* (*L.*) *infantum* chagasi infection in the Brazilian Amazon region. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 103, n. 12, p. 1250–6, 2009.

CUNNINGHAM, A. C. Parasitic adaptive mechanisms in infection by *leishmania*. **Experimental and molecular pathology**, v. 72, n. 2, p. 132–41, 2002.

DA COSTA, R. T. et al. Standardization of a rapid immunochromatographic test with the recombinant antigens K39 and K26 for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 97, n. 6, p. 678–82, 2003.

DA SILVA, S. S. et al. Brazilian propolis antileishmanial and immunomodulatory effects. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, 2013.

DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Visceral leishmaniasis in Brazil: Revisiting paradigms of epidemiology and control. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 48, n. 3, p. 151–156, 2006.

DE ASSIS, J. et al. Estudo comparativo dos métodos diagnósticos para leishmaniose visceral em cães oriundos de Ilha Solteira, SP. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 1, p. 17–25, 2010.

DE PAULA, A. A. et al. The use of immunoblot analysis in the diagnosis of

canine visceral leishmaniasis in an endemic area of Rio de Janeiro. **The Journal of parasitology**, v. 89, n. 4, p. 832–6, 2003.

DO RÊGO LIMA, L. V. et al. Preclinical diagnosis of American visceral leishmaniasis during early onset of human *Leishmania* (L.) infantum chagasi-infection. **Pathogens and global health**, v. 108, n. 8, p. 381–4, 2014.

DUARTE, M. I. et al. Interstitial pneumonitis in canine visceral leishmaniasis. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 28, n. 6, p. 431–436, 1986.

DUARTE, M. I. et al. Comparative study of the biological behaviour in hamster of two isolates of *Leishmania* characterized respectively as *L. major*-like and *L. donovani*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 30, n. 1, p. 21–7, 1988.

ETTINGER, N. A.; WILSON, M. E. Macrophage and T-cell gene expression in a model of early infection with the protozoan *Leishmania chagasi*. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 2, n. 6, p. e252, 2008.

FALQUETO, A. et al. Cross-sectional and longitudinal epidemiologic surveys of human and canine *Leishmania infantum* visceral infections in an endemic rural area of southeast Brazil (Pancas, Espírito Santo). **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 80, n. 4, p. 559–65, 2009.

FARIA, A. R.; ANDRADE, H. M. DE. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina: grandes avanços tecnológicos e baixa aplicação prática. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 3, n. 2, p. 47–57, 2012.

FEITOSA, M. et al. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba – São Paulo (Brasil). **Clínica Veterinária**, v. 5, p. 36–44, 2000.

FERNÁNDEZ-PÉREZ, F. J. et al. Short report: improved diagnosis and follow-

up of canine leishmaniasis using amastigote-based indirect

immunofluorescence. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 61, n. 4, p. 652–3, 1999.

FERNÁNDEZ-PÉREZ, F. J. et al. Leishmania-specific lymphoproliferative responses and IgG1/IgG2 immunodetection patterns by Western blot in asymptomatic, symptomatic and treated dogs. **Acta tropica**, v. 86, n. 1, p. 83–91, 2003.

FERRER, L. et al. Skin lesions in canine leishmaniasis. **Journal of Small Animal Practice**, v. 29, n. 6, p. 381–388, 1988.

FERRER, L. et al. Serological diagnosis and treatment of canine leishmaniasis. **The Veterinary record**, v. 136, n. 20, p. 514–6, 1995.

FIGUEIREDO, M. M. et al. Histopathological and parasitological investigations of ear healthy skin of dogs naturally and experimentally infected with Leishmania (Leishmania) chagasi. **Histology and Histopathology**, v. 25, n. 7, p. 877–887, 2010.

FONSECA, A. M. et al. Evaluation of three recombinant Leishmania infantum antigens in human and canine visceral leishmaniasis diagnosis. **Acta Tropica**, v. 137, p. 25–30, 2014.

FRAGA, D. B. et al. A multicentric evaluation of the recombinant Leishmania infantum antigen-based immunochromatographic assay for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, v. 7, n. 1, p. 136, 2014.

GAMA, M. E. A. et al. Subclinical form of the American visceral leishmaniasis. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 8, p. 889–93, 2004.

GARCÍA-ALONSO, M. et al. Immunopathology of the uveitis in canine leishmaniasis. **Parasite immunology**, v. 18, n. 12, p. 617–23, 1996.

GHEDIN, E. et al. Antibody response against a *Leishmania donovani* amastigote-stage-specific protein in patients with visceral leishmaniasis.

Clinical and diagnostic laboratory immunology, v. 4, n. 5, p. 530–535, 1997.

GOMES, Y. M. et al. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis:

biotechnological advances. **Veterinary journal (London, England : 1997)**, v. 175, n. 1, p. 45–52, 2008.

GRIMALDI, G. et al. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP ® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 106, n. 1, p. 54–59, 2012.

GUARGA, J. L. et al. Canine leishmaniasis transmission: higher infectivity amongst naturally infected dogs to sand flies is associated with lower proportions of T helper cells. **Research in veterinary science**, v. 69, n. 3, p. 249–53, 2000.

HSIAO, C. C. et al. The major surface protease (MSP or GP63) in the intracellular amastigote stage of *Leishmania chagasi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 157, n. 2, p. 148–159, 2008.

INIESTA, L.; GÁLLEGO, M.; PORTÚS, M. Immunoglobulin G and E responses in various stages of canine leishmaniosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 103, n. 1–2, p. 77–81, 2005.

JESUS, R. et al. Comparação das técnicas de RIFI (Ag. IEC X Ag. Bio-Manguinhos) e ELISA no sorodiagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC), Estado do Pará, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 1, p. 323, 2003.

KEENAN, C. M. et al. Visceral leishmaniasis in the German shepherd dog. I. Infection, clinical disease, and clinical pathology. **Veterinary pathology**, v. 21, n. 1, p. 74–9, 1984.

KONTOS, V.; KOUTINAS, A. **OLD-WORLD CANINE LEISHMANIASIS. COMPENDIUM ON CONTINUING EDUCATION FOR THE PRACTICING VETERINARIAN**. [s.l: s.n.].

KRAWCZAK, F. DA S. et al. Leishmania, Babesia and Ehrlichia in urban pet dogs: co-infection or cross-reaction in serological methods? **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 1, p. 64–8, 2015.

LAURENTI, M. D. Correlação entre o diagnóstico parasitológico e sorológico na leishmaniose visceral americana canina. **BEPA. Boletim Epidemiológico Paulista (Online)**, v. 6, n. 67, p. 13–23, 2009.

LAURENTI, M. D. et al. Asymptomatic dogs are highly competent to transmit Leishmania (Leishmania) infantum chagasi to the natural vector. **Veterinary parasitology**, v. 196, n. 3–4, p. 296–300, 2013.

LAURENTI, M. D. et al. Comparative evaluation of the DPP^{??} CVL rapid test for canine serodiagnosis in area of visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 205, n. 3–4, p. 444–450, 2014.

LEMOS, E. M. et al. Canine visceral leishmaniasis: performance of a rapid diagnostic test (Kalazar Detect) in dogs with and without signs of the disease. **Acta tropica**, v. 107, n. 2, p. 205–7, 2008.

LONGSTAFFE, J. A. et al. Leishmaniasis in imported dogs in the United Kingdom; a potential human health hazard. **Journal of Small Animal Practice**, v. 24, n. 1, p. 23–30, 1983.

MANCIANTI, F. et al. Comparison between an enzyme-linked immunosorbent

assay using a detergent-soluble *Leishmania infantum* antigen and indirect immunofluorescence for the diagnosis of canine leishmaniosis. **Veterinary parasitology**, v. 59, n. 1, p. 13–21, 1995.

MANCIANTI, F.; PEDONESE, F.; POLI, A. Evaluation of dot enzyme-linked immunosorbent assay (dot-ELISA) for the serodiagnosis of canine leishmaniosis as compared with indirect immunofluorescence assay.

Veterinary parasitology, v. 65, n. 1–2, p. 1–9, 15 1996.

MARTINEZ, E. Z.; LOUZADA-NETO, F.; PEREIRA, B. D. B. **A Curva ROC para Testes Diagnósticos** *Cadernos Saúde Coletiva*, 2003.

MARZOCHI, M. C. et al. Canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. Clinical, parasitological, therapeutical and epidemiological findings (1977-1983).

Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 80, n. 3, p. 349–57, [s.d.].

MELO, M. N. Leishmaniose Visceral No Brasil : Desafios E Perspectivas.

Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, v. 23, n. 1, p. 41–45, 2004.

MENDONÇA, S. C. F. Differences in immune responses against *Leishmania* induced by infection and by immunization with killed parasite antigen: implications for vaccine discovery. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, p. 492, 2016.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. [s.l: s.n.].

MIRÓ, G. et al. Canine leishmaniosis--new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. **Trends in parasitology**, v. 24, n. 8, p. 371–7, 2008.

MOREIRA, M. A. B. et al. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different

- clinical signs. **Veterinary parasitology**, v. 145, n. 3–4, p. 245–52, 2007.
- OLIVA, G. et al. Incidence and time course of *Leishmania infantum* infections examined by parasitological, serologic, and nested-PCR techniques in a cohort of naive dogs exposed to three consecutive transmission seasons. **Journal of clinical microbiology**, v. 44, n. 4, p. 1318–22, 2006.
- OLIVEIRA, G. M. DE et al. Systematic review of diagnostic tests accuracy: a narrative review. **Rev. Col. Bras. Cir.**, v. 37, n. 2, p. 153–156, 2010.
- OPAS_OMS. Leishmanioses: Informe Epidemiológico das Américas. **Informe Leishmanioses**, v. 2, p. 1–4, 2014.
- PALTRINIERI, S. et al. Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 236, n. 11, p. 1184–91, 2010.
- PEARSON, R. D.; SOUSA, A. Q. Clinical spectrum of Leishmaniasis. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 22, n. 1, p. 1–13, 1996.
- PINELLI, E. et al. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 1, p. 229–235, 1994.
- PORROZZI, R. et al. Comparative Evaluation of Enzyme-Linked Immunosorbent Assays Based on Crude and Recombinant Leishmanial Antigens for Serodiagnosis of Symptomatic and Asymptomatic *Leishmania infantum* Visceral Infections in Dogs. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 14, n. 5, p. 544–548, 2007.
- QUINNELL, R. J. et al. Tissue cytokine responses in canine visceral leishmaniasis. **The Journal of infectious diseases**, v. 183, n. 9, p. 1421–4,

2001.

QUINNELL, R. J. et al. Evaluation of rK39 rapid diagnostic tests for canine visceral leishmaniasis: longitudinal study and meta-analysis. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 7, n. 1, p. e1992, 2013.

RAMOS, P. K. et al. Serum cytokine responses over the entire clinical-immunological spectrum of human *Leishmania (L.) infantum* chagasi infection. **BioMed Research International**, v. 2016, n. 1, 2016.

ROSA, I. C. DE A. S.; OLIVEIRA, I. C. S. Leishmaniose visceral: breve revisão sobre uma zoonose reemergente. **Clínica Veterinária**, v. II, n. 11, p. 24–28, 1997.

ROSSI, C. N. et al. In situ cutaneous cellular immune response in dogs naturally affected by visceral leishmaniasis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 58, n. 1, p. 3–10, 2016.

SAAR, Y. et al. Characterization of developmentally-regulated activities in axenic amastigotes of *Leishmania donovani*. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 95, n. 1, p. 9–20, 1998.

SCALONE, A. et al. Evaluation of the *Leishmania* recombinant K39 antigen as a diagnostic marker for canine leishmaniasis and validation of a standardized enzyme-linked immunosorbent assay. **Veterinary parasitology**, v. 104, n. 4, p. 275–85, 2002.

SILVA, R. M. DA et al. TG-ROC analysis of immunofluorescence assays in canine visceral leishmaniasis diagnosis. **Revista de saude publica**, v. 43, n. 6, p. 1044–53, 2009.

SILVEIRA, F. T. et al. A prospective study on the dynamics of the clinical and immunological evolution of human *Leishmania (L.) infantum* chagasi infection in

the Brazilian Amazon region. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 104, n. 8, p. 529–35, 2010.

SLAPPENDEL, R.; FERRER, L. Leishmaniasis. In: **Greene CE. Clinical Microbiology and Infectious Diseases of the Dog and Cat**. [s.l.]

W.B.Saunders Co, 1990. p. 450–8.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. Leishmania infantum-specific IgG, IgG1 and IgG2 antibody responses in healthy and ill dogs from endemic areas. Evolution in the course of infection and after treatment. **Veterinary parasitology**, v. 96, n. 4, p. 265–76, 2001.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. **Parasites & vectors**, v. 4, p. 86, 2011.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. Serological diagnosis of canine leishmaniosis: comparison of three commercial ELISA tests (Leiscan®, ID Screen® and Leishmania 96®), a rapid test (Speed Leish K®) and an in-house IFAT.

Parasites & Vectors, v. 7, n. 1, p. 111, 2014.

TAFURI, W. L. et al. Canine visceral leishmaniosis: a remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil. **Veterinary parasitology**, v. 96, n. 3, p. 203–12, 2001.

TAFURI, W. L. et al. An alternative immunohistochemical method for detecting Leishmania amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. **Journal of Immunological Methods**, v. 292, n. 1–2, p. 17–23, 2004.

TUON, F. F. et al. Toll-like receptors and leishmaniasis. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 3, p. 866–872, 2008.

TURREL, J. M.; POOL, R. R. BONE LESIONS IN FOUR DOGS WITH VISCERAL LEISHMANIASIS. **Veterinary Radiology**, v. 23, n. 6, p. 243–249,

1982.

VARGAS-DUARTE, J. J. et al. Evaluacion por Western Blot, Inmunofluorescencia Indirecta y ELISA de Perros Infectados con Leishmania (Leishmania) infantum. **Revista de Salud Pública**, v. 11, n. 4, p. 641–652, 2009.

VERCAMMEN, F. et al. Follow-up of Leishmania infantum naturally infected dogs treated with allopurinol: immunofluorescence antibody test, ELISA and Western blot. **Acta tropica**, v. 84, n. 3, p. 175–81, 2002.

ZANETTE, M. F. et al. Serological cross-reactivity of Trypanosoma cruzi, Ehrlichia canis, Toxoplasma gondii, Neospora caninum and Babesia canis to Leishmania infantum chagasi tests in dogs. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 1, p. 105–107, 2014.