

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA, MICROBIOLOGIA E
IMUNOLOGIA

Ingrid Estevam Pereira

Desempenho das proteínas recombinantes rKLO8, rLb6H, rK28, rK39, 39r2
e 39r4 no diagnóstico sorológico da Leishmaniose Visceral Canina:
Relação com apresentações clínicas da doença e vacinação

Juiz de Fora

2021

Ingrid Estevam Pereira

Desempenho das proteínas recombinantes rKLO8, rLb6H, rK28, rK39, 39r2 e 39r4 no diagnóstico sorológico da Leishmaniose Visceral Canina: Relação com apresentações clínicas da doença e vacinação

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas. Área de concentração: Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias (DIP)

Orientador: Prof. Dr. Henrique Couto Teixeira

Co-orientador: Prof. Dr. Erick Esteves de Oliveira

Juiz de Fora

2021

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitaria da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Pereira, Ingrid Estevam .

Desempenho das proteínas recombinantes rKLO8, rLb6H, rK28, rK39, 39r2 e 39r4 no diagnóstico sorológico da Leishmaniose Visceral Canina: Relação com apresentações clínicas da doença e vacinação / Ingrid Estevam Pereira. -- 2021.
115 f. : il.

Orientador: Henrique Couto Teixeira

Coorientador: Erick Esteves de Oliveira

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2021.

1. Leishmaniose visceral canina. 2. Imunodiagnóstico. 3. Vacina. 4. IgG. 5. Análise de curva ROC. I. Teixeira, Henrique Couto, orient. II. Oliveira, Erick Esteves de, coorient. III. Título.

Ingrid Estevam Pereira

"Desempenho das proteínas recombinantes rKLO8, rLb6H, rK28, rK39, 39r2 e 39r4 no diagnóstico sorológico da Leishmaniose Visceral Canina: Relação com apresentações clínicas da doença e vacinação"

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Doutor Ciências Biológicas. Área de concentração: Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias

Aprovada em 10 de dezembro de 2021

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Henrique Couto Teixeira

Orientador

Universidade Federal de Juiz de Fora

Dr. Erick Esteves de Oliveira

Coorientador

Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Adolfo Firmino da Silva Neto

Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof.^a Dr.^a Elaine Soares Coimbra

Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Renato Porrozzi de Almeida
FIOCRUZ

Prof. Dr. João Santana da Silva
USP/FIOCRUZ

Juiz de Fora, 22/12/2021.



Documento assinado eletronicamente por **Renato Porrozzi de Almeida, Usuário Externo**, em 22/12/2021, às 13:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Henrique Couto Teixeira, Professor(a)**, em 22/12/2021, às 15:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **João Santana da Silva, Usuário Externo**, em 22/12/2021, às 15:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Elaine Soares Coimbra, Professor(a)**, em 03/01/2022, às 10:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Erick Esteves de Oliveira, Professor(a)**, em 05/01/2022, às 08:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Adolfo Firmino da Silva Neto, Professor(a)**, em 09/01/2022, às 16:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-U f (www2.u f.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **0625225** e o código CRC **197AF76E**.

Dedico esse trabalho aos meus pais, Rosa e Gilberto, pelo amor incondicional e ensinamentos de vida, que foram exemplos para que eu me tornasse quem sou hoje.

Minha irmã Erika e minha sobrinha Laura, luzes na minha vida!

Meu marido Bruno, minha inspiração para toda a vida!

AGRADECIMENTOS

À minha família, que não poupou esforços para me apoiar de forma incondicional nessa jornada. Sem vocês, nada disso seria possível.

Especial agradecimento aos amigos Kátia e Edney pelo esforço, ética, profissionalismo que os tornam exemplos a serem seguidos.

Ao Bruno, meu marido e amigo de todas as horas, por acreditar em mim quando tudo parecia impossível. Vivemos os melhores e mais difíceis momentos de pós-graduação juntos e essa conquista é nossa!

Ao Dr. Ulrich Steinhoff, do “Institute for Medical Microbiology and Hygiene”, University of Marburg, Alemanha, por fornecer o antígeno rKLO8 e ao Dr. Malcolm S. Duthie (HDT Biotech, Seattle, USA) pelo fornecimento dos antígenos rK28, rK39, rLb6H, 39r2 e 39r4, objetos desse estudo.

Ao Dr. Alexandre Barbosa Reis, do Laboratório de Imunopatologia da UFOP (MG), pelo fornecimento de amostras de soro de cães infectados por *Leishmania*.

À Dr^a. Aimara C. Pinheiro, da Gerência de Controle de Zoonoses/ Secretaria Municipal de Saúde de Governador Valadares (MG), pelo fornecimento dos soros de cães e pela prestatividade em ajudar, sempre.

Ao Santo Agostinho Hospital Veterinário, de Belo Horizonte (MG) e a Dra. Lourdes Palhares pelo fornecimento dos soros de cães vacinados contra leishmaniose visceral canina.

Ao orientador desse projeto, professor Dr. Henrique Couto Teixeira. Obrigada pela confiança. Ao Co-orientador Erick pelo privilégio da sua amizade e por compartilhar todo o seu conhecimento na realização e finalização desse projeto! Muito obrigada!

Aos amigos, professores e membros do Laboratório de Imunologia da UFJF, pessoas que tornaram essa jornada muito especial e de muitos aprendizados. Sem vocês, tudo seria mais difícil. Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora e à CNPq e CAPES, pelo apoio financeiro. A todos que, de alguma forma, colaboraram para a realização desse projeto, meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

A leishmaniose visceral (LV), zoonose de transmissão vetorial, é um dos principais problemas de saúde pública no Brasil e outros países tropicais e subtropicais, tendo o cão como importante elemento no ciclo de transmissão. A detecção da infecção nesses animais é parte fundamental no monitoramento da doença. Entretanto, o diagnóstico da LV canina (LVC) é dificultado pela ampla variabilidade clínica e longo período de incubação. No intuito de elevar a acurácia do diagnóstico sorológico da LVC, diversos antígenos recombinantes de *Leishmania sp* têm sido desenvolvidos e estudados. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o desempenho diagnóstico das proteínas recombinantes rKLO8, rLb6H, 39r2 e 39r4 no diagnóstico da LVC, comparados aos antígenos de referência, rK28 e rK39. Primeiramente, os antígenos rK28, rKLO8, rLb6H e rK39 foram avaliados por IgG-ELISA quanto a sua capacidade de detectar e diferenciar cães positivos para TR-DPP® e EIE *L.major-like*® (grupo CVL), controles negativos de área endêmica (negativos para o teste TR-DPP® - grupo CE), ambos provenientes da cidade de Governador Valadares (MG) e cães que foram imunizados contra LVC (Leish-Tec® - grupo VAC), provenientes da cidade de Belo Horizonte (MG). A reatividade de IgG contra os antígenos rK28, rKLO8, rK39 e rLb6H foi elevada nos soros do grupo LVC, com o maior valor de sensibilidade obtido com rK28 (84%), seguido por rK39 (82%), rKLO8 (75-77%) e rLb6H (52-57%). Os antígenos rK28 e rKLO8 foram mais específicos (95-100% e 93-100%, respectivamente), seguidos de rK39 (86-95%) e rLb6H (95%). Além disso, para todos os antígenos houve reatividade com soro de cães vacinados, embora em números variáveis, sendo maior para rLb6H (25%), seguido por rKLO8 e rK39 (13%) e menor (4,5%) para o antígeno de referência, rK28. Em seguida, os antígenos acima citados, e outras duas novas proteínas recombinantes com 2 ou 4 cópias da repetição de 39 aminoácidos (39r2 e 39r4), foram estudadas utilizando amostras de soro de cães negativos para o teste RIFI (grupo SAE) e cães com infecção por *Leishmania* confirmada parasitologicamente, assintomáticos (AD), oligossintomáticos (OD) e sintomáticos (SD), provenientes de Belo Horizonte (MG). A reatividade de anticorpos IgG e IgG2 foi maior em todos os grupos clínicos, em comparação ao grupo negativo, para todos os antígenos. Embora IgG1 se apresente

elevado ($p < 0,05$) somente no grupo sintomático para os antígenos rK28, 39r2, 39r4 e rK39, níveis séricos de IgG, IgG1 e IgG2 se correlacionaram com o status clínico para todos os antígenos. Adicionalmente, nossos resultados mostram que rLb6H e rKLO8 se destacaram na detecção de cães assintomáticos (100% e 81,81%, respectivamente), com valores maiores de sensibilidade para rK28 e rLb6H (91,43%), seguidos por rKLO8 (85,71%), 39r2 e 39r4 (ambos, 80%). Em relação ao antígeno rK39, os valores de sensibilidade foram similares nas duas etapas experimentais (82% e 82,86%, respectivamente). Curiosamente, os cães sintomáticos com a maior reatividade de IgG para rK28 tiveram baixa reatividade para rLb6H. Em relação a especificidade, o valor máximo (100%) foi detectado para rK28, 39r2, 39r4 e rK39, provenientes de sequências homólogas entre *L. infantum* e *L. donovani*, seguidos por rKLO8 (85,71%) e rLb6H (71,43%). Os resultados mostram características importantes dos antígenos rKLO8, rLb6H, 39r2 e 39r4 para o diagnóstico da LVC, por apresentarem desempenho elevado e comparável aos antígenos de referência rK28 e rK39, permitindo ainda, o aprimoramento da detecção da LVC nos grupos de maior dificuldade diagnóstica (assintomáticos e oligossintomáticos).

Palavras-chave: Leishmaniose visceral canina. Imunodiagnóstico. Proteínas recombinantes. Vacina. IgG. Análise de curva ROC.

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis (VL), a vector-borne zoonosis, is one of the major public health problems in Brazil and other tropical and subtropical countries. Since dogs represent an important element in transmission cycle, detection of infected dogs is an essential part of monitoring the disease. However, canine VL diagnosis (CVL) is hampered by the wide clinical variability and long incubation period. In order to increase the accuracy of CVL serological diagnosis, several recombinant *Leishmania sp* antigens have been developed and studied. The present study aimed to evaluate the diagnostic performance of rKLO8, rLb6H, 39r2 and 39r4 recombinant proteins in CVL diagnosis, compared to the reference antigens, rK28 and rK39. First, rK28, rKLO8, rLb6H and rK39 antigens were evaluated by IgG-ELISA for their ability to detect and differentiate TR-DPP® and EIE *L.major-like*® positive dogs (CVL group), TR-DPP® negative dogs (endemic control - CE group), both from Governador Valadares city (MG) and anti CVL vaccinated dogs (Leish-Tec® - VAC group), from Belo Horizonte city (MG). IgG reactivity against rK28, rKLO8, rK39 and rLb6H antigens was higher in sera from CVL group, with the highest sensitivity value obtained by rK28 (84%), followed by rK39 (82%), rKLO8 (75-77%) and rLb6H (52-57%). The most specific antigens were rK28 and rKLO8 (95-100% and 93-100%, respectively), followed by rK39 (86-95%) and rLb6H (95%). In addition, vaccinated dogs sera reacted to all antigens, although in variable numbers, being higher for rLb6H (25%), followed by rKLO8 and rK39 (13%) and lower (4.5%) for the reference antigen, rK28. Then, the aforementioned antigens, and two other new recombinant proteins with 2 or 4 copies of the 39 amino acid repeat (39r2 and 39r4), were studied using serum samples from RIFI-negative dogs (SAE group) and dogs with parasitological confirmed *Leishmania* infection, asymptomatic (AD), oligosymptomatic (OD) and symptomatic (SD), from Belo Horizonte (MG). For all antigens, IgG and IgG2 antibody reactivity was higher in all clinical groups compared to the negative group. Although IgG1 was elevated ($p < 0.05$) only in the symptomatic group for rK28, 39r2, 39r4 and rK39 antigens, serum levels of IgG, IgG1 and IgG2 correlated with clinical status for all antigens. Additionally, our results show that rLb6H and rKLO8 stood out in detection of asymptomatic dogs (100% and 81.81%, respectively), with higher sensitivity values,

for rK28 and rLb6H (91,43%), followed by rKLO8 (85.71 %), 39r2 and 39r4 (both, 80%). Regarding the rK39 antigen, sensitivity values were similar in the two experimental stages (82% and 82.86%, respectively). Interestingly, symptomatic dogs with the highest IgG reactivity to rK28 had low reactivity to rLb6H. Regarding specificity, the maximum value (100%) was detected for rK28, 39r2, 39r4 and rK39, from homologous sequences between *L. infantum* and *L. donovani*, followed by rKLO8 (85.71%) and rLb6H (71.43%). The results show important characteristics of the rKLO8, rLb6H, 39r2 and 39r4 antigens for the diagnosis of CVL, as they present high performance, comparable to the reference antigens rK28 and rK39, allowing the improvement of CVL detection in groups with greater diagnostic difficulty (asymptomatic and oligosymptomatic).

Keywords: Canine visceral leishmaniasis. Immunodiagnosis. Recombinant proteins. ELISA. Vaccine. IgG. ROC curve analysis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	- Endemicidade da Leishmaniose Visceral no Mundo, 2019 -----	18
Figura 2	- Estratificação de risco da LV por município de infecção. Brasil, 2017 a 2019 -----	19
Figura 3	- Forma promastigotas e forma amastigotas de <i>Leishmania</i> -----	21
Figura 4	- <i>Lutzomyia longipalpis</i> , principal vetor da LV no Brasil -----	22
Figura 5	- Ciclo de vida das espécies de <i>Leishmania</i> -----	23
Figura 6	- Manifestações clínicas da LVC -----	26
Figura 7	- Aspectos imunológicos envolvidos no curso da LVC -----	32
Figura 8	- Representação das origens dos antígenos em estudo, rLb6H, rKLO8, rK28, rK39, 39r2 e 39r4 -----	41
Figura 9	- Organograma dos ensaios para avaliação da acurácia diagnóstica dos antígenos rKLO8, rK28, rLb6H, 39r2, 39r4 e rK39 -----	55
Figura 10	- Resposta de anticorpos IgG antígeno-específicos dos cães com LVC-----	57
Figura 11	- Desempenho diagnóstico dos ELISA antígeno-específicos -----	60
Figura 12	- Índices de Correlações Spearman entre os ELISAs antígeno-específicos -----	61
Figura 13	- Resposta de anticorpos antígeno-específica em soro de cães vacinados e não vacinados -----	64
Figura 14	- Organograma dos ensaios para a avaliação do desempenho dos antígenos recombinantes rKLO8, rK28, rLb6H, 39r2, 39r4 e rK39 no diagnóstico da LVC -----	66
Figura 15	- Reatividade de anticorpos IgG frente aos antígenos rKLO8, rK28, rLb6H, 39r2, 39r4 e rK39 em cães infectados e não infectados com <i>Leishmania</i> -----	68
Figura 16	- Reatividade de anticorpos IgG frente aos antígenos rKLO8, rK28, rLb6H, 39r2, 39r4 e rK39 em grupos clínicos de cães com LVC ---	69
Figura 17	- Reatividades simultâneas das sete amostras de animais infectados por <i>Leishmania</i> que apresentaram as menores	

	absorbâncias IgG-rK28 -----	74
Figura 18	- Reatividades simultâneas das sete amostras de animais infectados por <i>Leishmania</i> que apresentaram as maiores absorbâncias IgG-rK28 -----	75
Figura 19	- Estudo e comparação das curvas ROC geradas a partir do ELISA antígeno específico -----	77
Figura 20	- Organograma do estudo da reatividade das subclasses IgG1 e IgG2 e sua relação com os sintomas clínicos da leishmaniose visceral canina -----	80
Figura 21	- Reatividades de anticorpos IgG, IgG1 e IgG2 antígeno-específicos e a relação com o status clínico na leishmaniose visceral canina -----	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Número e porcentagem de amostras positivas em cada grupo de soro de cães frente aos diferentes antígenos recombinantes	58
Tabela 2	- Sensibilidade e especificidade dos antígenos rK28, rKLO8, rK39 e rLb6H no diagnóstico sorológico da LVC -----	62
Tabela 3	- Número e porcentagem de amostras positivas em cada grupo de soro de cães frente aos diferentes antígenos recombinantes	71
Tabela 4	- Soropositividade IgG dos animais infectados frente aos diferentes antígenos testados -----	73
Tabela 5	- Sensibilidade e especificidade dos antígenos rKLO8, rK28, rLb6H, 39r2, 39r4 e rK39 no diagnóstico sorológico da LVC-----	78
Tabela 6	- Índices de Correlações Spearman entre as reatividades dos anticorpos IgG, IgG1 e IgG2 anti- <i>Leishmania</i> -----	84

LISTA DE ABREVIações

ASC	Área Sob a Curva
BSA	<i>Bovine Serum Albumine</i> (Albumina Sérica Bovina)
CR1	<i>Complement Receptor 1</i> (Receptor de complemento 1)
CE	Controle endêmico
DAMPs	Padrões Moleculares Associados a Danos
DAT	Teste de Hemaglutinação Direta
DPP	<i>Dual-Path Platform</i>
DO	Densidade óptica
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i> (ensaio imunoenzimático)
Fc γ R	<i>Fc gamma receptor</i> (Receptor Fc gamma)
GP63	Protease maior de superfície
IFN- γ	Interferon gama
IgG	Imunoglobulina G
IL-12	Interleucina 12
IL-4	Interleucina 4
IL-13	Interleucina 13
IL-10	Interleucina 10
IFAT	<i>Indirect fluorescent antibody test</i> (teste de imunofluorescencia indireta)
IMUNOCET	Laboratório de Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas
INF	Infectado
AD	<i>Assymptomatic disease</i> (doença assintomática)
OD	<i>Oligosymptomatic disease</i> (doença oligossintomática)
SD	<i>Symptomatic disease</i> (doença sintomática)
LC	Leishmaniose cutânea
LDPC	Leishmaniose dérmica pós-calazar
LMC	Leishmaniose mucocutânea
LV	Leishmaniose visceral
LVC	Leishmaniose visceral canina

LVH	Leishmaniose visceral humana
LTA	Leishmaniose tegumentar americana
MHC-II	<i>Major histocompatibility complex II</i> (Complexo principal de histocompatibilidade de classe II)
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MS	Ministério da Saúde
MG	Minas Gerais
NO	Óxido nítrico
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	<i>Polimerase chain reaction</i> (Reação em cadeia da polimerase)
LPG	Lipofosfoglicano
PBS	<i>Phosphate buffer saline</i> (salina tamponada com fosfato)
OPD	<i>o-Phenylenediamine dihydrochloride</i>
RIFI	Reação de imunofluorescência indireta
RT-PCR	<i>Real time-PCR</i>
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i>
TLRs	<i>Toll like receptors</i> (receptores do tipo Toll)
TGF- β	<i>Tumoral grow factor-β</i> (fator de crescimento tumoral- β)
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor</i> (fator de necrose tumoral- α)
TR	<i>Tandem repeats</i> (repetições em série)
UFJF	Universidade Federal de Juiz de Fora
UFOP	Universidade Federal de Ouro Preto
VAC	Vacinados

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
1.1	LEISHMANIOSE VISCERAL NO BRASIL.....	18
1.2	AGENTES ETIOLÓGICOS E VETORES.....	20
1.3	CICLO BIOLÓGICO E MECANISMO DE TRANSMISSÃO.....	22
1.4	RESERVATÓRIOS.....	24
1.5	LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA.....	25
1.5.1	Aspectos Imunológicos da Leishmaniose Visceral Canina.....	28
1.5.2	Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina.....	33
1.5.2.1	<i>Diagnóstico Parasitológico</i>	33
1.5.2.2	<i>Diagnóstico Sorológico.....</i>	34
1.5.2.3	<i>Diagnóstico Molecular.....</i>	41
1.6	MEDIDAS DE CONTROLE DA LEISHMANIOSE VISCERAL NO BRASIL.....	42
1.7	TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA NO BRASIL.....	45
1.8	JUSTIFICATIVA.....	46
2	OBJETIVOS.....	47
2.1	OBJETIVO GERAL.....	47
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	47
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	49
3.1	ANTÍGENOS.....	49
3.2	AMOSTRAS DE SORO.....	49
3.3	ENSIAIO IMUNOENZIMÁTICO – ELISA.....	51
3.4	CURVA ROC (<i>Receiver Operating Characteristic</i>).....	52
3.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	52
4	RESULTADOS.....	54
4.1	DETECÇÃO DE ANTICORPOS IgG anti-rK28, anti-rKLO8, anti-rK39 e anti-rLb6H.....	56
4.2	AVALIAÇÃO COMPARATIVA DA ACURÁCIA DIAGNÓSTICA DOS TESTES ELISA ENVOLVENDO AS QUATRO PROTEÍNAS RECOMBINANTES: rK28, rKLO8, rK39 E rLb6H, USADAS NO	

	DIAGNÓSTICO DA LVC.....	59
4.3	AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE DE ANTICORPOS IgG EM SORO DE CÃES VACINADOS CONTRA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA (VACINA Leish-Tec®) FRENTE AOS ANTÍGENOS rKLO8, rK28, rLb6H e rK39.....	63
4.4	AVALIAÇÃO DA UTILIDADE DIAGNÓSTICA DOS ANTÍGENOS RECOMBINANTES rKLO8, rLb6H, 39r2, 39r4, COMPARADOS AOS ANTÍGENOS DE REFERÊNCIA rK28 e rK39 NA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA EM AMOSTRAS DE CÃES COM CONFIRMAÇÃO PARASITOLÓGICA DA INFECÇÃO POR <i>Leishmania</i>	65
4.4.1	Todos os antígenos testados são reconhecidos por anticorpos IgG de cães infectados por Leishmania.....	67
4.4.2	A reatividade dos anticorpos IgG varia individualmente frente a cada antígeno.....	72
4.4.3	O antígeno rLb6H detecta cães assintomáticos não reagentes ao antígeno de referência rK28.....	74
4.4.4	Curvas ROC indicam elevada acurácia para todos os antígenos utilizados.....	76
4.5	AVALIAÇÃO DA RESPOSTA DAS SUCLASSES DE ANTICORPOS IgG1 E IgG2 CONTRA OS ANTÍGENOS rKLO8, rK28, rLb6H, 39r2, 39r4 E rK39 E A SUA RELAÇÃO COM SINTOMAS CLÍNICOS EM AMOSTRAS DE CÃES COM CONFIRMAÇÃO PARASITOLÓGICA DA INFECÇÃO POR <i>Leishmania</i>	79
4.5.1	As reatividades IgG e IgG2, para todos os antígenos estudados, se mantem elevadas em todos os grupos clínicos (AD, OD e SD), porém, IgG1 apresenta elevação significativa somente em cães sintomáticos.....	80
5	DISCUSSÃO.....	85
6	CONCLUSÃO.....	95
	REFERÊNCIAS.....	96
	APÊNDICE - Publicação.....	112
	ANEXO - COMITÊ DE ÉTICA CEUA / UFJF.....	113

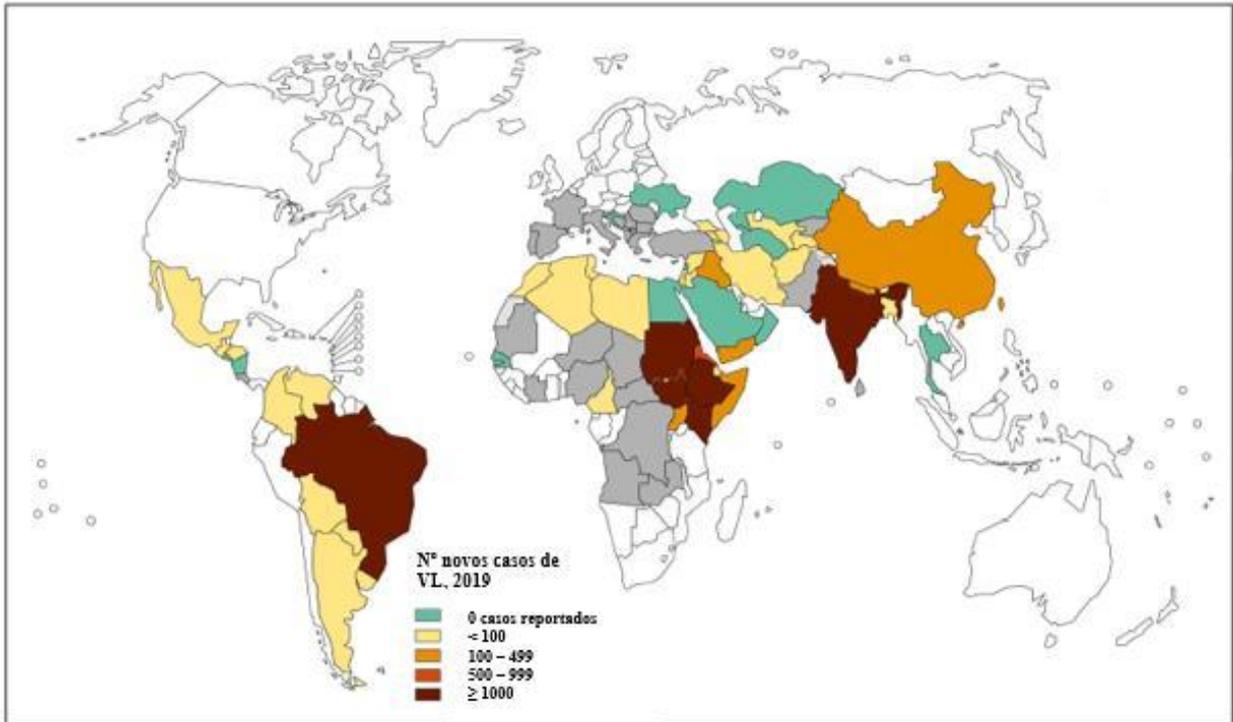
1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças tropicais negligenciadas, causadas pelo protozoário intracelular obrigatório *Leishmania*, sendo transmitidas através da picada de fêmeas de flebotomíneos infectadas. Mais de 20 espécies do protozoário são conhecidas por causar doença tanto em humanos quanto em animais (OKWOR e UZONNA, 2016).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), existem três formas clínicas da leishmaniose: leishmaniose cutânea (LC), que compreende a forma mais comum da doença, a leishmaniose visceral ou calazar (LV), a forma mais severa e a leishmaniose mucocutânea (LMC) (WHO, 2019). Estima-se entre 700.000 e 1 milhão o número de novos casos a cada ano no mundo (WHO, 2019).

A leishmaniose visceral é uma doença sistêmica, potencialmente fatal, se não tratada, e, embora um elevado número de novos casos aconteça anualmente, apenas 25 a 45% desses são reportados a OMS (WHO, 2019). No ano de 2019, mais de 90% dos casos reportados a OMS ocorreram em dez países: Brasil, Etiópia, Eritreia, Índia, Iraque, Quênia, Nepal, Somália, Sudão do Sul e Sudão (BURZA, CROFT e BOELAERT, 2018; WHO, 2019) (Figura 1).

Figura 1 – Endemicidade da Leishmaniose Visceral no Mundo, 2019.



Fonte: World Health Organization (WHO), 2019

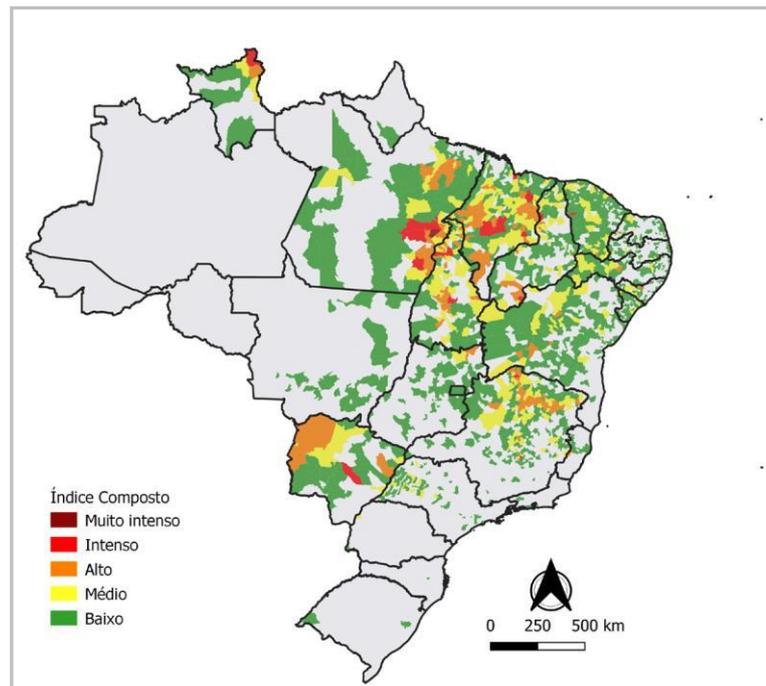
1.1 LEISHMANIOSE VISCERAL NO BRASIL

O Brasil é um país endêmico para LV e concentra 90% dos casos da América Latina, com maior incidência histórica nas regiões Norte e Nordeste até a década de 1990 (MS, 2014). Com mudanças no perfil de transmissão, a LV passou a ser notificada com maior frequência nas regiões Centro e Sudeste a partir da década de 1990 (MACHADO et al., 2019) e, a partir de 2009 passam a ser notificados casos humanos e caninos de LV na região Sul do Brasil, antes considerada indene para a doença (MARCONDES e ROSSI, 2013).

Acredita-se que a grande expansão territorial da LV no Brasil e a adaptação do vetor, *Lutzomyia longipalpis*, a ambientes antropogênicos possa ser explicada pela destruição ou modificação de ambientes naturais, intenso fluxo migratório, ocupações irregulares, elevado índice de pobreza, falta de saneamento dentre outros fatores. Soma-se a esses fatos, a movimentação de cães de áreas endêmicas em direção as áreas não endêmicas (OLIVEIRA et al., 2018).

Em 2019 foram confirmados 2.529 casos novos de LV no Brasil, com uma taxa de incidência de 1,2 casos a cada 100 mil habitantes. As 24 Unidades Federativas, distribuídas nas cinco regiões brasileiras, possuem casos autóctones confirmados, sendo a região Nordeste responsável pelo maior registro de casos do país (49,1%) (Figura 2) (MS, 2021).

Figura 2 – Estratificação de risco da LV por município de infecção. Brasil, 2017 a 2019



Fonte: Fonte: Sinan/Ministério da Saúde.

Em Minas Gerais, a LV foi inicialmente registrada na região Norte do estado, na década de 1940 e na região do Vale do Rio Doce, leste do estado, na década de 1960. Em 1989 o primeiro caso autóctone e em área urbana foi registrado em Sabará, região metropolitana de Belo Horizonte e, em 1994 o primeiro caso autóctone foi registrado na grande Belo Horizonte (SILVA et al., 2017).

Com a implementação do Programa de Controle da LV no estado, regiões como o Vale do Rio Doce permaneceram como “área endêmica controlada” até 2008, quando casos de LV canina e humana voltaram a ser registrados na região (BARATA et al., 2013).

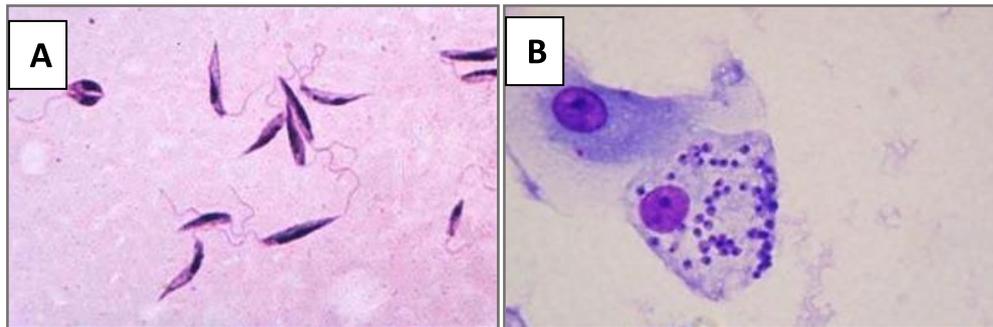
Atualmente, os casos de LV em Minas Gerais são distribuídos principalmente em Belo Horizonte, Montes Claros e Governador Valadares. Outras áreas no estado apresentam transmissão conhecida de LV como Unaí, Sete Lagoas, Coronel Fabriciano, Diamantina, Pedra Azul e outros (SEC. EST. SAÚDE DE MINAS GERAIS, 2016).

Juiz de Fora é considerada área silenciosa, sem casos notificados de LV em humanos (SEC. EST. SAÚDE DE MINAS GERAIS, 2016). Entretanto, em 2008, foi diagnosticado o primeiro caso de LV canina no município, o que estimulou a realização de um inquérito soroepidemiológico do calazar canino na cidade. O estudo abrangeu cães provenientes do Canil Municipal e de Associações de Proteção aos Animais, além de inquérito entomológico, a partir da fixação de armadilhas em diversas regiões do município, indicando a presença de animais positivos para LVC, mesmo que com baixa prevalência e a identificação de diversas espécies do flebotomíneo *Lutzomyia*, embora não tenha sido identificada a espécie *Lutzomyia longipalpis* (COIMBRA et al., 2013).

1.2 AGENTES ETIOLÓGICOS E VETORES

As leishmanioses são causadas por protozoários da classe Kinetoplastidae, família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania* (AKHOUNDI et al., 2016). Apresentam ciclo de vida digenético envolvendo hospedeiros mamíferos e insetos vetores (flebotomíneos), nos quais assume as principais formas, amastigota (arredondada ou fusiforme, encontrada em monócitos e macrófagos) e promastigotas (formato alongado, apresentando flagelo bem desenvolvido), respectivamente (SUNTER e GULL, 2017; BATES, 2018) (Figura 3A e B).

Figura 3 – (A) forma promastigotas e (B) forma amastigota de *Leishmania*.



Fonte: Fiocruz

Os parasitos do gênero *Leishmania* estão divididos em 3 subgêneros, de acordo com o sítio de desenvolvimento no vetor (BATES, 2007). O agente etiológico da leishmaniose visceral pertence ao subgênero *Leishmania*, compreendendo duas principais espécies: *L. infantum* e *L. donovani*. Na América Latina, o agente causador da LV é a *L. infantum* (sinonímia de *L. chagasi*) (MS, 2014). Na América Central e alguns países da América do Sul, espécies causadoras da leishmaniose cutânea como *L. braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. tropica*, *L. mexicana* e *L. colombiense* estão associados com a enfermidade visceral em humanos e animais (KEVRIC et al, 2015). Além disso, algumas variantes intermediárias ou híbridas têm sido encontradas na América Latina (MARCONDES e DAY, 2019). No Brasil, 3 espécies tem sido identificadas em cães com LV: *L. infantum*, *L. braziliensis* e *L. amazonensis* (PAZ et al., 2018).

Os dípteros flebotomíneos responsáveis pela transmissão vetorial das leishmanioses pertencem a família Psychodidae e subfamília Phlebotominae, sendo os gêneros, *Phlebotomus* e *Lutzomyia*, envolvidos na transmissão no Velho e Novo Mundo, respectivamente (LAINSON, 2010). Na América Latina e no Brasil, a *Lutzomyia longipalpis* (Figura 4) é o principal vetor da LV, possuindo ampla distribuição geográfica, hábitos crepusculares e adaptação a ambientes urbanos, peri e intradomiciliares, além de variadas temperaturas (SOUZA, BRAZIL e ARAKI, 2017). Possui corpo pequeno, com intensa pilosidade, voo em pequenos saltos e, quando em repouso, suas asas

permanecem entreabertas e em posição de “V”. A oviposição é feita em material orgânico (CLABORN, 2010).

Figura 4 – *Lutzomyia longipalpis*, principal vetor da LV no Brasil.



Fonte: <https://www.bio.fiocruz.br>

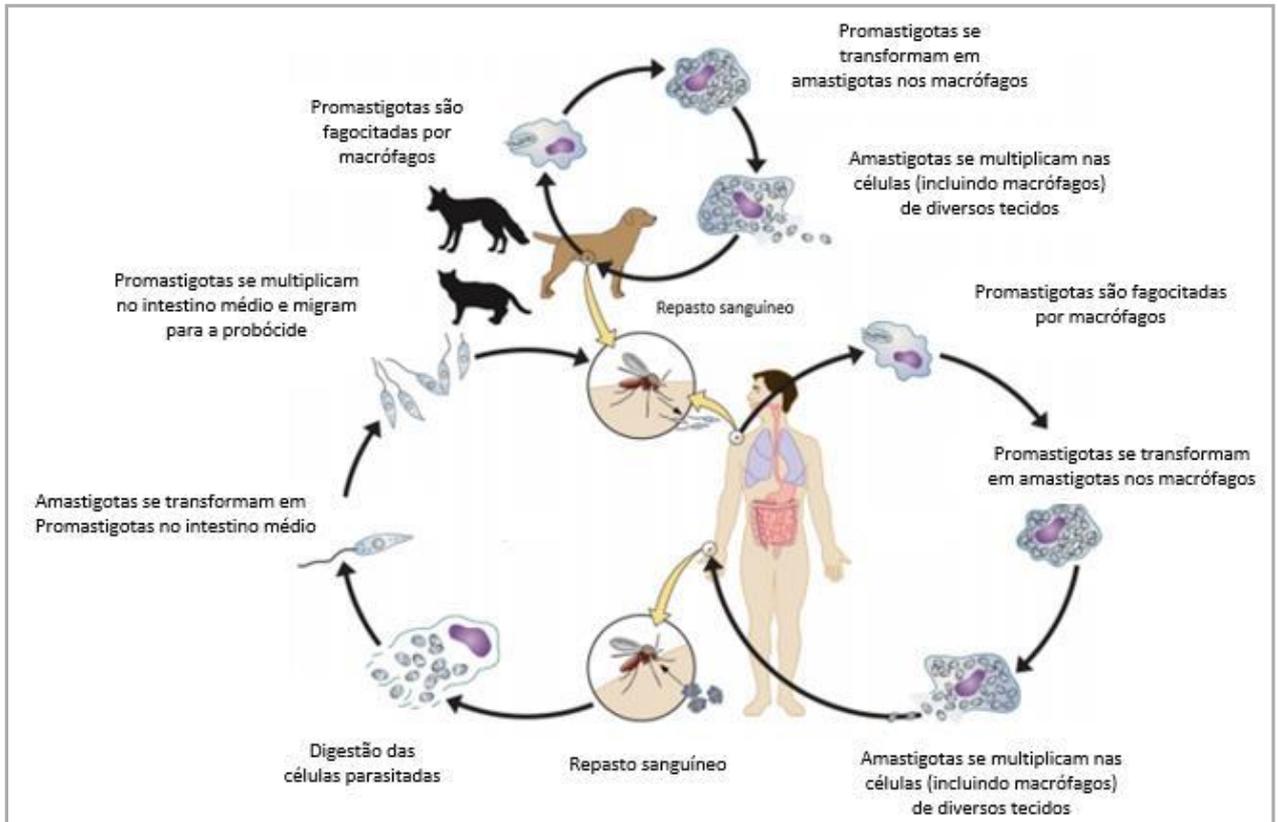
1.3 CICLO BIOLÓGICO E MECANISMO DE TRANSMISSÃO

O ciclo se inicia quando fêmeas do flebotomíneo ingerem sangue de mamíferos infectados contendo macrófagos parasitados com as formas amastigotas de *Leishmania*. Após a ruptura dos macrófagos no trato digestivo anterior, as amastigotas iniciam um processo de sucessivas divisões binárias e diferenciação em promastigotas. Estas, por sua vez, se fixam no epitélio da faringe e do esôfago onde podem, finalmente, se diferenciar em promastigotas metacíclicas, formas infectantes para mamíferos (MS, 2014).

No repasto sanguíneo, as formas promastigotas são depositadas, juntamente com a saliva do flebotomíneo, e fagocitadas por células do sistema mononuclear fagocitário do hospedeiro (SUNTER e GULL, 2017). Nos fagócitos, as promastigotas se diferenciam em amastigotas e se multiplicam intensamente provocando ruptura da célula infectada. As amastigotas livres são novamente fagocitadas, num processo contínuo que gera disseminação hematogênica para os tecidos ricos em células do sistema mononuclear fagocitário, como baço, medula óssea, linfonodos e fígado (Figura 5) (ESCH e PETERSEN, 2013). Embora as células do sistema mononuclear fagocitário sejam os principais alvos da *Leishmania*, neutrófilos também são atraídos para o local

da picada e podem fagocitar as promastigotas, porém, nessas células não ocorre a diferenciação e multiplicação de amastigotas (BEATTIE e KAYE, 2011).

Figura 5 – Ciclo de vida das espécies de *Leishmania*



Fonte: Adaptado de Esch e Petersen (2013).

Flebotomíneos transmitem promastigotas para hospedeiros mamíferos susceptíveis através do repasto sanguíneo. Promastigotas são fagocitadas por fagócitos onde se transformam em amastigotas e se multiplicam. Os parasitos continuam infectando células fagocíticas tanto no sítio de infecção quando em órgãos linfóides secundários, com eventual parasitemia. Flebotomíneos se tornam infectados através do repasto sanguíneo em mamíferos infectados. Amastigotas se transformam em promastigotas no intestino do vetor, migram para o aparelho bucal, onde se transformam em promastigotas metacíclicas.

A baixa taxa de infecção natural da *L. longipalpis*, a ocorrência de LV canina em áreas onde não se identifica a presença do vetor e regiões com alta prevalência da doença em cães com baixas taxas de infecção humana, levam a hipótese de outros mecanismos de transmissão, além do vetorial (COUTINHO et al., 2005). Neste sentido, formas de transmissão direta, venérea, transplacentária e transfusional em cães tem

sido comprovadas, apesar de parecerem exercer papel epidemiológico secundário (SOLANO-GALLEGO et al., 2009; PAZ et al., 2010).

1.4 RESERVATÓRIOS

Diversos mamíferos selvagens, domésticos e sinantrópicos são importantes reservatórios das espécies de *Leishmania* e participam do ciclo de transmissão no meio silvestre e domiciliar (ALEMAYEHU e ALEMAYEHU, 2017). Raposas (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous*) e marsupiais (*Didelphis albiventris*) são os principais reservatórios silvestres. Roedores constituem um importante elo entre os ambientes silvestre e domiciliar (ALEMAYEHU e ALEMAYEHU, 2017).

Os cães (*Canis familiaris*) são os principais reservatórios urbanos da leishmaniose, especialmente aqueles que apresentam intenso parasitismo, (LEAL et al., 2014) devido a sua alta susceptibilidade e frequência de infecção por *L. infantum*, longo período pré-patente e possibilidade de infecção assintomática, facilidade de transmissão ao vetor, e sua estreita aproximação do homem (STEVERDING, 2017; MAIA e CAMPINO, 2011). Apesar da leishmaniose visceral já ser descrita, em gatos, desde 1912 (GRAMICCIA e GRADONI, 2005), a participação desses animais no ciclo de transmissão urbano *L. infantum* ainda não é bem estabelecido (ROQUE e JANSEN, 2014).

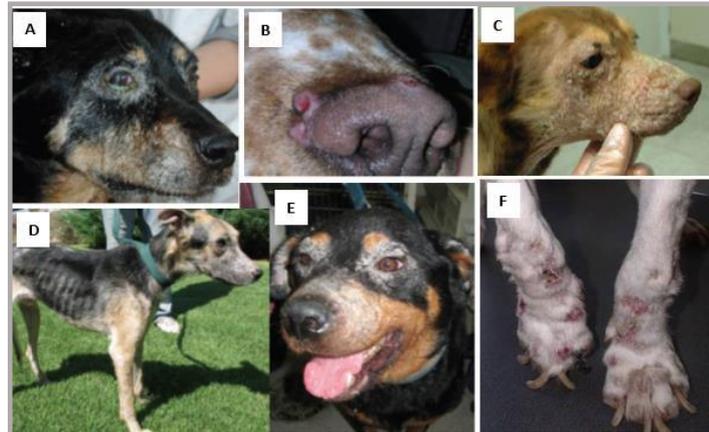
O comprometimento do sistema imunológico causado pela infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), na presença de coinfeção com *Leishmania*, gera complicações para ambas as condições, favorecendo a disseminação do parasito e a replicação do vírus, manifestações atípicas e mais severas da leishmaniose e sua visceralização e cronificação (CUNHA et al., 2020). A disseminação da *Leishmania*, inclusive para órgãos fora do sistema reticuloendotelial, como sangue periférico, torna esses pacientes verdadeiros reservatórios e fontes de infecção para o vetor (LINDOSO et al., 2014).

1.5 LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

A Leishmaniose visceral canina (LVC) é uma doença sistêmica, podendo acometer qualquer órgão, tecido ou fluido, e que se manifesta como uma infecção crônica subclínica, autolimitante ou não limitante grave, com período de incubação que pode variar de 3 meses a vários anos (SOLANO-GALLEGO et al., 2011; ORDEIX et al., 2017). Estima-se que uma pequena porcentagem dos cães infectados seja clinicamente resistente, podendo eliminar os parasitos espontaneamente e cerca de 50% são assintomáticos por longos períodos (ALVAR et al., 2004; RIBEIRO et al., 2018).

Os achados clínicos mais comuns incluem lesões cutâneas, febre, letargia, perda de peso progressiva, onicogribose, hepatoesplenomegalia, epistaxe, linfadenomegalia generalizada, ceratoconjuntivite, vômitos, diarreia, claudicação, poliúria e polidipsia (SOLANO-GALLEGO et al., 2009; RIBEIRO et al., 2018) (Figura 6). Alterações bioquímicas e hematológicas podem acompanhar ou até preceder às manifestações clínicas. Alterações nas funções renais são indicativos de progressão da doença e sua severidade, e é a principal causa de óbito em cães com LV (REIS et al., 2010).

Figura 6 – Manifestações clínicas da LVC



Fonte: adaptado de Abad *et al* (2016) e Solano-Gallego *et al* (2011). (A) ceratoconjuntivite, (B) dermatite ulcerativa, (C) alopecia e descamação, (D) emagrecimento progressivo, (E) alopecia periorbital e (F) onicogribose.

Mancianti (1988), pela primeira vez, classificou cães positivos para LVC em três categorias de acordo com as características clínicas: assintomáticos (AD), aqueles que não apresentam sintomas clínicos sugestivos de infecção por *Leishmania*; oligossintomáticos (OD), cães que apresentam até 3 sintomas clínicos incluindo pelos opacos e/ou alopecia localizada e/ou perda de peso moderada e sintomáticos (SD), com sintomas clínicos característicos da LVC como pelo opaco, perda de peso acentuada (caquexia), onicogribose, lesões cutâneas, apatia e ceratoconjuntivite. Esse recurso permitiu verificar que cães AD apresentam melhores respostas ao tratamento comparado aos cães OD e SD (MANCIANTI, 1988).

As manifestações clínicas e a carga parasitária variam em diferentes cães e em diferentes órgãos alvo (medula óssea, baço, fígado, pele e linfonodos) e a associação entre a carga parasitária e evolução clínica da doença tem sido alvo de diferentes estudos nos últimos anos (GIUNCHETTI *et al.*, 2019). Reis *et al* (2006a) classificou o nível de parasitismo em baixo (LP), médio (MP) e alto (HP) de acordo com os valores de Unidade de *Leishmania donovani* (LDU – *Leishmania donovani units*) em diferentes tecidos. Foi possível identificar correlação entre a doença assintomática e baixo parasitismo e doença sintomática e elevado parasitismo em diferentes compartimentos (medula óssea, pele, baço, fígado, linfonodos e fígado).

Classificações atuais sugerem uma combinação de critérios clínicos e laboratoriais para a classificação dos cães em: Não infectado sadio (animais com sorologia negativa, sem alterações clínico-laboratoriais); Exposto (sorologia positiva a títulos baixos/médios, negativo na citologia, histologia, PCR e cultura e sem alterações clínico-laboratoriais); Infectado sadio (sorologia positiva a títulos baixos/médios, positivo em citologia, histologia/imuno-histoquímica, PCR e/ou cultura e sem alterações clínico-laboratoriais); Infectado doente (sorologia positiva, a títulos baixos/altos, positivo na citologia, histologia, PCR e/ou cultura e presença de alterações clínico-laboratoriais (RIBEIRO et al., 2013).

A LVC não apresenta predileção por sexo e raça, mas sabe-se que o gene N-RAMPI e certos alelos de MHC-II têm sido associados com a susceptibilidade, além de uma maior prevalência de doença em cães menores que 3 anos e mais velhos que 8 anos (SOLANO-GALLEGO et al., 2009).

1.5.1 Aspectos Imunológicos da Leishmaniose Visceral Canina

A variabilidade clínica da LVC, de cães assintomáticos a severamente doentes, é fortemente influenciada pelo perfil de resposta imune desenvolvida (REIS et al., 2010). Neste sentido, a resistência parece estar associada ao desenvolvimento de resposta imune celular específica anti-*Leishmania*, síntese de citocinas pró-inflamatórias e atividade leishmanicida de macrófagos. Em contrapartida, o perfil de susceptibilidade está associado ao desenvolvimento de resposta imune humoral, elevados níveis de anticorpos e aumento da carga parasitária (HOSEIN, BLAKE e SOLANO-GALLEGO, 2017; GIUNCHETTI et al., 2019).

Diversos aspectos patogênicos da LVC são atribuíveis a produção de anticorpos (Figura 7), formação de imunocomplexos, sua deposição nos tecidos e geração de lesões inflamatórias (ORDEIX et al., 2017). A hipergamaglobulinemia é uma característica dominante da LVC, principalmente em cães sintomáticos, e pode levar a produção de imunoglobulinas inespecíficas, inclusive auto-anticorpos (GIUNCHETTI et al., 2019).

A forte correlação entre os níveis de anticorpos IgG e a presença de sintomas bem como com a carga parasitária tem sido amplamente demonstrada. Cães sintomáticos (SD) apresentam elevados títulos de IgG e carga parasitária em diferentes compartimentos (pele, baço, medula óssea, fígado e linfonodos) quando comparados a cães assintomáticos (AD) (BOURDOISEAU et al., 1997; HOSEIN, BLAKE e SOLANO-GALLEGO, 2017; NOGUEIRA et al., 2019).

Foram demonstradas quatro subclasses de imunoglobulina G em cães: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. O soro de cães saudáveis apresenta quantidades similares de IgG1 e IgG2 e ambas superiores a IgG3 e IgG4. A depender do estímulo antigênico, ocorre aumento da produção de determinadas subclasses, sendo demonstrado predominância de IgG2 para uma gama de condições clínicas (MAZZA e WHITING, 1994).

Em relação a LVC, não há consenso na literatura sobre anticorpos e subclasses e sua relação com perfil de resistência ou susceptibilidade a doença (GIUNCHETTI et al., 2019). Reis et al. (2006) correlacionam a subclasse IgG1 com a doença assintomática, e IgG2, IgA e IgE com a forma sintomática da LVC. Outros

estudos demonstram níveis elevados de IgG1 em cães sintomáticos, quando comparados a cães assintomáticos (QUINNELL et al., 2003; DEPLAZES et al., 1995). Por sua vez, Chaabouni et al. (2018) demonstrou que IgG assim como suas subclasses IgG1 e IgG2 se mantem em níveis elevados durante todo o curso da doença, com forte correlação entre IgG e IgG2 tanto para cães assintomáticos quanto para sintomáticos. Ainda, o estudo de Lima et al. (2017) mostrou aumento da produção de IgG1 em cães sintomáticos sem que houvesse, no entanto, diferença nos níveis de IgG2 entre os cães sintomáticos e assintomáticos.

Em estudo de Coura-vital et al. (2011), cães naturalmente infectados por *L. infantum*, com teste de reação em cadeia da polimerase (PCR) positivo, assintomáticos, foram classificados em dois grupos, sendo AD-I e AD-II sendo sorologicamente negativos e positivos, respectivamente. Foi possível observar diferenças entre esses dois grupos tanto em relação ao perfil de imunoglobulinas quanto a imunofenotipagem de células circulantes. AD-I apresentou elevada contagem de linfócitos T, principalmente CD4⁺, monócitos CD14⁺ e eosinófilos. Já o grupo AD-II apresentou elevada contagem de linfócitos T, entretanto, representado pelo aumento da contagem de CD8⁺, além de aumento de linfócitos B CD21⁺ e maiores níveis de IgG, IgG2, IgM e IgA. Essas observações levaram à hipótese de que há uma resposta imune celular distinta após a soroconversão e com a progressão da doença.

A saliva do flebotomíneo possui propriedades pró-inflamatórias e quimioatraentes para fagócitos como neutrófilos e macrófagos (WARDINI et al., 2019). Os neutrófilos podem contribuir para destruição do patógeno através da fagocitose, entretanto, também são considerados hospedeiro intermediários da *Leishmania* e podem contribuir para a entrada silenciosa do parasito nos macrófagos (VAN ZANDBERGEN et al., 2004). Macrófagos desempenham importante papel na resposta imune contra *Leishmania* já que são as células alvo do parasito e sua ativação é crucial para o controle do patógeno, através da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS) (ROSSI e FASEL, 2017), e por ativar a resposta imune adaptativa (GIUNCHETTI et al., 2019).

Espécies de *Leishmania* são capazes de interferir de formas diferentes na ativação de macrófagos induzindo o perfil M1 (ativação clássica, com síntese de citocinas pró-inflamatórias e atividade leishmanicida) ou M2 (ativação alternativa e atividade imunossupressora). O lipofosfoglicano (LPG), expresso na superfície da *Leishmania*, impede a montagem do complexo NADPH oxidase na membrana do fagolisossomo, evitando a síntese de superóxido (O_2^-). A arginase sintetizada pela *Leishmania* compete com a óxido nítrico sintase induzida (iNOS) pela arginina e a desvia para síntese de compostos importantes para o parasito, como ureia e ornitina, em detrimento de óxido nítrico (NO), tóxico ao parasito (ROSSI e FASEL, 2017; PASSEDA e SILVA, 2020). Além disso, algumas espécies de *Leishmania* podem induzir a ativação da superóxido dismutase (SOD) nos macrófagos, que degrada superóxido (ROSSI e FASEL, 2017).

A ativação clássica do macrófago depende de células $TCD4^+Th1$ (T helper (h) 1) e NK e de citocinas produzidas por essas células como o interferon (IFN)- γ , que induz a expressão de iNOS no macrófago e esta, por sua vez, catalisa arginina a NO . Já a ativação alternativa é mediada por citocinas provenientes de células $TCD4^+Th2$ (T helper 2) como IL-4 e IL-13 (BARBIÉRI, 2006; LIU e UZONNA, 2012).

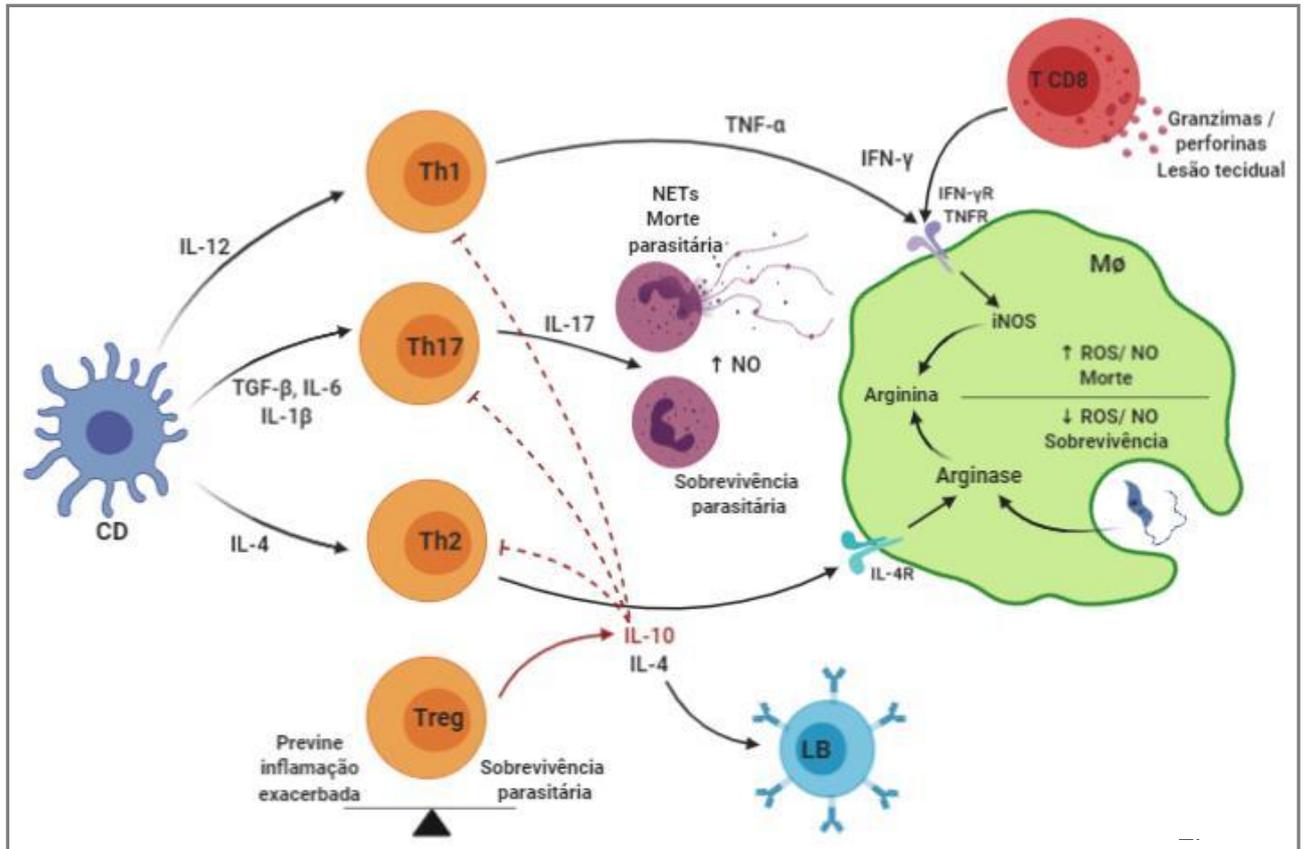
A resposta imune celular na LVC envolvendo a ativação de células $TCD4^+Th1$ produtoras de IFN - γ , induz a atividade leishmanicida de macrófagos, através da síntese de ROS e NRS, levando ao controle da carga parasitária em cães assintomáticos (AD) (ZAFRA et al., 2008; CARRILLO e MORENO, 2009). Por outro lado, em cães sintomáticos (SD), é encontrada uma resposta mista Th1/Th2, com baixos níveis circulantes de $CD4^+$ e $CD8^+$ (REIS et al., 2009; CARRILLO e MORENO, 2009; GIUNCHETTI et al., 2019). Estudos sobre o perfil de citocinas relacionadas com resistência e susceptibilidade na LVC tem mostrado predominância de citocinas pró-inflamatórias em cães assintomáticos (AD), com elevados níveis de IFN - γ e TNF - α , em detrimento de citocinas imunomoduladoras como IL-4, TGF - β e IL-10 (GIUNCHETTI et al., 2019).

Estudos recentes têm demonstrado a participação de células Th17 e seu produto, a IL-17, na complexa interação *Leishmania*-hospedeiro. A diferenciação de células Th17 é dependente da combinação de TGF - β , IL-6, IL-1 β e IL-23 e sua função

efetora está ligada ao recrutamento de neutrófilos, que potencializa o ambiente inflamatório (QUIRINO et al., 2016; GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE et al., 2017). Neutrófilos infectados podem favorecer a entrada silenciosa da *Leishmania* em macrófagos. Além disso, na ausência de um equilíbrio da produção de ROS, por citocinas como IL-10 e IL-4, podem ocorrer danos teciduais e progressão de lesões cutâneas, no caso da leishmaniose cutânea (GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE et al., 2017). Por outro lado, Nascimento et al. (2015) demonstrou que a infecção por *L. infantum* induz a produção de IL-17A e esta, por sua vez, modula o ambiente inflamatório por regular negativamente células T regulatórias e a produção de IL-10, ao mesmo tempo que beneficia a resposta de células Th1, produtoras de IFN- γ , aumentando a atividade leishmanicida dos macrófagos infectados induzindo a síntese de NO.

Células T regulatórias, produtoras de IL-10, têm sido associadas com a latência parasitária, resistência ao tratamento e recidivas da doença, enquanto células TCD8⁺, produtoras de IFN- γ , são associadas a proteção contra *L. infantum* e *L. donovani* em humanos e camundongos (ROSSI e FASEL, 2017).

Figura 7 – Aspectos imunológicos envolvidos no curso da LVC



Fonte: elaborado pela autora (2021).

Neutrófilos são rapidamente recrutados para o sítio de infecção e podem eliminar a *Leishmania* através da produção de ROS (NO) e NETs. Algumas espécies de *Leishmania* resistem à ação das NETs. Subsequentemente, células dendríticas (CD) migram para os linfonodos, onde medeiam a diferenciação de células T em diferentes subtipos de células Th. Na presença de IL-12, células TCD4⁺ naive se diferenciam em células Th1. A secreção de IL-4 leva à transcrição de genes Th2 (IL-10 e IL-4). Na presença das citocinas como IL-6, IL-10 e TGF-β, células TCD4⁺ se diferenciam em Th17, secretoras de IL-17. Interferon (IFN) -γ e TNF-α, secretados por células Th1 e TCD8⁺, induzem a enzima óxido nítrico sintase (iNOS) no macrófago (Mφ) e morte dos parasitos via síntese de NO. A produção de NO no ambiente da infecção é intensificada pela presença de neutrófilos, recrutados por IL-17 e na ausência da regulação por IL-10, podem ser nocivos aos tecidos. Citocinas do tipo Th2 (IL-10, IL-4), são amplamente associadas à susceptibilidade à infecção por *Leishmania*. IL-4 ativa arginase e ativação alternativa dos macrófagos, favorecendo a persistência do parasito, associada, também, ao aumento da atividade das células B (LB) e hiperglobulinemia relacionadas à resposta Th2. As células Treg e L TCD8⁺ são associadas tanto à progressão quanto à resolução da doença, dependendo da espécie de *Leishmania* envolvida. Algumas espécies de *Leishmania* podem sintetizar arginase, que promove a conversão da arginina em ureia e ornitina, usados pelo metabolismo do parasito.

1.5.2 Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina

O diagnóstico da LVC constitui um dos maiores desafios do ciclo epidemiológico da infecção. Isso porque as manifestações clínicas nos cães são altamente variáveis e inespecíficas, podendo mimetizar e até sobrepor sintomaticamente com outras doenças (LAURENTI et al., 2014). Ainda, a prevalência da infecção canina pode chegar a 50% em áreas endêmicas, entretanto, a prevalência da doença é baixa, variando de 3 a 10%, o que demonstra o elevado número de cães infectados que podem permanecer assintomáticos por longos períodos (FREITAS, 2010). Portanto, o diagnóstico laboratorial é importante para a detecção de cães infectados e a confiabilidade desses testes é necessária, uma vez que o cão representa um importante elo na epidemiologia da leishmaniose visceral, principalmente em áreas urbanas.

1.5.2.1 Diagnóstico Parasitológico

O padrão ouro para diagnóstico da LVC é o exame parasitológico positivo, consistindo na demonstração de formas amastigotas em aspirados e esfregaços da medula óssea, baço, fígado, linfonodo e biópsia de pele intacta ou lesionada (FIGUEIREDO et al., 2010). Apesar da alta especificidade, o exame parasitológico direto possui sensibilidade variável de acordo com o tipo e a qualidade do material coletado, a carga parasitária no tecido avaliado e os critérios de análise (FREITAS, 2010; PALTRINIERI et al., 2016).

Durante o curso da infecção por *Leishmania* o parasitismo tecidual pode variar consideravelmente de acordo com o compartimento avaliado. Reis et al. (2006) avaliou diferentes preparações teciduais de cães assintomáticos (AD), oligossintomáticos (OD) e sintomáticos (SD) e observou que a densidade parasitária na pele, medula óssea e baço foi maior de acordo com a severidade da doença, ou seja, maior para cães SD e ainda, nesse grupo, a carga parasitária é maior independentemente do tecido avaliado, em relação aos cães OD e AD. Outro dado

importante foi a constatação de que todos os animais infectados, até mesmo os AD apresentaram parasitismo na pele maior que na medula óssea.

A pesquisa parasitológica indireta consiste na semeadura, em meio de cultura apropriado, de aspirados de linfonodo e medula óssea. A cultura positiva, confirma a infecção, porém, esse método demanda um longo tempo para obtenção dos resultados (2 a 14 dias) (FARAHMAND e NAHREVANIAN, 2016).

O exame histopatológico de fragmentos de pele e linfonodos demonstra infiltrado inflamatório inespecífico e apenas quando é possível encontrar formas amastigotas, o diagnóstico pode ser confirmado. O uso de anticorpos específicos marcados nas técnicas de imunohistoquímica (IHQ) ajuda na identificação de formas amastigotas em cortes de tecidos (TAFURI et al., 2004).

O xenodiagnóstico é uma técnica que se utiliza da criação em laboratório de colônias de *L. longipalpis* para detecção e isolamento do patógeno usando o próprio vetor artrópode. Embora não seja passível de aplicações em diagnóstico na rotina, pode ser útil na resolução de questões epidemiológicas sobre o estado clínico do animal e relativas ao tratamento do cão infectado (RIBEIRO et al., 2013; NOGUEIRA et al., 2019).

1.5.2.2 Diagnóstico Sorológico

A hipergamaglobulinemia característica da LVC, principalmente de anticorpos IgG, vem sendo usada com o objetivo de detectar sorologicamente os animais infectados, através da demonstração de anticorpos anti-*Leishmania* (PAZ et al., 2018). Dentre as técnicas utilizadas, podem ser citadas: Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), Ensaio Imunoabsorvente ligado a Enzima (Enzyme Linked Immunosorbent Assay - ELISA) e os testes rápidos imunocromatográficos (FARAHMAND e NAHREVANIAN, 2016; PAZ et al., 2018).

A RIFI é, ainda hoje, umas das técnicas mais utilizadas para o diagnóstico da LVC e utiliza promastigotas de *Leishmania spp* como antígenos para detecção dos anticorpos na amostra. Assim, a demora no cultivo, a necessidade de um profissional qualificado para a leitura das lâminas e o tempo despendido na análise de um grande

número de amostras, são fatores limitadores do teste (COURA-VITAL et al., 2014; PALTRINIERI et al., 2016). Embora existam “kits” comerciais a partir da técnica de RIFI, os testes feitos em laboratório tendem a ser melhor padronizados e fornecerem reprodutibilidade (FREITAS, 2010). Apesar da elevada sensibilidade, que varia entre 68 e 100% (LIRA, 2005; FERROGLIO et al., 2006), a especificidade da RIFI pode ser comprometida pela possibilidade de reações cruzadas com *Trypanosoma caninum*, *T. cruzi*, *Leishmania braziliensis* e *Ehrlichia canis* (COURA-VITAL et al., 2014).

O ELISA é o segundo método sorológico mais utilizado no diagnóstico de LVC (MS, 2014). O teste pode ser realizado com antígenos brutos, derivados de culturas *in vitro* de promastigotas de *Leishmania spp*, rompidas por ultrassom (ROSÁRIO et al., 2005). Apesar da elevada sensibilidade (98 – 100%), o teste empregando antígenos brutos é de difícil padronização e, assim como a RIFI, possui especificidade limitada (ROSÁRIO et al., 2005) pela possibilidade de reações cruzadas com espécies de *Leishmania* não viscerais (PORROZZI et al., 2007), outros tripanosomatídeos e outras doenças de cães, que se sobreponham em áreas endêmicas (VALE et al., 2009; FIGUEIREDO et al., 2010).

A limitação adicional para os testes sorológicos é a possibilidade de resultados falso-negativos (ROSÁRIO et al., 2005; PORROZZI et al., 2007; VALE et al., 2009; GRIMALDI et al., 2012). Isto porque, apesar da soroconversão ocorrer, em geral, cerca de 5 meses após a infecção natural (PALTRINIERI et al., 2016), alguns cães infectados podem desenvolver uma forte resposta imune celular e reverter para um quadro soronegativo ou ainda, nunca se tornarem soropositivos (GRIMALDI et al., 2012). Estima-se que entre 10% a 62% dos cães aparentemente saudáveis de áreas endêmicas, sejam positivos parasitologicamente para *L. infantum* através da técnica de PCR. Cães soronegativos, assintomáticos mas que são parasitologicamente positivos, constituem importantes fontes de transmissão de amastigotas para os vetores, contribuindo para a perpetuação do ciclo de transmissão da LV (COURA-VITAL et al., 2011). Desta forma, assim como nos testes parasitológicos, a sensibilidade dos testes sorológicos pode variar de acordo com a fase clínica da doença e da resposta imune específica desenvolvida pelo cão (QUINNELL et al., 2001; GRIMALDI et al., 2012).

Visando superar limitações do uso de antígenos brutos, esforços têm sido direcionados, nas últimas décadas, à síntese de antígenos purificados/ recombinantes para o diagnóstico da LVC. Essas proteínas, sintetizadas em laboratório a partir de sequências imunodominantes do genoma de espécies de *Leishmania*, garantem uma técnica independente do crescimento do parasito em cultura, possibilidade de padronização e menores possibilidades de reações cruzadas (FARAHMAND e NAHREVANIAN, 2016; PAZ et al., 2018).

Testes imunocromatográficos (ICTs) utilizando antígenos recombinantes oferecem resultados rápidos e podem ser aplicados a campo, sem necessidade de estrutura laboratorial (ALVAR et al., 2004). O teste de fita que utiliza o antígeno recombinante K39 (rK39-ICT) e o DPP®-LVC, composto pela proteína quimérica rK28, são os mais estudados no diagnóstico da LVC (PALTRINIERI et al., 2016; NOGUEIRA et al., 2019). Ambos os testes demonstram sensibilidade variável para detecção de cães assintomáticos, numa faixa de 52,9% a 77% para rK39-ICT (REITHINGER et al., 2002; METTLER et al., 2005) e de 47% a 92% para DPP®-LVC (GRIMALDI et al., 2012; LAURENTI et al., 2014). Portanto, a busca por antígenos recombinantes que sejam capazes de detectar cães assintomáticos e /ou em estágios iniciais da infecção se faz necessária (PALTRINIERI et al., 2016).

O antígeno rK28, empregado no teste imunocromatográfico DPP LVC (Bio-Manguinhos), é uma proteína quimérica recombinante de 264 aminoácidos. Compreende a fusão de três repetições de um trecho de 14 aminoácidos do gene *haspb1* de *L. donovani* (homólogo de rK26 de *L. infantum*), duas repetições de trecho com 39 aminoácidos do gene codificante da proteína cinesina *k39* de *L. donovani* (homólogo de rK39 de *L. infantum*) e o gene completo com 133 aminoácidos de *haspb2* de *L. donovani* (homólogo de rK9 de *L. infantum*). No Sudão e na Índia, estudos mostram que o antígeno rK28 apresenta elevada sensibilidade (99,6% - 99,8%) e especificidade (94,1% - 100%) no diagnóstico da leishmaniose humana (PATTABHI et al., 2010; VAISH, 2012). No Brasil, Venturin et al. (2015) mostrou sensibilidade e especificidade de 100% para rK28 no diagnóstico da LVC. Ainda, o antígeno tem se mostrado sensível em regiões onde a sensibilidade ao antígeno rK39 é baixa

(LAURICELLA et al., 2016), e, com elevada acurácia principalmente na detecção de cães sintomáticos (DANTAS-TORRES et al., 2018).

Usado com sucesso no diagnóstico de LVH na África e na Índia e no diagnóstico em ambos, humanos e cães, na América do Sul (VENTURIN et al., 2015), o antígeno rK39 possui sequência de 298 aminoácidos, idêntica em sete espécies de *Leishmania* spp., apresentando ainda, um epítopo de alta densidade e identidade específica com *Leishmania donovani* e *Leishmania infantum* (BADARÓ et al., 1996).

Um gene parcial imunodominante de *Leishmania donovani*, nomeado KLO8, foi clonado e purificado a partir de formas promastigotas de cepa de *L. donovani* do Sudão, em 2013 por Abass et al. (2013). Após a clonagem e purificação do antígeno imunodominante KLO8, este foi inserido em plasmídeos de pQE41 contendo um marcador de histidina N-terminal (Quiagen GmbH, Alemanha) seguido pela transformação de células de *E. coli* M15 (Quiagen GmbH, Alemanha) pela inserção do vetor de expressão bacteriana pQE41/KLO8. O antígeno foi recuperado a partir da cultura bacteriana, a pureza e tamanho foram verificados por eletroforese em gel e western blotting com anticorpos anti-His e os soros de pacientes com LV (ABASS et al, 2013).

A proteína rKLO8 possui 294 aminoácidos, com uma massa molecular prevista de 32.4 kDa e um ponto isoelétrico (IP) de 4.39. A pesquisa de homologia no banco de dados de proteínas mostrou que o KLO8 contém domínios conservados putativos de alta similaridade com proteínas cinesinas de *Leishmania* e exibe identidade de aminoácidos de 93% com a proteína cinesina K39 da cepa BA-2 de *L. infantum* do Brasil (GenBank: AAA29254.1) e 88% com a proteína KE16 da cepa KE16 de *L. donovani* da Índia (GenBank: AAT40474.1). Além disso, a análise BLAST (alinhamento de sequências de DNA ou de proteínas) mostrou 79% de identidade com a proteína sintética de fusão rK28, derivada de *L. donovani* (ABASS et al, 2013).

Ao ser testado na detecção de anticorpos específicos em pacientes com LV, através de ELISA, a reatividade dos soros foi maior frente a rKLO8 em comparação ao antígeno rK39 e outros dois kits comerciais. Além disso, a sensibilidade e especificidade de rKLO8 (98,1% e 96,1%, respectivamente) foi maior em comparação ao ELISA-rK39 (96,2% e 94,8%, respectivamente) (ABASS et al, 2013). Estudo recente, desenvolvido

em nosso laboratório, (ABAD et al., 2016), foi o primeiro na utilização do antígeno recombinante rKLO8 no diagnóstico da LVC no Brasil. Neste estudo, a combinação dos antígenos rKLO8 e rK26 foi capaz de elevar a sensibilidade e especificidade (85% e 93%, respectivamente), em comparação aos antígenos isolados (68% e 92%, respectivamente para rKLO8 e 77% e 91%, respectivamente para rK26).

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) frequentemente é diagnosticada por exame parasitológico e reação de hipersensibilidade tardia a *Leishmania*, sendo os testes sorológicos não usados, rotineiramente, devido sua baixa sensibilidade. Recentemente, foi gerada uma versão recombinante de uma proteína proveniente de *Leishmania (Viannia) braziliensis*, rLb6H, que apresentou 90% de identidade a nível de aminoácidos com homólogos em *L. infantum*, causador de VL no Brasil, e *L. major*, um agente causador de leishmaniose cutânea, indicando a elevada conservação de rLb6H nas espécies de *Leishmania* (SATO et al., 2017).

Nesse estudo, rLb6H apresentou sensibilidade de 100,0% e especificidade de 98,5% (versus controles saudáveis) para a detecção de anticorpos em soros de pacientes com LTA, e sensibilidade de 89,4% e especificidade de 95,3% quando testado em soro de pacientes com LV. Além disso, amostras de pacientes de diferentes regiões endêmicas para *Leishmania* no Brasil para as quais a LTA foi causada pelas espécies particulares de *Leishmania* prevalentes na região, mostrou boa performance no diagnóstico da doença causada por *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis* e *L. shawi*, enquanto nenhuma reatividade a soro de pacientes com histoplasmose, toxoplasmose, malária, tuberculose e paracoccidiodomicose e discreta reatividade com soro de pacientes com doença de Chagas (18,7%). Apesar disso, os resultados obtidos com o antígeno rLb6H são promissores e corroboram o seu potencial de uso rotineiro no diagnóstico sorológico de LTA, além de instigar a curiosidade em avaliar seu desempenho no sorodiagnóstico da LVC no Brasil, uma das motivações desse trabalho.

Genes que codificam proteínas com domínios de repetição em série (tandem repeats – TR), definidos como duas ou mais cópias de uma sequência de aminoácidos, têm sido descritos em uma variedade de organismos, de procariontes a superiores, e inclui protozoários, inclusive *Leishmania spp*, (WICKSTEAD, ERSFELD e GULL, 2003; GOTO, COLER e REED, 2007; GOTO et al., 2010).

Análises computacionais do genoma da *Leishmania* revelaram que esses parasitos apresentam uma grande quantidade de proteínas com domínios de repetição e, essas proteínas são potentes alvos de resposta de células B (GOTO et al., 2006). Além disso, essas proteínas em TR de *Leishmania infantum* podem ser altamente antigênicas por diversas razões dentre elas a existência de múltiplas cópias de unidades antigênicas, aumentando a exposição ao sistema imune, e uma elevada prevalência de aminoácidos carregados, tornando-as hidrofílicas e assim, antígenos de células B mais potentes do que proteínas hidrofóbicas (GOTO, COLER e REED, 2007).

As proteínas em TR nas espécies de *Leishmania* parecem influenciar a sobrevivência do parasito. A indução de resposta imune humoral é ineficiente no controle da carga parasitária. Além disso, a hipergamaglobulinemia induz IL-10 nos macrófagos e a própria opsonização induzida por anticorpos pode ser favorável para a disseminação da *Leishmania* (GOTO et al., 2010).

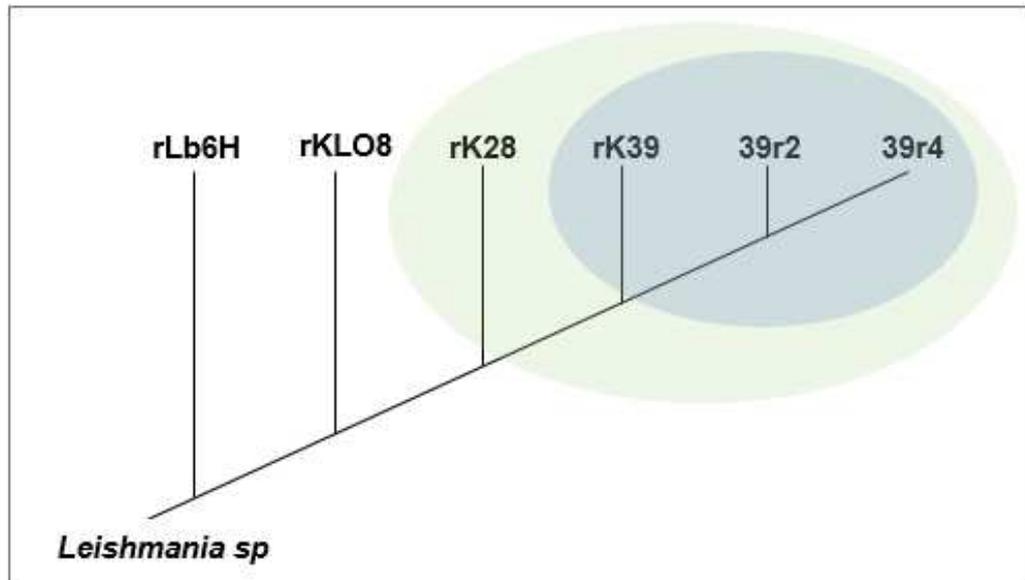
A proteína em TR A2, que parece ser um fator de virulência para *Leishmania donovani*, apresenta mais de 40 cópias de uma sequência de 10 aminoácidos nessa espécie, causadora de leishmaniose visceral, e apenas 1 cópia em *Leishmania major*, causadora de leishmaniose cutânea. Assim, acredita-se que TR A2 possa desempenhar uma importante função na visceralização do parasito (ZHANG e MATLASHEWSKI, 1997; ZHANG et al., 2003). Assim como o antígeno rK39, uma proteína de repetição em série, outras proteínas com essa característica tem sido estudadas como candidatas ao diagnóstico da leishmaniose humana e canina (GHEDIN et al., 1997; BHATIA et al., 1999).

Em estudo de Goto et al. (2010), foi feita análise computacional do genoma e síntese de novas proteínas recombinantes a partir do aumento do número de cópias de uma sequência repetida de duas proteínas em TR de *Leishmania infantum* e avaliou-se a antigenicidade dessas proteínas com soro de pacientes humanos com LV. Foi possível verificar que a antigenicidade dessas proteínas está ligada a dois fatores: a composição fundamental como TR, onde o aumento do número de cópias elevou a força de ligação do anticorpo ao antígeno, e a regulação da sua expressão pelo parasito, já que as proteínas em TR são mais expressas nas formas amastigotas (forma de desenvolvimento no hospedeiro mamífero).

No mesmo estudo de Goto et al. (2010), foi avaliada, de forma breve, o efeito na reatividade a partir do aumento do número de cópias da sequência repetida de 39 aminoácidos do antígeno rK39. Foram sintetizadas proteínas recombinantes com 2 ou 4 cópias da repetição de 39 aminoácidos (39r2 e 39r4, respectivamente) e comparadas com a proteína original rK39 (6,5 cópias). Essas sequências repetidas foram inseridas em vetor introduzido em *Escherichia coli* para expressão em cultura. As proteínas de interesse foram purificadas por eletroforese. A utilidade das proteínas 39r2 e 39r4 assim como o efeito do aumento do número de cópias do segmento de 39 aminoácidos no diagnóstico da LVC está sendo investigada pela primeira vez no presente trabalho.

Os antígenos estudados neste trabalho possuem origem em espécies diferentes de *Leishmania*. O antígeno rK39 possui sequência de aminoácidos idêntica entre *L. donovani* e *L. infantum* (VENTURIN et al., 2015), da mesma forma que as sequências compreendidas no antígeno de fusão rK28 (rK39, rK26 e rK9) também são idênticas nas mesmas espécies (DANTAS-TORRES et al., 2018). Enquanto rKLO8 é baseado em uma sequência de cinesina de *L. donovani* do Sudão que apresenta 93% de identidade com uma proteína cinesina de *L. infantum* (ABASS et al., 2013), a proteína rLb6H, de *L. braziliensis*, mostrou mais de 90% de identidade ao nível de aminoácidos com homólogos em *L. infantum* do Brasil (SATO et al., 2017). Os antígenos rK28 e rK39 são amplamente utilizados no diagnóstico da LVC e foram incluídos como antígenos de referência neste estudo. Os antígenos rLb6H, rKLO8, 39r2 e 39r4 ainda estão em fase de estudos para sua consolidação como antígenos adequados para uso no diagnóstico da LVC e são referidos como antígenos novos neste estudo.

Figura 8 – Representação das origens dos antígenos em estudo, rLb6H, rKLO8, rK28, rK39, 39r2 e 39r4



Fonte: Elaborado pela autora (2021)

Representação das origens dos antígenos e sua proximidade genética. rLb6H, proveniente de *L. braziliensis*; rKLO8, proveniente de *L. donovani*; rK28, rK39, 39r2 e 39r4 são provenientes de *L. donovani* e possuem sequências homólogas em *L. infantum* (sombreado verde). Ainda, 39r2, 39r3 e rK39 são os mais próximos geneticamente (sombreado azul) uma vez que compreendem a mesma sequência de 39 aminoácidos repetida em série por duas vezes (39r2), quatro vezes (39r4) e 6,5 vezes (rK39). Serão considerados antígenos novos neste estudo rLb6H, rKLO8, 39r2 e 39r4. Os antígenos rK28 e rK39 foram considerados referência para as análises.

1.5.2.3 Diagnóstico Molecular

Técnicas sorológicas e parasitológicas necessitam de elevados níveis de anticorpos e carga parasitária e, ainda, não são capazes de distinguir as fases da doença (FREITAS, 2010). Desta forma, técnicas de biologia molecular podem ser importantes não só no diagnóstico como no acompanhamento de animais positivos, submetidos ao tratamento, uma vez que são testes qualitativos e que existe correlação entre a carga parasitária e o status clínico (fase da doença) (RIBEIRO et al, 2007).

Para infecções recentes, antes da soroconversão e na doença assintomática, a demonstração parasitológica e a reação em cadeia da polimerase (PCR) podem ser mais sensíveis. É possível identificar a infecção em PCR de medula óssea a partir de 6

meses após a infecção natural e 3 meses após a infecção experimental. Entretanto, a medida que a infecção progride, a resposta é variada entre os cães. Alguns cães se tornam clinicamente doentes, com elevados títulos de anticorpos e carga parasitária e resposta imune celular suprimida. Porém, uma fração de cães com PCR positivo pode ser tornar negativo nos meses seguintes, mesmo sem nenhum tratamento. Não se sabe se a carga parasitárias desses animais abaixa a um nível abaixo do detectável pelo PCR, se as amastigotas permanecem em outros órgãos ou se esses cães tem a infecção erradicada pela resposta imune (QUINNELL et al., 2001; PALTRINIERI et al., 2016).

1.6 MEDIDAS DE CONTROLE DA LEISHMANIOSE VISCERAL NO BRASIL

A leishmaniose possui características epidemiológicas e de cadeia de transmissão que ainda não são plenamente conhecidas e, por isso, as medidas de controle tem se mostrado pouco efetivas. No Brasil, as estratégias de controle estão centradas no diagnóstico e tratamento precoce dos casos humanos, combate ao vetor e diagnóstico e eliminação de cães positivos para LVC, identificados por testes sorológicos e / ou parasitológicos (MS, 2006).

O programa nacional para controle da LV existe no Brasil, desde a década de 1960 e mesmo assim, a incidência da doença em humanos permanece elevada, com crescente expansão territorial. Na última década, se tornaram crescentes os questionamentos da comunidade científica em relação a eficácia da eliminação de cães positivos devido à baixa acurácia nos testes empregados, a falta de evidência de que a eutanásia de cães positivos diminua a prevalência de LV em humanos em áreas endêmicas, ao trauma psicossocial dos tutores de animais e a rápida reposição de filhotes susceptíveis a infecção (RIBEIRO et al., 2007; FIGUEIREDO et al., 2010; COURA-VITAL et al., 2014; PEIXOTO et al., 2015; DANTAS-TORRES et al., 2019).

Até o ano de 2011, os testes sorológicos recomendados pelo Ministério da Saúde, para diagnóstico da LVC eram ELISA, baseado em antígeno *L. major*-like e a confirmação de cães reagentes através da RIFI, sendo consideradas positivas as amostras com titulação de anticorpos igual ou superior a 1 para 40. Ambos os testes

são fornecidos pela Bio-Manguinhos (Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil) (MS, 2014; LAURENTI et al., 2014; PAZ et al., 2018).

Considerando a sensibilidade e especificidade variáveis da RIFI e sua baixa reprodutibilidade, o Ministério da Saúde orientou a realização de um estudo transversal, multicêntrico, randomizado e duplo cego, comparando a utilização em série de ELISA e RIFI e do teste rápido DPP® e ELISA. O resultado mostrou maior sensibilidade (87,88%) e especificidade (88,03%) do TR DPP e ELISA ao se comparar com ELISA e RIFI (sensibilidade de 86,00% e e especificidade de 85,71%) (BRASIL. Nota Técnica nº 01/2011 – 9 CGDT/CGLAB/DEVIT/SVS/MS; COURA-VITAL et al., 2014). Neste sentido, em 2012, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) do Brasil registrou o teste rápido imunocromatográfico (Dual-Path Platform - DPP® - BioManguinhos / Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil) como recomendado para triagem de cães no diagnóstico da LVC (NOTA TÉCNICA Nº 01/2011 – 9 CGDT/CGLAB/DEVIT/SVS/MS).

O TR DPP®-LVC consiste em um dispositivo impregnado com o antígeno recombinante rK28 (uma proteína quimérica combinando os antígenos rK9, rK39 e rK26) e partículas de ouro coloidal ligadas a proteína A (FIGUEIREDO et al., 2018). As amostras (soro, plasma ou sangue fresco total) são diluídas em solução tampão (incluída no kit). A proteína A possui afinidade pela fração Fc de anticorpos e, desta forma, ao encontrar anticorpos presentes na amostra, que estejam ligadas ao antígeno presente no teste, é criado um complexo imune corado para visualização (GRIMALDI et al., 2012). O resultado positivo para TR DPP® deve ser confirmado através de *L. major*-like-ELISA Biomanguinhos, (BioManguinhos / Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil) (LAURENTI et al., 2014; PAZ et al., 2018).

A acurácia do DPP® tem sido testada em diversos estudos. Uma meta-análise feita por Peixoto *et al* (2015) com 15 estudos utilizando ELISA de antígeno bruto, 11 utilizando RIFI e 3 utilizando DPP® mostrou que as acurácias são moderadas para todos os testes e que há uma elevada heterogeneidade em relação aos sintomas clínicos e localização geográfica. Estudo de Laurenti *et al* (2014) mostra elevada sensibilidade para DPP® para cães sintomáticos (89.4%) e assintomáticos (92.1%), contrapondo o estudo de Grimaldi *et al* (2012) que supõe que a sensibilidade do DPP®

possa variar com a fase de infecção em cães assintomáticos. Em relação a especificidade, DPP® apresentou 95.1% e o ELISA 77.8%. O estudo ainda sugere que o teste deveria ser utilizado como teste confirmatório.

Uma ampla cobertura vacinal contra leishmaniose em cães, principalmente na ausência de vacinas licenciadas para leishmaniose visceral humana, constitui uma ferramenta importante para o controle da doença (PALATNIK-DE-SOUSA, 2012). Uma vacina efetiva contra leishmaniose canina deve induzir imunidade Th1 forte e duradoura, evitando o estabelecimento de infecções iniciais (objetivo difícil de ser alcançado para qualquer vacina anti-protozoário), ou ainda, controlar a progressão da doença, dessa forma, reduzindo a transmissão do parasito, já que ambas estão correlacionadas (GRADONI, 2015).

A primeira vacina aprovada para uso comercial no Brasil foi a Leishmune® (Fort Dodge Saúde Animal) em 2003, composta do antígeno glicoprotéico fucosemanose ligante purificado (FML) de promastigotas de *L. donovani* (MARCONDES e DAY, 2019). Apesar de apresentar eficácia de até 80%, foi descontinuada em 2014 devido ao não preenchimento de requisitos para sua aprovação na fase III de estudo (NOTA TÉCNICA N°038/2014/DFIP/SDA, 2014). Outro problema em relação ao seu uso foi a indiscriminação entre cães vacinados e infectados, o que levou a animais erroneamente diagnosticados e conseqüentemente eutanasiados (PALATNIK-DE-SOUSA, 2012; MELO et al., 2016).

Até o momento, portanto, a única vacina licenciada contra LVC, disponível para uso veterinário no Brasil, é a Leish-Tec® (Ceva Hertape), composta pela proteína recombinante A2, específica do estágio amastigota e altamente conservada entre espécies de *Leishmania*. Contém saponina como adjuvante e estimulante de resposta Th1. Essa vacina apresenta cerca de 71% de eficácia e estudos acerca de possível soroconversão pós vacinal ainda são controversos (MARCONDES e DAY, 2019).

O desenvolvimento de uma vacina eficaz, profilática e imunoterápica, de uso global, para leishmaniose é um enorme desafio, apesar de novos avanços tecnológicos e desenvolvimentos no campo da vacinologia. Portanto, os esforços devem continuar na busca de uma vacina segura e prática para eliminar essa doença parasitária do mundo (SRIVASTAVA et al., 2016).

Outras medidas de controle incluem uso de telas em janelas e canis, redução de microhabitats favoráveis ao flebotomíneo (pilhas de madeira e matérias em decomposição), evitar exposição dos cães em horários crepusculares (devido ao comportamento alimentar das fêmeas do flebotomíneo), e uso de inseticidas no interior de residências e canis (NOGUEIRA et al., 2019).

1.7 TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA NO BRASIL

É proibido, em todo o território nacional, o tratamento da leishmaniose visceral em cães infectados ou doentes, com produtos de uso humano ou produtos não registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL, Portaria Interministerial nº 1.426 de 11 de julho de 2008). Frente essa restrição, os fármacos utilizados no tratamento da LVC incluem medicamentos que atuam contra a *Leishmania*, imunomoduladores e imunoterapia, além dos tratamentos de suporte (RIBEIRO et al, 2007).

A miltefosina (Milteforan®, Virbac) é uma droga antitumoral com propriedades anti-*Leishmania* importantes e resultados promissores na remissão clínica de cães, é comercializada para tratamento de LVC, sob o nome comercial de Milteforan®, na Europa, desde 2007. (NOGUEIRA et al., 2019). Uma década mais tarde, no Brasil, a Nota Técnica Conjunta nº001/2016, assinada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e Ministério da Saúde (MS), autoriza o registro da Miltefosina (Milteforan® /Virbac) para o tratamento da LVC em território nacional (BRASIL, Nota Técnica nº 11/2016/CPV/DFIP/DAS/GM/MAPA).

Ainda não existe tratamento efetivo em erradicar a infecção do cão, que pode sofrer recidivas da doença. Entretanto, a cura clínica e redução da carga parasitária promovidas pelo tratamento, associadas ao uso de inseticidas tópicos no cão é capaz de reduzir a quase zero a infectividade para o vetor por pelo menos 4 meses (MIRÓ et al., 2017). Desta forma, o cão tratado deve receber manejo adequado, reavaliações periódicas com a possibilidade de repetição de protocolo de tratamento, se necessário (TRAVI et al., 2018).

A educação do proprietário para adequada manutenção das medidas de controle vetorial através do uso de produtos veterinários registrados, impregnados de deltametrina, permetrina ou piretróides, na forma de spot-on ou coleiras, que previnem o contato cão-vetor, é de essencial importância para prevenir a primo-infecção de cães e a picada do flebotomíneo em cães infectados (SOLANO-GALLEGO et al., 2011).

1.8 JUSTIFICATIVA.

Nas últimas décadas, diversas proteínas recombinantes têm sido descritas como candidatas ao diagnóstico sorológico das leishmanioses, em especial, a LVC e, em geral, essas proteínas apresentam elevada acurácia principalmente na detecção de cães com doença sintomática sendo, ainda, um desafio o diagnóstico de cães assintomáticos ou em estágios iniciais da infecção. Portanto, alternativas que melhorem a detecção de cães assintomáticos é necessidade urgente.

Cães infectados desenvolvem respostas imunes heterogêneas, provavelmente correlacionadas a multiplicidade de antígenos somáticos e de superfície das espécies de *Leishmania spp.* Esses antígenos podem ser diferencialmente reconhecidos em diferentes animais e em diferentes estágios da doença no mesmo hospedeiro. Neste contexto, os antígenos recombinantes utilizados no diagnóstico da LVC também podem apresentar imunorreatividades independentes e que poderiam ser usadas como complementares para que se atinja uma maior sensibilidade nos testes diagnósticos.

Diante do exposto, este trabalho visa contribuir para o controle da LVC, avaliando a utilidade diagnóstica de novos antígenos recombinantes de *Leishmania* rKLO8, rLb6H, 39r2, 39r4, comparando suas performances a dois antígenos de referência, rK28 e rK39. Ainda, este estudo visa identificar possíveis lacunas limitantes na capacidade diagnóstica desses antígenos recombinantes, investigando a capacidade dessas proteínas em discriminar cães saudáveis de cães infectados, a relação entre a reatividade de anticorpos e o status clínico do cão infectado (assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos) e ainda, avaliar a reatividade de soro de cães vacinados contra LVC frente aos referidos antígenos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a utilidade dos antígenos recombinantes rKLO8, rLb6H, 39r2, 39r4 no diagnóstico da leishmaniose visceral canina, comparando seu desempenho com dois antígenos de referência, rK28 e rK39.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a reatividade de anticorpos IgG anti-rKLO8, rK28, rLb6H e rK39 em amostras de soro de cães provenientes de Governador Valadares – MG, através do teste ELISA indireto;
- Avaliar a acurácia dos antígenos rKLO8, rK28, rLb6H e rK39 através da análise da curva ROC;
- Avaliar a reatividade de anticorpos IgG frente aos antígenos rKLO8, rK28, rLb6H e rK39 em amostras de soro de cães vacinados contra a LVC (vacina Leish-Tec®)
- Avaliar o desempenho dos antígenos recombinantes rKLO8, rLb6H, 39r2, 39r4 comparados aos antígenos de referência rK28 e rK39 em amostras de soro de cães com confirmação parasitológica da infecção por *Leishmania*, provenientes de Belo Horizonte, Minas Gerais;
- Avaliar a relação entre as reatividades de anticorpos IgG antígeno específicos e os grupos clínicos de acordo com a presença de sintomas da leishmaniose visceral canina, confirmada parasitologicamente (assintomático, oligossintomático e sintomático);

- Comparar a acurácia dos antígenos rKLO8, rK28, rLb6H, 39r2, 39r4 e rK39 em amostras de soro de cães com confirmação parasitológica da infecção por *Leishmania*, através da análise da curva ROC;
- Avaliar a resposta das subclasses de anticorpos IgG1 e IgG2 antígeno-específicos e a sua relação com os grupos clínicos de acordo com a presença de sintomas da LVC confirmada parasitologicamente (grupos assintomático, oligossintomático e sintomático).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANTÍGENOS

A proteína recombinante rKLO8, foi clonada e expressa a partir de um isolado sudanês de *L. donovani*, sendo gentilmente cedida pelo professor Dr. Ulrich Steinhoff, da Universidade Philipps de Marburg (Marburg, Alemanha). Resumidamente, os genes foram amplificados por reação em cadeia da polimerase (PCR) e clonados no vetor de expressão bacteriana pQ41 (Qiagen GmbH, Alemanha), contendo um marcador de histidina N-terminal. A proteína foi superexpressada em *Escherichia coli* M15 (Qiagen GmbH, Alemanha) e purificada (ABASS et al., 2013). Pureza e tamanho foram verificados por eletroforese em gel e western blotting com anticorpos anti-His e soros de pacientes com VL. As proteínas recombinantes de *L. donovani*, rK28, rK39, 39r2 e 39r4, e rLb6H de *L. braziliensis*, foram gentilmente cedidas pelo Dr. Malcolm S. Duthie, sendo produzidas no Infectious Disease Research Institute (hoje HDT-Biotech), Seattle, WA, EUA. Os antígenos, originalmente liofilizados, foram diluídos em água destilada estéril e estocados em PBS a -20°C, até o uso a 500ng/ml.

3.2 AMOSTRAS DE SORO

Inicialmente, para a avaliação do desempenho dos antígenos rKLO8, rK28, rLB6H e rK39 no diagnóstico da LVC, foram ainda usadas amostras de soro de cães gentilmente cedidas a partir do banco de soro da Gerência de Controle de Zoonoses/Secretaria Municipal de Saúde de Governador Valadares – MG, área endêmica para a infecção por *Leishmania*. Cães de diferentes sexos, raças e idades, foram submetidos ao protocolo diagnóstico para LVC compreendendo a triagem através do teste rápido imunocromatográfico TR-DPP® Bio-Manguinhos (DPP) e confirmação dos casos positivos através do ensaio imunoenzimático (Kit EIE-LVC Bio-Manguinhos). Cães negativos para DPP foram classificados como controle endêmico (CE; n = 44) e cães com resultados positivos (DPP⁺/EIE⁺) foram classificados como grupo LVC (n = 44). Os

testes nos cães foram feitos por profissionais da Secretaria de Saúde do Município de Governador Valadares, seguindo as instruções do fabricante.

Também foram incluídas amostras de soros de cães adultos, vacinados anualmente contra leishmaniose visceral canina (Leish-Tec®) (grupo VAC; n = 44). Esses cães são doadores regulares de sangue e são clinicamente examinados e testados sorologicamente para LVC (SNAP Leishmania - IDEXX, ELISA e RIFI), erliquiose, anaplasmosse, babesiose, doença de Lyme e dirofilariose, além do perfil hematológico completo a cada doação de sangue. As amostras foram gentilmente cedidas a partir do banco de sangue da unidade de hemoterapia do Santo Agostinho Hospital Veterinário, Belo Horizonte.

Em uma etapa seguinte, foram incluídas amostras de soro de cães adultos, de ambos os sexos, com idades entre 2 e 6 anos, não infectados (SAE; n = 14) ou naturalmente infectados por *Leishmania* (INF; n = 35), provenientes de área endêmica para *L. infantum*, com confirmação parasitológica, gentilmente cedidas a partir da soroteca do professor Dr. Alexandre Barbosa Reis, do Laboratório de Imunopatologia da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP) (REIS et al., 2006).

Os cães acima foram classificados a partir do resultado sorológico da reação de imunofluorescência indireta (RIFI), utilizando antígenos de promastigotas de *L. amazonenses* (MHOM/BR/1960/BH6) e *L. chagasi* (MHOM/BR/1972/BH46). Animais com títulos <1:40 e sem alterações clínicas e laboratoriais para LVC foram incluídos no grupo saudável de área endêmica (SAE; n = 14). Cães com títulos \geq 1:40 tiveram a infecção por *L. infantum* confirmada por exame parasitológico e pelo menos mais um teste sorológico adicional incluindo ELISA com extrato do parasito ou o antígeno rK39 (REIS et al., 2006). Ainda, os cães positivos para LVC foram classificados de acordo com a presença de sintomas clínicos em três grupos: assintomáticos (AD; n = 11), sem sinais clínicos sugestivos da doença; oligossintomáticos (OD; n = 11), com no máximo três sintomas sugestivos de LVC incluindo pelos opacos e/ou alopecia localizada e /ou perda de peso moderada; sintomáticos (SD; n = 13), com sinais clínicos característicos da LVC, como pelos opacos, perda de peso severa, onicogribose, lesões cutâneas, apatia e ceratoconjuntivite.

Todas as amostras cedidas para esse estudo foram armazenadas e/ou enviadas em frascos Eppendorf®, congeladas e devidamente identificadas, e foram mantidas a temperatura de -20°C no IMUNOCET até o momento do uso. A proposta do estudo foi submetida e aprovada pelo CEUA/UFJF (Protocolo – 009/2017) e posteriormente revalidada pelo Memorando número 34/2020.

3.3 ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO – ELISA

Para a detecção de anticorpos IgG, IgG1 e IgG2 anti-*Leishmania* nas amostras, foi utilizado o método de ELISA indireto, de acordo com padronizações anteriormente realizadas em nosso laboratório ABAD et al. (2016).

Placas de poliestireno, de 96 poços (Cralplast®, Brasil) foram sensibilizadas, por 18 horas, a 4°C, com 500ng/ml (50µl/poço) dos antígenos rKLO8, rK28, rLb6H, 39r2, 39r4 e rK39, diluídos em tampão carbonato/bicarbonato. Após a incubação, as placas foram lavadas três vezes com solução salina tamponada com fosfato (PBS) contendo 0,05% de Tween-20 (PBS-T) e bloqueadas por 1 hora a temperatura ambiente com 100µl/poço de solução bloqueio (PBS-T contendo 2% de albumina de soro bovino, BSA). Após a lavagem, as amostras de soro, diluídas em PBS-T contendo 0,01% de BSA, foram adicionadas na diluição 1:2000 para IgG e 1:1000 para IgG1 e IgG2 (50µl/poço) e incubadas por 1 hora a temperatura ambiente. Então, após a lavagem, anticorpos policlonais foram adicionados (50µl/poço), previamente diluídos, em PBS-T contendo 0,01% de BSA, como a seguir: anti-dog IgG: peroxidase (Rabbit anti-Dog IgG; Sigma-Aldrich®, USA), 1:5000; anti-dog IgG1:peroxidase (Goat anti-Dog IgG1; AbD Serotec®, A Bio-Rad Company, USA), 1:4000; anti-dog IgG2 (Sheep anti-Dog IgG2; AbD Serotec®, A Bio-Rad Company, USA), 1:2000, seguido de incubação, lavagem e adição, em segunda etapa, de anti-sheep IgG: peroxidase (Rabbit anti-Sheep IgG; AbD Serotec®, A Bio-Rad Company, USA), 1:2000. Todos os anticorpos foram incubados por 1 hora a temperatura ambiente e após a lavagem, a reação foi iniciada com a adição 50µl/poço do substrato dicloridrato de o-fenilenodiamina (OPD), diluído em tampão citrato-fosfato, adicionado de água oxigenada (H₂O₂). Após o desenvolvimento de cor, a reação foi interrompida pela adição de 25µl/poço de H₂SO₄

2N e as leituras foram feitas em leitor de ELISA Spectramax-190 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) a 492nm. Os resultados foram expressos em absorbância, que correspondem à média dos valores das densidades ópticas (DO) de cada amostra.

3.4 CURVA ROC (*Receiver Operating Characteristic*)

Neste estudo, utilizou-se a *receiver operating characteristic curve*, conhecida como Curva ROC, para a análise dos valores de acurácia – área sob a curva, sensibilidade e especificidade, além do ponto de corte (cut-off). As curvas foram obtidas utilizando-se programa estatístico MedCalc Statistical – versão 5.00.020 (www.medcalc.br/index.html).

A curva ROC consiste na representação gráfica da sensibilidade (verdadeiro positivo) no eixo vertical e do complemento da especificidade (taxa de falso positivo) no eixo horizontal. Cada ponto no gráfico representa os valores dos referidos índices, em diferentes pontos de corte (valores normativos acima dos quais o teste é considerado positivo e abaixo dos quais o teste é considerado negativo), determinando assim, a área sob a curva (ASC). A ASC é o indicador de acurácia global do teste. Quanto maior a ASC, passando pelo canto superior esquerdo, onde a sensibilidade e especificidade tomam valores máximos, significa mais próximo do valor 1, sendo melhor o desempenho do teste. Além da acurácia global do teste, a curva ROC permite também identificar com precisão o ponto de corte associado ao menor número de resultados errôneos do teste. Além disso, é possível estabelecer os valores de sensibilidade e especificidade. O teste diagnóstico ideal é aquele cujo ponto de corte está mais próximo da interseção sensibilidade/especificidade.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram feitas utilizando o programa GraphPad Prism 5.0 (Graph Pad Software). Primeiramente, a normalidade das médias de absorbância foi avaliada pelo teste Kolmogorov-Smirnov. O teste *t de student* ou o teste não paramétrico Mann-Whitney foram usados para comparar as médias de densidades

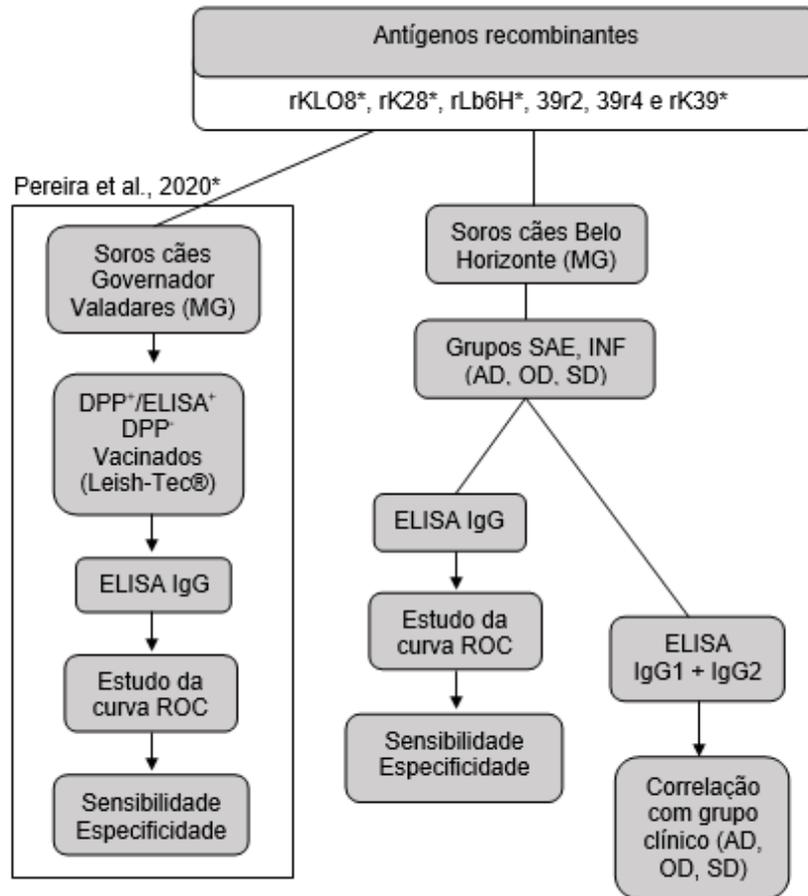
ópticas (DOs) entre dois grupos. Análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste Tukey de comparações múltiplas, ou o teste não paramétrico Kruskal-Wallis seguido pelo teste Dunn de comparações múltiplas foram usados para comparar as médias de DO entre três ou mais grupos independentes. Correlações foram estabelecidas utilizando a classificação Spearman.

Comparações das curvas ROC relativas aos ensaios dos antígenos recombinantes estudados foram avaliadas pelo teste não paramétrico Wilcoxon, usando o programa MEDCALC 14.8.1 (MedCalc Software). Parâmetros da curva, sensibilidade, especificidade, foram extraídos no melhor ponto de corte indicado pela curva. Valores de p menores que 0.05 ($p < 0,05$) foram considerados estatisticamente significativos.

4 RESULTADOS

Com o intuito de formar os grupos necessários para a obtenção dos dados, foram utilizadas amostras de origens distintas, com as quais foram realizados diferentes procedimentos, de acordo com cada objetivo do presente trabalho. A figura 9 ilustra a sequência de avaliações feitas para os antígenos rKLO8, rK28, rLb6H, 39r2, 39r4 e rK39 para se determinar a acurácia e a aplicabilidade dos mesmos em testes diagnósticos para LVC. Também se encontram ilustrados na figura, os grupos e origens dos soros de cães utilizados.

Figura 9 - Organograma dos ensaios para avaliação da acurácia diagnóstica dos antígenos rKLO8, rK28, rLb6H, 39r2, 39r4 e rK39



Elaborado pela autora (2021)

Ensaio realizado com amostras de soro de cães provenientes do município de Governador Valadares-MG e Belo Horizonte-MG. Grupo DPP⁺/ELISA⁺ = cães considerados positivos para LVC. DPP⁻ = cães considerados negativos para LVC. Vacinados (Leish-Tec®) = cães provenientes de Belo Horizonte-MG vacinados anualmente contra leishmaniose (vacina Leish-Tec®). Grupos INF (AD, OD, SD) = cães provenientes de Belo Horizonte-MG com infecção por *Leishmania* confirmada. Grupo SAD = cães considerados como não infectados. ELISA = ensaio imunoenzimático. INF = infectado por *Leishmania*. AD = assintomáticos. OD = oligossintomáticos. SD = sintomáticos. Através da análise da curva ROC (Receiver Operating Characteristic Curve) foram definidos o ponto de corte dos ensaios, valores de sensibilidade e especificidade. Caixa e * correspondem aos antígenos e ensaios publicados recentemente (Pereira et al., 2020).

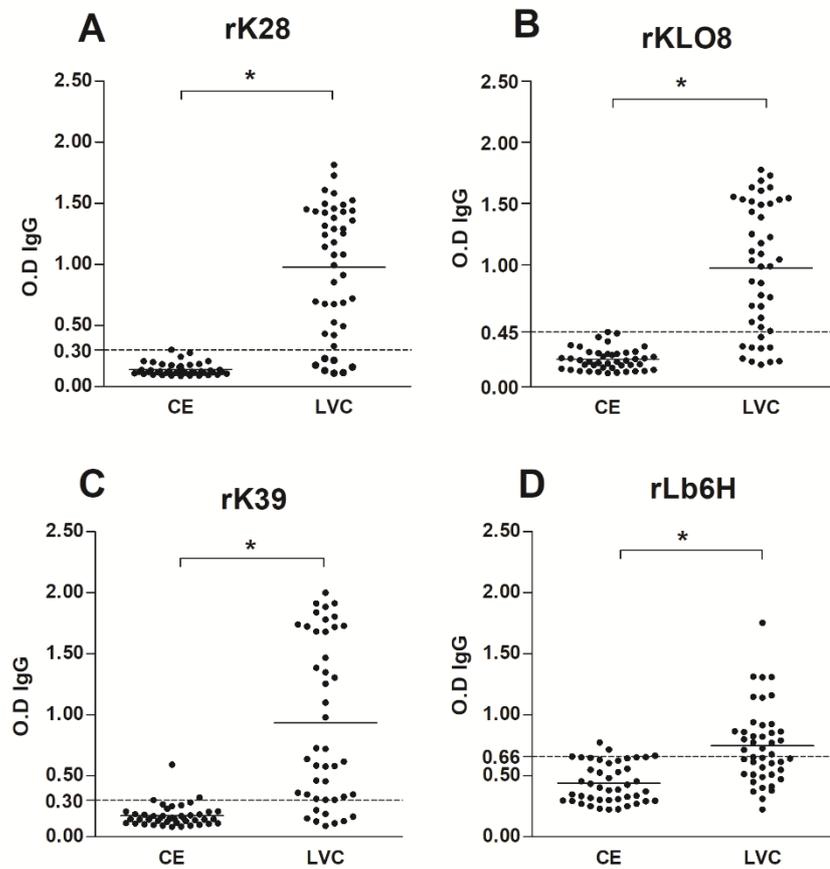
4.1 DETECÇÃO DE ANTICORPOS IgG anti-rK28, anti-rKLO8, anti-rK39 e anti-rLb6H

O método de ELISA indireto foi padronizado e empregado para a detecção de anticorpos IgG específicos contra os antígenos rK28, rKLO8, rK39 e rLb6H, nas amostras de soro cedidas pela Gerência de Controle de Zoonoses da Secretaria Municipal de Saúde de Governador Valadares – MG. Foram testadas 88 amostras de soro de cães, referente aos grupos CE (controle endêmico, n = 44, negativos para o TR-DPP®) e LVC (grupo infectado, n = 44, positivos para TR-DPP® e EIE-LVC *L.major-like*®).

A figura 10 mostra a distribuição da densidade óptica dos antígenos a partir do cut-off estabelecido pela curva ROC, sendo 0,30 para rK28 (A), 0,45 para rKLO8 (B), 0,20 para rK39 (C) e 0,66 para rLb6H (D).

Pode-se observar que a reatividade de anticorpos IgG contra os antígenos recombinantes foi maior ($p < 0,05$) nos soros de cães do grupo considerado positivo (LVC) quando comparado ao grupo considerado negativo (CE). Enquanto se observa uma grande variação na magnitude das respostas, as médias de densidades ópticas (DO) do grupo LVC foram similares para rK28 ($0,97 \pm 0,52$) (Figura 10A), rKLO8 ($0,97 \pm 0,52$) (Figura 10B) e rK39 ($0,93 \pm 0,67$) (Figura 10C), e discretamente menor para rLb6H ($0,75 \pm 0,31$) (Figura 10D). No grupo CE, ao contrário, as densidades ópticas apresentaram menor dispersão ao redor da mediana para rK28 ($0,14 \pm 0,04$), rKLO8 ($0,22 \pm 0,08$) e rK39 ($0,17 \pm 0,08$), enquanto a dispersão foi maior para rLb6H ($0,44 \pm 0,16$).

Figura 10 - Resposta de anticorpos IgG antígeno-específicos dos cães com LVC



Elaborado pela autora (2021)

Níveis séricos de anticorpos IgG anti-rK28 (A), rKLO8 (B), rK39 (C) e rLb6H (D) em soros de cães negativos (CE; n = 44) e positivos (LVC; n = 44) para LVC. Ponto de corte (barras tracejadas) estabelecido pela curva ROC. Barras horizontais representam mediana das densidades ópticas determinadas pelo ELISA. Análise estatística Mann Whitney. * = p < 0,05.

No grupo LVC, das 44 amostras testadas, 84% (37/44), 77% (34/44), 82% (36/44) e 52% (23/44) foram sororreagentes (DO maior que cut-off) e 16% (7/44), 22% (10/44), 18% (8/44) e 48% (21/44) foram não reagentes (DO menor ou igual ao cut-off) aos antígenos rK28, rKLO8, rK39 e rLb6H, respectivamente. Já no grupo CE, apenas 2% (1/44), 7% (3/44) e 9% (4/44) reagiram aos antígenos rK28, rK39 e rLb6H, respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1 - Número e porcentagem de amostras positivas em cada grupo de soro de cães frente aos diferentes antígenos recombinantes

	rKLO8	rK28	rLb6H	rK39
Grupos (n)	Nº de animais reagentes (%)			
CE (44)	0	1 (2)	4 (9)	3 (7)
LVC (44)	34 (77)	37 (84)	23 (52)	36 (82)

Fonte: Elaborado pela autora (2021)

CE: amostras negativas para o teste DPP®

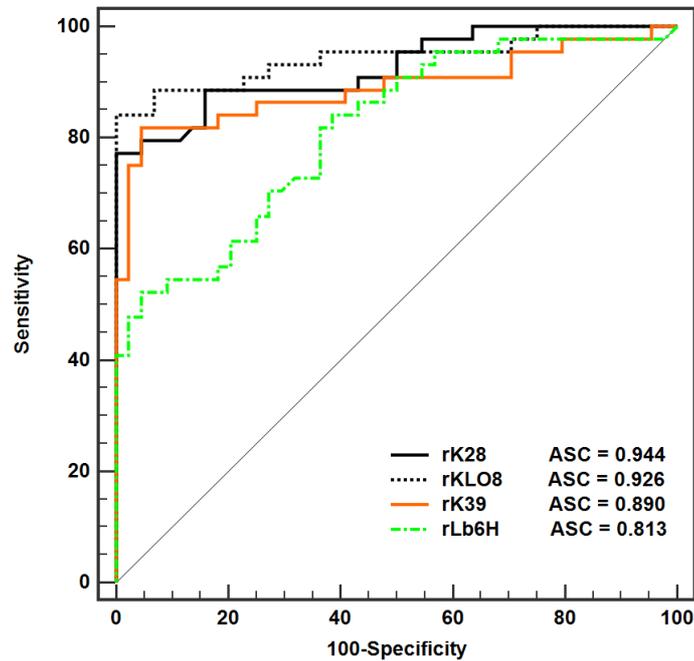
LVC: amostras positivas para os testes DPP® e *L. major*-Like-ELISA®.

4.2 AVALIAÇÃO COMPARATIVA DA ACURÁCIA DIAGNÓSTICA DOS TESTES ELISA ENVOLVENDO AS QUATRO PROTEÍNAS RECOMBINANTES: rK28, rKLO8, rK39 E rLb6H, USADAS NO DIAGNÓSTICO DA LVC

A análise da curva ROC foi realizada para avaliar a acurácia geral de cada ELISA, empregando os antígenos rK28, rKLO8, rK39 e rLb6H para o diagnóstico da LVC (Figura 11). Representados pelos valores da área sob a curva (ASC), encontramos um desempenho similar entre ELISA-rK28 (0,944; 95% IC = 0,874 - 0,982) e ELISA-rKLO8 (0,926; 95% IC = 0,850 - 0,971). Embora o valor de ASC do teste ELISA-rK39 (0,890; 95% IC = 0,806 - 0,947) não tenha sido estatisticamente diferente do teste ELISA-rKLO8, foi inferior ao observado por ELISA-rK28 ($p < 0,05$). O valor de ASC para o ELISA-rLb6H foi o mais baixo em 0,813 (95% IC = 0,716 - 0,888) e foi significativamente menor do que aqueles observados para rKLO8 e rK28 (ambos $p < 0,05$; Figura 11).

As correlações de ordem de Spearman mostraram que os resultados dos testes ELISA-rK28, ELISA-rKLO8 e ELISA-rK39, revelaram uma forte correlação linear ($r = 0,93$ para rK28 vs rKLO8; $r = 0,90$ para rK28 vs rK39; $r = 0,96$ para rKLO8 vs rK39). Por outro lado, cada um deles mostrou uma fraca correlação com o ELISA-rLb6H ($r = 0,70$ para rLb6H vs rK28; $r = 0,68$ para rLb6H vs rKLO8; $r = 0,71$ para rLb6H vs rK39) (Figura 12).

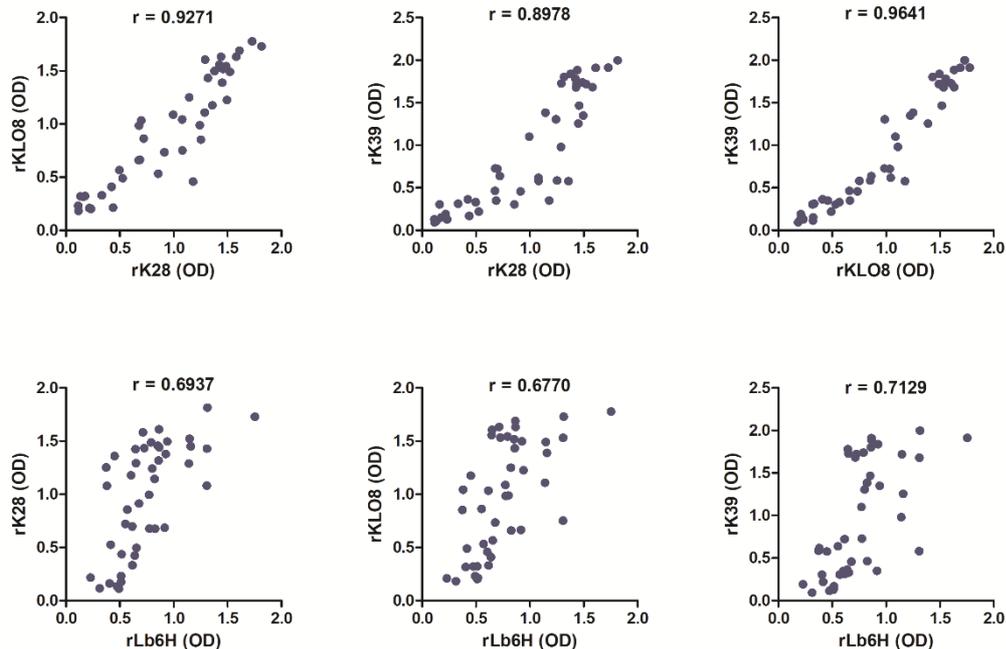
Figura 11 – Desempenho diagnóstico dos ELISA antígeno-específicos



Elaborado pela autora (2021)

A análise da curva ROC foi realizada, comparando as áreas sob a curva (ASC) para rKLO8 x rK28 ($p = 0,4287$), rKLO8 x rK39 ($p = 0,1246$), rK28 x rK39 ($p = 0,0258$), rKLO8 x rLb6H ($p = 0,0011$), rK28 x rLb6H ($p = 0,0013$) e rK39 x rLb6H ($p = 0,0589$). Estatística: teste não paramétrico Wilcoxon. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Figura 12 - Índices de Correlações Spearman entre os ELISAs antígeno-específicos



Fonte: Elaborado pela autora (2021)

Correlações entre reatividades de anticorpos IgG anti-rK28, rKLO8, rK39 e rLb6H utilizando amostras de soro de cães testados positivo (DPP⁺/EIE⁺; n = 44) para leishmaniose visceral canina. r = índice de correlação Spearman a $p < 0,05$.

A análise da curva ROC também determinou os valores de sensibilidade e especificidade de cada ELISA antígeno-específico (realizado em duas ocasiões separadas para estabelecer a robustez do ensaio), bem como as razões de verossimilhança (RV) nos melhores pontos de corte (cut-off) de cada curva (Tabela 2). Cada antígeno recombinante testado, e em particular rK28 e rKLO8, demonstrou alta especificidade (95-100% [IC = 84,5-100] e 93-100% [IC = 81,3-100], respectivamente) indicando sua utilidade nos cães verdadeiramente negativos excluindo um diagnóstico incorreto de LVC. Em termos de sensibilidade, os antígenos rK28 e rK39 foram os mais sensíveis (84% [IC = 69,9-93,4] e 82% [IC = 67,3-91,8], respectivamente), seguidos pelo antígeno rKLO8 (75-77% [IC = 59,7-88,5]), indicando, portanto, sua adequação para detecção de LVC. O antígeno rLb6H apresentou menor sensibilidade (52 e 57% [IC = 36,7-71,7]). Os maiores valores de sensibilidade e especificidade, foram

retornados pelo teste ELISA-rK28 (Tabela 2). Assim, nossos dados confirmam o importante papel do ELISA-rK28 na triagem e detecção de CVL.

Tabela 2 - Sensibilidade e especificidade dos antígenos rK28, rKLO8, rK39 e rLb6H no diagnóstico sorológico da LVC

ELISA	Exp.	Cut-off (A₄₅₀)	Sensibilidade % [95% IC]	Especificidade % [95% IC]
rK28	1	0,30	84 [69,9-93,4]	100 [92-100]
	2	0,23	84 [69,9-93,4]	95 [84,5-99,4]
rKLO8	1	0,45	77 [62,2-88,5]	100 [92-100]
	2	0,41	75 [59,7-86,8]	93 [81,3-98,6]
rK39	1	0,30	82 [67,3-91,8]	95 [84,5-99,4]
	2	0,20	82 [67,3-91,8]	86 [72,6-94,8]
rLb6H	1	0,66	52 [36,7-67,5]	95 [84,5-99,4]
	2	0,35	57 [41,0-71,7]	95 [84,5-99,4]

Elaborado pela autora (2021)

Ponto de corte (*cut-off*), sensibilidade, especificidade e intervalos de confiança foram determinados pela curva ROC. Os dados representam valores obtidos em 2 ensaios de ensaio independentes com soros de cães de controle negativo (TR-DPP⁻, n = 44) e de cães afetados por LVC (DPP⁺ / EIE⁺, n = 44).

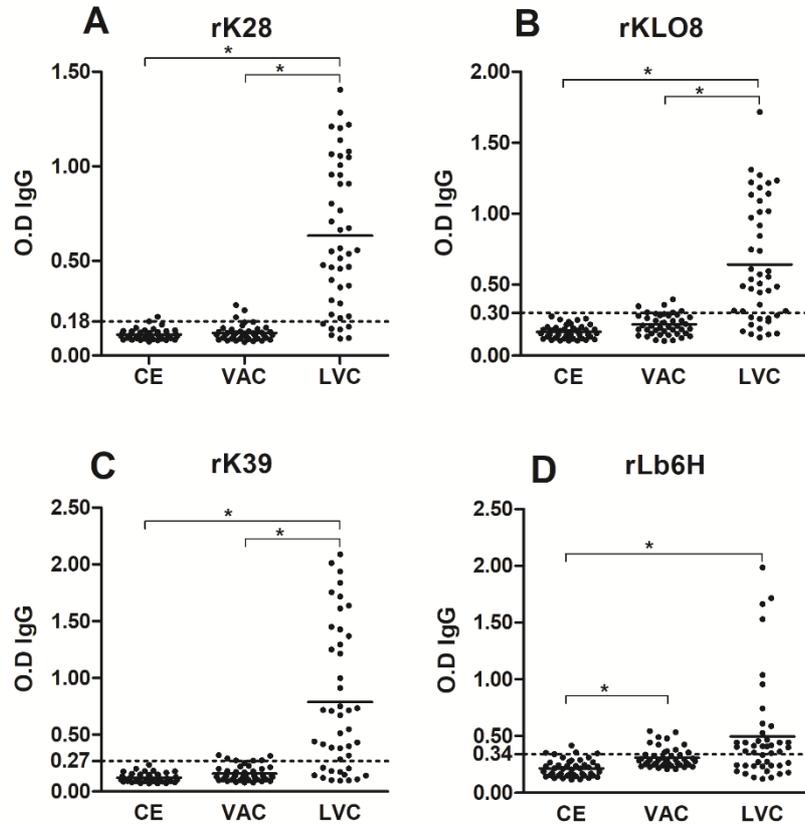
4.3 AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE DE ANTICORPOS IgG EM SORO DE CÃES VACINADOS CONTRA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA (VACINA Leish-Tec®) FRENTE AOS ANTÍGENOS rKLO8, rK28, rLb6H e rK39

A vacinação de cães contra a LVC constitui importante ferramenta no controle da doença. Entretanto, essa medida não é adotada pelo Ministério da Saúde do Brasil. As questões que envolvem a não adoção dessa medida como política pública são referentes a resultados controversos de estudos apontando a possibilidade da soroconversão de cães vacinados, o que poderia interferir nos inquéritos epidemiológicos pela dificuldade em se diferenciar cães infectados de cães vacinados (MARCONDES e DAY, 2019).

Diante do exposto, avaliamos o impacto da imunização com a vacina Leish-Tec® sobre as respostas aos antígenos recombinantes em estudo. Para isso, um novo grupo controle foi formado consistindo de 88 amostras divididas em dois subgrupos: controle endêmico (as mesmas amostras utilizadas anteriormente, EC, n = 44) e soros de cães previamente vacinados contra LVC (Leish-Tec®, VAC, n = 44), para o cálculo do novo ponto de corte.

Enquanto os soros de cães vacinados com Leish-Tec® não diferiram do grupo CE na resposta ao rK28, rKLO8 ou rK39, foi demonstrada uma reatividade significativamente maior do que o grupo CE frente ao antígeno rLb6H (Figura 13). Embora a magnitude das DO seja mais baixa que no grupo LVC, 25% dos soros de cães vacinados (11/44) tinham anticorpos detectáveis contra o antígeno rLb6H. A proporção de soros reagentes no grupo VAC foi de 13% para rKLO8 e rK39 e menor para rK28 (4,5%). Juntos, esses dados indicam que entre os testes, o ELISA-rK28 teve a melhor capacidade de discriminar cães infectados (LVC) de controles (CE) e imunizados (VAC).

Figura 13 - Resposta de anticorpos antígeno-específica em soro de cães vacinados e não vacinados



Elaborado pela autora (2021)

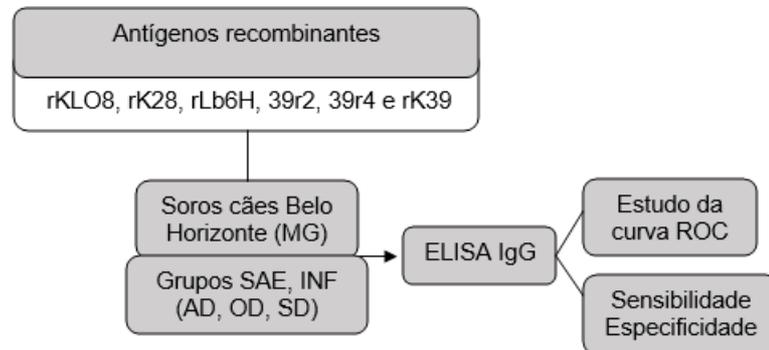
Níveis de anticorpos IgG contra rK28 (A), rKLO8 (B), rK39 (C) e rLb6H (D) no soro de cães controles endêmicos saudáveis (EC; n = 44), cães imunizados com Leish-Tec® (VAC; n = 44), e cães com LVC (CVL; n = 44) foram medidos por ELISA. O ponto de corte (linha tracejada) foi estabelecido pela curva ROC enquanto as barras horizontais representam a mediana da DO determinada pelo ELISA. Estatística Kruskal-Wallis com pós teste Dunns * = $p < 0,05$.

4.4 AVALIAÇÃO DA UTILIDADE DIAGNÓSTICA DOS ANTÍGENOS RECOMBINANTES rKLO8, rLb6H, 39r2, 39r4, COMPARADOS AOS ANTÍGENOS DE REFERÊNCIA rK28 e rK39 NA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA EM AMOSTRAS DE CÃES COM CONFIRMAÇÃO PARASITOLÓGICA DA INFECÇÃO POR *Leishmania*

Mesmo havendo um bom desempenho dos antígenos citados nos tópicos anteriores, a falta de confirmação parasitológica (padrão ouro para diagnóstico da LVC) na seleção das amostras para a construção da soroteca, pode afetar os valores de sensibilidade e especificidade dos ensaios de validação dos antígenos. Portanto, novos ensaios foram realizados, a fim de confirmar os dados obtidos anteriormente. Além disso, foram adicionados dois novos antígenos, o 39r2 e o 39r4, proteínas recombinantes com 2 ou 4 cópias da repetição de 39 aminoácidos, a fim de avaliar seus desempenhos em comparação com o rK39 (que possui 6,5 cópias dessa repetição).

Para a avaliação do desempenho diagnóstico dos antígenos recombinantes rKLO8, rLb6H, rK28, 39r2 e 39r4 e rK39 no diagnóstico da LVC, foi feita a pesquisa de anticorpos IgG em amostras de soros de cães naturalmente infectados com *Leishmania*, provenientes da cidade de Belo Horizonte, que foram gentilmente cedidas pelo professor Dr. Alexandre Reis, conforme o organograma abaixo. (Figura 14).

Figura 14 – Organograma dos ensaios para a avaliação do desempenho dos antígenos recombinantes rKLO8, rK28, rLb6H, 39r2, 39r4 e rK39 no diagnóstico da LVC



Elaborado pela autora (2021)

Delineamento experimental da avaliação do desempenho dos antígenos recombinantes rKLO8, rLB6H, 39r2, 39r4 comparados aos antígenos de referência rK28 e rK39 no diagnóstico da leishmaniose visceral canina utilizando amostras de soro com confirmação parasitológica da LVC (grupos INF: AD, OD, SD) ou do grupo não infectado (SAE). A reatividade de anticorpos IgG anti-rKLO8, rK28, rLb6H, 39r2, 39r4 e rK39 foi avaliada por ELISA. Os antígenos foram usados na concentração de 500ng/ml. Amostras de soro diluídas a 1:2000. Anticorpos anti-IgG: peroxidase foram adicionados a 1:5000.

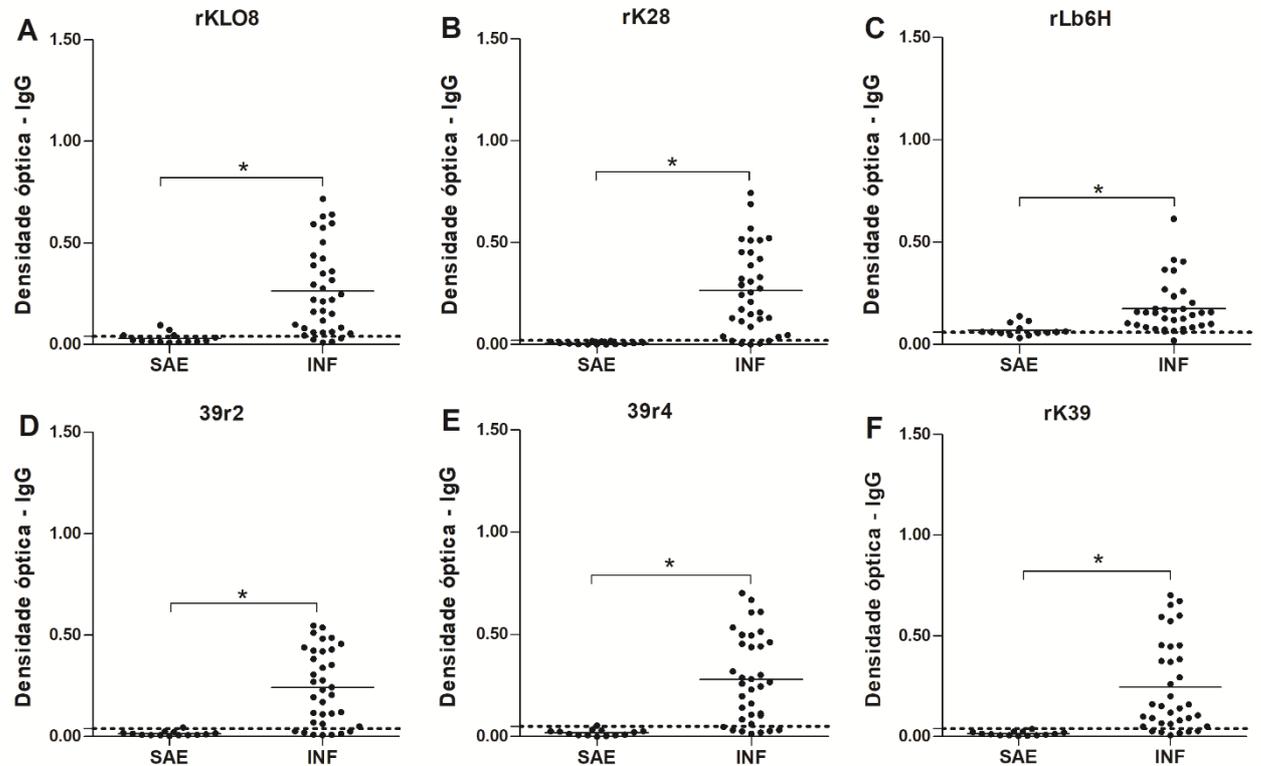
4.4.1 Todos os antígenos testados são reconhecidos por anticorpos IgG de cães infectados por *Leishmania*

Os resultados de reatividade dos anticorpos frente aos antígenos são expressos como densidade ótica (DO), e são consideradas amostras de soro positivas aquelas cujo valor da absorvância foram superiores ao ponto de corte (*cut-off*), o qual foi estabelecido através do software MedCalc, com base na curva ROC. A figura 15 mostra a distribuição das DO de anticorpos IgG em soros de cães não infectados (SAE) e infectados (INF) frente aos antígenos recombinantes com seus respectivos pontos de corte: 0,04 para rKLO8 (A), 0,02 para rK28 (B), 0,06 para rLb6H (C), 0,04 para 39r2 (D), 0,05 para 39r4 (E) e 0,04 para rK39 (F).

Pode-se observar que todos os antígenos foram capazes de diferenciar os grupos de cães infectados (INF) e não infectados (SAE) ($p < 0,05$). Além disso, é possível notar uma grande dispersão das DO, ao redor da mediana, no grupo infectado, com médias de absorvância similares entre todos os antígenos ($0,26 \pm 0,21$ para rKLO8 e rK28; $0,17 \pm 0,12$ para rLb6H; $0,24 \pm 0,18$ para 39r2; $0,27 \pm 0,21$ para 39r4; $0,24 \pm 0,22$ para rK39).

Levando em conta a não uniformidade das absorvâncias entre os indivíduos infectados, os dados foram separados de acordo com o perfil sintomático dos animais, respeitando os critérios definidos por Reis et al. (2006). Quando desmembrados nos grupos assintomáticos (AD), oligossintomáticos (OD) e sintomáticos (SD) (Figura 16), podemos notar que esses três grupos tiveram reatividades maiores que o grupo SAE ($p < 0,05$). Adicionalmente, o grupo SD apresentou maior reatividade que o grupo AD ($p < 0,05$) para os antígenos rKLO8, rK28, 39r2, 39r4 e rK39, enquanto o grupo SD teve reatividades maiores que OD ($p < 0,05$) para rKLO8, 39r2, 39r4 e rK39. Portanto, a reatividade de anticorpos IgG se relaciona com a intensidade da doença clínica. Diferente do observado para os demais antígenos, rLb6H (Figura 16C), não apresentou diferenças de reatividade de anticorpos IgG entre os grupos clínicos.

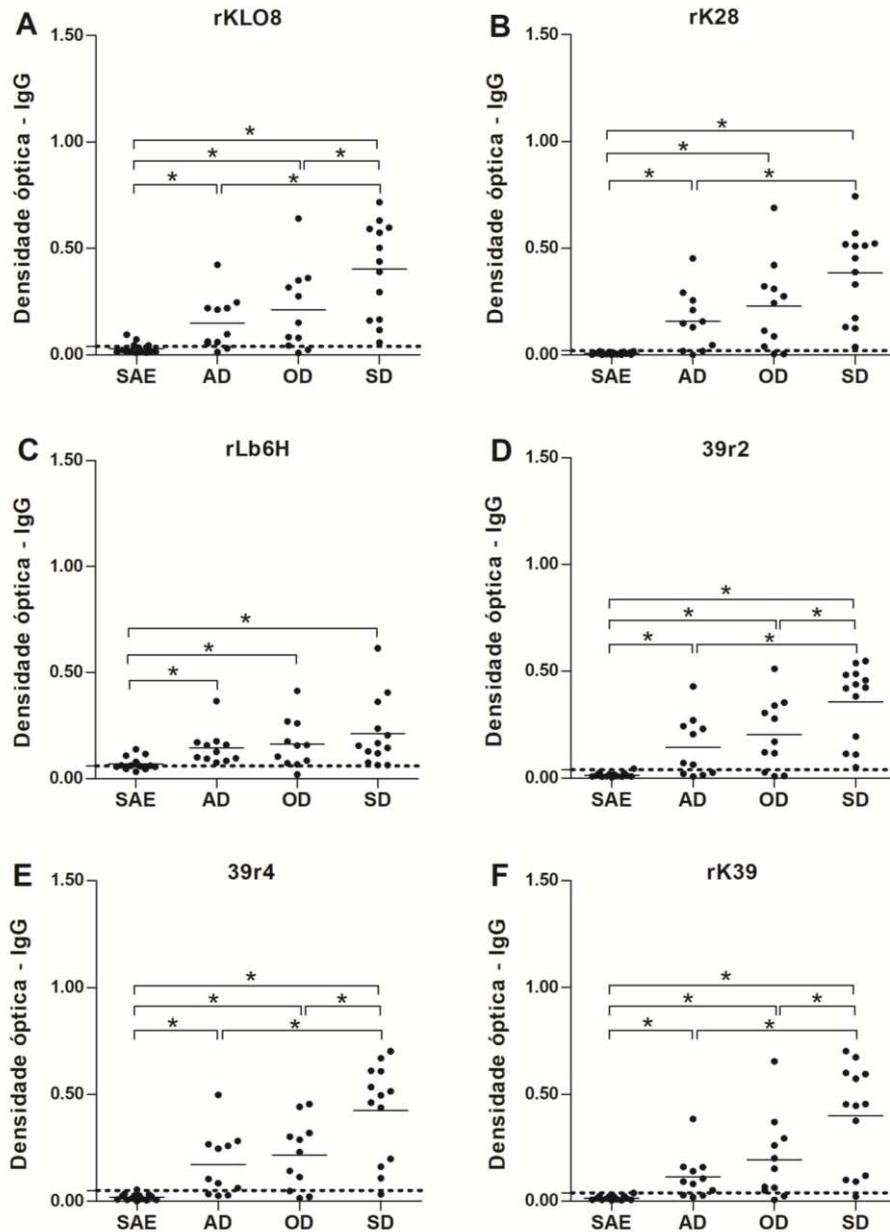
Figura 15 – Reatividade de anticorpos IgG frente aos antígenos rKLO8, rK28, rLb6H, 39r2, 39r4 e rK39 em cães infectados e não infectados com *Leishmania*



Fonte: Elaborado pela autora (2021)

Níveis séricos de anticorpos IgG anti-rK28 (A), rKLO8 (B), rLb6H (C), 39r2 (D), 39r4 (E) e rK39 (F) em soros de cães não infectados (SAE; n = 14) e infectados (INF; n = 35) com *Leishmania*. Ponto de corte (linhas tracejadas) estabelecido pela curva ROC sendo 0,04 para rKLO8, 39r2 e rK39, 0,02 para rK28, 0,06 para rLb6H e 0,05 para 39r4. Barras horizontais representam mediana das densidades ópticas determinadas pelo ELISA. Estatística: Teste *t de student* ou Mann-Whitney. * = $p < 0,05$.

Figura 16 – Reatividade de anticorpos IgG frente aos antígenos rKLO8, rK28, rLb6H, 39r2, 39r4 e rK39 em grupos clínicos de cães com LVC



Fonte: Elaborado pela autora (2021)

Níveis séricos de anticorpos IgG anti-rK28 (A), anti-rKLO8 (B), anti-rLb6H (C), anti-39r2 (D), anti-39r4 (E) e anti-rK39 (F) em soros de cães não infectados (SAE; n = 14), infectados assintomáticos (AD; n = 11), oligossintomáticos (OD; n = 11) e sintomáticos (SD; n = 13). Ponto de corte (barras tracejadas) estabelecido pela curva ROC sendo 0,04 para rKLO8, 39r2 e rK39, 0,02 para rK28, 0,06 para rLb6H e 0,05 para 39r4. Barras horizontais representam mediana das densidades ópticas determinadas pelo ELISA. Estatística: ANOVA seguido de Tukey ou Kruskal-Wallis seguido de Dunn * = $p < 0,05$.

Para melhor visualização do perfil de reatividade de cada grupo frente aos diversos antígenos, foi avaliada a quantidade (e porcentagem) de amostras reativas (DO superior ao valor do *cut-off*) em cada um dos grupos experimentais (tabela 3). Tendo em vista que o grupo SAE é composto por amostras oriundas de cães não infectados, a reatividade nesse grupo indica a quantidade de falsos positivos. Nesse sentido 57,14% das amostras (8/14) deste grupo foram reagentes ao rLb6H, 28,7% (4/14) ao rKLO8 e dentre os antígenos novos, 39r2 e 39r4 apresentaram o menor número de cães negativos reagentes, 7,14% (1/14). Para os antígenos de referência rK28 e rK39, nenhuma das amostras negativas foram reativas. Nota-se que entre os antígenos o aumento do número de repetições (*tandem repeats*) reduziu a detecção de cães do grupo controle (SAE) de 1/14 (7,14%) em 39r2 e 39r4 para 0/14 em rK39 (redução de falsos positivos).

Em geral, todos os antígenos tiveram boa performance na detecção de cães sintomáticos (SD) e reforçam os dados da literatura de que o grande desafio no controle da LVC é a detecção de cães assintomáticos e oligossintomáticos nos testes sorológicos. Neste sentido, nota-se que para o grupo OD, o antígeno rKLO8 apresentou performance semelhante aos antígenos rK28 e rK39 (9/11; 81,81%) e superior aos mesmos em relação ao grupo AD (9/11; 81,81% para rKLO8 e 8/11; 72,72% para rK28 e rK39). O aumento de repetições melhorou a detecção de cães assintomáticos (7/11; 63,63% para 39r2 e 8/11; 72,72% para 39r4 e rK39) e oligossintomáticos (8/11; 72,72% para 39r2 e 39r4 e 9/11; 81,81% para rK39).

Tabela 3 – Número e porcentagem de amostras positivas em cada grupo de soro de cães frente aos diferentes antígenos recombinantes

Grupos (n)	rKLO8	rK28	rLb6H	39r2	39r4	rK39
	Nº de animais reagentes (%)					
SAE (14)	4 (28,70)	0	8 (57,14)	1 (07,14)	1 (07,14)	0
AD (11)	9 (81,81)	8 (72,72)	11 (100,0)	7 (63,63)	8 (72,72)	8 (72,72)
OD (11)	9 (81,81)	9 (81,81)	10 (90,90)	8 (72,72)	8 (72,72)	9 (81,81)
SD (13)	13 (100,0)	13 (100,0)	13 (100,0)	13 (100,0)	12 (92,30)	12 (92,30)
INF (35)	31 (88,57)	30 (85,71)	34 (97,14)	28 (80,00)	28 (80,00)	29 (82,85)

Fonte: Elaborado pela autora (2021)

SAE: não infectado; AD: infectados assintomáticos; OD: infectados oligossintomáticos; SD: infectados sintomáticos; INF: total de animais infectados (AD + OD + SD).

Apesar da forte reatividade de cães do grupo SAE, o antígeno rLb6H apresentou a melhor performance dentre os cães infectados, totalizando 97,14% (34/35) de cães reagentes, sendo ainda as melhores taxas dentro dos grupos clínicos, ou seja, 100% (11/11) assintomáticos, 90,90% (10/11) oligossintomáticos e 100% (13/13) sintomáticos. Interessante observar que 27,27% dos cães AD e 18,18% dos cães OD não foram detectados pelo antígeno de referência rK28 e que nesses grupos, como já mencionado, houve uma ótima performance do antígeno rLb6H. Nesse sentido, buscamos avaliar, individualmente os cães não reagentes ao rK28 e como eles se comportam, simultaneamente, frente aos demais antígenos estudados.

4.4.2 A reatividade dos anticorpos IgG varia individualmente frente a cada antígeno

Com intuito de comparar o comportamento de cada amostra em relação a cada antígeno, foram identificadas as amostras reagentes (+) e não reagentes (-) entre os animais infectados, com confirmação parasitológica. Dessa forma foi possível evidenciar se a reatividade de um antígeno faz a cobertura da falta de reatividade de outros (tabela 4). Foram consideradas amostras reativas aquelas com DO superior aos *cut-offs* listados a seguir: 0,04 para rKLO8, 39r2 e rK39, 0,02 para rK28, 0,06 para rLb6H e 0,05 para 39r4. Os cães não reagentes (-) correspondem aqueles que tiveram densidades ópticas abaixo ou iguais ao *cut-off*.

Dentre o grupo SD, apenas o animal SD31 não foi detectado pelos antígenos 39r4 e rK39. Entretanto, no grupo AD se encontra o maior número de cães não detectados pelos antígenos, e é importante salientar que os animais AD1, AD2 e AD3, não foram detectados pelo antígeno de referência rK28, ao passo que AD2 foi detectado por rKLO8, rLb6H, 39r4 e rK39 (Tabela 4). Também é importante destacar que entre os antígenos 39r2, 39r4 e rK39 o aumento do número de repetições permitiu que os animais AD2 e OD13 fossem detectados. Além de haver concordância entre esses três antígenos em relação aos animais que não foram detectados. Analisando o comportamento de rLb6H, nota-se que três animais, sendo dois assintomáticos (AD1 e AD3) e um oligossintomático (OD12) somente foram detectados por esse antígeno, não reagindo a nenhum outro. E ainda, que o cão OD21 não foi detectado por nenhum dos seis antígenos.

Tabela 4 – Soropositividade IgG dos animais infectados frente aos diferentes antígenos testados

	Animais	rKLO8	rK28	rLb6H	39r2	39r4	rK39
Grupo AD	AD1	-	-	+	-	-	-
	AD2	+	-	+	-	+	+
	AD3	-	-	+	-	-	-
	AD4	+	+	+	+	+	+
	AD5	+	+	+	-	-	-
	AD6	+	+	+	+	+	+
	AD7	+	+	+	+	+	+
	AD8	+	+	+	+	+	+
	AD9	+	+	+	+	+	+
	AD10	+	+	+	+	+	+
	AD11	+	+	+	+	+	+
Grupo OD	OD12	-	-	+	-	-	-
	OD13	+	+	+	-	-	+
	OD14	+	+	+	+	+	+
	OD15	+	+	+	+	+	+
	OD16	+	+	+	+	+	+
	OD17	+	+	+	+	+	+
	OD18	+	+	+	+	+	+
	OD19	+	+	+	+	+	+
	OD20	+	+	+	+	+	+
	OD21	-	-	-	-	-	-
	OD22	+	+	+	+	+	+
Grupo SD	SD23	+	+	+	+	+	+
	SD24	+	+	+	+	+	+
	SD25	+	+	+	+	+	+
	SD26	+	+	+	+	+	+
	SD27	+	+	+	+	+	+
	SD28	+	+	+	+	+	+
	SD29	+	+	+	+	+	+
	SD30	+	+	+	+	+	+
	SD31	+	+	+	+	-	-
	SD32	+	+	+	+	+	+
	SD33	+	+	+	+	+	+
	SD34	+	+	+	+	+	+
	SD35	+	+	+	+	+	+

Fonte: Elaborado pela autora (2021)

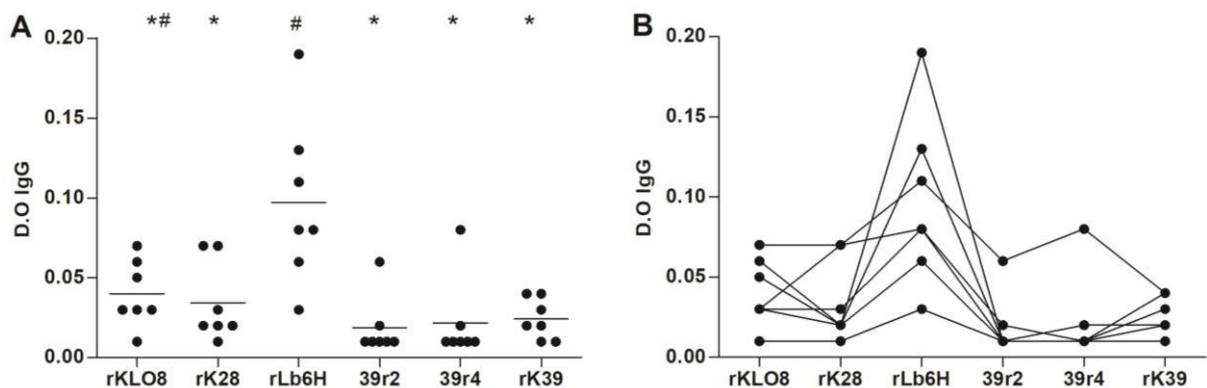
Soropositividade de IgG dos animais do grupo infectado, divididos em assintomáticos (AD), oligossintomáticos (OD) e sintomáticos (SD), a partir do ponto de corte (*cut-off*) estabelecido para cada antígeno (rKLO8, 39r2 e rK39: 0.04; rK28: 0.02; rLb6H: 0.06; 39r4: 0.05). Animais cuja densidade óptica foi maior que o ponto de corte foram considerados positivos (+) e aqueles cuja densidade óptica foi menor ou igual que o ponto de corte foram considerados negativos (-).

4.4.3 O antígeno rLb6H detecta cães assintomáticos não reagentes ao antígeno de referência rK28

Buscando comparar as reatividades entre os antígenos, eliminando o viés do uso de placas distintas e as diferenças nos tempos de revelação, avaliamos a reatividade simultânea de sete animais infectados por *Leishmania* (grupo INF) que apresentaram os menores valores de densidade óptica para rK28 sendo quatro animais do grupo AD (AD1, AD2, AD3, AD5), dois do grupo OD (OD12, OD21) e um do grupo SD (SD31). Essas amostras foram avaliadas nas mesmas condições de experimento (mesma placa e mesmo tempo de parada) (figura 17)

Pode-se observar diferença significativa entre os antígenos rKLO8 e 39r2, com maiores valores para o primeiro (Figura 17A). Dentre 39r2, 39r4 e rK39, o aumento do número de repetições não influenciou na reatividade IgG nesse grupo de cães. Houve uma reatividade IgG significativamente maior destes animais (< 0.05) para o antígeno rLb6H em comparação aos demais antígenos (Figura 17A).

Figura 17 – Reatividades simultâneas das sete amostras de animais infectados por *Leishmania* que apresentaram as menores absorvâncias IgG-rK28

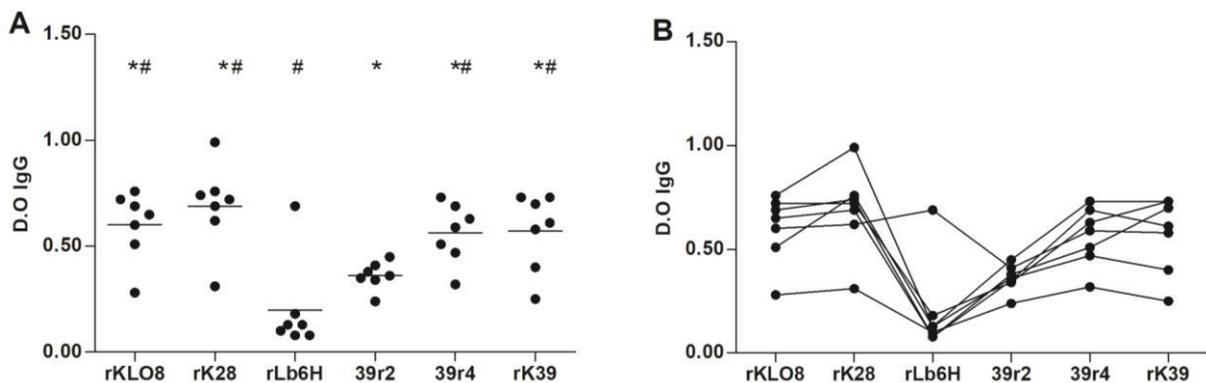


Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Dispersão das densidades ópticas dos sete animais do grupo infectado com os menores valores de densidade óptica IgG anti-rK28, testados simultaneamente, por ELISA para rKLO8, rK28, rLb6H, 39r2, 39r4 e rK39. Estatística: Teste *t de student* ou Mann-Whitney. * = $p < 0,05$. A: * = $p < 0,05$ em relação ao antígeno rLb6H; # = $p < 0,05$ em relação ao 39r2.

A fim de comparar as reatividades entre os animais com melhores reatividades para rK28, foi feita avaliação de sete amostras de cães infectados que, apresentaram os maiores valores de densidade óptica para o antígeno de referência, sendo seis animais do grupo SD (SD26, SD27, SD29, SD30, SD34, SD35) e um animal do grupo OD (OD19). Interessantemente, nota-se que as amostras mais reagentes ao rK28 são as que apresentam os menores valores de densidade óptica para rLb6H (com exceção de um animal, SD26). Também, observa-se que os antígenos rKLO8, rK28, 39r4 e rK39 apresentaram atividades semelhantes e foram superiores, estatisticamente, aos antígenos rLb6H e 39r2 ($p < 0,05$), embora este último também tenha apresentado atividade superior ($p < 0,05$) ao rLb6H. Também, foi possível notar que dentre os antígenos 39r2, 39r4 e rK39, o aumento de número de repetições aumentou estatisticamente a média de absorbância das amostras (Figura 18A).

Figura 18 – Reatividades simultâneas das sete amostras de animais infectados por *Leishmania* que apresentaram as maiores absorbâncias IgG-rK28



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Dispersão das densidades ópticas dos sete animais do grupo infectado com os maiores valores de densidade óptica IgG anti-rK28, testados simultaneamente, por ELISA para rKLO8, rK28, rLb6H, 39r2, 39r4 e rK39. Teste *t de student* ou Mann-Whitney. A: * = $p < 0,05$ em relação ao antígeno rLb6H. # = $p < 0,05$ em relação a 39r2.

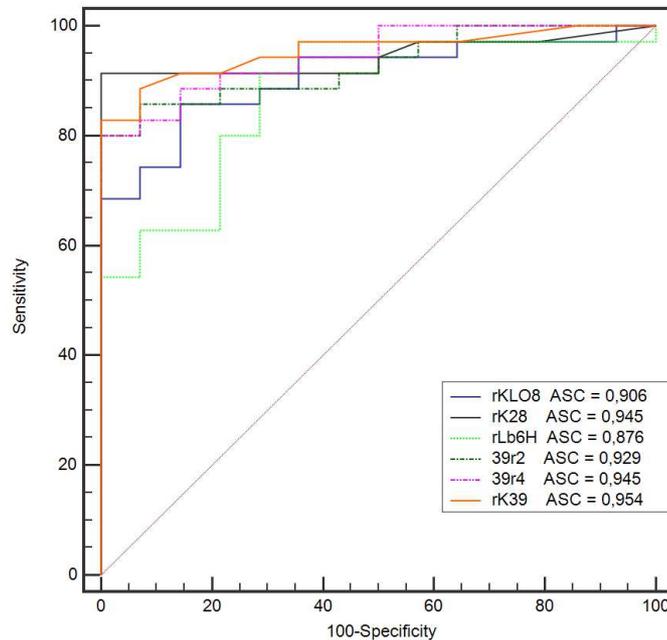
Em conjunto as avaliações das amostras mais reagente e menos reagentes para o antígeno de referência rK28, indicam que dentre os antígenos novos (rKLO8, rLb6H, 39r2 e 39r4), rLb6H apresenta melhor atividade dentre os animais positivos que permaneceram não detectados por rK28. Entretanto, dentre as amostras com maior reatividade a rK28, o antígeno rLb6H apresentou as menores absorbâncias.

4.4.4 Curvas ROC indicam elevada acurácia para todos os antígenos utilizados

Tendo em vista que as amostras de soro de cães usadas nesse estudo passaram por um critério externo de classificação conhecido como padrão ouro para o diagnóstico da LVC (demonstração do parasito em aspirados de tecidos) e que foram distintamente detectadas pelos antígenos em estudo, passamos a avaliar qual a proporção de cães corretamente detectados, através da análise da curva ROC. A curva ROC é uma representação gráfica que ilustra a acurácia global do ELISA empregando cada um dos antígenos rKLO8, rK28, rLb6H, 39r2, 39r4 e rK39 para o diagnóstico da LVC (Figura 19), representada pelos valores de área sob a curva (ASC), além de sensibilidade, especificidade nos diferentes pontos de corte (*cut-off*).

Representados pelos valores da área sob a curva (ASC), encontramos um desempenho excelente (acima de 0,9) para os ELISAs rKLO8 (0,906; 95% IC = 0,788 - 0,971), rK28 (0,945; 95% IC = 0,840 - 0,990), 39r2 (0,929; 95% IC = 0,818 - 0,982), 39r4 (0,945; 95% IC = 0,840 - 0,990) e rK39 (0,954; 95% IC = 0,853 - 0,993). O maior valor de ASC foi alcançado pelo antígeno rK39 e foi significativamente maior ($p < 0,05$) que a ASC de rLb6H (0,876; 95% IC = 0,750 - 0,952). Importante salientar que com exceção de rK39 e rLb6H ($p = 0,0492$), não houve diferença significativa entre as acurácias dos demais antígenos.

Figura 19 – Estudo e comparação das curvas ROC geradas a partir do ELISA antígeno específico



Fonte: Elaborado pela autora (2021)

A análise da curva ROC foi realizada, comparando as áreas sob a curva (ASC) para rKLO8 vs rK28 ($p = 0,2420$), rKLO8 vs rK39 ($p = 0,0743$), rKLO8 vs rLb6H ($p = 0,5710$), rKLO8 vs 39r2 ($p = 0,4324$), rKLO8 vs 39r4 ($p = 0,1972$), rK28 vs rK39 ($p = 0,7204$), rK28 vs rLb6H ($p = 0,1708$), rK28 vs 39r2 ($p = 0,4714$), rK28 vs 39r4 ($p = 1,0000$), rK39 vs rLb6H ($p = 0,0490$), rK39 vs 39r2 ($p = 0,3197$), rK39 vs 39r4 ($p = 0,6628$), rLb6H vs 39r2 ($p = 0,2741$), rLb6H vs 39r4 ($p = 0,0886$) e 39r2 vs 39r4 ($p = 0,4077$). Estatística: teste não paramétrico Wilcoxon. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Os valores de sensibilidade e especificidade de cada ELISA antígeno-específico também foram determinados através da curva ROC, bem como os pontos de corte (*cut-off*) de cada teste (Tabela 5).

O antígeno de referência, rK28, apresentou os maiores valores de sensibilidade e especificidade, em conjunto (91,43% e 100%, respectivamente). Dentre os antígenos novos, rLB6H e rKLO8 apresentaram os maiores valores de sensibilidade (91,43% e 85,71%, respectivamente), seguidos por 39r2 (80%), 39r4 (80% e rK39 (82,86%). Em relação a especificidade, o valor máximo (100%) foi atingido pelos antígenos rK28, 39r2, 39r4 e rK39, seguidos por rKLO8 (85,71%) e rLb6H (71,43%).

Tabela 5 – Sensibilidade e especificidade dos antígenos rKLO8, rK28, rLb6H, 39r2, 39r4 e rK39 no diagnóstico sorológico da LVC

Antígenos	Cut-off	Sensibilidade [95% IC]	Especificidade [95% IC]
rKLO8	0,04	85,71 [69,7 – 95,2]	85,71 [57,2 – 98,2]
rK28	0,02	91,43 [76,9 – 98,2]	100,0 [76,8 – 100,0]
rLb6H	0,06	91,43 [76,9 – 98,2]	71,43 [41,9 – 91,6]
39r2	0,04	80,00 [63,1 – 91,6]	100,0 [76,8 – 100,0]
39r4	0,05	80,00 [63,1 – 91,6]	100,00 [76,8 – 100,0]
rK39	0,04	82,86 [66,4 – 93,4]	100,00 [76,8 – 100,0]

Elaborado pela autora (2021)

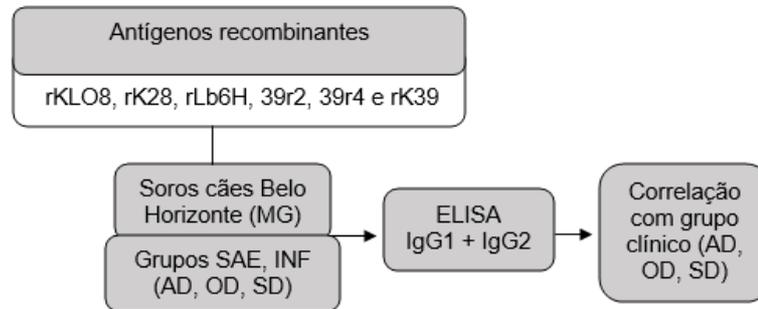
O *cut-off* (ponto de corte), sensibilidade e especificidade foram determinados com base na análise da curva ROC. Valores de sensibilidade e especificidade apresentados foram aqueles correspondentes ao ponto da curva ROC mais próximo de sensibilidade e especificidade igual a 100%. IC: intervalo de confiança.

4.5 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA DAS SUCLASSES DE ANTICORPOS IgG1 E IgG2 CONTRA OS ANTÍGENOS rKLO8, rK28, rLb6H, 39r2, 39r4 E rK39 E A SUA RELAÇÃO COM SINTOMAS CLÍNICOS EM AMOSTRAS DE CÃES COM CONFIRMAÇÃO PARASITOLÓGICA DA INFECÇÃO POR *Leishmania*

Sabe-se que a reatividade de anticorpos IgG em cães infectados por *Leishmania* se correlaciona com o status clínico do animal, onde se observa maior reatividade em cães sintomáticos em comparação a cães assintomáticos (NOGUEIRA et al., 2019). Entretanto, embora muitos estudos tentem correlacionar perfis de susceptibilidade e resistência com a reatividade de anticorpos IgG1 e IgG2, os resultados são conflitantes.

Uma vez que os estudos para avaliação da utilidade de subclasses de IgG como biomarcadores da LVC são conduzidos em condições diversas, com antígenos diferentes entre si, desde antígenos brutos a antígenos recombinantes de espécies e cepas diferentes de *Leishmania* (TEIXEIRA NETO et al., 2010; LIMA et al., 2017; CHAABOUNI et al., 2018), buscamos avaliar a reatividade de anticorpos IgG1 e IgG2 em soro de cães com LVC, frente aos antígenos rKLO8 de *L. donovani*, rK28, 39r2, 39r4 e rK39, de *L. donovani*, com sequências homólogas em *L. infantum* e ao rLb6H de *L. braziliensis*. A figura 20 ilustra o delineamento experimental para a avaliação da reatividade IgG1 e IgG2 entre os grupos clínicos de cães.

Figura 20 - Organograma do estudo da reatividade das subclasses IgG1 e IgG2 e sua relação com os sintomas clínicos da leishmaniose visceral canina



Elaborado pela autora (2021)

Delineamento experimental da avaliação da reatividade de subclasses de anticorpos IgG (IgG1 e IgG2) anti-rKLO8, rK28, rLB6H, 39r2, 39r4 e rK39 em soro de cães infectados por *Leishmania*, provenientes de Belo Horizonte. Cães com infecção por *Leishmania* confirmada foram categorizados em assintomáticos (AD), oligossintomáticos (OD) e sintomáticos (SD). Cães do grupo SAE (não infectados) foram utilizados como controle. Os antígenos foram usados na concentração de 500ng/ml. Amostras de soro diluídas a 1:2000. Anticorpos anti-dog IgG1: peroxidase e IgG2: peroxidase foram adicionados a 1:4000 e 1:2000, respectivamente.

4.5.1 As reatividades IgG e IgG2, para todos os antígenos estudados, se mantem elevadas em todos os grupos clínicos (AD, OD e SD), porém, IgG1 apresenta elevação significativa somente em cães sintomáticos

A reatividade de IgG e IgG2 em todos os animais infectados (grupos AD, OD e SD) foi significativamente maior ($p < 0,05$) em comparação ao grupo controle SAE para todos os antígenos estudados (Figura 21). Em relação aos anticorpos IgG1, somente o grupo SD apresentou reatividade superior à do grupo controle ($p < 0,05$) para os antígenos rK28 (Figura 21E), 39r2 (Figura 21K), 39r4 (Figura 21N) e rK39 (Figura 21Q).

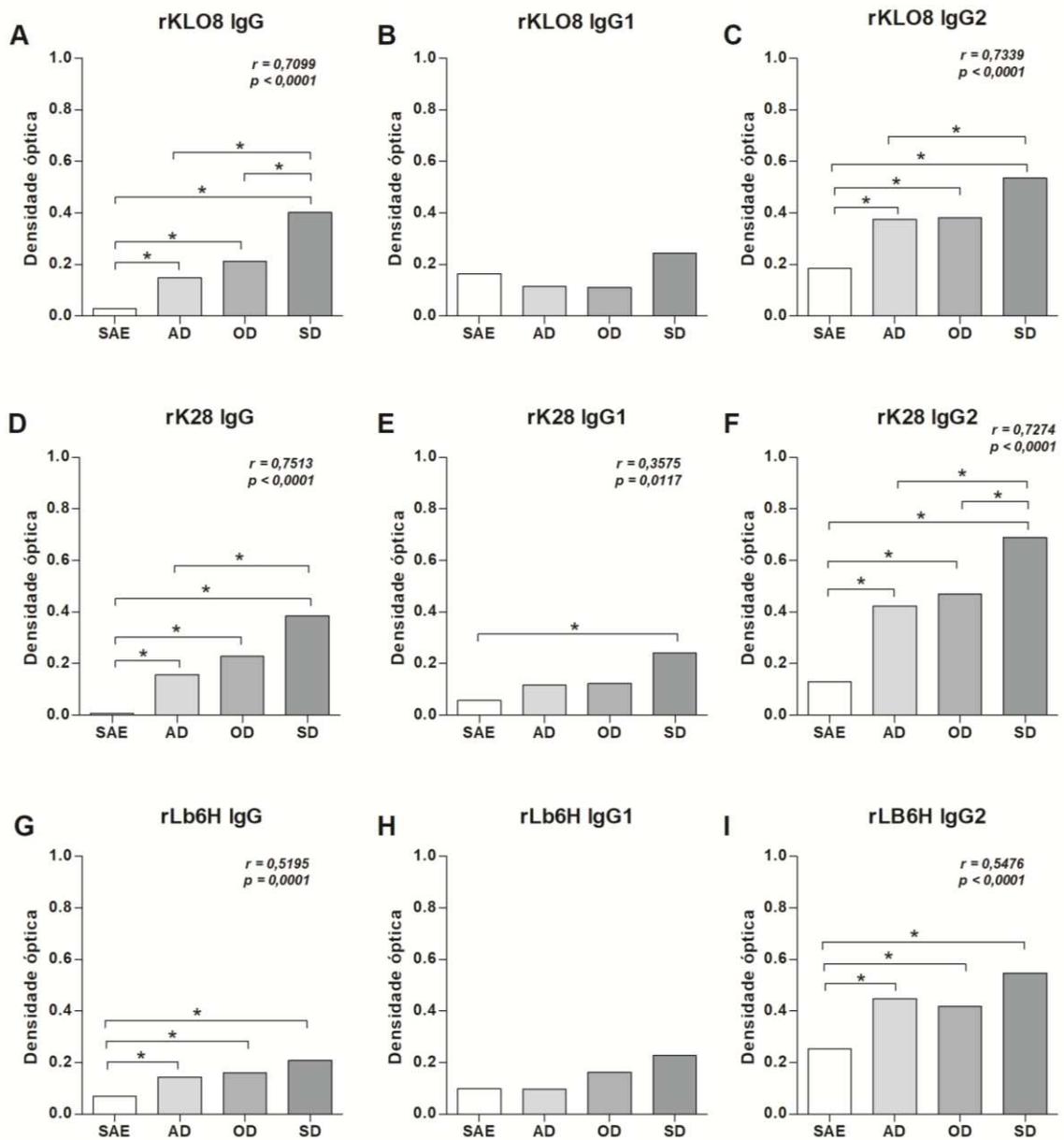
Ao avaliar as respostas de IgG2 entre os grupos infectados, nota-se que houve maior reatividade em cães do grupo SD em relação a AD ($p < 0,05$) para os antígenos rKLO8 (Figura 21C), rK28 (Figura 21F), 39r2 (Figura 21L), 39r4 (Figura 21O) e rK39 (Figura 21R), e de cães do grupo SD para OD para os antígenos rK28, 39r4 e

rK39. Enquanto, não houve diferença de reatividade de IgG2 entre os grupos OD e AD, para nenhum dos antígenos testados.

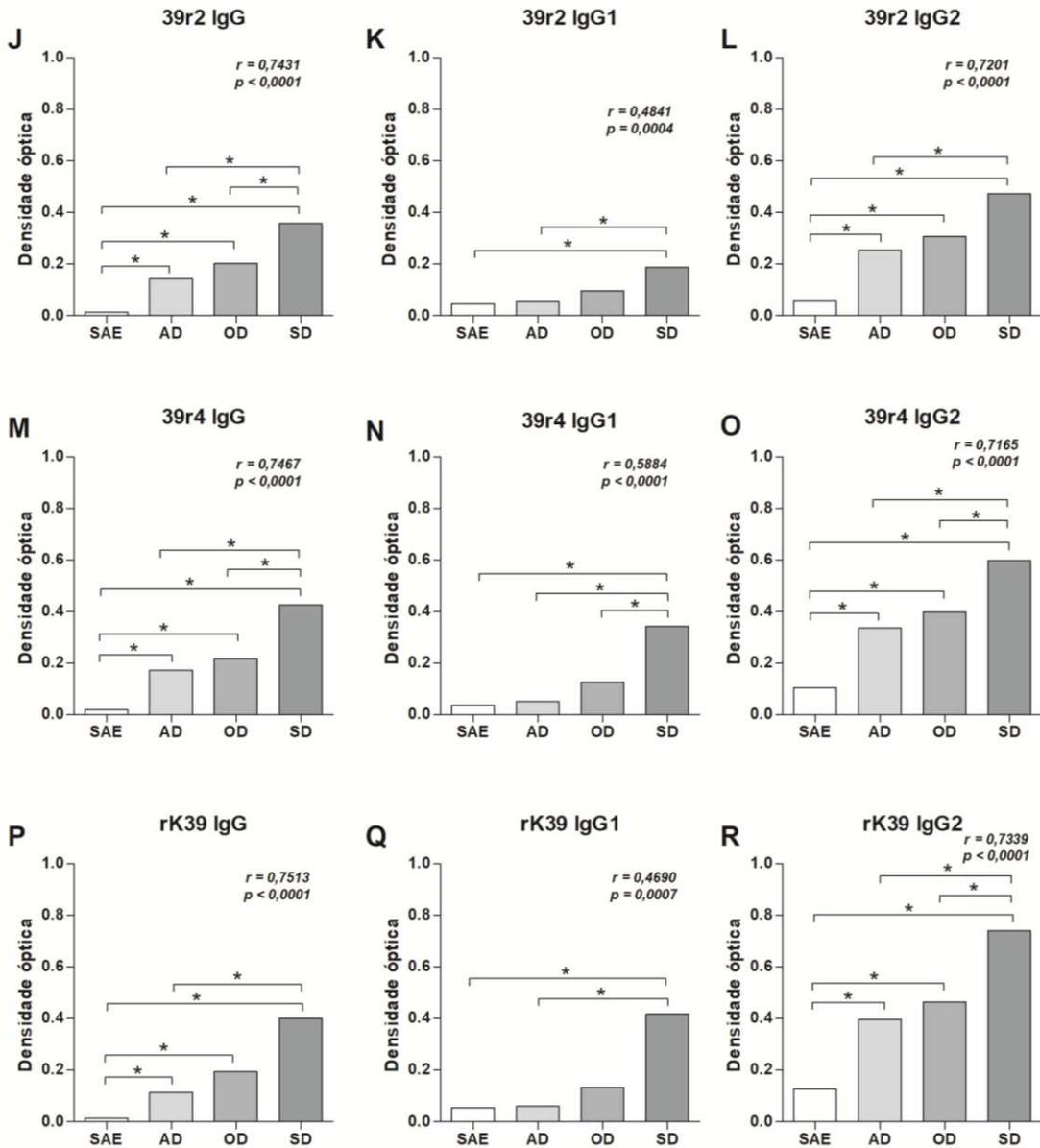
Em relação às reatividades de IgG1, são observados valores mais elevados para o grupo SD em relação a AD ($p < 0,05$) para os antígenos 39r2 (Figura 21K), 39r4 (Figura 21N) e rK39 (Figura 21Q). Ao passo que, somente para o antígeno 39r4 (Figura 21N), a reatividade IgG1 do grupo SD se mostrou superior ao do grupo OD ($p < 0,05$).

Tendo em vista as diferentes respostas sorológicas em relação ao status clínico, foi realizada a avaliação de correlação com as reatividades, e observou-se sua relação com IgG e IgG2 (valores de r de Spearman, figura 21) para todos os antígenos, e com a reatividade de IgG1 para os antígenos 39r2 (Figura 21K), 39r4 (Figura 21N), rK39 (Figura 21Q) e de forma baixa para rK28 (Figura 21E). Não houve correlação entre as reatividades IgG1 e status clínico para os antígenos rKLO8 (Figura 21B) e rLB6H (Figura 21H). Portanto, podemos notar que as reatividades IgG e IgG2 são elevadas em todos os grupos clínicos, porém, IgG1 apresenta elevação significativa somente em cães sintomáticos para os antígenos rK28, 39r2, 39r4 e rK39. Ainda, é possível perceber que esse perfil de reatividades se repete de forma uniforme para todos os antígenos que possuem domínios conservados entre as espécies de *L. infantum* e *L. donovani*, como no caso de rK28, 39r2, 39r4 e rK39. Portanto, podemos supor que a reatividade IgG1 se difere para os antígenos rKLO8 e rLB6H por não possuírem a mesma sequência entre as espécies *L. donovani* e *L. infantum*.

Figura 21 - Reatividades de anticorpos IgG, IgG1 e IgG2 antígeno-específicos e a relação com o status clínico na leishmaniose visceral canina



Continuação figura 21



Fonte: Elaborado pela autora (2021)

Reatividades de anticorpos IgG, IgG1 e IgG2 em cães infectados por *Leishmania*, de acordo com o status clínico como assintomáticos (AD), oligossintomáticos (OD) e sintomáticos (SD), representado pela média das densidades ópticas para cada grupo (barras). Cães não infectados foram usados como controle (grupo SAE). Estatística: ANOVA seguido de teste Tukey ou Kruskal-Wallis seguido de teste Dunn. * = $p < 0,05$. Correlações Spearman (r) também foram feitas para comparar reatividades de anticorpos com o status clínico e entre os anticorpos a $p < 0,05$.

A correlação entre as reatividades das imunoglobulinas IgG, IgG1 e IgG2 também foi avaliada (Tabela 6). Observa-se que para todos os antígenos houve forte correlação entre os níveis de IgG e IgG2 (valor de r acima de 0,9 para os antígenos rKLO8, rK28, 39r4 e rK39 e acima de 0,8 para os antígenos rLb6H e 39r2), demonstrando que IgG2 é importante componente da reatividade de IgG.

A correlação entre as reatividades de IgG e IgG1 apresentou os maiores valores para os antígenos 39r4 e rK39 ($r = 0,7754$ e $r = 0,6950$, respectivamente), embora tenha sido possível observar correlações positivas para todos os antígenos, ainda que em menores valores. Enquanto os menores valores de correlação, embora ainda significativos, foram observados para IgG1 e IgG2, com exceção dos antígenos 39r4 e rK39 que apresentaram valores de r elevados para essa correlação ($r = 0,7973$ e $0,6687$, respectivamente).

Tabela 6 - Índices de Correlações Spearman entre as reatividades dos anticorpos IgG, IgG1 e IgG2 anti-*Leishmania*

Antígeno	IgG x IgG1	IgG x IgG2	IgG1 x IgG2
rKLO8	$r = 0,4083$ $p = 0,0036$	$r = 0,9310$ $p < 0,0001$	$r = 0,3214$ $p = 0,0243$
rK28	$r = 0,5690$ $p < 0,0001$	$r = 0,9352$ $p < 0,0001$	$r = 0,5133$ $p = 0,0002$
rLb6H	$r = 0,3572$ $p = 0,0118$	$r = 0,8214$ $p < 0,0001$	$r = 0,2985$ $p = 0,0372$
39r2	$r = 0,5437$ $p < 0,0001$	$r = 0,8872$ $p < 0,0001$	$r = 0,5100$ $p = 0,0002$
39r4	$r = 0,7754$ $p < 0,0001$	$r = 0,9387$ $p < 0,0001$	$r = 0,7973$ $p < 0,0001$
rK39	$r = 0,6950$ $p < 0,0001$	$r = 0,9736$ $p < 0,0001$	$r = 0,6687$ $p < 0,0001$

Fonte: Elaborado pela autora (2021)

Correlações entre reatividades de anticorpos IgG, IgG1 e IgG2 anti-rKLO8, rK28, rLb6H, 39r2, 39r4 e rK39 em cães infectados por *Leishmania*. r = índice de correlação Spearman a $p < 0,05$.

5 DISCUSSÃO

No ano de 2015, a Organização Mundial da Saúde (OMS) classificou a leishmaniose visceral como uma doença tropical negligenciada (DTN) devido à baixa atenção voltada a doença, resultando em altas taxas de mortalidade e disseminação endêmica nas regiões mais pobres do mundo (KAIMING BI et al., 2018). O cão representa um importante elemento no ciclo de transmissão da leishmaniose visceral, portanto, a detecção da infecção nesses animais é parte fundamental no monitoramento da doença em regiões endêmicas e não endêmicas (DANTAS-TORRES et al., 2019; GIUNCHETTI et al., 2019).

O diagnóstico da LVC é complexo pois a acurácia dos métodos depende de diversos fatores incluindo o estágio da infecção, o tipo de resposta imune desenvolvida pelo cão, a técnica empregada e até a natureza do antígeno usado nos testes sorológicos (DE CARVALHO et al., 2018). Conhecer os fatores que influenciam esses métodos diagnósticos e buscar seu aprimoramento é de grande importância uma vez que, ao contrário do que acontece em países desenvolvidos, onde os cães infectados são submetidos a diferentes protocolos de tratamento que, embora não eliminem a infecção, causam melhora do quadro clínico, nos países em desenvolvimento, como o Brasil, a eutanásia recomendada de cães infectados gera conflitos sociais (TRAVI et al., 2018).

A tecnologia de produção de antígenos recombinantes, bem como a caracterização de sítios imunodominantes específicos, permitiram o desenvolvimento de uma segunda geração de ensaios ELISA, aumentando a sensibilidade e especificidade na detecção de anticorpos anti-*Leishmania*, tornando os testes mais consistentes, além de reduzir custo e tempo de produção (BADARÓ et al., 1996; ROSATI et al., 2003; PORROZZI et al., 2007; MARTINS et al., 2015; VENTURIN et al., 2015).

Um fator complicador na análise e validação dos antígenos candidatos ao aprimoramento do diagnóstico da LVC consiste na dificuldade da escolha de animais controle positivos, uma vez que há falhas no diagnóstico, independentemente do método, já que testes altamente específicos, como a demonstração do parasito ou a

técnica de PCR, podem não ser os mais sensíveis para todas as formas clínicas da LVC (TEIXEIRA et al., 2019).

Apesar da LV, no Brasil, estar associada a espécie *Leishmania infantum chagasi*, os antígenos utilizados no diagnóstico da LVC possuem origens variadas (promastigota ou amastigota de diferentes espécies de *Leishmania*) (SCHWANKE et al., 2014). Essa diversidade se justifica pelo fato de espécies de *Leishmania* apresentarem homologia genética que varia de 69 a 90% e devido a isso, antígenos heterólogos, ou seja, provenientes de espécies que não a causadora da doença na região, serem usados no diagnóstico da infecção e no desenvolvimento de vacinas (VALE et al., 2009).

No presente estudo anticorpos IgG presentes nas amostras de soro de cães infectados foram amplamente reagentes aos antígenos e tanto os antígenos novos (rKLO8, rLb6H, 39r2 e 39r4) quanto os usados como referência (rK28 e rK39) foram capazes de diferenciar cães infectados de cães controle não infectados. Nossos achados demonstraram valores satisfatórios de sensibilidade e especificidade para os antígenos rKLO8 e rLb6H (PEREIRA et al., 2020). Contudo, a menor sensibilidade dos antígenos de referência (rK28 e rK39) em relação aos valores encontrados na literatura (GHOSH et al., 2016; MAIA et al., 2012) reforça a necessidade da utilização de amostras confirmadas parasitologicamente para esses ensaios (FUJIMORI et al., 2021). Nesse sentido, observa-se que, o bloco de resultados, utilizando amostras com confirmação da infecção, refletem o melhor desempenho para os antígenos novos, testados previamente (rKLO8 e rLb6H), bem como para o antígeno de referência rK28. Entretanto, os valores de sensibilidade para rK39 apresentaram valores similares nos dois conjuntos experimentais (82% e 82,86%).

A elevada sensibilidade do antígeno rK28 encontrada nesse estudo (91,43% - confirmados parasitologicamente) está de acordo com a literatura que demonstra sensibilidade para este antígeno entre 91% e 100%, e sua importante aplicabilidade nos testes sorológicos baseados em ELISA para o diagnóstico da LVC (VENTURIN et al.; 2015; LAURICELLA et al.; 2016; FUJIMORI et al., 2021). Em contrapartida, o outro antígeno utilizado como referência, rK39, tem se mostrado sensível para detectar cães sintomáticos (sensibilidade de 93% a 100%) (BADARÓ et al., 1996; RHALEM et al.,

1999; ROSÁRIO et al., 2005), porém se mostra menos sensível para cães assintomáticos com infecção comprovada (sensibilidade de 52,9% a 64,7%) (RHALEM et al., 1999; PORROZZI et al., 2007), o que pode influenciar a sensibilidade geral do antígeno. Outro fator importante que pode interferir no desempenho de rK39 é a sensibilidade flutuante de acordo com a região estudada (REITHINGER et al., 2002; GOTO et al., 2009; LAURICELLA et al., 2016). Em conjunto, esses fatores explicam valores inferiores de sensibilidade em relação a outros estudos com esse antígeno (SCALONE et al., 2002; MAIA et al., 2012; FUJIMORI et al., 2021).

O presente estudo mostra pela primeira vez a comparação da sensibilidade da sequência de 39 aminoácidos duplicada (39r2), quadruplicada (39r4) e a sua versão original, rK39 (6,5 repetições). As proteínas de repetição têm sido encontradas no genoma de vários organismos, de vírus a seres humanos, e são caracterizados pela presença de duas ou mais cópias de uma sequência de aminoácidos (GOTO, COLER e REED, 2007). Essas proteínas imunodominantes são potentes antígenos de células B (WICKSTEAD, ERSFELD e GULL, 2003), e têm ganhado destaque no diagnóstico da leishmaniose, apresentando acurácia superior ao antígeno lisado de *L. infantum* (GOTO et al., 2006). Adicionalmente, Goto et al., 2010, avaliou o efeito do aumento do número de repetições sobre a acurácia dos antígenos, observando melhor desempenho para as proteínas maiores. Além disso, foi possível constatar a imunodominância do antígeno com maior número de cópias usando apenas 25% da concentração usual. De modo semelhante, nossos achados mostram que rK39 apresentou maior sensibilidade que suas variações menores (39r2 e 39r4), bem como maior avidéz na ligação antígeno-anticorpo e imunodominância (Apêndice B, figuras S4 e S7).

Ainda compondo o grupo de antígenos novos, foi avaliado o desempenho de rKLO8 no diagnóstico da LVC, tendo em vista sua atividade promissora na detecção da leishmaniose visceral em humanos, apresentando performance superior ao antígeno rK39 (ABASS et al., 2013). De modo semelhante, o presente estudo demonstra que rKLO8 foi mais sensível que rK39 (com confirmação parasitológica) também para o diagnóstico da LVC, com valores de 85,71% e 82,86%, respectivamente. Em estudo anterior, desenvolvido em nosso laboratório, mostramos que a combinação dos antígenos rKLO8 e rK26 aumenta a sensibilidade e a especificidade para a LVC (ABAD

et al., 2016). Também, Pereira et al. (2020) encontrou sensibilidade de 77,30% e especificidade de 100% para rKLO8 usado isoladamente no ELISA para diagnóstico da LVC. Em conjunto, esses resultados indicam a relevância desse antígeno, de 6,3 repetições, que apresenta sensibilidade próxima a proteína quimérica rK28 e superior ao antígeno de repetição rK39.

Outra abordagem possível para o diagnóstico da LV é a utilização de antígeno de espécies de *Leishmania* relacionadas, como o presente no teste ELISA confirmatório preconizado pelo Ministério da Saúde, compreendendo antígeno *L. major*-like. Nesse sentido, o antígeno recombinante derivado de *L. braziliensis*, rLb6H, já foi avaliado para o diagnóstico da LV em humanos, apresentando elevada sensibilidade (SATO et al., 2017). De modo semelhante, nossos dados demonstram que este antígeno também apresenta elevada sensibilidade em amostras de cães com confirmação parasitológica da infecção por *Leishmania* (91,43%).

A avaliação da especificidade também é parte fundamental na validação de testes diagnósticos. Nesse sentido, nossos dados demonstram que antígenos que apresentam sequências idênticas nas espécies *L. infantum* e *L. donovani* (rK28, 39r2, 39r4 e rK39) apresentaram especificidade máxima (100%) no ELISA sendo que apenas um animal saudável teve reatividade de anticorpos IgG contra 39r2 e 39r4. Sendo, ainda, importante salientar que o aumento do número de repetições elevou a especificidade de rK39 em relação a 39r2 e 39r4, excluindo o animal erroneamente detectado pelos últimos. Em contrapartida, os antígenos derivados de *L. donovani* e *L. braziliensis* (rKLO8 e rLb6H, respectivamente) apresentaram especificidades de 85,71% e 71,43%, reconhecendo quatro e oito animais saudáveis, respectivamente. Os elevados valores de especificidade alcançados por rK28 e rK39 estão de acordo com a literatura (GOTO et al., 2009; VENTURIN et al., 2015; LAURICELLA et al., 2016; FUJIMORI et al., 2021), e podem estar relacionados com o nível de homologia dos antígenos recombinantes usados no diagnóstico com a espécie envolvida nos casos de LVC na região estudada (*L. infantum*). O antígeno rK39 possui sequência de aminoácidos idêntica entre *L. donovani* e *L. infantum* (VENTURIN et al., 2015), da mesma forma que as sequências compreendidas no antígeno de fusão rK28 (rK39, rK26 e rK9) também são idênticas nas mesmas espécies (DANTAS-TORRES et al.,

2018). Enquanto rKLO8 é baseado em uma sequência de cinesina de *L. donovani* do Sudão que apresenta 93% de identidade com uma proteína cinesina de *L. infantum* (ABASS et al., 2013), a proteína rLb6H, de *L. braziliensis*, mostrou mais de 90% de identidade ao nível de aminoácidos com homólogos em *L. infantum* do Brasil (SATO et al., 2017).

Interessantemente, a homologia dos antígenos utilizados se reflete no padrão de reatividade observado, uma vez que, as amostras (com confirmação parasitológica) altamente reativas a rK28 apresentam baixa reatividade a rLb6H, enquanto os demais antígenos, com maior proximidade ao antígeno de referência supracitado, se comportam de maneira semelhante a este. Em contrapartida, as menores reatividades para rK28 podem ser detectadas por rLb6H, como demonstrado no painel de reatividades (página 72).

Por mais que os valores de acurácia (sensibilidade e especificidade) sejam um bom parâmetro para a validação de testes sorológicos, também é desejável que os antígenos utilizados apresentem baixa ou nenhuma reatividade com anticorpos gerados a partir da vacinação. Além disso, a vacinação em massa de cães representa uma ferramenta adicional para o controle da LVC (RIBEIRO et al., 2013), embora essa medida não seja adotada pelo Ministério da Saúde do Brasil devido a diversos fatores dentre eles a dificuldade em diferenciar resultados sorológicos positivos por vacinação e por infecção (MARCONDES e DAY 2019). Contudo, a vacina Leish-Tec® utiliza antígeno recombinante A2 de amastigota de *L. donovani* e a possibilidade de reatividade a antígenos de promastigotas ainda é controversa (TESTASICCA et al., 2014), embora animais vacinados possam apresentar elevados níveis de anticorpos IgG2 anti-A2 por breves períodos após a vacinação (FERNANDES et al., 2008). Nesse sentido, avaliamos a reatividade de cães vacinados com Leish-Tec®, frente aos antígenos rKLO8, rK28, rLb6H e rK39.

Nossos resultados mostram que para todos os antígenos houve reatividade (valores de DO acima do ponto de corte) com soro de cães vacinados, mesmo não havendo diferença estatística entre os grupos (PEREIRA et al. 2020). Entretanto, a quantidade de animais vacinados com anticorpos detectáveis foi variável para cada antígeno. Enquanto 25% das amostras foram reativas a rLb6H, 13% reagiram a rKLO8

e rK39, e 4,5% dos animais foram reagentes ao antígeno de referência, presente no teste DPP®, rK28.

Em contraposição aos resultados encontrados em nosso estudo, Testasicca et al. (2014) observou apenas uma soropositividade ao acompanhar, por 14 meses, cães vacinados com a Leish-Tec®, empregando os testes oficiais adotados pelo Ministério da Saúde para o diagnóstico da LVC (ELISA *L.major*-like e DPP®). Por outro lado, Fernandes et al. (2014) observou 30,9% de soroconversão de cães vacinados 11 meses após a primeira dose da vacina, ao testá-los com antígeno bruto de *L. infantum*. Importante considerar que no nosso estudo, não foram incluídos cães recebendo a primeira vacinação com Leish-Tec® e a coleta de amostras se deu no momento da avaliação sorológica, previamente ao reforço anual da vacina. Assim, não podemos supor que a reatividade de anticorpos nesses animais se deva a soroconversão transitória por vacinação recente. Além disso, cães vacinados, incluídos nesse estudo, embora testados anualmente para infecção por *Leishmania*, são sujeitos a ocorrência da infecção natural. Sendo assim, a presença de anticorpos anti-*Leishmania* nesses cães pode ser em decorrência de infecção prévia ou posterior à vacinação.

Outra importante observação neste estudo foi a ampla dispersão das densidades ópticas ao redor da mediana em cada um dos ELISA antígeno-específicos. Essa variabilidade pode estar relacionada a diversidade das respostas imunes de cada cão, diferenças na carga parasitária ou na fase da doença, cada uma das quais é conhecida por influenciar o diagnóstico de LVC (VALE et al., 2009; PEIXOTO et al., 2015). Por isso, a categorização de animais de acordo com as manifestações clínicas pode ser útil para o entendimento dos processos imunopatológicos da LVC (TEIXEIRA NETO et al., 2010) e como esses processos podem influenciar na sensibilidade dos antígenos. No presente estudo, os cães infectados foram divididos em assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos, de acordo com a classificação clínica sugerida por Mancianti et al. (1988) para a LVC (REIS et al., 2006).

Nossos resultados mostram que a reatividade de anticorpos IgG em todos grupos clínicos estudados (AD, OD, SD) foi maior em relação ao grupo controle, independente da origem do antígeno. Além disso, todos os antígenos apresentaram elevada capacidade de detecção de cães do grupo sintomático (92,30% a 100%). A

exuberante gamaglobulinemia apresentada pelos animais sintomáticos é relatada em diversos estudos empregando ELISA com as mais variadas preparações antigênicas com elevada sensibilidade para essa manifestação da doença (DA COSTA-VAL et al., 2007; PORROZZI et al., 2007; CÂNDIDO et al., 2008; COURA-VITAL et al., 2011; LEAL et al., 2014). Esses dados corroboram estudos que mostram elevada sensibilidade de rK28 e rK39 na detecção de cães sintomáticos (BADARÓ et al., 1996; PORROZZI et al., 2007; SANTARÉM et al., 2010; DANTAS-TORRES et al., 2018). O presente estudo é o primeiro a descrever a eficácia dos antígenos rKLO8, rLb6H, 39r2 e 39r4 em detectar cães com LVC sintomática.

Embora um número similar de cães oligossintomáticos tenha sido detectado pelos diferentes antígenos, um maior número de cães assintomáticos foi detectado por antígenos provenientes de *L. braziliensis* e *L. donovani* (rLb6H e rKLO8, respectivamente). De fato, estudo de Vale et al. (2009) mostra forte reatividade de anticorpos IgG de cães infectados com *L. infantum*, assintomáticos e sintomáticos, à antígenos heterólogos provenientes do complexo *L. braziliensis*. Mendes et al. (2017) também demonstrou a utilidade do antígeno Bi-epítipo derivado da proteína A2, expressa em *L. donovani*, na detecção de cães infectados por *L. infantum* no Brasil.

Assim como foi observado nos estudos de Reis et al. (2006), Teixeira Neto et al. (2010) e Chaabouni et al. (2018), foi possível notar que os níveis de IgG se correlacionam ($p < 0,0001$) com o status clínico, sendo menores para o grupo AD e maiores para o grupo SD. A exceção foi observada no antígeno rLB6H para o qual a reatividade se mantém em níveis similares entre os diferentes grupos clínicos. Assim, diferente dos demais antígenos, a reatividade a este parece não ser influenciada pela forma clínica da doença.

Tendo em vista esse perfil de reatividade distinto de rLb6H, este antígeno se destaca como o mais eficaz na detecção de cães assintomáticos (100%) e oligossintomáticos (90,90%), grupos onde há maior dificuldade de detecção por métodos sorológicos. A elevada reatividade de anticorpos IgG anti-rLb6H em cães assintomáticos levanta importantes discussões. Muitos autores sugerem que o status assintomático compreende a fase inicial da LVC, antes da soroconversão e que os métodos sorológicos durante essa fase são menos sensíveis (REIS et al., 2006;

COURA-VITAL et al., 2011; GIUNCHETTI et al., 2019). Sendo assim, os resultados do presente trabalho demonstram uma importante aplicabilidade de rLb6H, por ser amplamente reconhecido por anticorpos IgG dos cães infectados, independente da forma clínica.

Outros fatores a se considerar em relação à importância de rLb6H para o diagnóstico de LVC são a distribuição geográfica da *Leishmania braziliensis*, principal espécie causadora de leishmaniose cutânea na América Latina (STEVEDING, 2017) e o fato de que, assim como humanos, os cães também podem ser co-infectados por *L. infantum* e *L. braziliensis* (SILVA et al., 2011), o que poderia causar reações cruzadas em testes sorológicos em regiões onde há sobreposição de endemicidades (MADEIRA et al., 2005), condição em que se enquadra a Região Metropolitana de Belo Horizonte (Minas Gerais), região de origem dos animais aqui avaliados (PASSOS et al., 2001; MADEIRA et al., 2006; DANTAS-TORRES et al., 2010; MARCONDES et al., 2011).

Interessante notar que o antígeno rKLO8 apresentou atividade bastante similar aos antígenos de referência, rK28 e rK39, no grupo OD (81,81% de sensibilidade para os três antígenos), superior a esses para o grupo AD (81,81% e 72,72%, respectivamente) e superior a rK39 no grupo SD (100% e 92,30%, respectivamente). Além disso, foi possível observar que o aumento de número de repetições aumentou a sensibilidade dos antígenos tanto para o grupo AD quanto para OD (grupo AD: 63,63% para 39r2 e 72,72% para 39r4 e rK39; grupo OD: 72,72% para 39r2 e 39r4 e 81,81% para rK39).

Importante notar, que cada antígeno recombinante usado no estudo foi capaz de detectar alguns animais positivos que não foram detectados por outros. Essas diferenças entre o reconhecimento de soros assintomáticos e sintomáticos pelos diferentes antígenos sugerem que a *Leishmania* pode expressar proteínas diferentes à medida que a doença progride e isso pode refletir uma alteração na seleção do repertório clonal de plasmócitos específicos (VALE et al., 2009). Porrozzi et al (2007), em seu trabalho que compara a aplicação de três diferentes antígenos (rK26 e rK39 de *L. infantum* e rA2 de *L. donovani*) no ELISA para diagnóstico da LVC, conclui que antígenos recombinantes devam ser usados em paralelo para obtenção de sensibilidades máximas dos testes diagnósticos.

A possibilidade da LVC apresentar diversas forma clínicas está relacionada diretamente com interação entre o parasito e o sistema imune do hospedeiro. (REIS et al., 2010). Muitos estudos tentam correlacionar os níveis de anticorpos IgG e suas subclasses IgG1 e IgG2 com perfis de susceptibilidade e resistência a LVC no sentido de melhor compreensão dos mecanismos imunopatológicos envolvidos (MARCONDES e DAY, 2019). Alguns estudos apontam relação entre os níveis de IgG1 e a doença sintomática, enquanto IgG2 se relaciona com a forma assintomática (QUINELL et al., 2003; LIMA et al., 2017). Por outro lado, Reis et al. (2006) e Teixeira Neto et al. (2010) relatam níveis de IgG1 em cães assintomáticos maiores que em cães sintomáticos. Esses resultados demonstram que ainda são necessários maiores conhecimentos a respeito da participação das subclasses IgG1 e IgG2 nas diferentes formas clinicas da LVC, assim como os eixos Th1/Th2 envolvidos (REIS et al., 2009).

Comparando as reatividades de anticorpos IgG, IgG1 e IgG2 em cães AD, OD e SD, nota-se, para todos os antígenos, elevados níveis de IgG e IgG2 em todas as formas clinicas da LVC, quando comparadas ao grupo controle, com forte correlação entre o status clínico e os níveis dessas imunoglobulinas. Entretanto, os níveis de IgG1 somente se elevam nos animais SD e mais especificamente, somente para os antígenos com sequências idênticas em *L. infantum* (rK28, 39r2, 39r4 e rK39) espécie causadora de LVC no Brasil.

Portanto, o presente estudo demonstra que a associação de IgG1 e IgG2 com perfis de resistência e susceptibilidade pode ser influenciado pelo antígeno empregado. Assim como demonstrado por Chaabouni et al. (2018), o presente trabalho reforça que IgG e IgG2 são produzidos em elevadas quantidades por cães infectados, independente da forma clínica da doença, desde assintomático a sintomático. Ainda, o antígeno derivado de *L. braziliensis*, rLb6H, falhou em demonstrar diferenças nos níveis de IgG, IgG1 e IgG2 entre os grupos clínicos.

Em conjunto, esses dados demonstram diferentes estratégias para a realização do diagnóstico sorológico da LVC, como a utilização de antígenos de repetição (39r2, 39r4 e rK39) e antígenos de espécies heterólogas (rKLO8 e rLb6H). Além disso, as diferentes performances desses antígenos, ressaltam a necessidade da utilização conjunta dessas estratégias de modo a otimizar o diagnóstico da LVC.

6 CONCLUSÃO

É possível concluir que os novos antígenos testados (rKLO8, rLB6H, 39r2 e 39r4) apresentam características importantes para o diagnóstico da LVC, quer seja na detecção de animais os quais não reagem aos antígenos de referência, como também, apresentando elevada eficácia, comparável aos antígenos de referência, mesmo não sendo proteínas de fusão. Além disso, a utilização dos antígenos propostos, permitiu o aprimoramento da detecção da LVC nos grupos de maior dificuldade diagnóstica. Por mais que novas estratégias de validação desses antígenos sejam necessárias, nossos resultados contribuem para o entendimento do seu potencial diagnóstico.

Por fim, pode-se concluir que, inicialmente, o antígeno rLb6H não se mostra adequado para fazer a discriminação entre cães infectados e não infectados, entretanto, pode ser muito bem utilizado para a identificação de animais assintomáticos que não tenham sido detectados previamente por antígenos de uso padrão no diagnóstico da LVC. Assim, supomos que o uso combinado de diferentes antígenos, com complementariedade sorodiagnostics, seja promissor e merece atenção para estudos futuros.

REFERÊNCIAS

- ABAD, L. P. M.; ALMEIDA, C. S.; MATTOS, A. M. M.; MENDONÇA, A. C. P.; MÁRCIO, M. J. M.; PINHEIRO, A. C.; PORROZZI, R.; ABASS, E.; STEINHOFF, U.; TEIXEIRA, H. C. Diagnostic accuracy of rKLO8 versus rK26 ELISAs for screening of canine visceral leishmaniasis. **Acta tropica**, [s.l.], v. 166, p. 133-8, nov.2016.
- ABASS, E.; BOLLING, N.; REINHARD, K.; CAMARA, B.; MANSOUR, D.; VISEKRUNA, A.; LOHOFF, M.; STEINHOFF, U. rKLO8, a Novel *Leishmania donovani* - Derived Recombinant Immunodominant Protein for Sensitive Detection of Visceral Leishmaniasis in Sudan. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [s.l.], v. 7, n. 7, jul.2013.
- AKHOUNDI, M.; KUHLS, K.; CANNET, A.; VOTÝPKA, J.; MARTY, P.; DELAUNAY, P.; SERENO, D. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [s.l.], v. 10, n. 3, p. 1–40, mar.2016.
- ALEMAYEHU, B.; ALEMAYEHU, M. Leishmaniasis : A Review on Parasite , Vector and Reservoir Host. **Health Science Journal**, [s.l.], v. 11, n. 4: 519, ago.2017.
- ALVAR, J.; CAÑAVATE, C.; MOLINA, R.; MORENO, J.; NIETO, J. Canine leishmaniasis. **Advances in Parasitology**, [s.l.], v. 57, n. 04, 2004.
- BADARÓ, R.; BENSON, D.; EULÁLIO, M. C.; FREIRE, M.; CUNHA, S.; NETTO, E. M.; PEDRAL-SAMPAIO, D.; MADURCIRA, C.; BURNS, J. M.; HOUGHTON, R. L.; DAVID, J. R.; REED, S. G. rK39: A cloned antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral leishmaniasis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 173, n. 3, p. 758–761, mar.1996.
- BARATA, R. A.; PEIXOTO, J. C.; TANURE, A.; GOMES, M. E.; APOLINÁRIO, E. C.; BODEVAN, E. C.; DE ARAÚJO, H. S.; DIAS, E. S. PINHEIRO, A. C. Epidemiology of Visceral Leishmaniasis in a Reemerging Focus of Intense Transmission in Minas Gerais State, Brazil. **BioMed Research International**, [s.l.], v. 2013, p. 1–6, jul.2013.
- BARBIÉRI, C. L. Immunology of canine leishmaniasis. **Parasite Immunology**, [s.l.], v. 28, n. 7, p. 329–337, ago.2006.
- BATES, P. A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International Journal for Parasitology**, [s.l.], v. 37, n. 10, p. 1097–1106, abr.2007.
- BATES, P. A. Revising *Leishmania*'s life cycle. **Nature Microbiology**, [s.l.], v. 3, n. 5, p. 529–30, abr.2018.

BEATTIE, L.; KAYE, P. M. Leishmania-host interactions: What has imaging taught us? **Cellular Microbiology**, [s.l.], v. 13, n. 11, p. 1659–1667, ago.2011.

BHATIA, A.; DAIFALLA, N. S.; JEN, S.; BADARÓ, R.; REED, S. G.; SKEIKYY, A. W. Cloning, characterization and serological evaluation of K9 and K26: Two related hydrophilic antigens of *Leishmania chagasi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, [s.l.], v. 102, n. 2, p. 249–261, mai.1999.

BOURDOISEAU, G.; BONNEFONT, C.; HOAREAU, E.; BOEHRINGER, C.; STOLLE, T.; CHABANNE, L. Specific IgG1 and IgG2 antibody and lymphocyte subset levels in naturally *Leishmania infantum*-infected treated and untreated dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, [s.l.], v. 59, p. 21–30, mai.1997.

BRASIL. Ministério da Saúde (MS). **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. 1.ed., Brasília, DF, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde (MS). **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**., 1.ed., Brasília, DF, 2006.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde. **Boletim Epidemiológico, Doenças tropicais negligenciadas**. Brasília, DF, Mar.2021.

BRASIL. **Portaria Interministerial nº 1.426, de 11 de julho de 2008**. Proíbe o tratamento de leishmaniose visceral canina com produtos de uso humano ou não registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2008/pri1426_11_07_2008.html. Acesso em 24 out.2021.

BRASIL. **Guia de Vigilância em Saúde**. - 1. ed. Brasília, DF, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Nota Técnica conjunta nº 11/2016/CPV/DFIP/DAS/GM/MAPA**. Autoriza o registro do produto MILTEFORAN, sob número SP 000175-9.000003, de propriedade da empresa VIRBAC SAÚDE ANIMAL, indicado para o tratamento da leishmaniose visceral de cães. Brasília, DF, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Nota Técnica nº 01/2011 – 9 CGDT/CGLAB/DEVIT/SVS/MS**. Esclarece sobre substituição do protocolo diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC). Brasília, DF, dez.2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Fiscalização de Insumos Pecuários. **Nota Técnica 0.38/2014/DFIP/SDA**. Suspende a Licença de Fabricação e Comercialização do Produto Leishmune - Vacina Contra Leishmaniose Visceral Canina. Brasília, DF, nov. 2014.

BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. **The Lancet**, [s.l.], v. 392, p. 951-970, ago.2018.

CÂNDIDO, T. C.; PERRI, S. H. V.; GERZOSCHKWITZ, T. O.; LUVIZOTTO, M. C. R.; LIMA, V. M. F. Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay based on crude and purified antigen in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in symptomatic and oligosymptomatic dogs. **Veterinary Parasitology**, [s.l.], v. 157, p. 175 – 181, ago.2008.

CARRILLO, E.; MORENO, J. Cytokine profiles in canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, [s.l.], v. 128, n. 1–3, p. 67–70, mar.2009.

CHAABOUNI, A.; ELANDOULSI, R. B.; MHADHABI, M.; GHARBI, M.; SASSI, A. Comparative analysis of the *Leishmania infantum*-specific antibody repertoires and the autoantibody repertoires between asymptomatic and diseased dogs. **Veterinary Parasitology**, [s.l.], v. 261, p. 9 - 17, set.2018.

CLABORN, D. M. The biology and control of leishmaniasis vectors. **Journal of Global Infectious Diseases**, [s.l.], v. 2, n. 2, p. 127-134, abr.2010.

COIMBRA, E. S.; CASTRO-JÚNIOR, J. G.; SCOPEL, K. K. G.; FREIRE, M. L.; CAMPOS, S. P. S.; NOCELI, S.; SILVA, E. DA; PORROZZI, R.; MARQUES, M. J.; COLOMBO, F.; SILVEIRA, R. C. V.; SILVA, M. R.; MITTEROFHE, A.; LIMA, A. C.; CAMPOS, G. M. M.; PINHEIRO, I. O.; CASTRO, M. F.; GONÇALVES, M.; GUIMARÃES, R. J. P. S.; FILHO, J. D. A.; SILVA, A. D.; DE CARVALHO, G. S. G.; ALMEIDA, A. C.; PAULA, D. S. T.; MACHADO, P. A. Investigação epidemiológica do calazar canino e de flebotomíneos no município de Juiz de Fora (MG) e prospecção de moléculas com potencial atividade leishmanicida. Gerais: **Revista de Saúde Pública do SUS/MG**, [s.l.], v. 1, n. 1, p. 55–56, 2013.

COURA-VITAL, W.; KER, H. G.; ROATT, B. M.; AGUIAR-SOARES, R. D. O.; LEAL, G. G. A.; MOREIRA, N. D.; OLIVEIRA, L. A. M.; MACHADO, E. M. M.; MORAIS, M. H. F.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; CARNEIRO, M.; REIS, A. B. Evaluation of change in canine diagnosis protocol adopted by the visceral leishmaniasis control program in Brazil and a new proposal for diagnosis. **PLoS ONE**, [s.l.], v. 9, n. 3, p. 1–6, mar.2014.

COURA-VITAL, W.; MARQUES, M. J.; VELOSO, V. M.; ROATT, B. M.; AGUIAR-SOARES, R. D. O.; REIS, L. E. S.; BRAGA, S. L.; MORAIS, M. H. F.; REIS, A. B.; CARNEIRO, M. Prevalence and Factors Associated with *Leishmania infantum* Infection of Dogs from an Urban Area of Brazil as Identified by Molecular Methods. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [s.l.], v.5, n. 8, ago.2011.

COUTINHO, M. T. Z.; BUENO, L. L.; STERZIK, A.; FUJIWARA, R. T.; BOTELHO, J. R.; MARIA, M. DE; GENARO, O.; LINARDI, P. M. Participation of Rhipicephalus sanguineus (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, [s.l.], v. 128, n. 1–2, p. 149–155, mar.2005.

CUNHA, M. A.; CELESTE, B. J.; KESPER, N.; FUMIJORI, M.; LAGO, M. M.; IBANES, A. S.; OUKI, L. M.; NETO, E. A. S.; FONSECA, F. F.; SILVA, M. A. L.; JÚNIOR, W. L.; LINDOSO, J. A. L. Frequency of *Leishmania* spp. Infection among HIV-infected patients living in an urban area in Brazil: a cross-sectional study. **BCM Infectious Diseases**, [s.l.], v. 20. N. 885, nov.2020.

DA COSTA-VAL, A. P.; CAVALCANTI, R. R.; GONTIJO, N. F.; MICHALICK, S. M.; ALEXANDER, B.; WILLIAMS, P.; MELO, M. N. Canine visceral leishmaniasis: Relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* infectivity. **The Veterinary Journal**, [s.l.], v. 174, n. 3, p. 636 – 643, nov.2007.

DANTAS-TORRES, F.; DA SILVA SALES, K. G.; DA SILVA, L. G.; OTRANTO, D.; FIGUEIREDO, L. A. Level of agreement between two commercially available rapid serological tests and the official screening test used to detect *Leishmania* seropositive dogs in Brazil. **The Veterinary Journal**, [s.l.], v. 234, nov.2018.

DANTAS-TORRES, F.; PAIVA-CAVALCANTI, M.; FIGUEIREDO, L. A.; MELO, M. F.; SILVA, F. J.; SILVA, A. L.; ALMEIDA, E. L. Cutaneous and visceral leishmaniasis in dogs from a rural community in northeastern Brazil. **Veterinary Parasitology**, [s.l.], v. 170, p. 313 – 317, fev.2010.

DANTAS-TORRES, F.; MIRÓ, G.; BOWMAN, D. D.; GRADONI, L.; OTRANTO, D. Culling Dogs for Zoonotic Visceral Leishmaniasis Control: The Wind of Change. **Trends in Parasitology**, [s.l.], v. 35, n. 2, p. 97–101, fev.2019.

DE CARVALHO, F. L. N.; RIBOLDI, E. O.; BELLO, G. L.; RAMOS, R. R.; BARCELLOS, R. B.; GEHLEN, M.; HALON, M. L.; ROMÃO, P. R. T.; DALLEGRAVE, E.; ROSSETTI, M. L. R. Canine visceral leishmaniasis diagnosis: a comparative performance of serological and molecular tests in symptomatic and asymptomatic dogs. **Epidemiology and Infection**, [s.l.], v. 146, n. 5, p. 571 – 576, abr.2018.

DEPLAZES, P.; SMITH, N. C.; ARNOLD, P.; LUTZ, H.; ECKERT, J. Specific IgG1 and IgG2 antibody responses of dogs to *Leishmania infantum* and other parasites. **Parasite Immunology**, [s.l.], v. 17, n. 9, p. 451 – 458, abr.1995.

ESCH, K. J.; PETERSEN, C. A. Transmission and Epidemiology of Zoonotic Protozoal Diseases of Companion Animals. **Clinical Microbiology Reviews**, [s.l.], v. 26, n. 1, p. 58–85, jan.2013.

FARAHMAND, M.; NAHREVANIAN, H. Application of recombinant proteins for serodiagnosis of visceral leishmaniasis in humans and dogs. **Iranian Biomedical Journal**, [s.l.], v. 20, n. 3, p. 128–34, jul.2016.

FERNANDES, A. P.; COSTA, M. M. S.; COELHO, E. A. F.; MICHALICK, M. S. M.; FREITAS, E.; MELO, M. N.; TAFURI, W. L.; RESENDE, D. M.; HERMONT, V. ABRANTES, C. F.; GAZZINELLI, R. T. Protective immunity against challenge with

Leishmania (Leishmania) chagasi in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein. **Vaccine**, [s.l.], v. 26, p. 5888 – 5895, set.2008.

FERNANDES, C. B.; MAGALHÃES JUNIOR, J. T.; DE JESUS, C.; SOUZA, B. M. P. S.; LARANJEIRA, D. F.; FRAGA, D. B. M.; VERAS, P. S. T.; BARROUIN-MELO, S. M. Comparison of two commercial vaccines against visceral leishmaniasis in dogs from endemic areas : IgG , and subclasses , parasitism , and parasite transmission by xenodiagnosis. **Vaccine**, [s.l.], v. 32, n. 11, p. 1287–1295, jan.2014.

FERROGLIO, E.; ROMANO, A.; TRISCIUOGLIO, A.; POGGI, M.; GHIGGI, E.; SACCHI, P.; BIGLINO, A. Characterization of *Leishmania infantum* strains in blood samples from infected dogs and humans by PCR-RFLP. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, [s.l.], v. 100, n. 7, p. 636–641, jul.2006.

FIGUEIREDO, F. B.; MADEIRA, M. F.; NASCIMENTO, L. D.; ABRANTES, T. R.; MOUTA-CONFORT, E.; PASSOS, S. R. L.; SCHOUBACH, T. M. P. Canine visceral leishmaniasis: study of methods for the detection of IgG in serum and eluate samples. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 52, n. 4, p. 193–196, jul-ago.2010.

FIGUEIREDO, F. B.; VASCONCELOS, T. C. B.; MADEIRA, M. F.; MENEZES, R. C.; MAIA-ELKHOURY, A. N. S.; MARCELINO, A. P.; WERNECK, G. L. Validation of the Dual-path Platform chromatographic immunoassay (DPP® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 113, n. 11, set.2018.

FRAGA, D. B. M.; PACHECO, L. V.; BORJA, L. S.; TUY, P. G. S. E.; BASTOS, L. A.; SOLCÀ, M. S.; AMORIM, L. D. A. F.; VERAS, P. S. T. The Rapid Test Based on *Leishmania infantum* Chimeric rK28 Protein Improves the Diagnosis of Canine Visceral Leishmaniasis by Reducing the Detection of False-Positive Dogs. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, [s.l.], jan.2016.

FREITAS, E. DE. **Obtenção de um antígeno para Ensaio Imunoenzimático (ELISA) a ser utilizado no diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina pelos órgãos de Saúde Pública no Brasil**. 2010. Tese (doutorado em ciências) – Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Parasitologia, Belo Horizonte, 2010.

FUJIMORI, M.; ALMEIDA, A. B. P. F.; BARROUIN-MELO, S. M.; CORTEZ, L. R. P. B.; DUTHIE, M. S.; HIRAMOTO, R. M.; PINHO, F. A.; REED, S. G.; SOUZA, V. R. F.; SOUZA, N. F.; SOARES, R. M.; TOLEZANO, J. E.; SANCHEZ, M. C. A.; GOTO, H. Validation of ELISA with recombinant antigens in serological diagnosis of canine *Leishmania infantum* infection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 116, fev.2021.

GHEDIN, E.; ZHANG, W. W.; CHAREST, H.; SUNDAR, S.; KENNEY, R. T.; MATLASHEWSKI, G. Antibody response against a *Leishmania donovani* amastigote-stage-specific protein in patients with visceral leishmaniasis. **Clinical and Diagnostic**

Laboratory Immunology, [s.l.], v. 4, n. 5, p. 530–535, set.1997.

GHOSH, P.; BHASKAR, K. R. H.; HOSSAIN, F.; KHAN, M. A. A.; VALLUR, A. C.; DUTHIE, M. S.; HAMANO, S.; SALAM, M. A.; HUDA, M. M.; KHAN, M. G. M.; COLER, R. N.; REED, S. G.; MONDAL, D. Evaluation of diagnostic performance of rK28 ELISA using urine for diagnosis of visceral leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, [s.l.], v. 9, n. 383, jul.2016.

GIUNCHETTI, R. C.; SILVEIRA, P.; RESENDE, L. A.; LEITE, J. C.; MELO-JÚNIOR, O. A. O.; RODRIGUES-ALVES, M. L.; COSTA, L. M.; LAIR, D. F.; CHAVES, V. R.; SOARES, I. S.; MENDONÇA, L. Z.; LANNA, M. F.; RIBEIRO, H. S.; MAIA-GONÇALVES, A. A.; SANTOS, T. A. P.; ROATT, B. M.; AGUIAR-SOARES, R. D. O.; VITORIANO-SOUZA, J.; MOREIRA, N. D.; MATHIAS, F. A. S.; CARDOSO, J. M. O.; COURA-VITAL, W.; SILVEIRA-LEMONS, D.; DUTRITA, W. O.; REIS, A. B. Canine visceral leishmaniasis biomarkers and their employment in vaccines. **Veterinary Parasitology**, [s.l.], v.271, p. 87 – 97, mai.2019.

GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE, S. DA C.; PESSOA-E-SILVA, R.; TRAJANO-SILVA, L. A. M.; GOES, T. C. DE.; MORAIS, R. C. S. DE.; OLIVEIRA, C. N. C.; LORENA, V. M. B. DE.; PAIVA-CAVALCANTI, M. DE. The equivocal role of Th17 cells and neutrophils on immunopathogenesis of leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, [s.l.], v. 8, out.2017.

GOTO, Y.; CARTER, D.; GUDERIAN, J.; INOUE, N.; KAWAZU, S.-I.; REED, S. G. Upregulated expression of b-cell antigen family tandem repeat proteins by *Leishmania* Amastigotes. **Infection and Immunity**, [s.l.], v. 78, n. 5, p. 2138–2145, mai.2010.

GOTO, Y.; COLER, R. C.; GUDERIAN, J.; MOHAMATH, R.; REED, S. G. Cloning, characterization, and serodiagnostic evaluation of *Leishmania infantum* tandem repeat proteins. **Infection and Immunity**, [s.l.], v. 74, n. 7, p. 3939–3945, jul.2006.

GOTO, Y.; COLER, R. N.; REED, S. G. Bioinformatic Identification of Tandem Repeat Antigens of the *Leishmania donovani* Complex. **Infection and Immunity**, [s.l.], v. 75, n. 2, p. 846 – 851, fev.2007.

GRADONI, L. Canine *Leishmania* vaccines: Still a long way to go. **Veterinary Parasitology**, [s.l.], v. 208, n. 1–2, p. 94–100, fev.2015.

GRAMICCIA, M.; GRADONI, L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. **International Journal for Parasitology**, [s.l.], v. 35, n. 11–12, p. 1169–1180, jul.2005.

GRIMALDI, J. G.; TEVA, A.; FERREIRA, A. L.; DOS SANTOS, C. B.; PINTO, I. DE-S.; DE AZEVEDO, C. T.; FALQUETO, A. 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**, [s.l.], v. 106, n. 1, p. 54–59, jan.2012.

HOSEIN, S.; BLAKE, D. P.; SOLANO-GALLEGO, L. Insights on adaptive and innate immunity in canine leishmaniosis. **Parasitology**, [s.l.], v. 144, n. 1, p. 95–115, hu2017.

KEVRIC, I.; CAPPEL, M. A.; KEELING, J. H. New World and Old World Leishmania Infections: A Practical Review. **Dermatologic Clinics**, [s.l.], v. 33, n. 3, p. 579–593, jul.2015.

KAIMING BI; CHEN, Y.; ZHAO, S.; KUANG, Y.; WU, C-H. J. Current Visceral Leishmaniasis Research: A Research Review to Inspire Future Study. **BioMed Research International**, [s.l.], v. 2018, jul.2018.

LAINSON, R. The Neotropical Leishmania species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, [s.l.], v. 1, n. 2, p. 13–32, 2010.

LAURENTI, M. D.; LEANDRO JR, M. V. S.; TOMOKANE, T. Y.; DE LUCCA, H. R. L.; ASCHAR, M.; SOUZA, C. S. F.; SILVA, R. M.; MARCONDES, M.; DA MATTA, V. L. R. Comparative evaluation of the DPP® CVL rapid test for canine serodiagnosis in area of visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, [s.l.], v. 205, n. 3–4, p. 444–450, out.2014.

LAURICELLA, M. A.; MAIDANA, C. G.; FRIAS, V. F.; ROMAGOSA, C. M.; NEGRI, V.; BENEDETTI, R.; SINAGRA, A. J.; LUNA, C.; TARTAGLINO, L.; LAUCELLA, S.; REED, S. G.; RIARTE, A. R. An rk28-based immunoenzymatic assay for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Latin America. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, [s.l.], v. 95, n. 1, p. 92–98, jul.2016.

LEAL, G. G. A.; ROATT, B. M.; AGUIAR-SOARES, R. D. O.; CARNEIRO, C. M.; GIUNCHETTI, R. C.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; MARTINS-FILHO, O. A.; FRANCISCO, A. F.; CARDOSO, J. M.; MATHIAS, F. A. S.; CORREA-OLIVEIRA, R.; CARNEIRO, M.; COURA-VITAL, W.; REIS, A. B. Immunological profile of resistance and susceptibility in naturally infected dogs by *Leishmania infantum*. **Veterinary Parasitology**, [s.l.], v. 205, p. 472 – 482, ago.2014.

LINDOSO, J. A.; COTA, G. F.; CRUZ, A. M. DA; GOTO, H.; MAIA-ELOHOURY, A. N. S.; ROMERO, G. A. S.; SOUSA-GOMES, M. L. DE; SANTOS-OLIVEIRA, J. R.; RABELLO, A. Visceral leishmaniasis and HIV coinfection in Latin America. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 9, set.2014.

LIRA, R. A. **Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina : Avaliação do Desempenho dos Kits EIE-Leishmaniose-Visceral-Canina-Bio-Manguinhos e IFI-Leishmaniose-Visceral-Canina-Bio-Manguinhos**. 2005. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Departamento de Saúde Coletiva, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2005.

LIMA, L. V. R.; CARNEIRO, L. A.; CAMPOS, M. B.; SANTOS, T. V.; RAMOS, P. K.; LAURENTI, M. D.; TEIXEIRA, C. E. C.; SILVEIRA, F. T. Further evidence associating

IgG1, but not IgG2, with susceptibility to canine visceral leishmaniasis caused by *Leishmania (L.) infantum chagasi*-infectoin. **Parasite**, [s.l.], v. 24, n. 37, set.2017.

LIU, D.; UZONNA, J. E. The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [s.l.], v. 2, p. 1–8, jun.2012.

MACHADO, G.; ALVAREZ, J.; BAKKA, H. C.; PEREZ, A.; DONATO, L. E.; LIMA JÚNIOR, F. E. F.; ALVES, R. V.; VILAS, V. J. R. Revisiting area risk classification of visceral leishmaniasis in Brazil. **BMC Infectious Diseases**, [s.l.], v. 19, n. 2, jan.2019.

MADEIRA, M. F.; SCHUBACH, A. O.; SCHUBACH, T. M. P.; SERRA, C. M. B.; PEREIRA, S. A.; FIGUEIREDO, F. B.; CONFORT, E. M.; QUINTELLA, L. P.; MARZOCHI, M. C. A. Is *Leishmania (Viannia) braziliensis* preferentially restricted to the cutaneous lesions of naturally infected dogs? **Parasitological Research**, [s.l.], v. 97, p. 73 – 76, jun.2005.

MAIA, Z.; LÍRIO, M.; MISTRO, S.; MENDES, C. M. C.; MEHTA, S. R.; BADARO, R. Comparative Study of rK39 *Leishmania* Antigen for Serodiagnosis of Visceral Leishmaniasis: Systematic Review with Meta-Analysis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, [s.l.], v. 6, n. 1, jan.2012.

MAIA, C.; CAMPINO, L. Can domestic cats be considered reservoir hosts of zoonotic leishmaniasis? **Trends in Parasitology**, [s.l.], v. 27, n. 8, p. 341–344, ago.2011.

MANCIANTI, F.; GRAMICCIA, M.; GRADONI, L.; PIERI, S. Studies on canine leishmaniasis control . 1 . Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, [s.l.], v. 82, p. 566–567, abr.1988.

MARTINS, V. T.; CHAVÉZ-FUMAGALLI, M. A.; LAGE, D. P.; DUARTE, M. C.; GARDE, E.; COSTA, L. E.; SILVA, V. G.; OLIVEIRA, J. S.; MAGALHÃES-SOARES, D. F.; TEIXEIRA, S. M. R.; FERNANDES, A. P.; SOTO, M.; TAVARES, C. A. P.; COELHO, E. A. F. Antigenicity, Immunogenicity and Protective Efficacy of Three Proteins Expressed in the Promastigote and Amastigote Stages of *Leishmania infantum* against Visceral Leishmaniasis. **PLOS One**, [s.l.], v. 10, n. 9, set.2015.

MARCONDES, M.; DAY, M. J. Current status and management of canine leishmaniasis in Latin America. **Research in Veterinary Science**, [s.l.], v. 123, p. 261–272, jan.2019.

MARCONDES, M.; ROSSI, C. N. Visceral leishmaniasis in Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, [s.l.], v. 50, n. 5, p. 341–352, out.2013.

MARCONDES, M.; BIONDO, A. W.; GOMES, A. A. D.; SILVA, A. R. S.; VIEIRA, R. F. C.; CAMACHO, A. A.; QUINN, J.; CHANDRASHEKAR, R. Validation of a *Leishmania infantum* ELISA rapid test for serological diagnosis of *Leishmania chagasi* in dogs. **Veterinary Parasitology**, [s.l.], v. 175, p. 15 - 19, jan.2011.

MAZZA, G.; WHITING, A. H. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of IgG subclasses in the serum of normal and diseased dogs.

Research in Veterinary Science, [s.l.], v. 57, p. 133 - 139, 1994.

MELO, M. A. M.; SILVA, R. B. S.; SILVA, L. F. F. E; BRAZ, B. M. A.; SANTOS, J. M. DOS; SANTOS, S. J. S.; ANDRADE, P. P. DE. Canine Visceral Leishmaniasis in Brazil.

Canine Medicine - Recent Topics and Advanced Research, [s.l.], dez.2016.

MENDES, T. M.; ROMA, E. H.; COSTAL-OLIVEIRA, F.; DHOM-LEMONS, L. C.; TOLEDO-MACHADO, C. M.; BRUNA-ROMERO, O.; BARTHOLOMEU, D. C.; FUJIWARA, R. T.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. Epitope mapping of recombinant *Leishmania donovani* virulence factor A2 (recLdVFA2) and canine leishmaniasis diagnosis using a derived synthetic bi-epitope. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, [s.l.], v. 11, n.5, mai.2017.

METTLER, M.; GRIMM, F.; CAPELLI, G.; CAMP, H.; DEPLAZES, P. Evaluation of Enzyme-Linked Immunosorbent Assays, an Immunofluorescent-Antibody Test, and Two Rapid Tests (Immunochromatographic-Dipstick and Gel Tests) for Serological Diagnosis of Symptomatic and Asymptomatic Leishmania Infections in Dogs. **Journal of Clinical Microbiology**, [s.l.], v. 43, n. 11, p. 5515–5519, nov.2005.

MINAS GERAIS. **Boletim Epidemiológico, Leishmaniose Visceral Humana, Minas Gerais, 2010-2015**. Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais, Programa de Vigilância da Leishmaniose Visceral, Belo Horizonte, 2016.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Leishmaniose Visceral. 2017. Disponível em:

<https://www.saude.gov.br/images/pdf/2019/janeiro/28/leishvisceral-17-novo-layout.pdf>

MIRÓ, G.; PETERSEN, C.; CARDOSO, L.; BOURDEAU, P.; BANETH, G.; SOLANO-GALLEGO, L.; PENNISI, M. G.; FERRER, L.; OLIVA, G. Novel Areas for Prevention and Control of Canine Leishmaniosis. **Trends in Parasitology**, [s.l.], v. 33, n. 9, p. 718–730, jun.2017.

NASCIMENTO, M. S. L.; CARREGARO, V.; LIMA-JÚNIOR, D. S.; COSTA, D. L.; RYFFEL, B.; DUTHIE, M. S.; JESUS, A.; ALMEIDA, R. P.; SILVA, J. S. Interleukin 17A Acts Synergistically With Interferon γ to Promote Protection Against *Leishmania infantum* Infection. **The Journal of Infectious Diseases**, [s.l.], v. 211, p. 1015 – 1026, mar.2015.

NOGUEIRA, F. S.; AVINO, V. C.; GALVIS-OVALLOS, F.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L.; MOREIRA, M. A. B.; ROMARIZ, A. P. P. L.; MOLLA, L. M.; MENZ, I. Use of miltefosine to treat canine visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* in Brazil.

Parasites and Vectors, [s.l.], v. 12, fev.2019.

NOGUEIRA, C. T.; DEL CISTIA, M. L.; URBACZEK, A. C.; JUSI, M. MG.; VELÁSQUEZ, A. M. A.; MACHADO, R. Z.; FERREIRA, H.; HENRIQUE-SILVA, F.; LANGONI, H.; COSTA, P. I.; GRAMINHA, M. AS. Potencial application of rLc36 protein for diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s.l.], v. 113, n. 3,

p. 197 - 201, Rio de Janeiro, mar.2018.

OKWOR, I.; UZONNA, J. Social and Economic Burden of Human Leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, [s.l.], v. 94, n. 3, p. 489–493, mar.2016.

OLIVEIRA, A. M.; LÓPEZ, R. V. M.; DIBO, M. R.; RODAS, L. A. C.; GUIRADO, M. M.; CHIARAVALLOTI-NETO, F. Dispersion of *Lutzomyia longipalpis* and expansion of visceral leishmaniasis in São Paulo State, Brazil: identification of associated factors through survival analysis. **Parasites & vectors**, [s.l.], v. 11, set.2018.

ORDEIX, L.; DALMAU, A.; OSSO, M.; LLULL, J.; MONTSERRAT-SANGRÀ, S.; SOLANO-GALLEGO, L. Histological and parasitological distinctive findings in clinically-lesioned and normal-looking skin of dogs with different clinical stages of leishmaniosis. **Parasites and Vectors**, [s.l.], v. 10, n. 121, mar.2017.

PALATNIK-DE-SOUSA, C. B. Vaccines for canine leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, [s.l.], v. 3, n. 69, abr.2012.

PALTRINIERI, S.; GRADONI, L.; ROURA, X.; ZATELLI, A.; ZINI, E. Laboratory tests for diagnosing and monitoring canine leishmaniasis. **Veterinary Clinical Pathology**, [s.l.], v. 45, n. 4, p. 552–578, dez.2016.

PASSENDIA, G.; SILVA, J. S. Arginase and its mechanisms in *Leishmania* persistence. **Parasite Immunology**, [s.l.], v. 42, n. 7, jul.2020.

PASSOS, V. M. A.; BARRETO, S. M.; ROMANHA, A. J.; KRETTLI, A. U.; VOLPINI, A. C.; GONTIJO, C. M. F.; FALCÃO, A. L.; LIMA-COSTA, M. F. F. Cutaneous leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte: clinical, laboratorial, therapeutic and prospective aspects. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [s.l.], v. 34, n. 1, p. 5 – 12, jan-fev.2001.

PATTABHI, S.; WHITTLE, J.; MOHAMATH, R.; EL-SAFI, S.; MOULTON, G. G.; GUDERIAN, J. A.; COLOMBARA, D.; ABDOON, A. O.; MUKHTAR, M. M.; MONDAL, D.; ESFANDIARI, J.; KUMAR, S.; CHUN, P.; REED, S. G.; BHATIA, A. Design, development and evaluation of rK28-based point-of-care tests for improving rapid diagnosis of visceral leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [s.l.], v. 4, n. 9, set.2010.

PAZ, G. F.; RIBEIRO, M. F. B.; MAGALHÃES, D. F.; SATHLER, K. P. B.; MORAIS, M. H. F.; FIÚZA, V. O. P.; BRANDÃO, S. T.; WERNECK, G. L.; FORTES-DIAS, C. L.; DIAS, E. S. Association between the prevalence of infestation by *Rhipicephalus sanguineus* and *Ctenocephalides felis felis* and the presence of anti-*Leishmania* antibodies: A case - control study in dogs from a Brazilian endemic area. **Preventive Veterinary Medicine**, [s.l.], v. 97, p. 131 - 133, ago.2010

PAZ, G. F.; RUGANI, J. M. N.; MARCELINO, A. P.; GONTIJO, C. M. F. Implications of

the use of serological and molecular methods to detect infection by *Leishmania* spp. in urban pet dogs. **Acta Tropica**, [s.l.], v. 182, p. 198–201, jun.2018.

PEIXOTO, H. M.; OLIVEIRA, M. R. F. DE; ROMERO, G. A. S. Serological diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil: Systematic review and meta-analysis. **Tropical Medicine and International Health**, [s.l.], v. 20, n. 3, p. 334–352, mar.2015.

PEREIRA, I. E.; SILVA, K. P.; MENEGATI, L. M.; PINHEIRO, A. C.; ASSUNÇÃO, E. A. O.; ARAÚJO, M. L. P.; ABASS, E.; DUTHIE, M. S.; STEINHOFF, U.; TEIXEIRA, H. C. Performance of recombinant proteins in diagnosis and differentiation of canine visceral leishmaniasis infected and vaccinated dogs. **European Journal of Microbiology and Immunology**, [s.l.], v. 10, n. 3, p. 165 – 171, ago.2020.

PORROZZI, R.; COSTA, M. V. S. DA; TEVA, A.; FALQUETO, A.; FERREIRA, A. L.; SANTOS, C. D. DOS; FERNANDES, A. P.; GAZZINELLI, R. T.; CAMPOS-NETO, A.; GRIMALDI JR, G. 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**, [s.l.], v. 14, n. 5, p. 544–548, mai.2007.

PREFEITURA DE BELO HORIZONTE. Leishmaniose Visceral Canina. Belo Horizonte, Minas Gerais, set.2019. Disponível em: <https://prefeitura.pbh.gov.br/saude/leishmaniose-visceral-canina>. Acesso em: 17 de agosto de 2021.

QUINNELL, R. J.; COURTENAY, O.; GARCEZ, L. M.; KAYE, P. M.; SHAW, M. A.; DYE, C.; DAY, M. J. IgG subclass responses in a longitudinal study of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, [s.l.], v. 91, p. 161 - 168, 2003.

QUIRINO, G. F. S.; NASCIMENTO, M. S. L.; DAVOLI-FERREIRA, M.; SACRAMENTO, L. A.; LIMA, M. H. F.; ALMEIDA, R. P.; CARREGARO, V.; SILVA, J. S. Interleukin-27 (IL-27) Mediates Susceptibility to Visceral Leishmaniasis by Suppressing the IL-17-Neutrophil Response. **Infection and Immunity**, [s.l.], v. 84, n. 8, p. 2289 – 2298, ago.2016.

QUINNELL, R. J.; COURTENAY, O.; DAVIDSON, S.; GARCEZ, L.; LAMBSON, B.; RAMOS, P.; SHAW, J. J.; SHAW, M.-A.; DYE, C. Detection of *Leishmania infantum* by PCR, serology and cellular immune response in a cohort study of Brazilian dogs. **Parasitology**, [s.l.], v. 122, n. 03, p. 253-261, mar.2001. hed

REIS, A. B.; GIUNCHETTI, R. C.; CARRILLO, E.; MARTINS-FILHO, O. A.; MORENO, J. Immunity to *Leishmania* and the rational search for vaccines against canine leishmaniasis. **Trends in Parasitology**, [s.l.], v. 26, n. 7, p. 341–349, jul.2010.

REIS, A. B.; MARTINS-FILHO, O. A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; CARVALHO, M. G.; MAYRINK, W.; FRANÇA-SILVA, J. C.; GIUNCHETTI, R. C.; GENARO, O.; CORRÊA-OLIVEIRA, R. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are

associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. **Research in Veterinary Science**, [s.l.], v. 81, p. 68 - 75, 2006a

REIS, A. B.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; VALE, A. M.; MARQUES, M. J.; GIUNCHETTI, R. C.; MAYRINK, W.; GUERRA, L. L.; ANDRADE, R. A.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O. A. Isotype patterns of immunoglobulins: Hallmarks for clinical status and tissue parasite density in brazilian dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, [s.l.], v. 112, p. 102 - 116, fev.2006

REIS, L. E. S.; COURA-VITAL, W.; ROATT, B. M.; BOUILLET, L. E. M.; KER, H. G.; BRITO, R. C. F.; RESENDE, D. M.; CARNEIRO, M.; GIUNCHETTI, R. C.; MARQUES, M. J.; CARNEIRO, C. M.; REIS, A. B. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: A comparative study of three methods using skin and spleen from dogs with natural *Leishmania infantum* infection. **Veterinary Parasitology**, [s.l.], v. 197, p. 498 - 503, jul.2013

REIS, A. B.; MARTINS-FILHO, O. A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; GIUNCHETTI, R. C.; CARNEIRO, C. M.; MAYRINK, W.; TAFURI, W. L.; CORRÊA-OLIVEIRA, R. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, [s.l.], v. 128, n. 1 - 3, p. 87 - 95, mar.2009.

REITHINGER, R.; QUINNELL, R. J.; ALEXANDER, B.; DAVIES, C. R. Rapid Detection of *Leishmania infantum* Infection in Dogs : Comparative Study Using an Immunochromatographic Dipstick Test , Enzyme-Linked Immunosorbent Assay , and PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, [s.l.], v. 40, n. 7, p. 2352–2356, jul.2002.

RHALEM, A.; SAHIBI, H.; GUESSOUS-IDRISSI, N.; LASRI, S.; NATAMI, A.; RIYAD, M.; BERRAG, B. Immune response against *Leishmania* antigens in dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania infantum*. **Veterinary Parasitology**, [s.l.], v.81, n. 3, p. 173 – 184, mar.1999.

RIBEIRO, R. R.; MICHALICK, M. S. M.; SILVA, M. E. DA; SANTOS, C. C. P. DOS; FRÉZARD, F. J. G.; SILVA, S. M. DA. Canine Leishmaniasis: An Overview of the Current Status and Strategies for Control. **BioMed Research International**, [s.l.], mar.2018.

RIBEIRO, V.M. Leishmaniose Visceral Canina: Aspectos de tratamento e controle. **Revista Clínica Veterinária**, n. 71; p. 66-76, 2007.

RIBEIRO, V. M.; SILVA, S. M. DA; MENZ, I.; TABANEZ, P.; NOGUEIRA, F. DOS S.; WERKHAÜSER, M.; FONSECA, A. L. S. DA; DANTAS-TORRES, F. Control of visceral leishmaniasis in Brazil: Recommendations from Brasileish. **Parasites and Vectors**, [s.l.], v. 6, n. 8, jan.2013.

ROQUE, A. L. R.; JANSEN, A. M. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. *International Journal for Parasitology*: **Parasites and Wildlife**,

[s.l.], v. 3, n. 3, p. 251–62, ago.2014.

ROSÁRIO, E. Y. DO; GENARO, O.; FRANÇA-SILVA, J. C.; DA COSTA, R. T.; MAYRINK, W.; REIS, A. B.; CARNEIRO, M. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay using crude *Leishmania* and recombinant antigens as a diagnostic marker for canine visceral leishmaniasis. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s.l.], v. 100, n. 2, p. 197–203, abr.2005.

ROSATI, S.; ORTOFFI, M.; PROFITI, M.; MANNELLI, A.; MIGNONE, W.; BOLLO, E.; GRADONI, L. Prokaryotic Expression and Antigenic Characterization of the Three Recombinant *Leishmania* Antigens for Serological Diagnosis of Canine Leishmaniasis. **Clinical and Diagnostic laboratory Immunology**, [s.l.], v. 10, n. 6, p. 1153 – 1156, nov.2003.

ROSSI, M.; FASEL, N. How to master the host immune system ? *Leishmania* parasites have the solutions ! **International Immunology**, [s.l.], v. 30, n. 3, p. 103–111, dez.2017.
SANTARÉM, N.; SILVESTRE, R.; CARDOSO, L.; CHALLIG, H.; REED, S. G.; CORDEIRO-DA-SILVA, A. Application of an Improved Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Method for Serological Diagnosis of Canine Leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, [s.l.], v. 48, n. 5, p. 1866 – 1874, mai.2010.

SATO, C. M.; SANCHEZ, M. C. A.; CELESTE, B. J.; DUTHIE, M. S.; GUDERIAN, J.; REED, S. G.; BRITO, M. E. F. DE; CAMPOS, M. B.; ENCARNAÇÃO, H. V. S.; GUERRA, J.; MESQUITA, T. G. R. DE; PINHEIRO, S. K.; RAMASAWMY, R.; SILVEIRA, F. T.; SOUZA, M. A.; GOTO, H. Use of Recombinant Antigens for Sensitive Serodiagnosis of American Tegumentary Leishmaniasis Caused by Different *Leishmania* Species. **Journal of Clinical Microbiology**, [s.l.], v. 55, n. 2, p. 495–503, fev.2017.

SCALONE, A.; DE LUNA, R.; OLIVA, G.; BALDI, L.; SATTA, G.; VESCO, G.; MIGNONE, W.; TURILLI, C.; MONDESIRE, R. R.; SIMPSON, D.; DONOGHUE, A. R.; FRANK, G. R.; GRADONI, L. Evaluation of the *Leishmania* recombinant K39 antigen as a diagnostic marker for canine leishmaniasis and validation of a standardized enzyme-linked immunosorbent assay. **Veterinary Parasitology**, [s.l.], v. 104, p. 275 – 285, 2002.

SCHWANKE, K.; SILVA, A. M. M.; PACHECO, A. P.; BAHIA, M.; SILVEIRA, F. T.; SCOFIELD, A.; GÓES-CAVALCANTE, G. Diagnóstico molecular e frequência de anticorpos anti-*Leishmania infantum chagasi* em cães do município de Belém, Pará. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, [s.l.], v. 34, n. 3, p. 255 – 260, mar.2014.

SILVA, T. A. M. DA; COURA-VITAL, W.; BARBOSA, D. S.; OIKO, C. S. F.; MORAIS, M. H. F.; TOURINHO, B. D.; MELO, D. P. O.; REIS I. A.; CARNEIRO, M. Spatial and temporal trends of visceral leishmaniasis by mesoregion in a southeastern state of Brazil, 2002-2013. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [s.l.], v. 11, n. 10, out.2017.

SILVA, D. A.; MADEIRA, M. F.; TEIXEIRA, A. C.; SOUZA, C. M.; FIGUEIREDO, F. B.

Laboratory tests performed on *Leishmania* seroreactive dogs euthanized by the leishmaniasis control program. **Veterinary Parasitology**, [s.l.], v. 179, p. 257 - 261, jan.2011.

SOLANO-GALLEGO, L.; KOUTINAS, A.; MIRÓ, G.; CARDOSO, L.; PENNISI, M. G.; FERRER, L.; BOURDEAU, P.; OLIVA, G.; BANETH, G. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, [s.l.], v. 165, p. 1–18, mai.2009.

SOLANO-GALLEGO, L.; MIRÓ, G.; KOUTINAS, A.; CARDOSO, L.; PENNISI, M. G.; FERRER, L.; BOURDEAU, P.; OLIVA, G.; BANETH, G. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. **Parasites and Vectors**, [s.l.], v. 4, n. 86, mai.2011.

SOUZA, N. A. DE; BRAZIL, R. P.; ARAKI, A. S. The current status of the *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) species complex. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s.l.], v. 112, n. 3, p. 161–174, mar.2017.

SOUZA, N. A.; LEITE, R. S.; SILVA, S. O.; PENNA, M. G.; VILELA, L. F. F.; MELO, M. N.; ANDRADE, A. S. R. Detection of mixed *Leishmania* infections in dogs from an endemic area in southeastern Brazil. **Acta Tropica**, [s.l.], v. 193, p. 12–17, mai.2019.

SRIVASTAVA, S.; SHANKAR, P.; MISHRA, J.; SINGH, S. Possibilities and challenges for developing a successful vaccine for leishmaniasis. **Parasites and Vectors**, [s.l.], v. 9, n. 277, mai.2016.

STEVERDING, D. The history of leishmaniasis. **Parasites and Vectors**, [s.l.], v. 10, n. 82, fev.2017.

SUNTER, J.; GULL, K. Shape, form, function and *Leishmania* pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding. **Open biology**, [s.l.], v. 7, n. 9, set.2017.

TAFURI, W. L.; SANTOS, R. L.; ARANTES, R. M. E.; GONÇALVES, R.; MELO, M. N.; MICHALICK, M. S. M.; TAFURI, W. L. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. **Journal of Immunological Methods**, [s.l.], v. 292, p. 17–23, jul.2004.

TEIXEIRA NETO, R. G.; GIUNCHETTI, R. C.; CARNEIRO, C. M.; VITOR, R. W. A.; COURA-VITAL, W.; QUARESMA, P. F.; KER, H. G.; MELO, L. A.; GONTIJO, C. M. F.; REIS, A. B. Relationship of *Leishmania*-specific IgG levels and avidity with parasite density and clinical signs in canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, [s.l.], v. 169, n. 3 – 4, p. 248 – 257, mai.2010.

TEIXEIRA, A. I. P.; SILVA, D. M.; VITAL, T.; NITZ, N.; CARVALHO, B. C.; HECHT, M.; OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, E.; RABELLO, A.; ROMERO, G. A. S. Improving reference standard for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis: a challenge for current and

future tests. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s.l.], v. 114, Rio de Janeiro, jan.2019.

TESTASICCA, M. C. S.; SANTOS, M. S.; MACHADO, L. M.; SEFURI, A. V.; DORO, D.; AVELAR, D.; TIBÚRCIO, A. M. L.; ABRANTES, C. F.; MACHADO-COELHO, G. G. L.; GRIMALDI, G.; GAZZINELLI, R. T.; FERNANDES, A. P. Antibody responses induced by Leish-Tec®, an A2-based vaccine for visceral leishmaniasis, in a heterogeneous canine population. **Veterinary parasitology**, [s.l.], v. 204, n. 3–4, p. 169–76, abr.2014.

TRAVI, B. L.; CORDEIRO-DA-SILVA, A.; DANTAS-TORRES, F.; MIRÓ, G. Canine visceral leishmaniasis: Diagnosis and management of the reservoir living among us. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [s.l.], v. 12, n. 1, jan.2018.

VAISH, M.; BHATIA, A.; REED, S. G.; CHAKRAVARTY, J.; SUNDAR, S. Evaluation of rK28 antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis in India. **Clinical Microbiology and Infection**, [s.l.], v. 18, n. 1, p. 81 - 85, jan.2012.

VALE, A. M.; FUJIWARA, R. T.; NETO, A. F. S.; MIRET, J. A.; ALVAREZ, D. C. C.; SILVA, J. C. F. DA; CAMPOS-NETO, A.; REED, S.; MAYRINK, W.; NASCIMENTO, E. Identification of highly specific and cross-reactive antigens of leishmania species by antibodies from leishmania (*Leishmania*) chagasi naturally infected dogs. **Zoonoses and Public Health**, [s.l.], v. 56, n. 1, p. 41–48, fev.2009.

VAN ZANDBERGEN, G.; KLINGER, M.; MUELLER, A.; DANNENBERG, S.; GEBERT, A.; SOLBACH, W.; LASKAY, T. Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. **Journal of immunology**, [s.l.], v. 173, n. 11, p. 6521–6525, 2004.

VENTURIN, G. L.; BRAGATO, J. P.; SILVA, K. L. O.; LIMA, V. M. F. Recombinant K28 antigen in ELISA in the diagnosis of canine visceral leishmaniosis. **Parasite Immunology**, [s.l.], v. 37, n. 12, p. 670–673, dez.2015.

WARDINI, A. B.; PINTO-DA-SILVA, L. H.; NADAES, N. R.; NASCIMENTO, M. T.; ROATT, B. M.; REIS, A. B.; VIANA, K. F.; GIUNCHETTI, R. C.; SARAIVA, E. M. Neutrophil properties in healthy and *Leishmania infantum*-naturally infected dogs. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 9, n. 6247, abr.2019.

World Health Organization. Control of the leishmaniose, Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis. Geneva. 2010.

World Health Organization. Leishmaniasis. February 2015. 2015. (WHO Technical Report Series No. 375).

World Health Organization. Leishmaniasis: Epidemiological situation. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>. Acessado em 20/10/2019.

ZAFRA, R.; JABER, J. R.; PÉREZ-ÉCIJA, R. A.; BARRAGÁN, A.; MARTÍNEZ-

MORENO, A.; PÉREZ, J. High iNOS expression in macrophages in canine leishmaniasis is associated with low intracellular parasite burden. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, [s.l.], v. 123, n. 3 - 4, p. 353–359, fev.2008.

ZHANG, W-W.; MATLASHEWSKI, G. Loss of virulence in *Leishmania donovani* deficient in an amastigote-specific protein, A2. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, USA, v. 94, p. 8807 – 8811, ago.1997.

ZHANG, W-W.; MENDEZ, S.; GHOSH, A.; MYLER, P.; IVENS, A.; CLOS, J.; SACKS, D. L.; MATLASHEWSKI, G. Comparison of the A2 Gene Locus in *Leishmania donovani* and *Leishmania major* and Its Control over Cutaneous Infections. **The Journal of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 278, n. 37, p. 35508 – 35515, set.2003.

WICKESTEAD, B.; ERSFELD, K; GULL, K. Repetitive Elements in Genome of Parasitic Protozoa. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, [s.l.], v. 67, n. 3, p. 360 – 375, set.2003.

APÊNDICE - Publicação

Artigo publicado na revista *European Journal of Microbiology and Immunology*, em 27 de agosto de 2020, compreendendo parte dos resultados do presente estudo.



European Journal of
Microbiology and
Immunology

10 (2020) 3, 165–171

DOI:

10.1556/1886.2020.00018

© 2020 The Authors

ORIGINAL RESEARCH
PAPER



Performance of recombinant proteins in diagnosis and differentiation of canine visceral leishmaniasis infected and vaccinated dogs

INGRID E. PEREIRA¹, KYSSIA P. SILVA¹, LAURA M. MENEGATI¹, AIMARA C. PINHEIRO², ELAINE A. O. ASSUNÇÃO², MARIA DE LOURDES P. ARAÚJO³, ELFADIL ABASS⁴, MALCOLM S. DUTHIE⁵, ULRICH STEINHOFF^{6†} and HENRIQUE C. TEIXEIRA^{1*†}

¹ Department of Parasitology, Microbiology and Immunology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Juiz de Fora, 36036-900, Juiz de Fora, Brazil

² Zoonosis Control Center, Municipal Health Secretariat, 35022-280, Governador Valadares, Brazil

³ Santo Agostinho Veterinary Hospital, 30180-003, Belo Horizonte, Brazil

⁴ Department of Clinical Laboratory Science, College of Applied Medical Sciences, Imam Abdulrahman Bin Faisal University, Dammam, Saudi Arabia

⁵ HDT Biotech, 98102, Seattle, United States

⁶ Institute for Medical Microbiology, Philipps University of Marburg, 35043, Marburg, Germany

Received: July 06, 2020 • Accepted: July 13, 2020

Published online: August 27, 2020

ABSTRACT

Control of canine visceral leishmaniasis (CVL), a major zoonotic disease in Brazil and many other tropical and subtropical countries, remains difficult as an accurate and reliable diagnosis is still missing. In endemic regions, infected dogs are the main parasitic reservoir host of human Visceral leishmaniasis (VL) infection. Vaccination of dogs against *Leishmania* infection constitutes an important strategy to prevent or to better control CVL, thus, a serological test that can discriminate between antibodies induced by immunization versus infection is highly desirable in order to improve and simplify diagnosis. Here, four recombinant proteins were evaluated for their ability to detect and differentiate between dogs that are infected with *Leishmania* or have been immunized with the anti-*Leishmania* vaccine Leish-Tec[®]. Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis of the four *Leishmania*-specific IgG ELISA revealed superior performance of rK28, followed by rKL08, rK39 and rLb6H. The rK28-based ELISA revealed not only the best accuracy against CVL, but also the lowest cross-reactivity with sera from Leish-Tec[®] immunized dogs. Our data show that the rK28-based ELISA is highly suitable for CVL screening as it shows high sensitivity with simultaneous low cross-reactivity. Further, the high specificity of the rKL08 indicates its suitability for the confirmation of CVL diagnosis.

KEYWORDS

leishmaniasis, canine visceral leishmaniasis, diagnosis, recombinant proteins, accuracy of diagnostic tests, kinesins, rK28, rK39, rKL08, rLb6H

[†]HCF and US contributed equally to this work and share last authorship.

*Corresponding author.
Tel: +55 32 2102 6320.
E-mail: henrique.teixeira@ufjf.edu.br



INTRODUCTION

Visceral leishmaniasis (VL) is a neglected disease that represents a serious public health problem in the more than 70 countries considered endemic [1]. In Brazil, the disease is caused by the protozoan *Leishmania infantum*, which can be transmitted to man through the bite of the sandfly *Lutzomyia longipalpis* [2]. Visceral leishmaniasis is a zoonotic disease and among several mammalian hosts, domestic dogs (*Canis familiaris*) represent the main rural

ANEXO – COMITÊ DE ÉTICA CEUA / UFJF



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

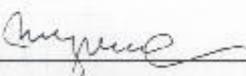
CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo nº. 009/2017 – CEUA sobre “Influência de reações cruzadas e vacinação na sensibilidade e especificidade do antígeno rKLO8 no diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina” projeto de pesquisa sob a responsabilidade de HENRIQUE COUTO TEIXEIRA com a colaboração de LILY PAOLA MARTINEZ ABAD, SYDNEI MAGNO DA SILVA E INGRID ESTEVAM PEREIRA está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF, em reunião realizada em 04/04/2017. O projeto será desenvolvido no período de 04/06/2017 a 28/02/2020.

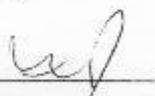
CERTIFICATE

We certify that the protocol nº. 009/2017 – CEUA about “Influência de reações cruzadas e vacinação na sensibilidade e especificidade do antígeno rKLO8 no diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina” under responsibility of HENRIQUE COUTO TEIXEIRA, and collaboration LILY PAOLA MARTINEZ ABAD, SYDNEI MAGNO DA SILVA E INGRID ESTEVAM PEREIRA is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF – ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL HANDLING (CEUA) in 04/04/2017. The project will be developed during the period of 04/06/2017 to 28/02/2020.

Juiz de Fora, 27 de abril de 2017



Vice-coordenadora
CEUA



Coordenadora
CEUA