

VIVIANA VANESSA PINEDO CANCINO

Avaliação imunodiagnóstica de antígenos excretados-secretados de *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) chagasi* na Leishmaniose visceral humana e canina

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título do Mestre em Ciências Biológicas.

São Paulo
2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

VIVIANA VANESSA PINEDO CANCINO

Avaliação imunodiagnóstica de antígenos excretados-secretados de *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) chagasi* na Leishmaniose visceral humana e canina

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título do Mestre em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Parasitologia

Orientador: Prof. Dra. Eufrosina Setsu Umezawa

São Paulo
2009

À Deus, pois sem ele nada seria possível, porque permitiu que meus sonhos de ontem, hoje se tornem uma realidade.

À minhas adoradas mães Lourdes e Matilde, pelo amor e apoio constante a pesar da distancia, incentivando quando bate o desânimo e porque estiveram comigo em todos os momentos desta e de outras caminhadas.

Ao Juan, Johana e Norka, meus queridos irmãos, pelo orgulho que sentem ao presenciar minha luta no sentido de alcançar meus objetivos, pela amizade e carinho que nos une.

Ao meu querido Alexander, por sua confiança e companheiro de cada momento.

AGRADECIMENTOS

À minha amiga e orientadora Prof. Dra. Eufrosina Setsu, que caminhou ao meu lado durante esta trajetória, ensinando não somente os fundamentos da ciência, mas também os fundamentos da amizade, da parceria e do respeito, pela intensa paciência e pela confiança depositada em minha pessoa para realizar este trabalho incluindo seu incentivo em continuar nesta linha de pesquisa.

Ao Prof. Dr. Robert Gilman, da Johns Hopkins University-USA, pela sua amizade incondicional, pelos sábios conselhos, motivação e confiança na minha pessoa para continuar com meus estudos no caminho da ciência.

Ao Prof. Dr. Heitor Franco de Andrade Jr, do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo-USP, pela paciência e disposição com que sempre me atendeu todas às vezes que precisei de algum auxílio ou conselho e pela valiosa orientação na parte estatística deste trabalho.

À Prof. Dra. Marcia Dalastra Laurenti do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina-USP, pela amizade, disposição para atender às minhas dúvidas e pelas valiosas intervenções neste trabalho e por ceder às amostras de soros de cães com leishmaniose visceral.

À Prof. Dra. Clara Lucia Barberie da Universidade Federal de São Paulo, pela colaboração em nos ceder às amostras de soros de pacientes com calazar.

À Dra. Rosely Malafronte do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo-USP, pela colaboração em nos ceder às amostras de soros de pacientes com malária.

Ao meu querido amigo Norival Kesper Jr, do Laboratório de Protozoologia – IMTSP-USP, pela amizade incondicional, pela paciência em transmitir seus conhecimentos, não somente na ciência, mas, pelas amáveis palavras nas horas difíceis, pelas lições de vida, pelo valioso tempo que lhe foi roubado desde o primeiro dia, pelo incentivo e dicas para melhorar este trabalho.

Ao meu querido amigo e colega de mestrado Leandro Rodrigues Ferreira, pelos momentos de aprendizagem constante que muito me ajudou no desempenho de minhas funções, sempre prestativo e disponível, me fazendo companhia em um período de muitas andanças, pelo incentivo, dicas e pela amizade solidificada, ao longo deste trabalho, que certamente se eternizará.

À minha amiga Mônica de Paula Leal do Laboratório de Protozoologia – IMTSP-USP, pela amizade, pelas boas conversas sobre o valor da vida, por ter sido tão prestativa, atenciosa e competente me auxiliando nos ensaios experimentais deste trabalho.

À minha amiga Marilda Savoia do Nascimento do Laboratório de Protozoologia – IMTSP-USP, pelos bons conselhos em um determinado momento de grandes dúvidas, pelas boas conversas, pelas risadas e todos os belos momentos de companhia na hora do almoço.

À minha amiga e colega de mestrado Tasciane Yamasaki pela amizade, pelas boas conversas, a risada contagiante e pela valiosa ajuda e paciência na correção do meu português para a melhora da redação da tese.

À minhas amigas Amanda Neves e Isabel Alves, pela amizade, pelos bons momentos que me proporcionaram durante minha convivência laboratorial e todo o carinho brindado, que tornaram meus dias mais agradáveis.

À Angela de Jesus e Wilma Garcia, secretarias da Pós - Graduação da Relação Patógeno Hospedeiro da Universidade de São Paulo, pela paciência e ajuda atenciosa em cada momento que precisei.

Aos funcionários do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo-USP, especialmente à Sonia Pedrozo Gomes, pela paciência, alegria e valiosa ajuda na obtenção das referências bibliográficas. Ao Adenilson Leite Ribeiro, pelos xerox e pela ajuda nos momentos de apuro. Ao Almir Robson Ferreira, pela ajuda na elaboração das fotografias do presente trabalho.

Aos meus amigos Viviane Morcelle, Glenda Niño, Ricardo Pariona, Priscilia Aguiar, Miguel Garay, Lizbeth Paredes, Lena de Castro, alguns da grande lista, que com certeza preencheriam muitas folhas, tal é o agradecimento que tenho por suas amigades e que fez meus dias no CRUSP muito agradáveis, neste tempo de convivência no Brasil.

Ao CNPq e LIM 49 HC-FMUSP, pelo apoio financeiro.

Enfim, devo dizer que a realização deste trabalho é a concretização do esforço de muitos amigos. Expressar minha gratidão a todos àqueles que direta ou indiretamente colaboraram, contribuindo para execução do mesmo, que confesso, não foi uma das tarefas das mais fáceis em minha vida. A todos os que me incentivaram, apoiaram, acreditando nos meus esforços. A todos os que nas horas difíceis, me dirigiram uma palavra ânimo e nas horas fáceis sorriram comigo, a todos aqueles que não tiveram seus nomes mencionados, mas desejaram de coração que eu lograsse êxito em meus esforços. **Muito Obrigado!**

RESUMO

PINEDO-CANCINO, V. **Avaliação imunodiagnóstica de antígenos excretados-secretados de *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) chagasi* na Leishmaniose visceral humana e canina.** 127 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

As leishmanioses são doenças tropicais endêmicas prevalentes em vários países, inclusive no Brasil. Dentre estas se destaca a leishmaniose visceral (LV) ou kalazar que é a forma de maior letalidade. No Estado de São Paulo o problema é alarmante e afeta tanto o homem como o cão. Leishmanias liberam no meio de crescimento moléculas de sua membrana e vários estudos mostram sua importância na indução da imunidade mediada pelas células T e B incluindo a produção de altos níveis de imunoglobulinas G-anti-leishmania. Este trabalho aborda a avaliação dos exoantígenos de *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) chagasi*, comparados ao antígeno total, no diagnóstico da leishmaniose visceral humana e canina, por ELISA e Immunoblotting. A sensibilidade de 100% foi obtida tanto para os exoantígenos como para os antígenos totais, independente da espécie de *Leishmania* empregada, no ELISA. A melhor especificidade foi apresentada pelo ELISA que utilizou exoantígenos tanto no diagnóstico da LV humana como canina, sendo que a melhor especificidade e maiores títulos foram apresentados pela espécie *L. (L.) chagasi*. Sensibilidade e especificidade de 100% foram apresentados pelo Immunoblotting que utilizou exoantígenos de *L. (L.) chagasi* (IBleish), no diagnóstico da LV canina, sem reatividade cruzada com cães infectados com *T. cruzi*. Os dados obtidos no IBleish-*L. (L.) chagasi* nos conduzem a pensar que esta metodologia poderia ser utilizada como um teste diagnóstico confirmatório na Leishmaniose canina, uma vez que em humanos este teste reage cruzadamente com uma pequena porcentagem de pacientes com leishmaniose tegumentar.

Palavras-chave: Leishmaniose visceral. Exoantígenos. *Leishmania (L.) chagasi*. ELISA. Immunoblotting. Diagnóstico sorológico.

ABSTRACT

PINEDO-CANCINO, V. **Evaluation of excreted-secreted antigens of *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* and *L. (L.) chagasi* in imunodiagnosis of human and dog Visceral leishmaniasis.** 127 p. Dissertation (Master) – Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2009.

Leishmaniasis are endemic tropical diseases prevalent in several countries, including Brazil. Among them, visceral leishmaniasis (VL) or Kala-azar, is the form with the greatest potential for mortality, it is a new problem that grows in São Paulo State, affecting men and dogs. The molecules released from *Leishmania* membrane are excreted-secreted (exoantigens) into culture medium, have been showing that are important in the induction of T and B cells immunity, stimulating high production of IgG antibodies. Our work was carried out with exoantigens of *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* and *L. (L.) chagasi* by ELISA and Immunoblotting and the results were compared with total parasites extract applied in the diagnosis of canine and human visceral leishmaniasis. A sensitivity of 100% was reached by all antigens independent of the specie of *Leishmania* employed. Exoantigens showed the best index of specificity for VL diagnosis of humans and dogs, but exoantigens from *L. (L.) chagasi* showed the best specificity with high titres. The Immunoblotting that used the exoantigens of *L. (L.) chagasi* (IBleish) showed 100% sensitivity and specificity in the canine VL. The IBleish-*L. (L.) chagasi* did not showed cross-reactivity with dogs infected with *T. cruzi*. These data led us to think that it could be a reliable method for confirmatory diagnostic and epidemiological assays, especially to help the diagnosis of Canine leishmaniasis.

Keywords: Visceral leishmaniasis. Exoantigens. *Leishmania (L.) chagasi*. ELISA. Immunoblotting. Serodiagnosis

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Distribuição das diferentes formas de Leishmaniose no Mundo, 2001	18
Figura 2- Distribuição dos municípios do Estado de São Paulo segundo a classificação epidemiológica para leishmaniose visceral, em fevereiro /2008	20
Figura 3- Grupo de estudo de soros Humanos	39
Figura 4- Amostragem de soros de cães	40
Figura 5- Curvas de titulação para determinar a concentração ideal dos antígenos ES de: A) <i>L. (L.) amazonensis</i> , B) <i>L. (L.) braziliensis</i> , C) <i>L. (L.) chagasi</i> a ser utilizado no ELISA	49
Figura 6- Curvas de titulação para determinar a concentração ideal dos antígenos AT: A) <i>L. (L.) amazonensis</i> , B) <i>L. (L.) braziliensis</i> , C) <i>L. (L.) chagasi</i> a ser utilizado no ELISA	50
Figura 7- Limiar de reatividade (LR) dos ELISAs-ES (exoantígenos) e ELISAs-AT (antígeno total) das leishmanias: A) <i>L. (L.) amazonensis</i> , B) <i>L. (L.) braziliensis</i> , C) <i>L. (L.) chagasi</i>	51
Figura 8- Reatividade do ELISA-ES e ELISA-AT, utilizando: A) <i>L. (L.) amazonensis</i> , B) <i>L. (L.) braziliensis</i> , C) <i>L. (L.) chagasi</i> com 89 indivíduos com LV (com parasitologia positiva)	52
Figura 9- Distribuição da reatividade da IgG (Abs) em indivíduos com: Leishmaniose cutânea (LC), Leishmaniose mucocutânea(LMC), doença de Chagas (DC) e outras doenças (OD); com ELISA-ES e AT de: A) <i>L. (L.) amazonensis</i> , B) <i>L. (V.) braziliensis</i> , C) <i>L. (L.) chagasi</i>	57
Figura 10- Reatividade de soros de indivíduos com suspeita clínica (oligossintomático; n=10) de LV ou sem clínica (assintomáticos; n=4) por ELISA-ES e AT [A) <i>L. (L.) amazonensis</i> , B) <i>L. (V.) braziliensis</i> , C) <i>L. (L.) chagasi</i>]	58
Figura 11- Limiar de reatividade (LR) dos ELISA-ES e AT [exoantígenos (ES) e antígeno total (AT)] das leishmanias: A) <i>L. (L.) amazonensis</i> , B) <i>L. (V.) braziliensis</i> , C) <i>L. (L.) chagasi</i>	60
Figura 12- Reatividade do ELISA-ES e ELISA-AT, utilizando: A) <i>L. (L.) amazonensis</i> , B) <i>L. (V.) braziliensis</i> , C) <i>L. (L.) chagasi</i> ; com 37 soros de cães sintomáticos e 16 soros de cães assintomáticos com parasitologia positiva	61
Figura 13- Distribuição da reatividade da IgG dos ELISA-ES e AT com leishmanias: A) <i>L. (L.) amazonensis</i> , B) <i>L. (V.) braziliensis</i> , C) <i>L. (L.) chagasi</i> de amostras de animais com outras parasitoses	64
Figura 14- Distribuição da reatividade da IgG dos ELISA-ES e AT com leishmanias: A) <i>L. (L.) amazonensis</i> , B) <i>L. (V.) braziliensis</i> , C) <i>L. (L.) chagasi</i> de amostras de cães com suspeita de Leishmaniose canina, com diagnóstico parasitológico negativo e classificados de acordo com os sinais clínicos como sintomáticos e assintomáticos	66

Figura 15- Reatividade por ELISA (Abs _{492nm}) do exoantígeno de <i>L. (L.) amazonensis</i> submetidos ou não a aquecimento e armazenados com ou sem a adição de inibidores de proteases e análise da influencia do tempo de armazenamento a -40C (0, 6, 12 meses)	67
Figura 16- Análise de frações protéicas de três preparados antigênicos de <i>L. (L.) chagasi</i> de gel corado com Coomassie Blue	68
Figura 17- Perfil de reatividade por Immunoblot dos antígenos de <i>L. (L.) chagasi</i> com um soro de paciente leishmaniótico um soro de cão com LV	70
Figura 18- Perfil protéico do Immunoblot da reatividade de 3 lotes de exoantígeno de <i>L. (L.) chagasi</i> (IBleish-ES), preparados em diferentes épocas	71
Figura 19- Perfis de reatividade do IBleish-ES das 3 espécies de <i>Leishmania</i> : A) <i>L. (L.) amazonensis</i> , B) <i>L. (V.) braziliensis</i> , e C) <i>L. (L.) chagasi</i> , com soros de cão com parasitologia positivo e clinicamente classificados como sintomático e assintomático	72
Figura 20- Perfil das bandas reativas do IBleish-ES das três espécies de <i>Leishmania</i> : A) <i>L. (L.) amazonensis</i> , B) <i>L. (V.) braziliensis</i> , C) <i>L. (L.) chagasi</i> , 1-Soro de cão infectado com <i>T. cruzi</i> , 2-Soro de cão controle positivo, 3- Soro de cão infectado com <i>T. evansi</i>	74
Figura 21- Perfil de reatividade apresentado por cães com outras parasitoses [IBleish- <i>L. (L.) chagasi</i>]	74
Figura 22- Perfis de reatividade, por Immunoblot do ES (IBleish-ES) das 3 espécies de <i>Leishmania</i> : A- <i>L. (L.) amazonensis</i> , B- <i>L. (V.) braziliensis</i> , C- <i>L. (L.) chagasi</i> ; com soro de paciente sintomático para LV com parasitologia positiva	78
Figura 23- Perfis de reatividade, por Immunoblot do ES (IBleish-ES) das três espécies de <i>Leishmania</i> : A- <i>L. (L.) amazonensis</i> , B- <i>L. (V.) braziliensis</i> , C- <i>L. (L.) chagasi</i> ; com soro de paciente oligossintomático e assintomático para LV	78
Figura 24- Perfil protéico da positividade dos antígenos ES das três espécies de <i>Leishmania</i> : A) <i>L. (L.) amazonensis</i> , B) <i>L. (V.) braziliensis</i> , C) <i>L. (L.) chagasi</i> ; com amostras de soros de pacientes 1- com Leishmaniose cutânea, 2- com Leishmaniose mucocutânea	80
Figura 25- Perfis protéico da positividade do IBleish-ES das 3 espécies de <i>Leishmania</i> : A) <i>L. (L.) amazonensis</i> , B) <i>L. (V.) braziliensis</i> , C) <i>L. (L.) chagasi</i> ; com amostra de soros de paciente 1- com doença de Chagas, 2- com Leishmaniose visceral (perfil protéico positivo)	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Cepas de três espécies do gênero <i>Leishmania</i>	41
Tabela 2- Combinação binária entre os resultados prováveis obtidos em um determinado teste e o diagnóstico verdadeiro da doença	47
Tabela 3- Índices de especificidades relativa (%) para os ELISAs-ES e AT, no diagnóstico da Leishmaniose humana	53
Tabela 4A- Número de casos com reatividade cruzada (positividade %) de amostras de soros de pacientes não infectados com <i>L. (L.) chagasi</i> , pelo ELISA-Exoantígenos	55
Tabela 4B- Número de casos com reatividade cruzada (positividade %) de amostras de soros de pacientes não infectados com <i>L. (L.) chagasi</i> , pelo ELISA-Antígeno total	56
Tabela 5- Especificidade relativa em porcentagem (%) para os ELISAs-ES e AT, com os soros de cão	62
Tabela 6- Número de casos com reatividade cruzada do ELISA-ES e AT no grupo de animais com outras parasitoses	63
Tabela 7- Porcentagem de positividade do ELISA-ES ou AT com amostras de cães com suspeita de Leishmaniose (n=32).....	65
Tabela 8- Porcentagem de positividade (%) do IBleish- <i>L. (L.) chagasi</i> em amostras de cães com suspeita de Leishmaniose	75
Tabela 9- Número de casos positivos discordantes nos ELISAs (ES e AT) comparada com IBleish- <i>L. (L.) chagasi</i> , positivo ou negativo	76
Tabela 10- Comparação da reatividade do IB e ELISA-ES de <i>L. (L.) chagasi</i> com pacientes com LC e LMC	81

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs – absorvância

ANOVA – análise de variancia

AT – antígeno total

DC – doença de Chagas

DNA – ácido desoxirribonucléico (do inglês "deoxyribonucleic acid")

E – especificidade

EDTA - ácido etilendiamino tetra-acético

EF – fatores de excreção (do inglês "Excreted Factor")

ELISA – ensaio imunoenzimático (do inglês "Enzyme Linked Immunosorbent Assay")

ES – antígenos solúveis excretados-secretados, exoantígenos ou antígenos "*shedados*"

FMUSP – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo

FUNASA – Fundação Nacional de Saúde

GIPLS – glicosilinositolfosfolípeos (do inglês "glycosylinositolphospholipids")

GPI – glicofosfolípeos (do inglês "glycophospholipids")

GPis – glicofosfolípeos (do inglês "glycosylphosphatidylinositol")

HCl – ácido clorídrico

HIV – Vírus de imunodeficiência humano (do inglês "Human Immunodeficiency Vírus")

IB – immunoblotting

IBleish-ES – immunoblotting com exoantígenos

IFI – imunofluorescência indireta (em inglês "Immunofluorescence Antibody Test"- IFAT)

LC – Leishmaniose cutânea

LIT – meio líquido para cultura de parasitos (do inglês "Liver Infusion Tryptose")

LMC – Leishmaniose mucocutânea

LPG – lipofosfoglicana (do inglês "lipophosphoglycan")

LR – limiar de reatividade

LTA – Leishmaniose tegumentar americana

LV – Leishmaniose visceral

LVC – Leishmaniose visceral canina

LVH – Leishmaniose visceral humana

MW – padrão de peso molecular

NaCl – cloreto de sódio

NaOH – hidróxido de sódio

NTC – membrana de nitrocelulose

OD – outras doenças

OPD – orto-phenylene diamine

PAHO – Organização Panamericana da Saúde (do inglês “Panamerican Health Organization”)

PBS – tampão fosfato salina

PCR – reação em cadeia da polimerase (do inglês “Polymerase Chain Reaction”)

PM – peso molecular

PMSF – fluoreto de fenil metil sulfonila

RPMI – meio de sais enriquecidos com aminoácidos, vitaminas e outros componentes
essências para o crescimento celular

RT-PCR – reação em cadeia da polimerase – transcriptase reversa (do inglês "Polymerase
Chain Reaction – quantitative reverse transcriptase")

S – sensibilidade

SACPs – fosfatasas ácidas secretórias conservadas (do inglês " Secretory Acid Phosphatases")

SDS – duodecil sulfato de sódio

SD – desvios padrões

SFB – soro fetal bovino

USP – Universidade de São Paulo

UNIFESP – Universidade Federal de São Paulo

WHO – Organização Mundial da Saúde (do inglês “World Health Organization”)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Etiologia e epidemiologia das Leishmanioses	17
1.1.1 Leishmaniose visceral	18
1.2 Aspectos de imunidade e controle da Leishmaniose visceral	21
1.3 Diagnóstico da Leishmaniose visceral	23
1.3.1 Diagnóstico parasitológico	24
1.3.1.1 Métodos moleculares na detecção do parasito	25
1.3.2 Diagnóstico sorológico	26
1.4 Situação do diagnóstico da Leishmaniose visceral no cão	29
1.5 Moléculas excretadas-secretadas pelas leishmanias	31
1.5.1 Diagnóstico com os metabolitos excretados-secretados de <i>Leishmania</i>	34
2 OBJETIVO	37
3 MATERIAIS E MÉTODOS	38
3.1 Amostragem	38
3.1.1 Soros humanos	38
3.1.2 Soros de cães	39
3.2 Parasitas	40
3.2.1 Cultura	41
3.2.2 Extratos antigênicos	41
3.2.2.1 Exoantígenos (ES)	41
3.2.2.2 Antígeno total (AT)	42
3.3 Técnicas sorológicas	42
3.3.1 ELISA	42
3.3.1.1 Cálculo do limiar de reatividade (LR) no ELISA	43
3.3.1.2 Análise estatística da imunorreatividade dos extratos antigênicos	43
3.3.2 Immunoblotting	44
3.3.2.1 Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida	44
3.3.2.2 Transferência eletroforética de proteínas	45
3.3.2.3 Immunoblotting	46
3.4 Cálculo dos parâmetros imunodiagnósticos	46
4 RESULTADOS	48
4.1 ELISA - HOSPEDEIRO HUMANO	48
4.1.1 Concentrações ideais dos extratos antigênicos	48
4.1.2 Cálculo do limiar de reatividade (LR)	51
4.1.3 Índice de sensibilidade relativa	52
4.1.4 Índice de especificidade relativa	53
4.1.5 Reatividade cruzada	54
4.1.6 Avaliação imunodiagnóstico de casos suspeitos de LV	58
4.2 ELISA - HOSPEDEIRO CANINO	59
4.2.1 Limiar de reatividade (LR)	59
4.2.2 Índice de sensibilidade relativa	60
4.2.3 Índice de especificidade relativa	62
4.2.4 Reatividade cruzada	63
4.2.5 Avaliação imunodiagnóstica de cães com suspeita de leishmaniose	65

4.3 Exoantígenos	67
4.3.1 Estabilidade e reprodutibilidade dos exoantígenos	67
4.3.2 Reatividade de diferentes extratos antigênicos de <i>L. (L.) chagasi</i>	68
4.3.3 Immunoblotting de <i>L. (L.) chagasi</i>	69
4.3.4 Reprodutibilidade do IBleish- <i>L. (L.) chagasi</i>	71
4.4 IMMUNOBLOTTING (IBleish-ES) - HOSPEDEIRO CANINO	72
4.4.1 Análise da reatividade do IBleish-<i>L. (L.) chagasi</i>.	73
4.4.2 Análise da reatividade cruzada do IBleish-<i>L. (L.) chagasi</i>	73
4.4.3 Perfil de reatividade de cães com suspeita de leishmaniose por IBleish- <i>L. (L.)chagasi</i>	75
4.5 IMMUNOBLOTTING (IBleish-ES) - HOSPEDEIRO HUMANO	77
4.5.1 Análise da reatividade cruzada do IBleish-ES	79
5 DISCUSSÃO	82
5.1 ELISA-HOSPEDEIRO HUMANO	82
5.2 ELISA-HOSPEDEIRO CANINO	90
5.3 IMMUNOBLOTTING-HOSPEDEIRO CANINO	95
5.4 IMMUNOBLOTTING-HOSPEDEIRO HUMANO	100
6 CONCLUSÕES	103
6.1 HOSPEDEIRO HUMANO	103
6.2 HOSPEDEIRO CANINO	104
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	105

1 INTRODUÇÃO

1.1 Etiologia e Epidemiologia das Leishmanioses

O grupo de doenças conhecidas como “Leishmanioses” são causadas por protozoários intracelulares heteroxenos da Ordem *Kinetoplastida*, família *Trypanosomatidae*, gênero *Leishmania*. De acordo com a evolução dos parasitas no trato digestivo do inseto o gênero *Leishmania* foi dividido em dois subgêneros *Leishmania* e *Viannia*. Enquanto o subgênero *Leishmania* apresenta o seu desenvolvimento restrito à porção anterior e média, o subgênero *Viannia* apresenta o seu desenvolvimento desde o intestino posterior até a porção anterior do tubo digestivo (LAINSON E SHAW, 1987).

Aproximadamente 20 espécies de *Leishmania* são patogênicas para o homem (LAINSON e SHAW, 1987). Os insetos do gênero *Phlebotomus* são os responsáveis pela transmissão natural do parasita no Velho Mundo e os do gênero *Lutzomyia* no Novo Mundo (SUNDAR e RAI, 2002).

A “Leishmaniose” pode apresentar diferentes formas clínicas como: cutânea (LC), mucocutânea (LMC) e visceral (LV) ou Calazar (da expressão indiana “kala-azar”), sendo que no pós tratamento da LV podemos encontrar uma manifestação cutânea conhecida como “pós-kala-azar” ou leishmaniose dérmica (LDPK) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, doravante citada como WHO, 2009).

Atualmente a leishmaniose é considerada, pela Organização Mundial de Saúde, a segunda doença tropical mais importante depois da malária, por apresentar altos índices de morbidade e mortalidade (WHO, 2001).

A doença é prevalente em 88 países e endêmica em 65 deles, de acordo com dados da WHO (Figura 1). Cerca de 90% dos casos notificados ocorrem na Índia, Sudão, Bangladesh, Nepal e Brasil com uma incidência anual de 500.000 (DESJEUX, 2004a; WHO, 2009).

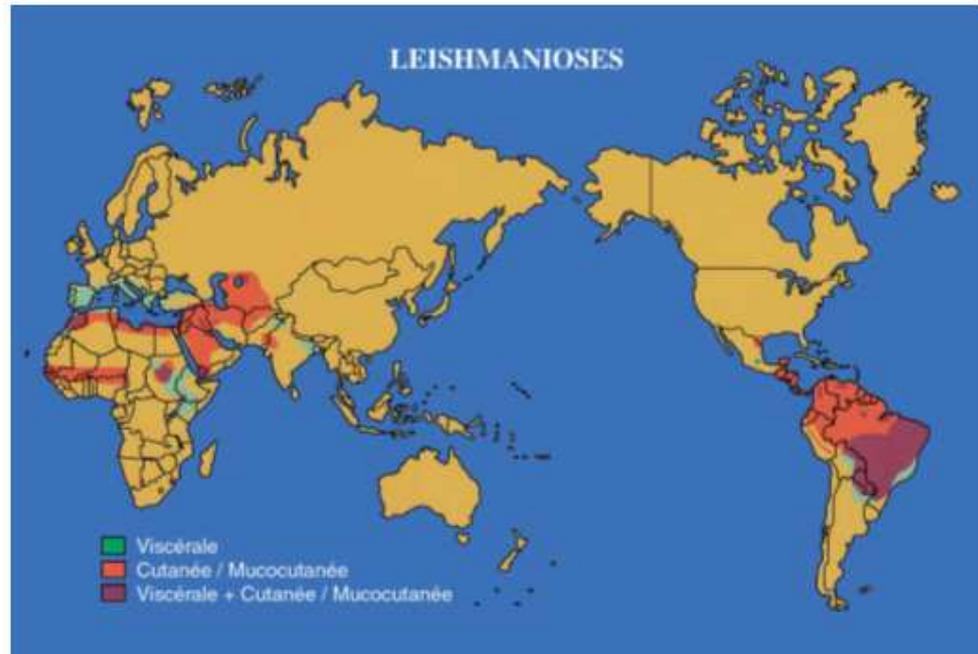


Figura 1- Distribuição das diferentes formas de Leishmaniose no Mundo, 2001.
 Fonte: <http://www.wehi.edu.au/research/divisions/inf/labs/handman/leishmaniasis.html>

1.1.1 Leishmaniose visceral

A Leishmaniose visceral (LV) é uma doença crônica, debilitante caracterizada pela infecção do sistema fagocítico mononuclear. Três espécies de *Leishmania* pertencentes ao complexo *Leishmania donovani* são causadoras da doença visceral no mundo, a *Leishmania (Leishmania) chagasi* nas Américas; a *Leishmania (Leishmania) donovani* na Ásia e África e a *Leishmania (Leishmania) infantum* na Ásia, Europa e África (LAINSON e SHAW, 1987).

Clinicamente a Leishmaniose visceral humana (LVH) pode ser classificada em: 1) assintomática ou inaparente; 2) forma oligossintomática ou subclínica e 3) forma sintomática ou clássica, podendo variar desde manifestações discretas até graves, que sem tratamento podem ocasionar a óbito (MINISTÉRIO DA SAÚDE, doravante citada como MS, 2008).

Nos países onde a doença se comporta como uma zoonose, o cão é considerado o principal reservatório doméstico, sendo que a Leishmaniose visceral canina (LVC) já foi registrada em 50 dos 65 países onde é endêmica ao homem (LVH) (FERREIRA et al., 2007). Os cães infectados podem ser classificados em: assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos. Os assintomáticos representam 57% dos infectados nas áreas endêmicas,

sendo aparentemente cães sadios (GENARO, 2003; GONTIJO e MELO, 2004). A Leishmaniose visceral além de afetar milhões de cães em diferentes áreas da Europa, Ásia, África do Norte e América do Sul vem sendo considerada como emergente na América do Norte (ROSYPAL et al., 2003).

Na América Latina, a LV é endêmica ou fator de risco em várias áreas da Argentina, Bolívia, Brasil, Colômbia, Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras, México, Nicarágua e Venezuela. No Brasil, não obstante a presença de um programa de controle e vigilância a LV é um problema de saúde pública e encontra-se em franca expansão geográfica atingindo 20 estados, com aproximadamente 3.000 casos/ano e letalidade média de 8% (MS, 2008). Além disso, o país aparece nas Américas, como a região onde se registra a maioria dos casos de acordo à Organização Panamericana da Saúde (PAHO,2005).

Em meados dos anos 80 observou-se uma transformação drástica na distribuição geográfica desta zoonose. Inicialmente era considerada de transmissão silvestre e restrita às regiões norte e nordeste com características de ambientes rurais (GONTIJO e MELO, 2004; ALVES e BEVILACQUA, 2004). Nesta época a raposa era tida como o principal reservatório da *L. (L.) chagasi*.

Atualmente, a LV está em expansão para as áreas periurbanas e urbanas, alcançando inclusive a periferia de grandes centros urbanos como São Paulo (GONTIJO e MELO, 2004). A principal espécie transmissora é a *Lutzomia longipalpus* (DEANE e DEANE, 1954), e o cão doméstico (*Canis familiaris*) o principal reservatório nas áreas urbanas e rurais (PARANHOS-SILVA et al., 1996; RAMIRO et al., 2003). A este fato deve-se o grande número de casos da doença em cães e o intenso parasitismo cutâneo observado nestes animais (COSTA et al., 1999), tornando-os as principais fontes de infecção para os vetores (SLAPPENDEL e TESKE, 1999; GENARO, 2003).

No Estado de São Paulo a LV, até 1998 era conhecida pela detecção de casos oriundos de outras regiões endêmicas do país. A partir de então, registrou-se a enzootia canina no Município de Araçatuba, região oeste do Estado de São Paulo, na qual se identificou a *L. (L.) chagasi* por meio de técnicas moleculares. Posteriormente, em 1999, registrou-se o primeiro caso humano de LV no estado e desde então a doença vem ocorrendo em municípios situados na região do planalto ocidental paulista, nos quais a transmissão tem feição exclusivamente urbana (GALIMBERTTI et al., 1999; CAMARGO-NEVES e KATZ, 1999). Até o mês de fevereiro de 2008, segundo a situação epidemiológica para a LV,

dos 645 municípios paulistas, 63 (9,8%) registraram transmissão da LV (humana/e ou canina) (Figura 2). No entanto, não se verificou expansão para novas regiões do Estado (SÃO PAULO, 2008).

A Leishmaniose visceral já foi identificada em canídeos domésticos e silvestres, marsupiais, roedores e também em gatos domésticos (BANETH, 2006). Não se tem prestado muita atenção na doença em gatos pela dificuldade de seu diagnóstico, podendo os felinos ter maior resistência à doença (ZANELLA, 2007). Nos últimos anos as pesquisas têm dado ênfase à doença em cães, pois seu diagnóstico ajuda a traçar a rota de expansão da doença (MOLINA et al., 1994; ZANELLA, 2007).

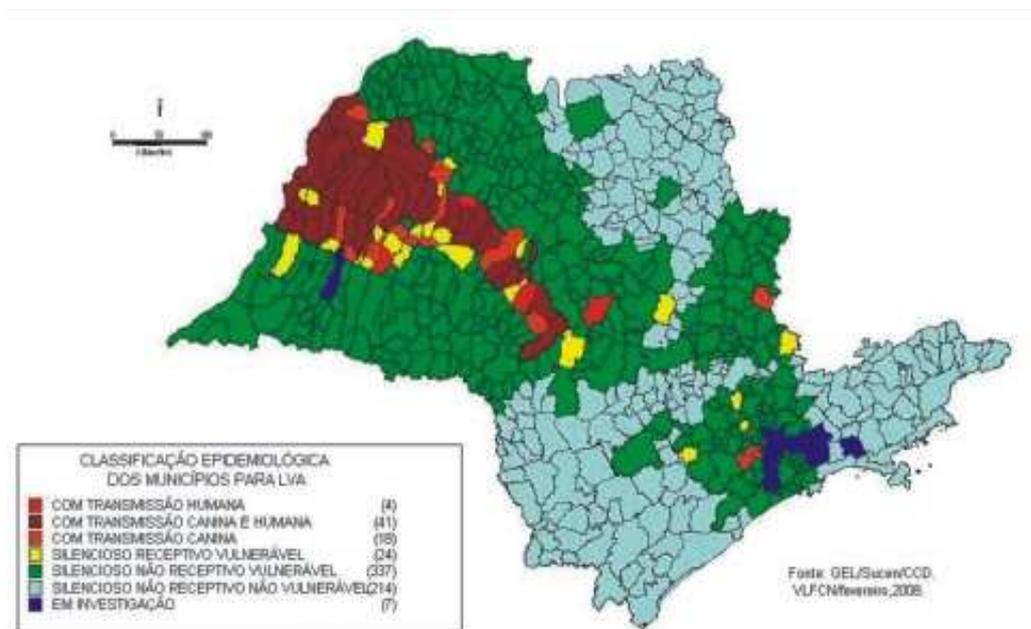


Figura 2- Distribuição dos municípios do Estado de São Paulo segundo a classificação epidemiológica para leishmaniose visceral, em fevereiro /2008.
Fonte: GEL/Sucen/CCD. VLFCN/ fevereiro, 2008.

1.2 Aspectos de imunidade e controle da Leishmaniose visceral

A saliva do vetor exerce relevante papel, tanto de caráter biológico quanto parasitológico. Do ponto de vista parasitológico, a saliva veicula as formas infectantes (promastigotas metacíclicas). Em relação aos aspectos biológicos destacam-se os componentes neuropeptídeos de ação vasodilatadora e imunossupressora, que facilitam a introdução do aparelho bucal e estimulam o aporte sanguíneo, facilitando assim a hematofagia, bem como, a inibição da resposta imunológica e conseqüentemente, o estabelecimento do parasita no hospedeiro (GENARO, 2003). Um dos componentes da saliva, o maxidilan, além de vasodilatador e imunossupressor, parece inibir a apresentação de antígenos pelos macrófagos. A saliva é responsável também pelo prurido verificado logo após a picada (NEVES, 2003).

Após a picada, se inicia a resposta imune juntamente com um processo inflamatório inespecífico. Os mecanismos imunológicos que regulam a susceptibilidade ou resistência ao parasitismo por *Leishmania* spp permanecem obscuros. Com base em estudos experimentais de camundongos infectados com *L. major*, sabe-se que macrófagos apresentam antígenos aos Linfócitos TCD₄⁺, ocasionando a polarização da resposta imune e formando a base para o paradigma, Th1/Th2, com clara associação à proteção gerada pela resposta Th1 e susceptibilidade pela resposta Th2. Paralelamente a sobrevivência da *Leishmania* depende da evasão ao sistema imune do hospedeiro, sendo esse parasita altamente adaptado ao escape da imunidade humoral e celular (ZAMBRANO-VILLA et al., 2002).

Camundongos geneticamente suscetíveis desenvolvem lesões cutâneas no sítio de inoculação e falham no desenvolvimento de resposta imune ao parasita mediada por células; já os camundongos resistentes parecem curar-se rapidamente, graças a uma forte resposta imune celular, com resistência a novas infecções (AWASTHI et al., 2004). Assim, em camundongos experimentalmente infectados, cães naturalmente infectados ou seres humanos, a proteção ou resistência esta associada com a resposta polarizada para células Th1. Enquanto a resposta Th2 esta associada à susceptibilidade ou gravidade da doença (sintomáticos) (DAY, 2007).

No entanto, esse modelo imunológico não pode ser integralmente aplicado a Leishmaniose visceral humana, nem às infecções experimentais em camundongos e cães por *L. infantum*. Nestas últimas situações, uma mistura de resposta Th1-Th2 ou de outros subgrupos de células T estão provavelmente envolvidas (SOLANO-GALLEGO et al., 2001b). Todavia a resposta celular do hospedeiro é importante para o desenvolvimento da resistência e autocura, enquanto o desenvolvimento de anticorpos específicos tem pouco ou nenhum papel na proteção contra a doença (BOGDAN e ROLLINGHOFF, 1998; LOUIS et al., 1998).

A LV induz imunidade caracterizada por elevação nos níveis de imunoglobulinas séricas, principalmente IgG, e fraca resposta imune celular. Esta exacerbação dos níveis de IgG acarreta hipergamaglobulinemia que aumenta gradativamente e não se traduz em regressão da doença (NEVES, 2003).

Em conclusão, a resposta humoral não é considerada útil em conferir resistência à infecção, e sim em caracterizar humanos e animais sensíveis, na maioria das vezes sintomáticos (PINELLI et al., 1994).

Atualmente, o Ministério da Saúde por intermédio da Fundação Nacional de Saúde (FUNASA) e de Secretarias Estaduais e Municípios de Saúde, realiza o programa de Controle da LV centrado nas seguintes medidas: diminuir a densidade populacional do vetor, detecção e eliminação dos cães soropositivos, identificação e tratamento dos doentes (BRASIL, 2003).

A medida de controle para o reservatório canino acarreta profundo impacto com indignação dos proprietários, uma vez que o cão ocupa papel de “membro da família”, tornando-se medida difícil de ser adotada pelas autoridades de saúde pública (FEIJÃO et al., 2001). O mais grave, porém, são os resultados obtidos com a eliminação dos animais, questionáveis em relação ao controle da doença (DIETZE et al., 1997; COUTERNAY et al., 2002).

A descoberta de vacinas para humanos e cães seria a mais eficiente medida de controle para a LV (DYE, 1996). A existência de uma vacina eficaz para a doença canina poderá ter um impacto na diminuição da prevalência da infecção canina e, conseqüentemente, da humana (MARZOCHI et al., 1985; HOMMEL et al., 1995).

Recentemente, vacina baseada no ligante de fucose-mannose (FML) foi registrada pelo Ministério da Agricultura para uso veterinário no Brasil, e animais vacinados

apresentaram forte resposta imune humoral logo após o protocolo de vacinação. No entanto, a utilização desta vacina criou problema específico para levantamentos soropidemiológicos e por consequência nas campanhas de erradicação, já que, os testes sorológicos baseiam-se na detecção de IgG total, ficando impossível distinguir animais infectados de vacinados. Devido a essa problemática, muitos estudos atualmente estão sendo conduzidos para o desenvolvimento de um teste sorológico específico e discriminatório de subclasses de IgG, que poderia fornecer informações sobre a imunopatogênese natural do hospedeiro (humano e canino) (OLIVEIRA et al., 2009).

Frente a tais problemas o Ministério da Saúde determinou em nota técnica a proibição do uso da vacina e que os animais soroconvertidos em virtude deste uso, são passíveis de eutanásia, conforme o programa de controle de Leishmaniose visceral de 2003 (MS, 2003).

1.3 Diagnóstico da Leishmaniose visceral

O diagnóstico definitivo da LV no homem baseia-se nos exames clínicos, aliados a dados epidemiológicos e exames laboratoriais. Muitas doenças podem ser confundidas com a LV no hospedeiro humano, destacando-se a enterobacteriose de curso prolongado (associação de esquistossomose com salmonela ou outra enterobactéria), cujas manifestações clínicas se superpõem, perfeitamente, ao quadro da Leishmaniose visceral (MS, 2008).

Em muitas situações, esse diagnóstico diferencial só pode ser concluído por meio de provas laboratoriais, já que, as áreas endêmicas de outras doenças como malária, brucelose, febre tifóide, esquistossomose hepatoesplênica, doença de Chagas aguda, linfoma, mieloma múltiplo, anemia falciforme entre outras, se superpõem em grandes faixas do território brasileiro (MS, 2008). Segundo o Ministério da Saúde (2008) um caso humano de LV é definido como:

- a) suspeito: todo indivíduo proveniente de área onde existe transmissão, apresentando febre e esplenomegalia, ou todo indivíduo de área sem ocorrência de transmissão com febre e esplenomegalia, desde que descartados outros diagnósticos mais frequentes na região.

- b) confirmado: os casos suspeitos devem ser confirmados pelo critério clínico-epidemiológico ou laboratorial. O critério clínico-epidemiológico é estabelecido naqueles pacientes sem confirmação laboratorial, porém que são provenientes de área com transmissão de LV e com resposta favorável ao teste terapêutico. O critério laboratorial baseia-se no encontro do parasita pelo exame direto, cultura ou imunofluorescência com título acima de 1:80.

Na LV o diagnóstico laboratorial precoce é necessário para que os casos humanos recebam atendimento rápido, visando tratamento adequado e acompanhamento. Para os cães, eutanásia é recomendada em todos animais sororreagentes em imunofluorescência, ou seja, títulos a partir de 1:40 e/ou com exame parasitológico positivo (MS, 2008).

1.3.1 Diagnóstico parasitológico

Os exames parasitológicos são considerados métodos de referência no diagnóstico da LV. São simples, baratos e necessitam de pessoal bem treinado para a detecção do parasito. Existe variação de sensibilidade entre 50% a 98% no método parasitológico de acordo com o tecido pesquisado, podendo ocorrer resultados falsos negativos (MACHADO DE ASSIS et al., 2008). Além disso, uma desvantagem desses métodos baseia-se em alguns casos, na necessidade de procedimentos invasivos para coleta e obtenção das amostras, como aspirados de medula óssea e baço. (DA SILVA et al., 2004). A detecção dos parasitas pelo exame microscópico (método direto) é dependente da presença abundante dos mesmos na amostra, (IKEDA, 2004) de sua distribuição heterogênea (SCHALLIG, et al., 2002), da fase evolutiva da doença, técnica utilizada e pesquisador (FERREIRA e AVILA, 2001). Métodos que empregam o cultivo do parasita apresentam melhor sensibilidade, como por exemplo, cultivo de aspirado medular aumenta a positividade e a segurança do diagnóstico (GENARO, 2003). O crescimento se dá dependendo tanto da espécie do parasito quanto do meio de cultura utilizado (NAVIN et al., 1990). Apesar da melhora na sensibilidade, a demora para a obtenção dos resultados dificulta o diagnóstico precoce e o início do tratamento (GUERIN et al., 2002).

1.3.1.1 Métodos moleculares na detecção do parasito

A partir de 1980, várias técnicas de biologia molecular foram desenvolvidas com o objetivo de detectar e identificar DNA dos parasitas do gênero *Leishmania* (GONTIJO e MELO, 2004). Atualmente, para este fim, existem diversos sistemas baseados na utilização da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR - polymerase chain reaction) (SILVA et al., 2001; DEBORGGRAEVE et al., 2008), incluindo o teste quantitativo transcriptase reversa (RT-PCR, quantitative reverse transcriptase - polymerase chain reaction) (PAIVA et al., 2004; QUARESMA et al., 2009). O melhor alvo para PCR e sondas de DNA tem sido amostras de minicírculo de kDNA da região conservada ou amplificação do minicírculo completo (GONTIJO e MELO, 2004). Diferentes tipos de amostras biológicas, tais como, aspirados esplênicos, de medula óssea, de linfonodos, sangue total, camada leucocitária, cultura e sangue coletado em papel filtro, podem ser utilizados como fonte de material para as reações (TAVARES et al., 2003).

A PCR tem apresentado maior sensibilidade quando comparada á métodos parasitológicos ou até mesmo sorológicos clássicos, sem necessidade de isolamento do parasito em cultura. Na maioria das publicações, o método apresenta elevada sensibilidade (acima de 90%) e especificidade diagnóstica de até 100% (WU et al., 1997; DISCH et al., 2003). Entretanto deve ser considerado com cuidado, principalmente nos pacientes provenientes de áreas endêmicas, com alta exposição antigênica (RAVEL et al., 1995). Além disso, esses altos índices podem também ser obtidos com amostras de cães e raposas (CABRAL, 2006). De fato a PCR detém a vantagem de poder ser utilizada, por exemplo, em estudos epidemiológicos com cães assintomáticos em áreas endêmicas (BRASIL, 2003; GENARO, 2003). A eficácia da PCR pode depender de algumas variações e fatores inerentes a técnica, como, por exemplo, a utilização de diferentes métodos de extração de DNA (BRASIL, 2003), iniciadores ou genes alvo de diferentes espécies de *Leishmania* (LACHAUD et al., 2002; ALVES e BEVILACQUE, 2004), amostras (LACHAUD et al., 2001) e protocolos e/ou material biológico coletado (ALVAR et al., 2004; BANETH e AROCH, 2008).

Dificuldades encontradas para a padronização da PCR estão principalmente relacionadas à seleção dos genes alvo e posteriormente iniciadores (primers), fato que influencia diretamente na sensibilidade e especificidade. Além disso, também reações falsas negativas podem ocorrer quando a quantidade de DNA está abaixo da sensibilidade de detecção do teste (MANSUR, 2009).

Enquanto o diagnóstico molecular da LV em humanos pode ser considerado eficiente (LACHAUD et al., 2000), alguns problemas ainda persistem no diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC), como por exemplo, as dificuldades encontradas na preparação do DNA ou a alta frequência de inibidores de PCR em sangue de cães (LACHAUD et al., 2002).

Conforme já citado, apesar de ser um método sensível para a detecção de *Leishmania* em uma variedade de materiais clínicos de humanos e cães, a PCR vem sendo mais utilizada em estudos epidemiológicos ou em nível de pesquisas que avaliam a sua aplicabilidade no diagnóstico de rotina (SOLANO-GALLEGO et al., 2001a, GONTIJO e MELO, 2004). Ainda assim, sua realização é complexa (disponibilidade de reagentes e equipamentos) e apresenta custo elevado, limitação para uso em larga escala e pouca adaptabilidade ao campo (MACHADO DE ASSIS et al., 2008).

1.3.2 Diagnóstico Sorológico

Os testes sorológicos são de extrema importância no contexto do diagnóstico da LV. Atualmente são as ferramentas mais adequadas e alternativa mais realista no auxílio ao controle da LVH, já que, são também muito utilizados em inquéritos epidemiológicos (GONTIJO e MELO, 2004).

O diagnóstico sorológico é favorecido pela expressiva resposta imune humoral que caracteriza a doença. A pesquisa de anticorpos, entretanto, deixa a desejar no que concerne à especificidade (MACHADO DE ASSIS et al., 2008). A escolha do antígeno é de suma importância tanto para o diagnóstico individual da LV, como também para estudos epidemiológicos (BADARÓ et al., 1986). Os antígenos utilizados nos testes diagnósticos são quase sempre derivados de promastigotas de cultura, parasitos intactos ou moléculas solúveis e apresentam reações cruzadas com outras espécies da família *Trypanosomatidae* [*L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis*], mesmo filogeneticamente distantes (*T. cruzi*). Por

tanto, no diagnóstico sorológico da LV é necessário considerar o diagnóstico diferencial com outras doenças (GONTIJO e MELO, 2004).

O emprego de antígenos de espécies de leishmanias diferentes daquelas que não causam a doença têm sido utilizadas no imunodiagnóstico da LV em humanos (BADARÓ et al., 1983; BARBOSA DE DEUS et al., 2002), justificando-se tal uso pela elevada imunorreatividade cruzada entre diferentes espécies do parasita.

Na rotina laboratorial, a técnica mais utilizada para diagnóstico das Leishmanioses é a reação de imunofluorescência indireta (IFI, em inglês Immunofluorescence Antibody Test-IFAT). O teste atualmente é considerado como o “padrão ouro” do diagnóstico sorológico, sendo de fácil execução (MS, 2004). Sua sensibilidade varia de 82 a 95% e especificidade de 78 a 92%, dependendo muito da espécie de promastigotas de *Leishmania* empregada como antígeno (GENARO, 2003; TÁVORA et al., 2007).

A especificidade do IFI é prejudicada pela presença de reações cruzadas com doenças principalmente causadas por outros tripanossomatídeos. De fato apresenta cerca de 85% de reações cruzadas freqüentemente com soros de pacientes chagásicos e leishmaniose tegumentar, o que de certa forma prejudica o seu uso em regiões onde estas doenças se sobrepõe (GENARO, 2003; GONTIJO e MELO, 2004). Observaram-se também reações cruzadas, porém menos freqüentes com outras doenças como: tuberculose pulmonar, hanseníse (MS, 2004), malária e esquistossomose (SUNDAR e RAI, 2002). Com o objetivo de melhorar os índices imunodiagnósticos da IFI, Fernández-Pérez et al. (1999) utilizaram as formas amastigotas de *L. (L.) donovani* como antígeno e encontraram aumento significativo de especificidade, sem perda de sensibilidade. A cultura das formas amastigotas, entretanto, é complicada e de custo elevado, não sendo possível em laboratórios sem recursos técnicos ou financeiros.

Outra técnica muito utilizada é o ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), um teste rápido, sensível, de fácil execução e leitura, tendo se tornado importante para sorodiagnóstico desde o seu desenvolvimento em 1972 por Engvall e Perlmann (1971), e suas aplicações para o diagnóstico de doenças tropicais em 1977 por Völler e colaboradores, e para LV em 1978 por Hommel e colaboradores.

Muitos estudos avaliando e aprimorando o ELISA-padrão, assim como suas diversas variações: Dot-ELISA, fucose manose ligant-ELISA (FML-ELISA), bovine submaxillary mucin-ELISA (BSM-ELISA), Fast-ELISA, micro ELISA, entre outras, foram desenvolvidas e adaptadas

para uso com vários tipos de antígenos. Os principais antígenos utilizados são extratos de parasita total, antígenos purificados, peptídeos sintéticos, e até proteínas recombinantes, todos com a finalidade de melhorar o diagnóstico da Leishmaniose visceral humana (HOMMEL et al., 1978; PAPPAS et al., 1983; PAPPAS et al., 1985; CABRERA et al., 1999).

O ELISA, porém, que, utiliza extratos de formas promastigotas do parasita como antígeno é limitado quanto aos índices de sensibilidade e especificidade, principalmente devido à ocorrência das reações cruzadas com indivíduos com doença de Chagas e leishmaniose tegumentar (BADARÓ et al., 1986; REED et al., 1987; VEXENAT et al., 1996; SUNDAR e RAI, 2002).

Buscando aumentar a sensibilidade e principalmente a especificidade dos testes de diagnósticos para LVH, muitas moléculas foram purificadas para obtenção de proteínas recombinantes específicas do gênero *Leishmania* como, por exemplo, as glicoproteínas de membranas (gp63, gp72, gp70) e: rk39, SLA, rGBP, H2A, H2B, rLACK, rP20, rPSA-2 e A2; (HO et al., 1983; SHREFFLER et al., 1993; BADARÓ et al., 1996; JENSEN et al., 1999; CARVALHO et al., 2002; MAALEJ et al., 2003). Algumas destas proteínas recombinantes diminuíram a reatividade cruzada, mas também a sensibilidade do teste (GONTIJO e MELO, 2004).

No entanto, o uso de proteínas recombinantes não aboliu as reações cruzadas com *T. cruzi*. (MOHAMMED et al., 1986; JAFFE et al., 1988; BADARÓ et al., 1996; OZENZÖY, 1998). Também, obtenção das proteínas recombinantes é limitada aos laboratórios de estudo, e ainda sua comercialização nos países endêmicos é pouco acessível (UMEZAWA et al., 1996a).

Baleeiro e colaboradores (2006) demonstraram que variação na espécie de *Leishmania* para a preparação do antígeno pode influenciar significativamente no resultado do ELISA. Eles mostraram que a utilização de antígenos preparados a partir de *L. (L.) amazonensis* ou *L. (V.) braziliensis*, em vez de *L. (L.) chagasi* resultou em diminuição da reatividade com soros de cães, resultado que poderia refletir na detecção de anticorpos anti-leishmania nos humanos.

Muitos pesquisadores baseados na elevada homologia genética das espécies de *Leishmania* e alta reatividade cruzada, acreditam, ser motivos suficientes para empregar diferentes espécies de *Leishmania* no diagnóstico da LV humana e canina (BARBOSA DE DEUS et al., 2002; LIRA et al., 2006).

Outra técnica muito utilizada para o diagnóstico da LV é o Immunoblotting (IB). Com sensibilidade reconhecidamente mais elevada do que a IFI e o ELISA, permite diagnóstico

precoce da LV, e poderia ser utilizada como preditivo da doença e do parasitismo no cão e humanos (EVANS et al., 1989; MARY et al., 1992; MARTY et al., 1995; CARDEÑOSA et al., 1995; AISA et al., 1998; SANTOS-GOMES et al., 2000; KUMAR et al., 2002; DE PAULA et al., 2003; NOGUEIRA et al., 2007).

O immunoblotting (IB) permitiu identificar algumas das diferentes proteínas presentes no gênero *Leishmania* durante o ciclo de vida, o que vem sendo motivo de estudo, visto que, muitas delas são de importância na relação parasita hospedeiro, estando implicadas em diversas funções como virulência, patogênese, replicação, nutrição, evasão imune entre outras (CHAUDHURI e CHANG, 1988; MEDINA ACOSTA et al., 1989; HEY et al., 1994; CIBRELUS et al., 1999; McGWIRE et al., 2003).

Estudos com os antígenos totais de *L. donovani infantum* mostraram a existência de bandas reconhecidas por anticorpos, de peso molecular que variam de 12 a 120 kDa. Entretanto apenas as proteínas de 14, 16, 18, 21, 23, 31, 65, 70 e 94 kDa se mostraram específicas e, portanto, importantes para o diagnóstico tanto da LVH quanto da LVC (MARY et al., 1992; MARTY et al., 1995; ROLLAND et al., 1995; AISA et al., 1998; SALOTRA et al., 1999; KUMAR et al., 2002; DE PAULA et al., 2003; NOGUEIRA et al., 2007). Até agora o potencial interesse do immunoblotting para diagnóstico da LV continua sendo discutido, visto que, ainda não há um consenso geral de um padrão definido correlacionado com a infecção e doença ativa (DA COSTA et al., 1996; MAIA e CAMPINO, 2008).

1.4 Situação do diagnóstico da Leishmaniose visceral no cão

A identificação de cães infectados (soropositivos) e sua eliminação (eutanásia) é uma das medidas de controle preconizadas pelo Ministério da Saúde, para reduzir a infecção humana, já que, casos de calazar canino precedem os humanos em áreas urbanas do Brasil (PARANHOS-SILVA et al., 1996; GALIMBERTTI et al., 1999).

Vários estudos têm considerado o papel do cão doméstico na transmissão da Leishmaniose visceral humana (LVH), o mais importante achado que surgiu de tais investigações é que cães infectados com LVC parecem estar em perfeita saúde (assintomáticos), ou alternativamente, eles podem apresentar sintomas leves, moderados ou graves (MANCIANTI e MECIANI, 1988).

O êxito no diagnóstico da LV em cães é difícil, uma vez que os sinais clínicos da doença são variados e não-específicos (ALVAR, et al., 1994; MOLINA, et al., 1994). Parte das dificuldades com as medidas de controle diz respeito à sensibilidade e especificidade dos atuais testes sorológicos utilizados na rotina laboratorial (IFI e ELISA) para caracterizar infecção e doença. A sensibilidade desses testes é bastante discutível, não havendo concordância entre testes parasitológicos, imunohistológicos com os sorológicos. Atribui-se essa discordância à incapacidade dos testes sorológicos detectarem em anticorpos nas várias fases da doença. Tal fato apresenta sérias conseqüências, pois implica na morte de animais (CABRERA et al., 2003).

No Brasil, os inquéritos sorológicos para identificação de cães infectados com LVC são realizados com testes comerciais. Os mais utilizados são os testes de IFI e ou ELISA produzidos pelo Instituto Bio-Manguinhos, Fundação Oswaldo Cruz-RJ, que utilizam como antígeno, respectivamente promastigotas e extrato total de *Leishmania major-like* (espécie que causa Leishmaniose cutânea). Estes testes são amplamente empregados pelo Ministério da Saúde e, baseiam-se exclusivamente na detecção de anticorpos anti-leishmania, não avaliando a carga parasitária. Podem, portanto, apresentar as dificuldades já citados anteriormente, com a presença de falso-negativos e falso-positivos (MANSUR, 2009). Para aumentar a sensibilidade e especificidade do diagnóstico no cão na triagem à realização combinada dos dois testes (ELISA e IFI), em vez de realizar apenas IFI (MS, 2004).

Em animais com resultados discordantes entre as metodologias, o mais indicado é considerar o quadro clínico do animal e repetir o exame após um mês. Pode-se, ainda, realizar o exame parasitológico direto e ou PCR. É importante ressaltar que resultados negativos nestas metodologias não devem ser usados como confirmatórios (ALVAR et al., 2004; BANETH e AROCH, 2008).

Por outro lado, a utilização da sorologia é questionável, animais saudáveis podem ser soropositivos, e animais infectados ocasionalmente se tornam soronegativos, dificultando o uso destas técnicas. A sorologia mostra que animais infectados desenvolvem uma resposta específica de anticorpos, e a proporção de soroconversão entre animais com infecção clínica ou subclínica é desconhecida (CABRAL, 2006).

Alguns autores têm relatado aumento na sensibilidade dos testes imunológicos anti-Leishmania usando cepas do mesmo parasita (BADARÓ et al., 1986) ou da espécie (REED et al., 1986) associada à infecção, como fontes de antígenos.

Na rotina diagnóstica, porém, diferentes espécies de *Leishmania* daquelas implicadas na gênese da doença são utilizadas como fonte de antígenos (PARANHOS-SILVA et al., 2001; ZIJLSTRA et al., 2001; EL-SAFI et al., 2002; BORGES et al., 2003).

Recentemente, para o diagnóstico da LVC, ELISA com “pool” de exoantígenos de formas promastigotas de diferentes espécies mostrou melhor sensibilidade e especificidade quando comparado ao emprego individual da cada antígeno (RAJASEKARIAH et al., 2008).

Por outro lado, estudos recentes sugeriram o emprego de Immunoblotting (IB) para melhorar a sensibilidade, sugerindo a possibilidade da sua utilização como preditora da doença e do parasitismo no cão. Provavelmente os cães positivos para o IB e negativos para o IFI ou ELISA, sejam animais resistentes que apresentam baixos níveis de anticorpos (DE PAULA et al., 2003; DA SILVA et al., 2005). Com relação ao estudo do reconhecimento antigênico a técnica de IB, mostrou maior sensibilidade em comparação à IFI; 26% dos cães que estavam negativos para IFI, apresentavam para IB reatividade para frações antigênicas (29 e 32 kDa), até 8 meses antes da soroconversão, sendo que alguns permaneceram negativos até o fim do acompanhamento (DA SILVA et al., 2005).

Outra questão que deve ser considerada no hospedeiro canino é também a intensa reatividade cruzada com outros agentes infecciosos, principalmente *T. cruzi*, *Ehrlichia canis* e *Babesia canis* (FERREIRA et al., 2007), resultando em testes com baixa especificidade. Além disso, sobretudo no hospedeiro canino, animais infectados assintomáticos podem apresentar resultado falso-negativos devido a baixa sensibilidade dos testes (SALOTRA et al., 2002; MAIA e CAMPINO, 2008). De fato a prevalência da infecção em áreas endêmicas, muitas vezes é subestimada, quando animais assintomáticos não são incluídos nos grupos de estudo para serem considerados nas medidas de controle.

1.5 Moléculas excretadas-secretadas pelas leishmanias

Durante o ciclo de vida, as espécies de *Leishmania* secretam vários antígenos, que poderiam estar diretamente implicados em muitas alterações imunológicas ou bioquímicas da célula hospedeira (CIBRELUS et al., 1999).

Substâncias antigênicas solúveis secretadas por amastigotas de *L. donovani* foram detectadas pela primeira vez por Nattan-Larrier e Grimard-Richard em 1933, em soro de cachorros infetados com LV.

Mais trabalhos apareceram durante a década de sessenta; caso de Adler e Gunders (1964) que demonstraram a liberação de "exoantígenos" por *L. tropica* e *L. mexicana* (amastigotas e promastigotas) o que foi em seguida confirmado por Sergeiev e Shuikina (1969) para *L. tropica*.

Mais tarde, em 1972 Schnur, Zuckerman e Greenblatt, demonstraram que as formas promastigotas da *L. donovani* e de outras espécies do gênero *Leishmania*, secretam no meio de cultura os chamados fatores de excreção (EF – excreted factor), durante e logo após a fase logarítmica do seu crescimento "*in vitro*". As formas amastigotas também produzem os EFs. Estes EFs comportam-se como haptenos, pois, quando inoculados em coelhos não levam à produção de anticorpos.

De acordo com Schnur e Zuckerman (1976) os EFs são capazes de precipitar "*in vitro*", anticorpos anti-promastigota produzidos em coelhos, e mostraram-se espécie específicos, servindo como base para a "sorotipagem" de amostras das espécies do gênero *Leishmania*.

El-On em 1979 realizou uma análise bioquímica do EF e encontrou riqueza em carboidratos associado a outro componente do parasita que podem precipitar anticorpos anti-promastigota produzido em coelhos.

Em 1981 Semprevivo e MacLeod conseguiram demonstrar que os EFs excretados pelas formas promastigotas de *L. donovani* em meio de cultura são moléculas complexas, que têm em sua constituição carboidratos, peptídeos, fósforo, lipídeos e esfingosina. Referiram-se ao fato de que moléculas de constituição semelhante são encontradas na membrana plasmática de *T. cruzi*, *Acanthamoeba castellanii* e plantas.

Posteriormente ficou demonstrado que os parasitas do gênero *Leishmania* apresentam na membrana plasmática um denso glicocálix composto de: lipofosfoglicana (LPG – "lipophosglycan"), glicosilinositolfosfolípidos (GIPLs – "glycosylinositolphospholipids"), glicoproteínas e fosfatases ácidas secretadas conservadas (SACPs – "secretatory acid phosphatases") (FERGUSON, 1997,1999; TURCO, 2003).

A LPG é uma das mais abundantes moléculas da superfície celular do parasita inteiro (promastigota e amastigota), incluindo o flagelo. Esta molécula encontra-se em todas as espécies do gênero *Leishmania* que infectam humanos (McCONVILLE e FERGUSON, 1993),

com exceção de *L. major* que no estágio de amastigota expressa pouco ou nenhum LPG (MOODY et al., 1993).

A LPG tem diferentes funções nos hospedeiros vertebrados, por exemplo, alguns experimentos "*in vitro*" mostraram que esta molécula confere proteção aos promastigotas de *Leishmania* contra lise mediada por complemento e atua como receptor mediando a endocitose por macrófagos. Além disso, dentro do macrófago a LPG atua inibindo o "burst" oxidativo e a fusão endosoma-fagosoma. Desta forma foi relacionada como um fator de virulência principalmente na interação com o hospedeiro vetor (TURCO e DESCOTEAUX, 1992; TURCO, 2003).

Os GIPLs expressos abundantemente no estágio de promastigotas são uma grande família de glicolipídeos de baixo peso molecular, sintetizada por o gênero *Leishmania* que formam camadas densas na superfície do parasita, acima do qual se projetam outras moléculas ancoradas por glicofosfolipídeos (GPI – “glycophospholipids”) (FERGUSON, 1997, 1999; TURCO, 2003). Ainda não é muito conhecido o papel desempenhado por esses glicolipídeos na interação parasita-hospedeiro, porém o uso de receptor de manose para ligação da *Leishmania* a macrófagos sugere que os GIPLs ricos em manose possam ter papel importante na invasão celular (TURCO, 2003). Os GIPLs estão também presentes em outras espécies de tripanosomatídeos como, por exemplo: *Leptomonas samueli* (PREVIATO et al., 1992) *Endotrypanum schaudinni*, *Herpetomonas samuelpeessoai* (ROUTIER et al., 1995) e *Crithidia fasciculata* (SCHENEIDER et al., 1996), com estrutura semelhante aos de *Leishmania* spp e *T. cruzi* (TURCO, 2003). Essa estrutura corresponde a um motivo comum definido como Man alpha 1-4GlcN alpha 1-6-myoinositol-1-HPO4-lipídio (FERGUSON, 1997), molécula que poderia ser a responsável pela reatividade cruzada encontrada entre estes tripanosomatídeos proximamente relacionados.

Outra molécula, importante presente na membrana das leishmanias é a gp63 ou leishmanolisina (do inglês Leishmanolysin) é uma glicoproteína enzimática do tipo metaloprotease conservada nas diferentes espécies (ETGES, BOUVIER e BOURDIER, 1986; MEDINA-ACOSTA et al., 1989). É expressa em amastigota e mais abundantemente em promastigota, podendo ser excretada-secretada nos ambientes extracelulares (MEDINA-ACOSTA et al., 1989; MCGWIRE et al., 2002; JAFFE e DWYER, 2003). Esta molécula está presa à membrana por âncoras de GPI (DESCOTEAUX e TURCO, 1999), e sua função não é clara, mas está relacionada à virulência do parasita e resistência lise mediada por complemento

(BRITTINGHAM et al., 1995). Recentemente alguns estudos com metaloproteases, como a gp63 tem demonstrado o potencial das mesmas como alvos para agentes quimioterápicos (CHENIK et al., 2006) ou na elaboração de vacinas (BEVERLEY et al., 2005, CHENIK et al., 2006).

As fosfatases ácidas secretadas conservadas (SACPs) são outras proteasas sintetizadas e liberadas por varias espécies de *Leishmania* presentes em abundância nas formas promastigotas (GOTTLIED e DWYER, 1982; BATES e DWYER, 1987), com exceção de *L. major* (DOYLE e DWYER, 1993). Ellis e colaboradores em 1998 nos seus experimentos com soros de pacientes com Leishmaniose cutânea infectados com *L. tropica*, *L. major*, *L. mexicana* e *L. braziliensis* mostraram que todos possuíam anticorpos anti-SACPs. Os autores também concluíram que os amastigotas destas espécies produzem SACPs, e indicaram a conservação estrutural desta enzima entre estas espécies de *Leishmania*. A presença de SACPs nas diversas espécies de *Leishmania* leva a hipótese de que estas moléculas desempenham um importante papel na sobrevivência da parasita dentro do hospedeiro humano (ELLIS, SHAKARIAN e DWYER, 1998).

Outra protease existente na superfície de membrana no estágio de amastigota das leishmanias é uma cisteíno proteinase de 30 kDa (p30) que está associada à resposta imuno celular das células Th1 encontrada em *L. (L) chagasi*. Esta protease permitiu proteção parcial em ratos BALB/c infectados com *L. (L) chagasi* (PINTO et al., 2000). A p30 da *L. (L) chagasi* apresenta similaridade ao antígeno de 30 kDa de amastigotas *L. (L) amazonensis* na resposta protetora em camundongos (BEYRODT et al., 1997). A cisteíno proteinase de 30 kDa já foi descritas também em amastigotas de *L. (L) pifanoi* e outras espécies de leishmanias do complexo *L. mexicana* (COOMBS, 1982; PUPKIS e COOMBS, 1984; ALFIERI et al., 1989).

1.5.1 Diagnóstico com os metabólitos excretados-secretados de *Leishmania*

Como abordado anteriormente diversas técnicas podem ser utilizadas para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana e canina. Apesar dos muitos avanços que ocorreram nos últimos anos e a despeito do grande número de testes disponíveis para o diagnóstico, nenhum apresenta sensibilidade e especificidade desejáveis (GONTIJO e MELO, 2004).

O fraco desempenho dos testes sorológicos utilizados na rotina laboratorial para o diagnóstico da LVH e da LVC pode estar diretamente limitado ao antígeno. Como visto anteriormente, Isso pode ter relação direta com a espécie que se utiliza como antígeno, que muitas vezes é diferente da que infecta o hospedeiro submetido ao teste.

Ao longo dos anos, várias moléculas envolvidas na biologia do parasito ou alvo para anticorpos específicos do hospedeiro como resposta celular foram identificados (FERGUSON, 1999; TURCO, 2003).

Alguns estudos têm demonstrado em doença de Chagas a importância da utilização de antígenos solúveis excretados-secretados designados freqüentemente de exoantígenos ou antígenos “shedados”, que são eliminados para o meio onde o parasita cresce. Estes exoantígenos são principalmente moléculas de superfície da membrana plasmática do parasito, e são importantes na patogenia da doença (UMEZAWA et al., 1996a, 2001). Por exemplo, o uso dos metabólitos excretados-secretados pelas formas tripomastigotas de *T. cruzi* no immunoblotting resultou em teste que pode ser considerado confirmatório para a doença (UMEZAWA et al., 1996a).

Outros estudos mostraram que as moléculas excretadas-secretadas de patógenos intracelulares, como por exemplo, *Mycobacterium tuberculosis* e *Toxoplasma gondii*, contem antígenos altamente imunogênicos e protetores em modelos de vacina (PRIGIONE et al., 2000; SHAMS et al., 2004).

Entre os primeiros trabalhos que mostraram a importância da utilização dos exoantígenos para o diagnóstico da LV, estão os trabalhos de Sergeiev e Shikuna (1969); Schnur e colaboradores (1972), que reportaram que os produtos metabólicos dos promastigotas excretadas ao meio de cultura são imunogênicos ao hospedeiro. Estas moléculas também produzem uma reação de hipersensibilidade na pele sensibilizada de cobaias e humanos (CLINTON et al., 1972).

Mas recentemente, Ellis et al. (1998) usando as fosfatases ácidas secretadas conservadas do meio de cultura de promastigotas de *L. donovani*, precipitaram anticorpos específicos de um pool de soros de pacientes com LV, coletados durante a fase aguda da doença. Isso indicou que usar os componentes presentes no meio de cultura das formas promastigotas poderia servir como uma fonte de antígenos para o imunodiagnóstico da leishmaniose.

Martin e colaboradores (1998) foram os primeiros a avaliar os exoantígenos da cultura de promastigotas de *L. donovani* por ELISA, com elevada sensibilidade e especificidade na detecção de anti IgG de *Leishmania*. Nenhuma reatividade cruzada foi encontrada com soros de pacientes com malária, filariose, tripanossomíases africana e equinococoses.

Em 2002, Ryan e colaboradores, mostraram também por ELISA que os exoantígenos de *L. donovani* só podiam reagir com anticorpos de pacientes com LV. A reatividade com anticorpos de pacientes com leishmaniose cutânea só foi evidenciada quando uso-se exoantígenos de *L. mexicana*. Mostrando a especificidade diferenciada das moléculas excretadas-secretadas.

Conforme já abordado anteriormente, Rajasekariah et al. (2008) desenvolveram ELISA, para o diagnóstico da LVC com “pool” de exoantígenos preparado a partir de três espécies de *Leishmania* (*L. infatum*, *L. donovani* e *L. major*). Os resultados mostraram correlação de 100% com a sintomatologia clínica e muitos soros de cães assintomáticos foram reativos.

São escassos, ainda, os estudos epidemiológicos da avaliação de exoantígenos liberados pelas formas promastigotas de *L. (L.) chagasi* no sorodiagnóstico da LV no hospedeiro humano ou canino.

Os pesquisadores vêm mostrando que estas moléculas liberadas parecem ter propriedades únicas, apresentando epitopos específicos diferentes daquelas encontradas nos extratos totais, e que os mesmos poderiam ser capazes de eliminar as reações cruzadas, e conferir uma alta especificidade para o diagnóstico da LVH e LVC.

Uma vantagem do uso dessas moléculas liberadas espontaneamente no meio de cultura decorre do fato de serem obtidas facilmente sem necessidade de técnicas sofisticadas ou mesmo de purificação (GONÇALVES et al., 1991; UMEZAWA et al., 1996a, 2001; ROMERO et al., 2004). Além disso, a cultura de promastigotas de *Leishmania* é uma fonte de antígenos barata para o imunodiagnóstico da leishmaniose visceral (MARTIN et al., 1998).

2 OBJETIVO

Avaliar comparativamente os parâmetros imunodiagnósticos de exoantígenos e antígeno total da *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) chagasi*, no diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral (LV) humana e canina, por ELISA e Immunoblotting.

Metas:

- 1) Padronizar as condições ideais de reatividade de exoantígenos (ES) e antígeno total (AT) de *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) chagasi* no imunodiagnóstico da LV humana e canina, por ELISA e Immunoblotting.
- 2) Calcular os parâmetros diagnósticos do ELISA: limiar de reatividade, sensibilidade e especificidade dos exoantígenos e antígenos totais.
- 3) Calcular os parâmetros diagnósticos do Immunoblotting em relação à sensibilidade e especificidade dos exoantígenos no diagnóstico da LV humana e canina.
- 4) Avaliar e analisar a imunorreatividade cruzada entre as diferentes espécies de *Leishmania* no contexto do imunodiagnóstico da LV humana e canina por ELISA e Immunoblotting.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Amostragem

3.1.1 Soros Humanos

Neste estudo foram utilizadas 250 amostras de soros humanos os quais foram, distribuídas em 3 grupos (Figura 3).

O primeiro grupo consistiu de 103 indivíduos com diagnóstico de leishmaniose visceral (LV), com exame parasitológico positivo (amastigotas no aspirado de medula óssea) e classificado pela sintomatologia clínica em: *i*) sintomático (n=89) [febre irregular, perda de peso (caquexia), tosse, diarreia, palidez cutâneo-mucosa e hepatoesplenomegalia acentuada]; *ii*) oligossintomático (n=10) (febre baixa ou ausente, hepatomegalia presente, esplenomegalia discreta, ausência de hemorragias e caquexia) ou *iii*) assintomático ou inaparente (n=4) (sem sintomatologia clínica, sorologia positiva sem encontro de parasitas em tecidos), provenientes da zona endêmica de LV do estado do Piauí, Brasil. Estas amostras foram gentilmente cedidas pela Dra. C. Barbieri, da Universidade Federal de São Paulo.

O segundo grupo consistiu de 32 amostras de soros de indivíduos saudáveis, moradores de região não endêmica para LV.

O terceiro grupo consistiu de 115 amostras de soros de indivíduos com outras infecções ou parasitose: 16 com leishmaniose cutânea (LC), 16 com leishmaniose mucocutânea (LMC), 20 chagásicos na fase crônica (DC), 63 com outras doenças (OD) [lúpus eritematoso sistêmico (n=4), doença autoimune com fator anti-núcleo positivo (n=14); artrite reumatóide (n=3); anti-streptolisina O positiva (n=5); infectados com *S. mansoni* (n=5), *Toxoplasma gondii* (n=6), *Toxocara canis* (n=3), *Plasmodium* sp (n=13), pacientes com paracoccidiodomicose (n=6) e tuberculose (n=4)].

As amostras do segundo o terceiro grupo fazem parte das coleções (tecas) armazenadas no Laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, sob a responsabilidade da Dra. E. S. Umezawa.

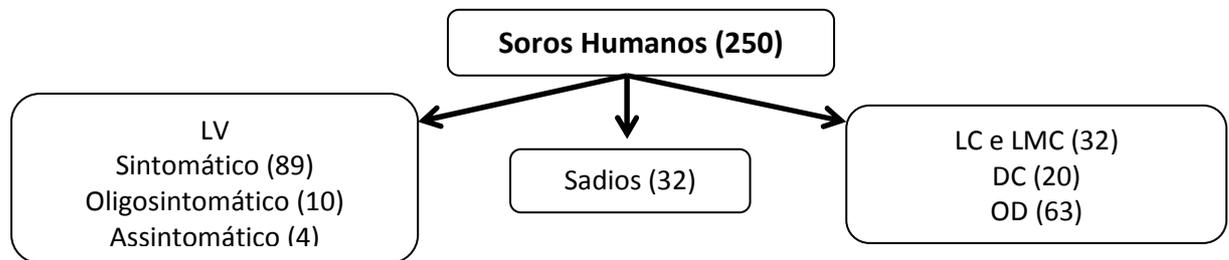


Figura 3- Grupo de estudo de soros Humanos.

3.1.2 Soros de cães

Cento e quarenta e quatro amostras de soros foram coletadas de cães domésticos e distribuídos didaticamente em 4 grupos (Figura 4).

O primeiro grupo consistiu de 53 amostras de soros de cães provenientes de Araçatuba - São Paulo, Brasil, região endêmica de LV com teste parasitológico positivo com presença de parasitas ao exame microscópico (imunohistoquímica) de material obtido de vísceras e/ou pele. Este grupo foi classificado clinicamente por diferentes parâmetros em: *i*) sintomático (n= 37) [onicogrifose, emagrecimento, linfadenomegalia, hepatoesplenomegalia e lesões do tegumento (descamação, alopecia, nódulos e úlceras)]; *ii*) assintomático (n=16) quando não apresentavam nenhum dos sintomas acima descritos ou que apresentavam um linfonodo discretamente palpável, com pelame opaco ou indícios de emagrecimento.

O segundo grupo consistiu de 32 cães com suspeita de leishmaniose canina com teste parasitológico negativo e clinicamente diagnosticados como sintomático (n=20) ou assintomático (n=12).

As amostras destes dois grupos foram gentilmente cedidas pela Dra. M. D. Laurenti do Laboratório de Patologia de Moléstias Infecciosas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

O terceiro grupo de cães sadios consistiu de 38 animais provenientes de Rondônia (n=20) e de Araçatuba-São Paulo (n=18), região endêmica para leishmaniose canina.

O quarto grupo consistiu de 21 soros de cães com outras doenças infectados com diferentes parasitoses [*Babesia* sp (n=3), *Ehrlichia* sp (n=3), *Neospora* sp (n=3), *Toxoplasma gondii* (n=3), *Trypanosoma cruzi* (n=7) e *Trypanosoma evansi* (n=2)]. Estes soros foram provenientes de animais naturalmente infectados, com sorologia positiva para cada parasitose e confinados em canis e acompanhados por mais de um ano.

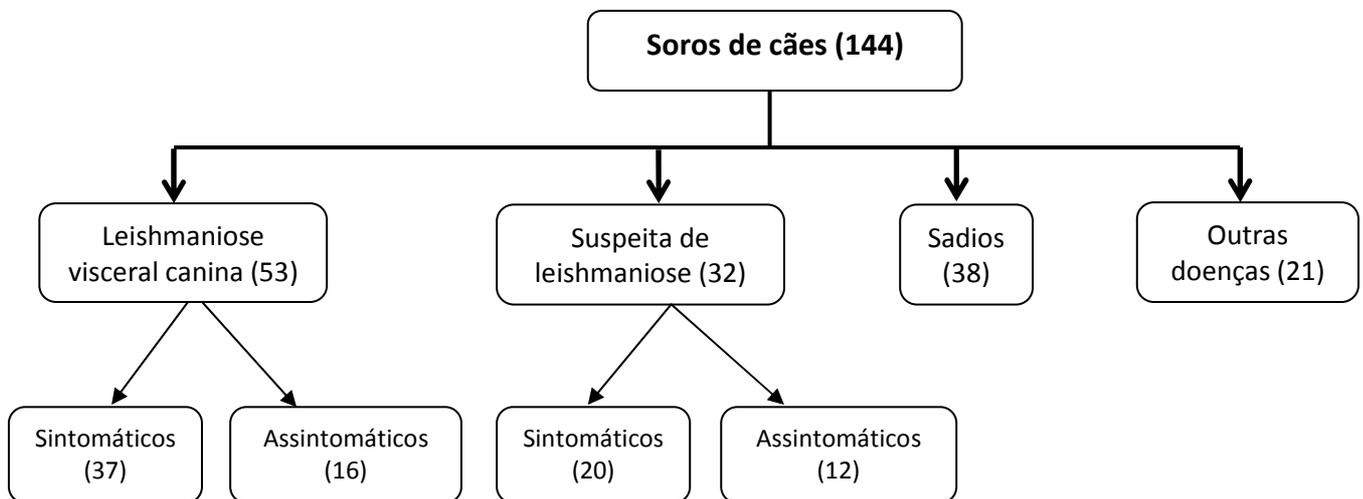


Figura 4- Amostragem dos soros de cães.

3.2 Parasitas

As diferentes espécies do gênero *Leishmania*, subgênero *Leishmania* e *Vianna*, utilizadas neste trabalho foram cedidas gentilmente por diferentes pesquisadores (Tabela 1).

Tabela 1- Cepas de três espécies do gênero *Leishmania*.

Espécie	Cepa	Procedência	Cedido por (local)
<i>Leishmania (L.) amazonensis</i>	MHOM/Br/1973/M2269	Brasil	Dra. S. Uliana (ICB-USP*)
<i>Leishmania (V.) braziliensis</i>	MHOM/Br/1975/M2903	Brasil	Dra. S. Uliana (ICB-USP)
<i>Leishmania (L.) chagasi</i>	MHOM/Br/1972/LD	Brasil	Dr. A.Tempone (IAL SP°)

*ICB-USP- Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

° IAL-SP- Instituto Adolfo Lutz de São Paulo

3.2.1 Cultura

As formas promastigotas das três espécies do gênero *Leishmania* foram cultivadas em meio líquido LIT (Liver Infusion Tryptose) (CASTELLANI et al., 1967), suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) e adicionado de 5% de urina masculina. As culturas foram mantidas à temperatura de 28 °C, sem agitação em frascos Erlenmeyer, em volumes de 20 ml. No terceiro dia de cultivo, quando o número de formas promastigotas eram aproximadamente 1×10^8 parasitas/ml efetuaram-se repiques na proporção de (1: 5) (1 ml da cultura de 3 dias de crescimento e 4 ml de meio LIT). Estas culturas foram empregadas na preparação dos diferentes extratos antigênicos.

3.2.2 Extratos antigênicos

3.2.2.1 Exoantígenos (ES)

Os exoantígenos (ES) foram obtidos de formas promastigotas das 3 espécies de *Leishmania*: *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) chagasi*, incubados (5×10^8 parasitas/ml), 24 horas em meio RPMI (Sigma-1640 Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brasil) adicionado de 2% de urina masculina e incubados a 28 °C. Após 24 horas os parasitas foram

centrifugados e o sobrenadante contendo os exoantígenos (ES) foi coletado e armazenado à -70 °C em alíquotas até o momento do uso. Os parasitas tinham sido previamente lavados 2 vezes com meio RPMI, sem soro fetal, e centrifugados a 1000 *xg*, por 15min a 4 °C.

3.2.2.2 Antígeno total (AT)

Os antígenos totais (AT) foram preparados com as formas promastigotas das 3 espécies de *Leishmania* crescidos em meio LIT. Os parasitas foram lavados 3 vezes com tampão fosfato salina (0,01 M fosfato pH 7,2; NaCl 0,8% = PBS) por centrifugação (1000 *xg*, 15min a 4 °C). Ao sedimento adicionou-se NaOH 0,3 M, na proporção de 1 ml/ 100 mg de parasita, após agitação magnética constante (18hr a 4 °C) os extratos antigênicos foram neutralizados com HCL 0,3 N até atingir o pH 7,2 e centrifugados a 4000 *xg* por 1min (UMEZAWA et al., 1996a). A concentração protéica foi quantificada no sobrenadante utilizando o kit comercial “Micro BCA Protein Pierce Assay Kit” (Pierce, Illinois, USA). Após dosagem do conteúdo protéico os AT foram armazenados em alíquotas a -70 °C até o momento do uso.

3.3 Técnicas sorológicas

3.3.1 ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

Placas de poliestireno “High binding” (Corning Incorporated, New York, NY, USA) de fundo chato com 96 cavidades foram sensibilizadas com 50 µl dos preparados antigênicos (ES e AT), de cada espécie de *Leishmania*, diluídos em tampão carbonato-bicarbonato (0,05 M; pH 9,6) incubados por 18hr a 4 °C, em câmara úmida. Após este tempo as placas foram lavadas uma vez com PBS e bloqueadas com 100 µl de leite desnatado (MOLICO-Nestlé) a 5% em PBS e incubados por 30min à temperatura ambiente. Após o descarte do bloqueio,

adicionou-se 50 µl dos soros diluídos em PBS-Tween 20 (0,05%) contendo 1% de leite desnatado (MOLICO-Nestlé) e novamente incubadas por 60min a 37 °C. Após cinco lavagens com PBS-T, adicionou-se 50 µl do conjugado peroxidase anti-IgG humana (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) na diluição 1: 3000, ou anti-IgG cão (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) na diluição 1: 800, diluídos em PBS-T e novamente incubados por 60min a 37 °C.

A reação foi revelada, após outro ciclo de lavagens, com a adição de 50 µl de uma mistura de 5 mg de orto-phenylene diamine (OPD), 7,5 µl do substrato peróxido de hidrogênio (H₂O₂ 30%) e 12,5 ml de tampão citrato-ácido cítrico 0,05 M, pH 5,0 e incubados por 30min a 37 °C. A reação foi interrompida com a adição de 25 µl de HCl 4 N e as densidades ópticas (Absorbâncias = Abs) foram obtidas no leitor de ELISA (Multiskan-Titertek II), no comprimento de onda de 492 nm.

3.3.1.1 Cálculo do limiar de reatividade (LR)

O Limiar de Reatividade de cada antígeno foi calculado utilizando-se a média aritmética das Abs_{492nm} obtidas com 32 amostras de soros de humanos saudáveis ou 38 amostras de soros de cães sadios, acrescidos de três desvios padrões (média+3SD) (KURSTAK, 1985).

3.3.1.2 Análise estatística da imunorreatividade dos extratos antigênicos

A imunorreatividade (Abs) de cada preparado antigênico, pelo ELISA, foi analisado pelo método estatístico ANOVA-One Way que compara as médias de amostras numéricas independentes (utilizando a distribuição F). Essencialmente, a razão de variância é uma comparação da variação entre os diferentes grupos antigênicos (ES e AT) para a variância entre as amostras individuais dentro desses grupos. A maior proporção implica diferenças significativas entre os grupos (p< 0.05). Para fortalecer os resultados do ANOVA-One Way,

utilizou-se o teste Dunnett's para realizar comparações múltiplas entre o antígeno ES de *L. (L.) chagasi* e os preparados antigênicos ES e AT das diferentes espécies de leishmanias, com o intuito de verificar a presença de diferenças estatísticas significativas ($p < 0.05$). Os métodos estatísticos foram efetuados com o software Prism™ versão 3.0 (Graphpad software, inc 1999) para Windows®.

3.3.2 Immunoblotting

3.3.2.1 Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida

Os componentes protéicos contidos nos ES, AT e parasitas íntegros das 3 espécies de *Leishmania* foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS 0,1% (Duodecil Sulfato de Sódio) (LAEMMLI, 1970) no sistema de mini gel (8,5 x 5,0 cm, Bio-Rad Co.) utilizando gel de separação (300 mM Tris-HCl pH 8,6; SDS 0,1%; acrilamida 29,2%; N,N metileno bis acrilamida 0,8%; persulfato de amônia 0,03% e N,N,N,N-tetrametilenodiamida= Temed 0,1%) na concentração de 13% e gel de empilhamento a 4%.

As amostras ES e AT das diferentes espécies de *Leishmania*, sem soro fetal bovino (SFB) foram diluídas Vol/Vol em tampão de amostra (160 mM Tris HCl pH 6,8; SDS 5%; 50 mM de 2-mercaptoethanol; glicerol 20% e azul de bromofenol 0,02%) e fervidas a 100 °C por 5min. As amostras foram aplicadas no gel no volume de 30 µl/canaleta, quando se utilizou um pente de teflon de 10 orifícios e 400 µl quando se utilizou um pente único de 90 mm de largura e 1 mm de espessura.

Os parasitas íntegros (5×10^6 formas promastigotas) foram diluídos com 150 µl de tampão de lise contendo inibidores de protease [NP40 1%; 10 mM Tris-HCL pH 7,5; 1 mM M- α -p-tosil-L-lisina clorometil cetona (TLCK); 1 mM Fluoreto de fenil metil sulfonila (PMSF) e 2,8 U/ml Aprotinina] e incubados por 5min a 4 °C. Após este tempo adicionou-se 150 µl de tampão de amostra e a mistura foi submetida à fervura de 100 °C por 5min, foram aplicadas 30 µl/canaleta.

A corrida eletroforética foi efetuada utilizando-se um tampão de corrida (75 mM Tris; 576 mM glicina pH 8,64 e SDS 0,1%) e submetida a uma corrente de 100V, por aproximadamente 2hr. Após este tempo as frações antigênicas, contidas no gel, foram transferidas eletroforéticamente para membranas de nitrocelulose (NTC).

Marcadores de peso molecular adquiridos comercialmente Sigma-High (Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brasil) foram utilizados como padrões de peso molecular correspondentes às seguintes proteínas: 29 kDa (Anidrase Carbônica), 45 kDa (Albumina de ovo), 66 kDa (Albumina bovina), 97 kDa (Fosforilase B), 116 kDa (Galactosidase) e 205 kDa (Miosina) ou Sigma-Low: 14,4 kDa (α -Lactalbumina), 20,1 kDa (Inibidor de tripsina), 30 kDa (Anidrase carbônica), 43 kDa (Albumina de ovo), 67 kDa (Albumina bovina) e 94 kDa (Fosforilase B).

3.3.2.2 Transferência eletroforética de proteínas

A transferência eletroforética das proteínas separadas por SDS-PAGE, para membranas de nitrocelulose (NTC) 0,45 μ m (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA) foi realizada de acordo com a técnica descrita por Towbin e colaboradores (1979). A transferência foi executada no sistema semi-seco (Semi-Phor TE 70 - Hoeffler Sc Instruments Co.) por 1 hora sob ação de uma corrente elétrica de 0,9 mA/cm² utilizando um tampão de transferência (25 mM Tris; 192 mM glicina e metanol 20% pH 8,3).

A eficiência da transferência das frações protéicas e a localização das proteínas do padrão de PM, nas membranas de NTC, foi efetuada usando-se o corante Ponceau (Ponceau-S 0,2%; ácido acético 1%). A região correspondente ao marcador do PM, corada com o Ponceau, localizada nas membranas, foi recortada, corada com amido black 0,1% e descorada com ácido acético 7%. A membrana restante corada com Ponceau foi descorada com PBS.

3.3.2.3 Immunoblotting

A membrana de nitrocelulose (NTC) contendo os antígenos foi bloqueada com a solução bloqueadora (leite desnatado (MOLICO-Nestlé) a 5%, em PBS, incubados por 1 hora à temperatura ambiente, sob agitação constante. As membranas bloqueadas foram incubadas com os soros diluídos (1: 100) em PBS contendo 1% de leite, por 2 horas à temperatura ambiente, sob agitação constante. Após 5 lavagens (5min cada) com PBS, as membranas foram incubadas com conjugados peroxidase anti-IgG humano (1: 3000) ou anti-IgG cão (1: 800), (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) diluídos em PBS, incubados por 2 horas à temperatura ambiente sob agitação. Após novo ciclo de lavagens em PBS, os imunocomplexos foram visualizados por meio da adição de 500 µl de uma solução reveladora (6 mg de 4-Cloro-naftol; 2 ml de metanol; 10 ml de PBS e 10 ul de H₂O₂). A reação foi interrompida por adição de água destilada, após o aparecimento das bandas. As membranas foram lavadas com água destilada e colocadas entre dois papéis de filtro para secagem. A documentação foi realizada por fotografias ou digitalizada em um programa de computador.

3.4 Cálculo dos parâmetros imunodiagnósticos

Os índices imunodiagnósticos de sensibilidade e especificidade foram calculados utilizando-se uma tabela de dupla entrada relacionando testes com o diagnóstico verdadeiro da doença (Tabela 2). O resultado do teste foi calculado empregando o programa WIN EPISCOPE 2.0. Para calcular os índices de sensibilidade e especificidade dos ELISAs ou Immunoblotting, quer para o hospedeiro humano como para o canino, foi utilizado como critério a positividade do teste parasitológico e presença de sintomatologia clínica.

Tabela 2- Combinação binária entre os resultados prováveis obtidos em um determinado teste e o diagnóstico verdadeiro da doença.

TESTES	DOENÇA- Diagnóstico verdadeiro	
	Presente	Ausente
Positivo	Verdadeiros positivos A	Falsos positivos B
Negativo	Falsos negativos C	Negativos verdadeiros D

FONTE: Ferreira e Ávila (2001)

A sensibilidade (S) do teste é fornecida pela porcentagem de casos positivos detectados pelo teste entre os indivíduos sabidamente doentes. A especificidade (E) pela porcentagem de casos negativos, entre indivíduos não doentes.

$$S = \frac{A}{A + C}$$

$$E = \frac{D}{B + D}$$

4 RESULTADOS

4.1 ELISA – HOSPEDEIRO HUMANO

Dois preparados antigênicos denominados: exoantígenos (ES) e antígeno total (AT) obtidos de formas promastigotas de 3 espécies do gênero *Leishmania* [(*L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) chagasi*)] foram analisados por ELISA. A análise comparativa dos parâmetros imunodiagnósticos (sensibilidade e especificidade) foi realizada com amostras de soros de pacientes diagnosticados com Leishmaniose visceral (LV) ou sem a parasitose (Figura 3).

4.1.1 Concentrações ideais dos extratos antigênicos

A padronização para determinar a concentração ideal dos antígenos ES (exoantígenos) e AT (antígeno total), a ser utilizada no ELISA, foi executada com amostras de soros de 3 indivíduos com Leishmaniose visceral (LV1, LV2, LV3) e de um sadio (S), diluídos a 1: 200. O critério de escolha da concentração ideal foi a diluição com a reatividade (Abs_{492nm}) que melhor discriminasse entre os indivíduos infectados do não infectado (sadio).

Entre as diluições efetuadas com o ES (de 1: 6,25 a 1: 800) escolheu-se a diluição 1: 50 correspondente às moléculas excretadas-secretadas por 1×10^7 promastigotas/ml. A mesma diluição foi a escolhida para as 3 espécies de leishmanias (Figura 5).

A titulação dos AT (antígeno total) diluídos na razão 2 (1: 125 a 1: 64.000) indicou que a diluição ideal para as três espécies foi 1:1000, correspondente à concentração protéica de 5,7 $\mu\text{g/ml}$ para *L. (L.) amazonensis*; de 5,6 $\mu\text{g/ml}$ para *L. (V.) braziliensis* e de 6 $\mu\text{g/ml}$ para *L. (L.) chagasi* (Figura 6).

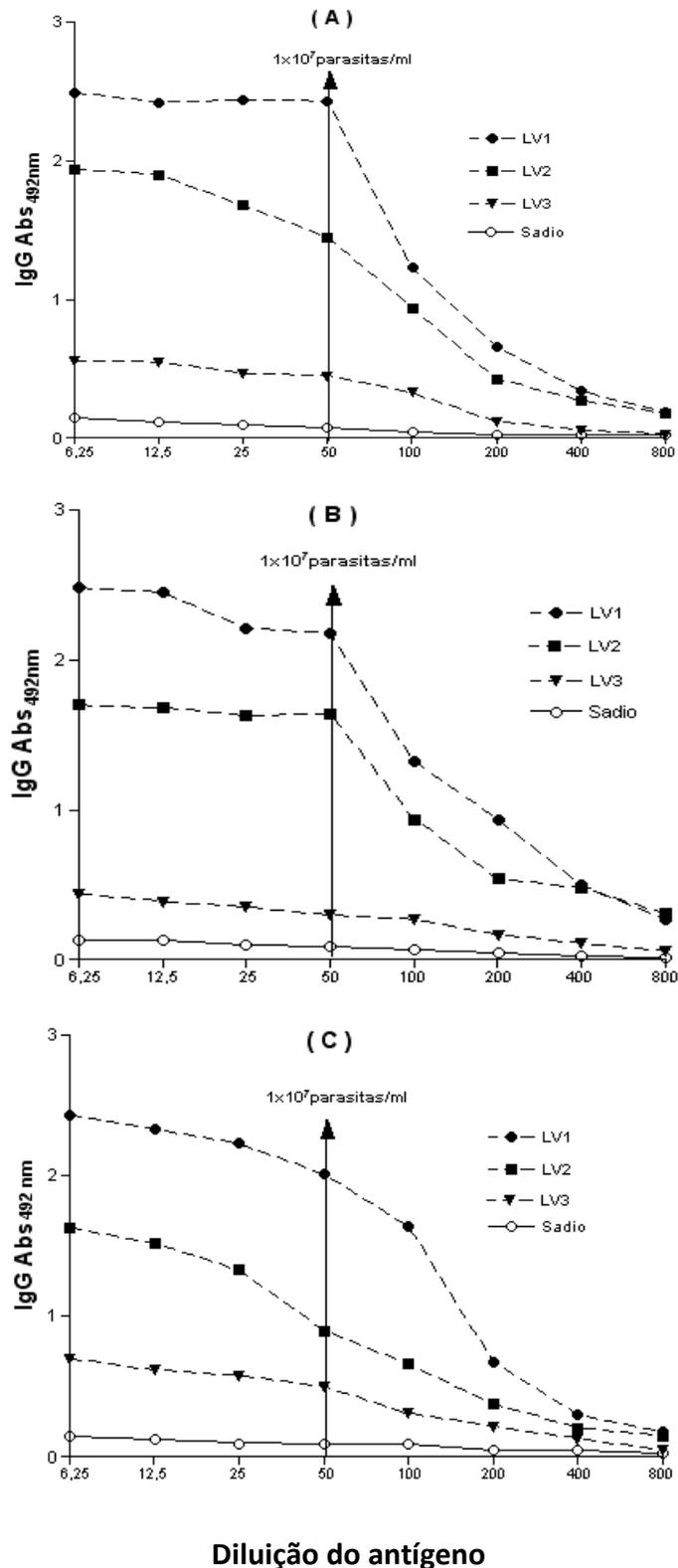


Figura 5- Curvas de titulação para determinar a concentração ideal dos exoantígenos ES de: A) *L. (L.) amazonensis*; B) *L. (L.) braziliensis*; C) *L. (L.) chagasi*. LV1, LV2, LV3 correspondem às amostras de soros de pacientes com Leishmaniose visceral. A seta vertical indica a diluição do antígeno escolhida para o ELISA o qual correspondente a 1×10^7 parasitas/ml.

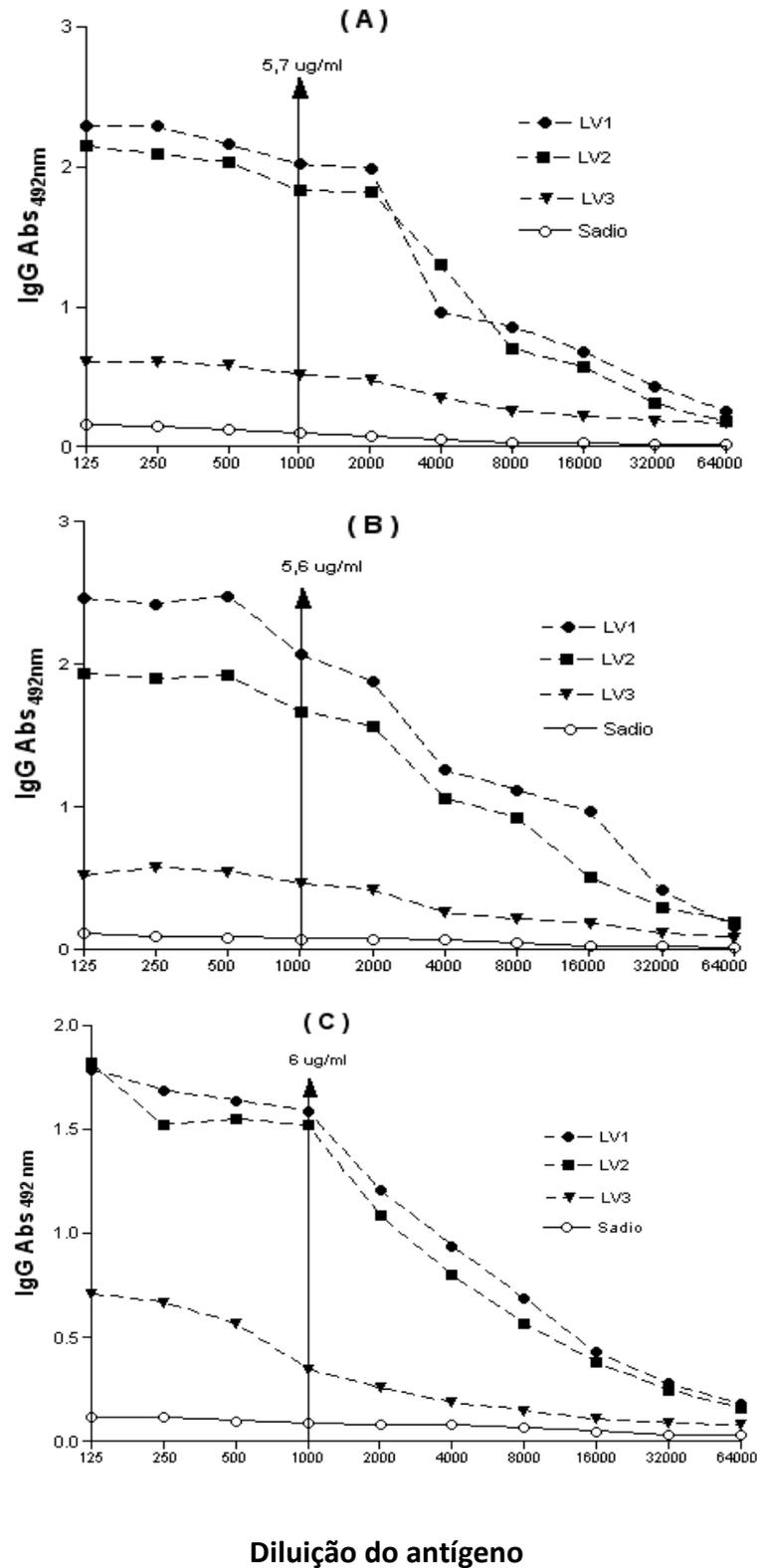


Figura 6- Curvas de titulação para determinar a concentração ideal dos antígenos AT: A) *L. (L.) amazonensis*; B) *L. (L.) braziliensis*; C) *L. (L.) chagasi* a ser utilizado no ELISA. LV1, LV2, LV3 correspondem às amostras de soros de pacientes com Leishmaniose visceral. A seta vertical indica a diluição do antígeno escolhida para o ELISA com a correspondente concentração protéica.

4.1.2 Cálculo do limiar de reatividade (LR)

O limiar de reatividade (LR), o qual foi obtido utilizando-se a média aritmética das Abs_{492nm} de 32 amostras de soros de indivíduos sadios acrescido de três desvios padrões (média+3SD), foram: ES-A [0,091 + (3x0,049)=0,24]; ES-B [0,075 + (3x0,050)=0,23]; ES-C [0,087 + (3x0,046)=0,23]; AT-A [0,088 + (3x0,053)=0,25]; AT-B [0,102 + (3x0,050)=0,25]; AT-C [0,105 + (3x0,042)=0,23]. Os LR foram semelhantes tanto para os ELISAs que utilizaram o antígeno ES (ELISA-ES) como para o AT (ELISA-AT), para as 3 espécies de *Leishmania*, com valores de muito próximos (0,23 a 0,25) (Figura 7).

Aplicando-se a análise estatística de ANOVA-One way para os LRs obtidos não se observou diferenças estatisticamente significativas entre os mesmos.

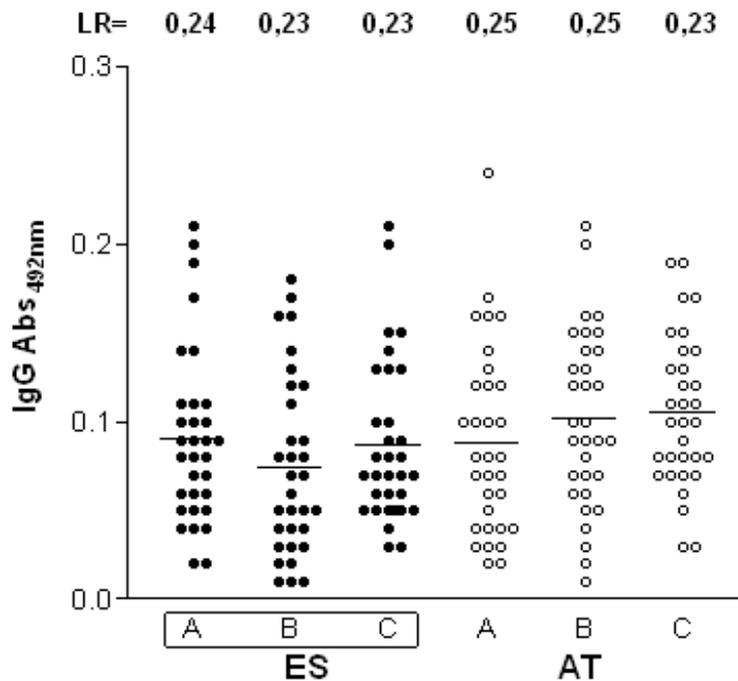


Figura 7- Limiar de reatividade (LR) dos ELISAs-ES (exoantígenos) e ELISAs-AT (antígeno total) das *Leishmanias*: A) *L. (L.) amazonensis*; B) *L. (L.) braziliensis*; C) *L. (L.) chagasi*. As barras horizontais representam a média aritmética das Abs_{492nm} da reatividade de IgG para cada ELISA. LR = limiar de reatividade.

4.1.3 Índice de sensibilidade relativa

A sensibilidade de 100%, do ELISA-ES e ELISA-AT das 3 espécies de *Leishmanias*, foi obtida analisando-se 89 amostras de soros de indivíduos provenientes do estado de Piauí (zona endêmica de LV) (Figura 3). Estes pacientes tinham previamente o diagnóstico clínico para Leishmaniose visceral (LV) e com diagnóstico parasitológico positivo pelo encontro de formas amastigotas no aspirado de material obtido da medula óssea.

As diferenças estatísticas entre os ELISAs-ES e AT, aplicando os testes ANOVA-One way e de Dunnett's (que utilizam mediana e médias aritméticas para comparar diferentes amostras), mostraram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0.05$) quando se comparou o ELISA-ES-*L.(L.) chagasi* com ELISA-ES-*L.(L.) amazonensis* e/ou ELISA-ES-*L.(V.) braziliensis* (Figura 8). Diferenças estatisticamente significativas ($p < 0.05$) também foram observadas quando se comparou os ELISA-ES e ELISA-AT de *L.(L.) chagasi* (figura 8).

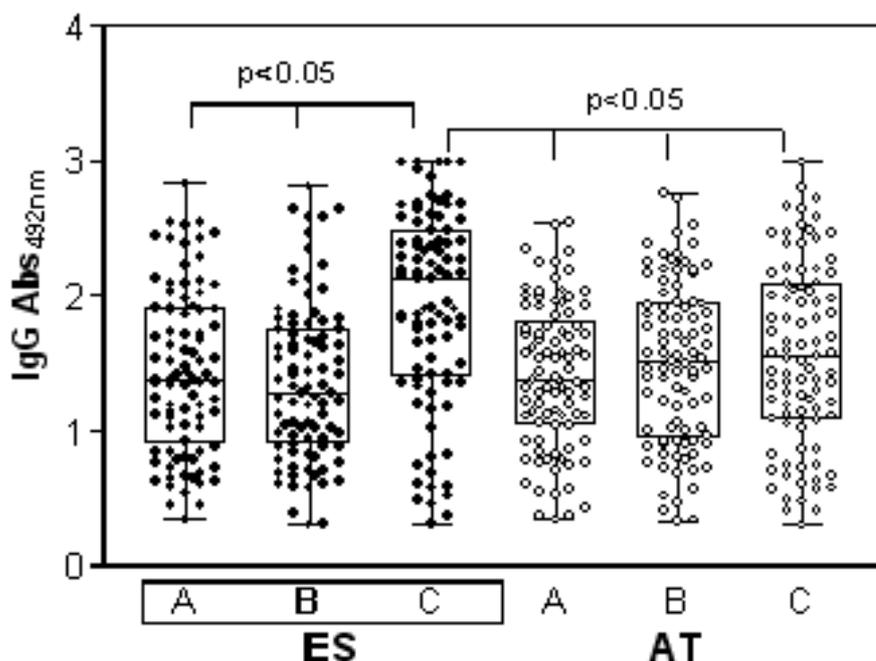


Figura 8- Reatividade do ELISA-ES e ELISA-AT com 89 indivíduos com LV (com parasitologia positiva), que utilizou como antígenos as *Leishmanias*: A) *L. (L.) amazonensis*; B) *L. (L.) braziliensis*; C) *L. (L.) chagasi*. Cada ponto representa a reatividade (Abs_{492nm}) de uma amostra. O gráfico interno é apresentada em forma de "wisker-box", que distribui a reatividade das amostras em quartis. A barra no meio do gráfico representa a mediana.

4.1.4 Índice de especificidade relativa

O índice de especificidade relativa, que representa o número de amostras que apresentaram reatividade cruzada, foi calculado utilizando 147 amostras de soros incluindo: indivíduos sadios (n=32), Leishmaniose cutânea e mucocutânea (n= 32), doença de Chagas (n=20) e outras doenças (n=63). A especificidade relativa de 92,5%; 92,5% e 91,2% foram obtidas pelos ELISAs-ES e de 74,2%; 75,5% e 77,6% pelos ELISAs-AT, respectivamente para *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) braziliensis*, *L. (L.) chagasi* (Tabela 3).

Estes dados indicam claramente que pacientes com LC ou LMC reagem cruzadamente com o ELISA-ES ou AT que utilizam *L.(L.) amazonensis*, *L. (L.) braziliensis* ou *L. (L.) chagasi*. Quando este índice foi calculado omitindo-se as amostras LC e LMC os índices dos ELISA-AT foram menores do que os do ELISA-ES (Tabela 3), indicando uma melhor especificidade para o antígeno ES independente da espécie de *Leishmania* utilizada.

Estes dados indicam que não existe uma reação espécie-específica, todos os pacientes infectados com *Leishmania* spp reagem com as 3 espécies de *Leishmania* aqui analisadas. Diferenças estatisticamente significativa ($p < 0,05$) foram observadas somente entre os ELISAs que utilizam diferentes preparados antigênicos, isto é entre ELISA-ES e ELISA-AT, indiferente da espécie de *Leishmania* empregada.

Tabela 3- Índices de especificidades relativa (%) para os ELISAs-ES e AT, no diagnóstico da Leishmaniose humana.

Índice	ELISA-ES (%)			ELISA-AT (%)			
	(n)	A	B	C	A	B	C
Especificidade	147	92,5	92,5	91,2	74,2	75,5	77,6
Especificidade*	115	92,2	95,7	99,1	87,0	87,0	82,6

A = *L. (L.) amazonensis*, B = *L. (V.) braziliensis*, C = *L. (L.) chagasi*

* índices nos quais se excluíram as amostras de pacientes com LC e LMC (n=32).

4.1.5 Reatividade cruzada

a) pacientes com Leishmaniose cutânea (LC, n=16) e mucocutânea (LMC, n=16);

Os dados comparativos entre ELISA-ES e ELISA-AT mostraram que a reatividade cruzada (número de amostras positivas) do grupo de pacientes com LC e LMC ocorre preferencialmente com o ELISA-AT (43,8-81,3%) (Tabela 4B) do que com o ELISA-ES (18,8-43,8%) (Tabela 4A), com diferentes títulos de reatividade e médias para as 3 espécies.

O grupo de pacientes com LC apresentou positivities de 31,3% para ELISA-ES (A= *L. (L.) amazonensis*, B= *L. (V.) braziliensis*, e C= *L. (L.) chagasi*) e 43,8% (C); 50% (B) e 56,3% (A) para ELISA-AT (Figura 9 e Tabela 4A,B).

O grupo de pacientes com LMC apresentou positivities de 18,8% (B); 25% (A) e 43,8% (C) para ELISA-ES e de 68,8% (A, B) e 81,3% (C) para ELISA-AT (Figura 9 e Tabela 4A, B).

As médias de reatividade do grupo LMC foram perto do LR para o ELISA-ES e maiores para o ELISA-AT (Figura 9).

b) pacientes com doença de Chagas (DC, n=20);

A porcentagem de reatividade cruzada no grupo dos chagásicos foi maior para ELISA-AT (55-65%) do que para ES (5-10%). O ELISA-ES apresentou reatividade de 10% (2/20) para *L. (L.) amazonensis* e 5% (1/20) tanto para *L. (V.) braziliensis* como para *L. (L.) chagasi*. Por outro lado o ELISA-AT de *L. (L.) chagasi* apresentou uma positividade de 55% (11/20), de 65% para ELISA-AT de *L. (L.) amazonensis* e 60% para ELISA-AT de *L. (V.) braziliensis* (Figura 9 e Tabela 4A, B).

c) pacientes com outras doenças (OD, n=63)

Entre o grupo de indivíduos com diferentes doenças somente um paciente infectado com Paracoccidioidomicose foi reagente (1,6%) para ELISA-ES de *L. (L.) braziliensis*. A reatividade cruzada foi maior para ELISA-AT, sendo de 7,9% para *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*. O ELISA-AT de *L. (L.) chagasi* não apresentou reatividade positiva (0% de reatividade).

A figura 9 ilustra os dados apresentados na tabela 4A e 4B, mostrando a reatividade em Abs_{492nm}, para os pacientes com leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose mucocutânea (LMC), doença de Chagas (DC) e outras doenças (OD). Uma comparação entre ELISA-ES e ELISA-AT mostra que a positividade de AT comparada ao ELISA-ES foi 3,7 vezes maior quando se utilizou a *L. (L.) amazonensis*, 3,4 vezes para a *L. (V.) braziliensis* e 2,6 vezes para a *L. (L.) chagasi*. Concluindo que mesmo utilizando um extrato total a melhor especificidade/ausência de reatividade cruzada foi obtida quando se utilizou *L. (L.) chagasi*.

Tabela 4A- Número de amostras de soros de pacientes não infectados com *L. (L.) chagasi* com reatividade cruzada (positividade %) para o ELISA-ES.

Estado clínico	(n)	ELISA-ES (exoantígeno)		
		A n(%)	B n(%)	C n(%)
Sadios	32	0	0	0
LC	16	5(31,3)	5(31,3)	5(31,3)
LMC	16	4(25)	3(18,8)	7(43,8)
doença de Chagas	20	2(10)	1(5)	1(5)
Outras doenças (OD)	63	0	1(1,6)	0
Lúpus eritematoso sistêmico	4	0	0	0
Doença autoimune com fator anti-núcleo positivo	14	0	0	0
Artrite reumatóide	3	0	0	0
Anti-streptolisina O positiva	5	0	0	0
<i>S. mansoni</i>	5	0	0	0
<i>T. gondii</i>	6	0	0	0
<i>Toxocara canis</i>	3	0	0	0
<i>Plasmodium</i> sp	13	0	0	0
Paracoccidiodomicose	6	0	1	0
Tuberculose	4	0	0	0
TOTAL	147	11(7)	10(7)	12(8)

A = *L. (L.) amazonensis*, B = *L. (V.) braziliensis*, C = *L. (L.) chagasi*

Tabela 4B- Número de amostras de soros de pacientes não infectados com *L. (L.) chagasi* com reatividade cruzada (positividade %) para o ELISA-AT.

Estado clínico	(n)	ELISA- AT (Antígeno total)		
		A n(%)	B n(%)	C n(%)
Sadios	32	0	0	0
LC	16	9(56,3)	8(50)	7(43,8)
LMC	16	11(68,8)	11(68,8)	13(81,3)
doença de Chagas	20	13(65)	12(60)	11(55)
Outras doenças (OD)	63	5(7,9)	5(7,9)	0
Lúpus eritematoso sistêmico	4	0	0	0
Doença autoimune com fator anti-núcleo positivo	14	2(14,3)	3 (21,4)	0
Artrite reumatóide	3	0	0	0
Anti-streptolisina O positiva	5	1 (20)	1 (20)	0
<i>S. mansoni</i>	5	0	0	0
<i>T. gondii</i>	6	1 (16,6)	1 (16,7)	0
<i>Toxocara canis</i>	3	0	0	0
<i>Plasmodium</i> sp	13	1 (7,7)	0	0
Paracoccidiodomicose	6	0	0	0
Tuberculose	4	0	0	0
TOTAL	147	38(26)	36(24)	31(21)

A = *L. (L.) amazonensis*, B = *L. (V.) braziliensis*, C = *L. (L.) chagasi*

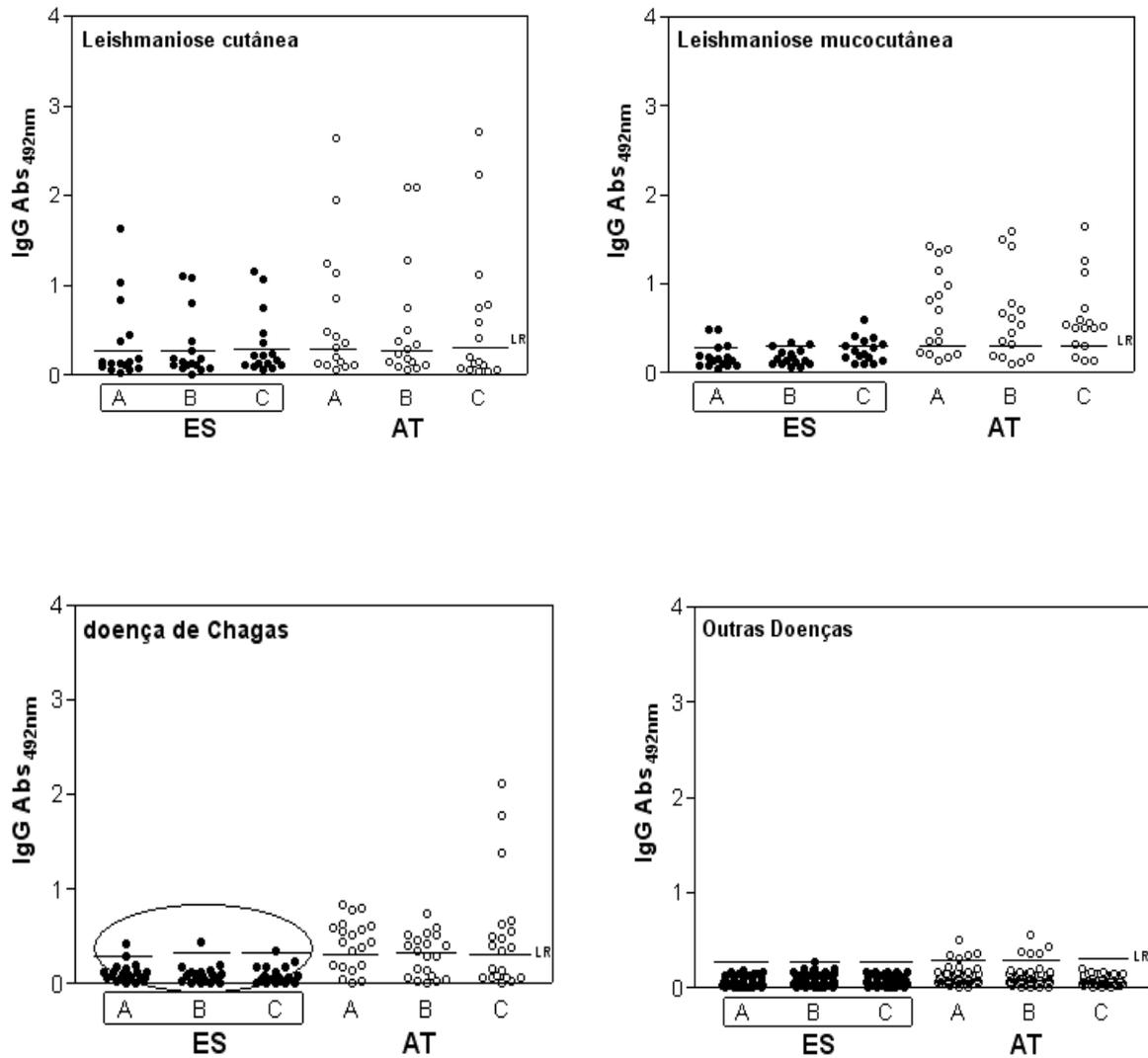


Figura 9- Reatividade de indivíduos com Leishmaniose cutânea (LC), Leishmaniose mucocutânea (LMC), doença de Chagas (DC) e outras doenças (OD) com ELISA-ES e AT de A) *L. (L.) amazonensis*; B) *L. (V.) braziliensis*; C) *L. (L.) chagasi*. A linha horizontal representa o limiar de reatividade (LR) para cada antígeno.

4.1.6 Avaliação imunodiagnóstico de casos suspeitos de LV

A positividade de 100% no ELISA-ES o ELISA-AT foi obtida quando foram testadas 14 amostras de indivíduos com suspeita de leishmaniose visceral, clinicamente diagnosticados como oligossintomáticos (n=10) (hepatoesplenomegalia discreta) ou sem sintomatologia clínica manifesta, considerados assintomáticos (n=4) (Figura 3).

O teste ANOVA-One way com teste de Dunnett's mostrou diferenças de reatividade estatisticamente significativas no grupo oligossintomático, a maior reatividade (mediana e média aritmética) foi observada com o ELISA-ES de *L. (L.) chagasi* e menores com o ELISA-AT de *L. (L.) chagasi* e *L. (L.) amazonensis* ($p < 0.05$) (Figura 10).

Nos assintomáticos os ELISA-AT e ELISA-ES não apresentaram diferenças estatisticamente significativas na sua reatividade, independentemente da espécie da *Leishmania* utilizada ($p > 0.05$). Como o número de amostras foi muito pequeno, estes dados deverão ser futuramente analisados com um número maior de amostras (Figura 10).

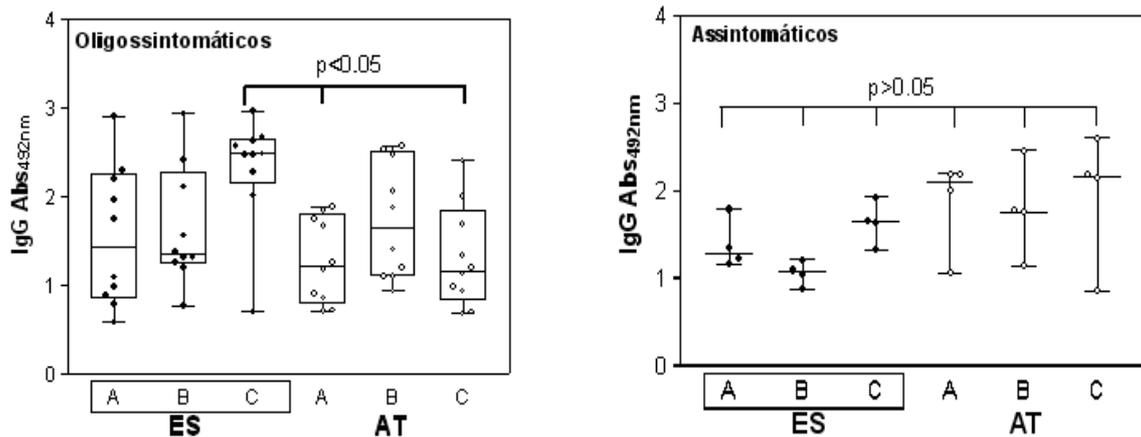


Figura 10- Reatividade de soros de indivíduos com suspeita clínica (oligosintomático; $n=10$) de LV ou sem clínica (assintomáticos; $n=4$) por ELISA-ES e AT [A] *L. (L.) amazonensis*, [B] *L. (V.) braziliensis*, [C] *L. (L.) chagasi*. Cada ponto representa a reatividade em Abs_{492nm} obtida para uma amostra. A figura é apresentada em forma de “wisker-box”, que distribui os dados em quartis. A barra no meio do gráfico representa a mediana.

4.2 ELISA – HOSPEDEIRO CANINO

A análise comparativa dos parâmetros imunodiagnósticos (sensibilidade e especificidade) do ELISA, no hospedeiro canino, foi realizada com amostras de soros de cão diagnosticados com leishmaniose canina e diagnosticados como não infectados com leishmaniose (Figura 4). Como no caso dos hospedeiros humanos analisou-se também o ELISA-ES e AT das 3 espécies do gênero *Leishmania*: *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) chagasi*.

4.2.1 Limiar de reatividade (LR)

O limiar de reatividade (LR) dos ELISAs foi calculado utilizando-se 38 amostras de soros de cães sadios [20 de cães de Rondônia e 18 de Araçatuba (São Paulo)], em amostras de soros de cães diluídos a 1: 200. Os limiares de reatividade obtidos para os ELISAs foram muito próximos de 0,24 a 0,29, calculados com a média aritmética acrescidos de 3 SD. Os LRs obtidos foram: para o ES-*L. (L.) amazonensis* [$0,112 + (3 \times 0,049) = 0,26$]; ES-*L. (V.) braziliensis* [$0,101 + (3 \times 0,046) = 0,24$]; ES-*L. (L.) chagasi* [$0,109 + (3 \times 0,046) = 0,25$]; AT-*L. (L.) amazonensis* [$0,139 + (3 \times 0,049) = 0,29$]; AT-*L. (V.) braziliensis* [$0,110 + (3 \times 0,052) = 0,27$]; AT-*L. (L.) chagasi* [$0,105 + (3 \times 0,042) = 0,26$] (Figura 11).

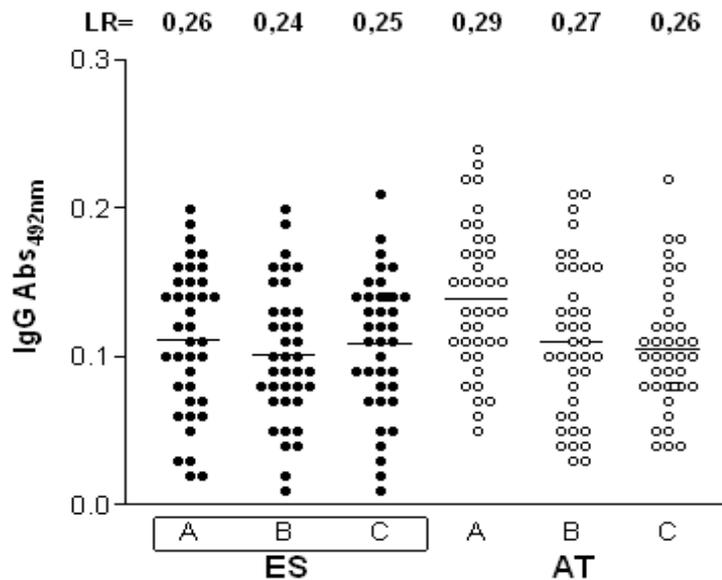


Figura 11- Limiar de reatividade (LR) dos ELISA-ES e AT [exoantígenos (ES) e antígeno total (AT)] das leishmanias: A) *L. (L.) amazonensis*, B) *L. (V.) braziliensis*, C) *L. (L.) chagasi*. Limiar de reatividade (LR = $M+3SD$). As barras horizontais no meio das Abs_{492nm} representam a média aritmética de cada antígeno.

4.2.2 Índice de sensibilidade relativa

A sensibilidade relativa foi calculada utilizando-se 53 amostras de soros de cães que apresentaram parasitologia positiva para leishmaniose visceral. O diagnóstico parasitológico baseou-se na detecção de formas parasitárias ao exame microscópico de material obtido de vísceras e/ou pele. Os animais que apresentavam onicogribose, emagrecimento, linfadenomegalia, hepatoesplenomegalia e lesões do tegumento (descamação, alopecia, nódulos e úlceras) foram clinicamente classificados em sintomáticos ($n= 37$) e quando não apresentavam nenhum dos sintomas acima descritos, mas apresentavam linfonodo discretamente palpável, com pelame opaco, ou indícios de emagrecimento foram considerados como assintomáticos ($n=16$).

Os ELISAs-ES ou AT apresentaram positividade de 100% para os grupos sintomáticos e assintomáticos resultando na sensibilidade de 100%. A mediana e média aritmética da reatividade das amostras após a avaliação do teste ANOVA-One way com teste de Dunnett's,

para as comparações entre os diferentes preparados antigênicos comparados com o ELISA-ES- *L. (L.) chagasi*, não mostrou diferenças estatisticamente significativas entre os testes ($p < 0.05$).

No grupo dos sintomáticos a maior reatividade foi observada para o ELISA-ES espécie específica [*L. (L.) chagasi*] comparado com o ELISA-AT da mesma espécie ($p < 0.05$) ou ELISAs-ES e AT das espécies *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* ($p < 0.05$) (Figura 12).

No grupo dos assintomáticos embora não fossem detectadas diferenças estatísticas entre ES e AT da mesma espécie *L. (L.) chagasi* ($p > 0.05$), é possível notar que a mediana e média aritmética foram mais altos para os ELISA-ES. O ELISA-ES de *L. (L.) chagasi* quando comparada aos ELISAs-ES e AT das *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* apresentou diferenças estatisticamente significativas ($p < 0.05$) (Figura 12).

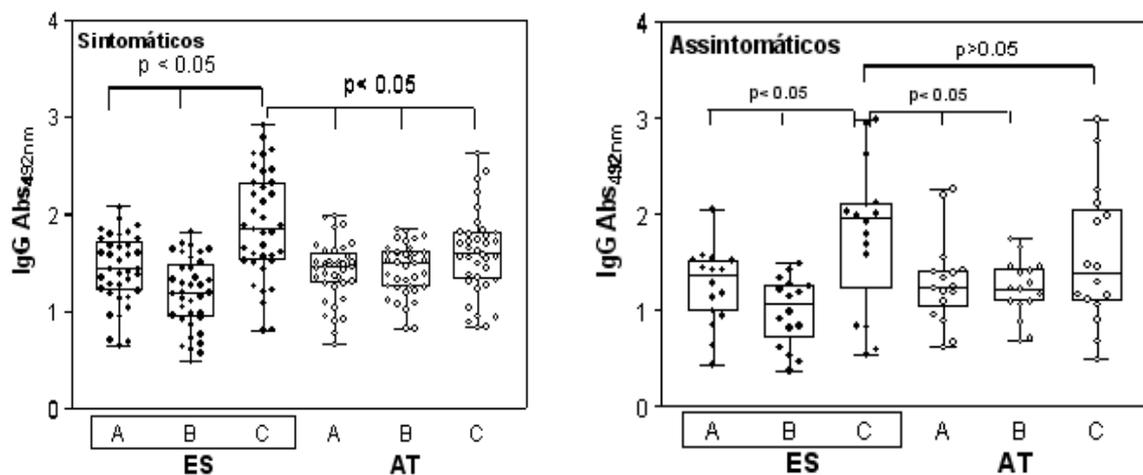


Figura 12- Reatividade do ELISA-ES e ELISA-AT, utilizando: A) *L. (L.) amazonensis*, B) *L. (V.) braziliensis*, C) *L. (L.) chagasi*; com 37 soros de cães sintomáticos e 16 soros de cães assintomáticos com parasitologia positiva. Cada ponto representa a reatividade observada para cada amostra medida em (Abs_{492nm}). Figura é apresentada em forma de wisker-box, que distribui a reatividade em quartis. A barra no meio do gráfico representa a mediana.

4.2.3 Índice de especificidade relativa

A especificidade relativa para os diferentes ELISAs foi calculada utilizando-se 59 amostras de soros (38 soros de animais sadios e 21 soros de cães com outras parasitose [*Babesia* sp (n=3), *Ehrlichia* sp (n=3), *Neospora* sp (n=3), *Toxoplasma gondii* (n=3), *Trypanosoma evansi* (n=2) e *Trypanosoma cruzi* (n=7)]).

Os índices de especificidade foram semelhantes entre os ELISAs-ES [89,8% (A); 88,1% (B) e 94,9% (C)] e os ELISAs-AT para as 3 espécies foi de 86,4% (Tabela 5).

Tabela 5- Especificidade relativa dos ELISAs-ES e AT, em porcentagem (%).

Índice	(n)	ELISA-ES (%)			ELISA-AT (%)		
		A	B	C	A	B	C
Especificidade	59	89,8	88,1	94,9	86,4	86,4	86,4

A = *L. (L.) amazonensis*, B = *L. (V.) braziliensis*, C = *L. (L.) chagasi*

4.2.4 Reatividade cruzada

Os ELISA-AT apresentaram as maiores reatividades cruzadas de 38% quando testados com soros de animais portadores de outras parasitoses, independentemente da espécie de *Leishmania* utilizada, as menores reatividades foram obtidos com os ELISA-ES (14,3-33,3%) (Tabela 6).

Como apresentado na tabela 6 a positividade do ELISA-ES de *L. (L.) chagasi* foi de 14,3% (com 2 soros de cão infectado com *T. evansi* e 1 soro de cão infectado com *T. cruzi*), com *L. (L.) amazonensis* de 28,6% e com *L. (V.) braziliensis* de 33,3%. O ELISA-AT apresentam reatividade de 38% para as 3 espécies.

Tabela 6- Número de casos com reatividade cruzada no ELISA-ES e AT, pertencentes ao grupo de animais com outras parasitoses.

Clínica	Número de casos positivos no ELISA						
	(n)	ELISA-ES			ELISA-AT		
		A	B	C	A	B	C
<i>Babesia</i> sp	3	0	0	0	0	0	0
<i>Ehrlichia</i> sp	3	0	0	0	0	0	0
<i>Neospora</i> sp	3	0	0	0	1	0	0
<i>T. gondii</i>	3	0	0	0	0	1	0
<i>T. evansi</i>	2	2	2	2	2	2	2
<i>T. cruzi</i>	7	4	5	1	5	5	6
Total n (%)	21	6(28,6)	7(33,3)	3(14,3)	8(38)	8(38)	8(38)

A = *L. (L.) amazonensis*, B = *L. (V.) braziliensis*, C = *L. (L.) chagasi*

A reatividade cruzada de 14,3% com menores títulos apresentada pelo ELISA-ES de *L. (L.) chagasi* indica que este teste pode ser indicado para o diagnóstico sorológico da Leishmaniose canina, uma vez que os ELISAs-AT que utilizam tanto *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) chagasi* resultaram em uma positividade cruzada de 28,6 e 33,3% respectivamente, com altos títulos (Figura 13).

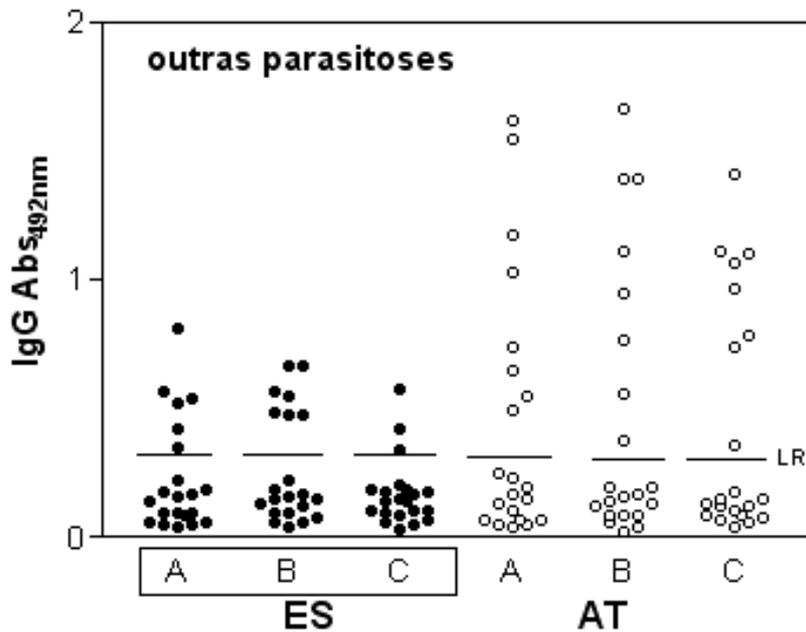


Figura 13- Distribuição da reatividade (Abs) com o ELISA-ES e AT [A] *L. (L.) amazonensis*, B) *L. (V.) braziliensis*, C) *L. (L.) chagasi*] de amostras de animais denominados "com outras parasitoses". A linha horizontal representa o limiar de reatividade (LR) para cada antígeno.

4.2.5 Avaliação imunodiagnóstica de cães com suspeita de Leishmaniose

Nesta etapa foram analisados 32 amostras de cães com suspeita de Leishmaniose canina, os quais tinham diagnóstico parasitológico negativo, sendo que aqueles que apresentavam sinais clínicos foram classificados como sintomáticos (n=20) e os sem sinais como assintomáticos (n=12) (Figura 4).

Os ELISAs ES e AT apresentaram positivities variadas no grupo de cães sintomáticos (Tabela 7), sendo de 55 a 70% para o ELISA-ES e 55% a 60% para o ELISA-AT de (Tabela 7). Nesta análise foi incluído um ELISA que utiliza extrato total de formas promastigotas de *L.(L.) chagasi*, obtido por congelamento e descongelamento, utilizado pelo grupo do departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da USP e denominado ELISA-T- FM, que apresentou 40% de positividade para o grupo de cães sintomáticos.

A positividade no grupo de cães diagnosticados como assintomático foi de 92% para o ELISA-ES [*L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis*], de 83% para *L. (L.) chagasi*, de 83% para o ELISA-AT [*L. (L.) amazonensis* e para *L. (V.) braziliensis*] e 75% para ELISA-T-FM de *L. (L.) chagasi*.

Tabela 7- Porcentagem de positividade do ELISA- ES ou AT com amostras de cães com suspeita de leishmaniose (n=32).

Clínica	(n)	ELISA ES n (%P)			ELISA AT n (%P)			T-FM
		A	B	C	A	B	C	
Sintomáticos	20	12(60)	14(70)	11(55)	11(55)	12(60)	12(60)	8(40)
Assintomáticos	12	11(92)	11(92)	10(83)	10(83)	10(83)	9(75)	9(75)
Total	32	23(71,9)	25(78,1)	21(65,6)	21(65,6)	22(68,7)	21(65,6)	17(53,1)

A = *L. (L.) amazonensis*, B = *L. (V.) braziliensis*, C = *L. (L.) chagasi*

Estes dados mostram a dificuldade do diagnóstico sorológico na leishmaniose canina, sugerindo que pode existir uma elevada porcentagem de cães assintomáticos que podem estar infectados com *Leishmania* spp. Apesar destes cães não apresentarem parasitas ao exame parasitológico e serem considerados suspeitos, uma positividade de 75 a 92%, dependente do antígeno utilizado, foi obtida no grupo considerado assintomático. Como houve discordância entre os ELISA-ES e/ou ELISA-AT, dependente do antígeno utilizado, o diagnóstico sorológico de alguns casos, tanto no grupo sintomático como no assintomático não foi possível (Tabela 7, Figura 14).

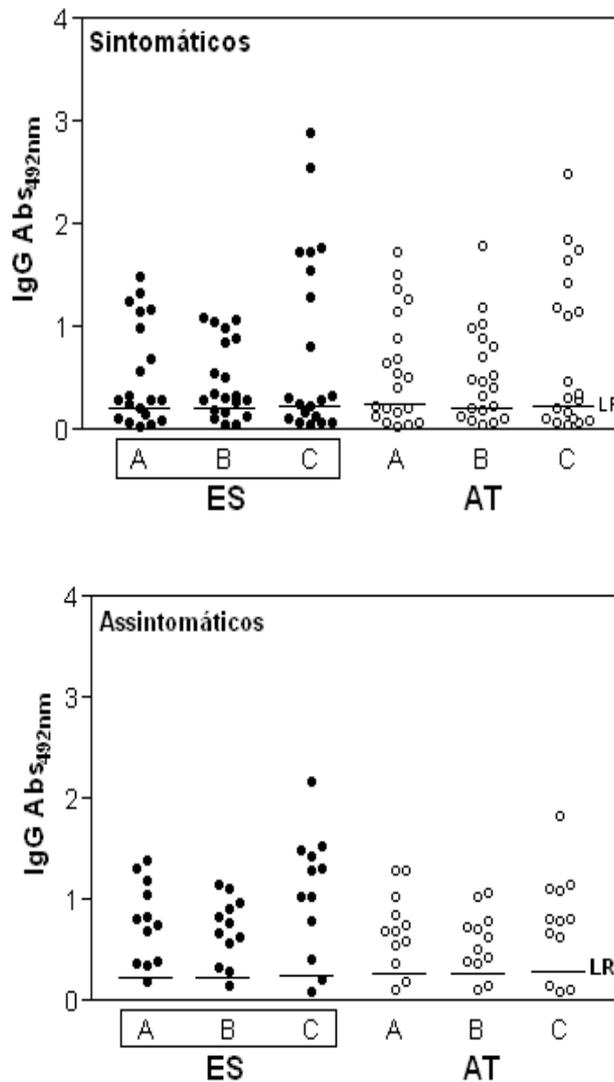


Figura 14- Distribuição da reatividade da IgG dos ELISA-ES e AT com leishmanias: A) *L. (L.) amazonensis*, B) *L. (V.) braziliensis*, C) *L. (L.) chagasi* de amostras de cães com suspeita de Leishmaniose canina, com diagnóstico parasitológico negativo e classificados de acordo com os sinais clínicos como sintomáticos e assintomáticos. A linha horizontal representa o limiar de reatividade (LR) para cada antígeno.

4.3 Exoantígenos

Os exoantígenos foram analisados quanto a sua reatividade, reprodutibilidade dos diferentes lotes assim como sua estabilidade ao armazenamento e ação de substâncias químicas ou físicas por ELISA e Immunoblotting.

4.3.1 Estabilidade e reprodutibilidade dos exoantígenos

A estabilidade e reprodutibilidade de um ES foi analisado pelo ELISA. Alíquotas de um lote de exoantígeno de *L. (L.) amazonensis* armazenadas por 0, 6 e 12 meses foram analisadas quanto sua estabilidade ao armazenamento. Simultaneamente foram analisadas sua reprodutibilidade após serem aquecidas ou não a 100 °C por 5min.

A adição ou não de inibidores de protease [1 mM fluoreto de fenil metil sulfonila (PMSF); 0,02 mM leupetptin; 0,5 mM EDTA e 0,5 mM antipain] no ES foram analisadas e alíquotas de cada amostra foram conservadas a -40 °C. Os resultados deste experimento estão representados na Figura 15, que mostram que tais tratamentos não influenciam a reatividade ou estabilidade dos exoantígenos.

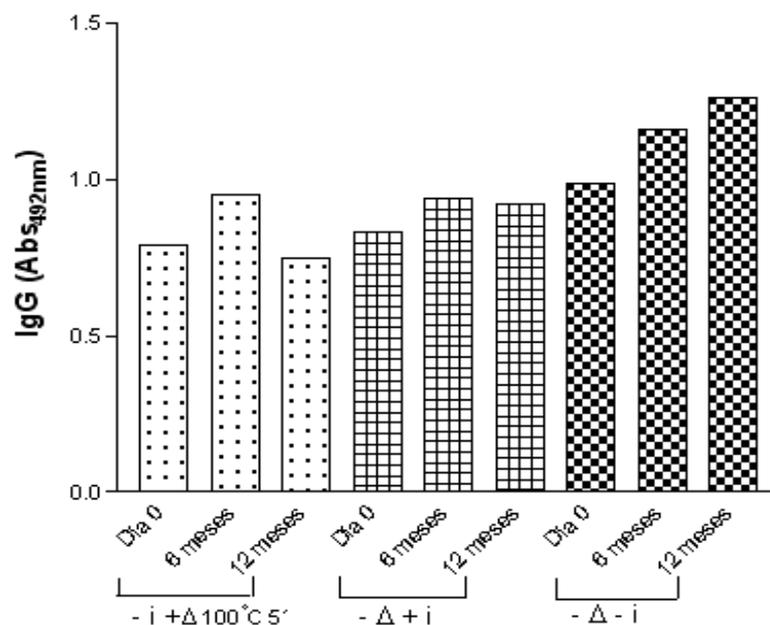


Figura 15- Reatividade por ELISA (Abs_{492nm}) do exoantígeno de *L. (L.) amazonensis* submetidos ou não a aquecimento e armazenados com ou sem a adição de inibidores de proteases e análise da influencia do tempo de armazenamento a -40 °C (0, 6, 12 meses). i = inibidores, Δ = aquecimento.

4.3.2 Reatividade de diferentes extratos antigênicos de *L. (L.) chagasi*

Após concluir que os exoantígenos (ES), em particular a *L. (L.) chagasi*, apresentaram os melhores resultados de sensibilidade e especificidade no diagnóstico da leishmaniose humana e canina, comparamos o perfil protéico de géis de poliacrilamida (gel a 12%) corados com Coomassie Blue contendo 3 diferentes preparados antigênicos de formas promastigotas de *L. (L.) chagasi* [parasitos íntegros (1×10^4 parasitas/ml), antígeno extrato alcalino (AT = 6 $\mu\text{g/ml}$) e exoantígenos (ES = 5×10^8 parasitas/ml)].

A figura 16 mostra um gel corado pelo corante Coomassie Blue, onde o antígeno ES não apresentou bandas protéicas, coradas o antígeno AT apresentou bandas protéicas sem definição e difusas e os parasitos íntegros (PI) apresentaram inúmeras bandas protéicas coradas.

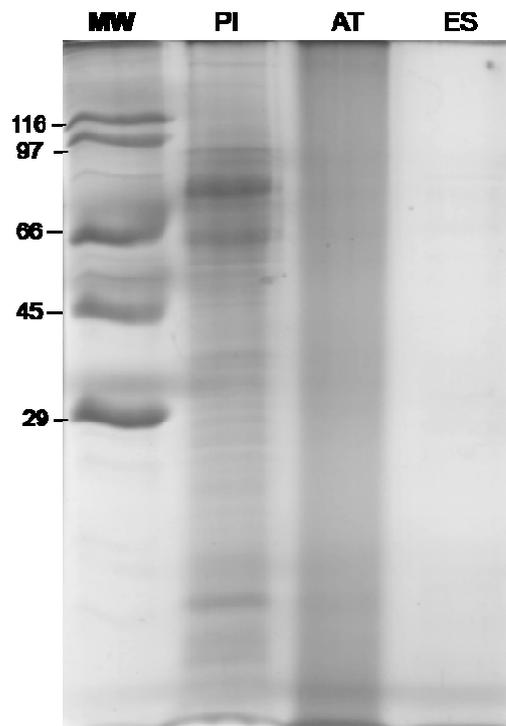


Figura 16- Análise de frações protéicas de três preparados antigênicos de *L. (L.) chagasi* de gel corado com o corante Coomassie Blue. MW= peso molecular High (Sigma Co) PI= parasitos íntegros, AT= antígeno total (obtido por digestão alcalina), ES=exoantígenos.

4.3.3 Immunoblotting de *L. (L.) chagasi*

O Immunoblotting (IB) de *L.(L.) chagasi* realizado com três diferentes preparados antigênicos (parasitos íntegros=PI, 1×10^4 parasitas/ml, extrato total alcalino=AT, 6 µg/ml e sobrenadante correspondente a 5×10^8 parasitas/ml=ES) transferidos para membrana de nitrocelulose (NTC) foi incubado com um soro de paciente com leishmaniose (sintomático) e um soro de cão (sintomático) com LV (1: 100).

A Figura 17 mostra os perfis protéicos reconhecidos pelos soros humano e de cão. O IB-PI apresentou inúmeros polipeptídios de PM entre 12 a 116 kDa, o IB-AT revelou bandas reativas de PM entre 66 a 97 kDa e uma banda predominante de PM 14 kDa. O IB-ES apresentou somente três bandas imunodominantes de PM relativos de 27, 28 e 31 kDa. Este immunoblotting foi denominado de IBleish-*L.(L.) chagasi*.

Diferenças quantitativas no perfil de reatividades das bandas, no parasita total, foram observadas quando foram comparadas amostras de soros de diferentes hospedeiros, humano ou cão (Figura 17). Uma banda de PM relativo de 14 kDa foi reconhecida pelo soro de hospedeiro humano. Quando se utilizou o antígeno total (AT) não se observou tais diferenças quando se comparou o perfil de reatividade o ES ou IBleish-*L. (L.) chagasi* quando se utilizou soros de hospedeiro humano ou cão.

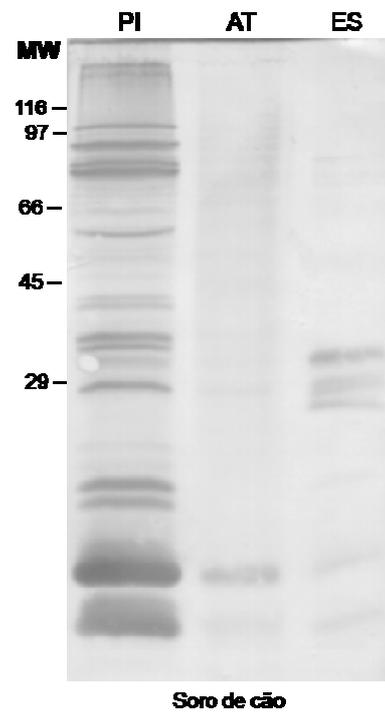
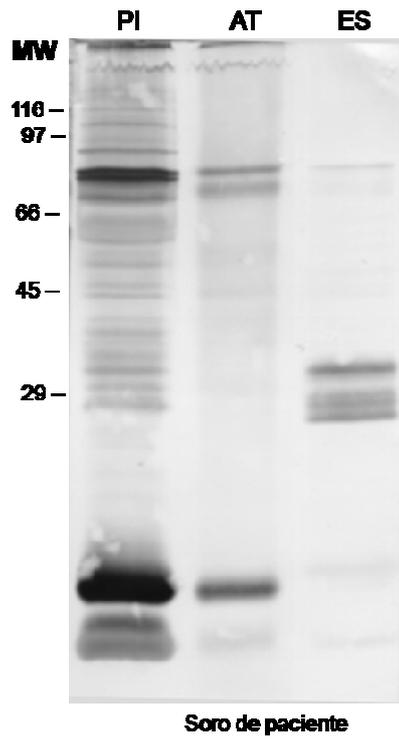


Figura 17- Perfil de reatividade por Immunoblotting dos antígenos de *L. (L.) chagasi* com um soro de paciente e um soro de cão com LV. MW= peso molecular High (Sigma), PI= parasitos íntegros, AT= antígeno total, ES= exoantígenos.

4.3.4 Reprodutibilidade do IBleish-*L. (L.) chagasi*

A reprodutibilidade do perfil de reatividade do IBleish-*L. (L.) chagasi*, de 3 diferentes lotes preparados em épocas distintas, foi executada com exoantígenos de formas promastigotas de *L. (L.) chagasi* obtido de 5×10^8 parasitas/ml.

As fitas de NTC contendo os exoantígenos [IBleish-*L. (L.) chagasi*] foram incubadas com soro de paciente (sintomático) ou cão (sintomático) (1: 100) com LV. A figura 18 mostra o perfil de reatividade destes soros que reagem com 3 bandas imunodominantes de PM de 27, 28 e 31 kDa, independente do hospedeiro. O mesmo perfil de reatividade foi observado nos diferentes lotes de exoantígenos, indicando que amostras coletadas em diferentes épocas são reprodutíveis.

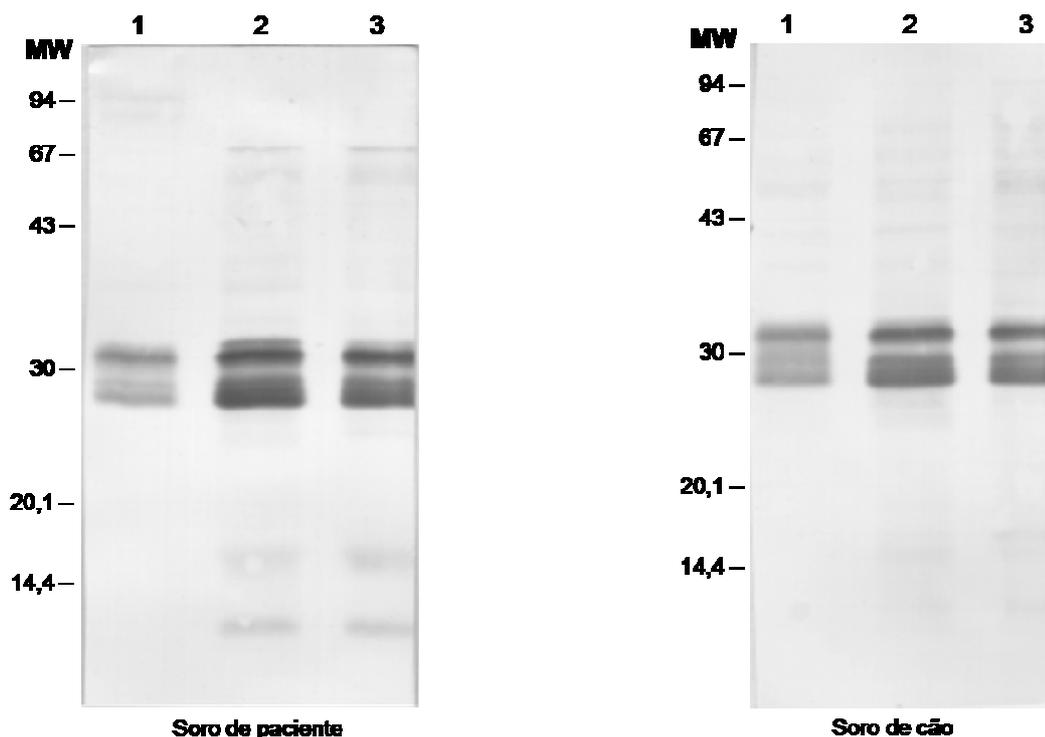


Figura 18- Perfil protéico do Immunoblotting de 3 lotes de exoantígeno de *L. (L.) chagasi* (IBleish), preparados em diferentes épocas. Soro de paciente e cão sintomáticos para LV. MW= Peso molecular (Sigma, Low), 1-Lote I(31/07/07), 2- Lote II (07/12/07), 3- Lote III (04/03/08).

4.4 IMMUNOBLOTTING (IBleish-ES) – HOSPEDEIRO CANINO

Nesta etapa do estudo, avaliamos por imunoblotting (IB) o perfil de reatividade de exoantígenos das 3 espécies de *Leishmania* (IBleish-ES), utilizando dois soros de cães clinicamente classificados como sintomático e assintomático (1: 100) e com diagnóstico parasitológico positivo.

A figura 19 mostra a similaridade dos perfis de reatividade para a espécie *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*, no qual 3 bandas foram imunodominantes e reconhecidas pelos dois soros, que reconheceram as bandas de PM 26,5; 27,5 e 30 kDa. Para a *L. (L.) chagasi* foram observadas 3 bandas reativas de PM de 27, 28 e 31 kDa. Cães de diferentes formas clínicas (sintomáticos e assintomáticos) mostraram a mesma reatividade ou apresentando o mesmo perfil antigênico.

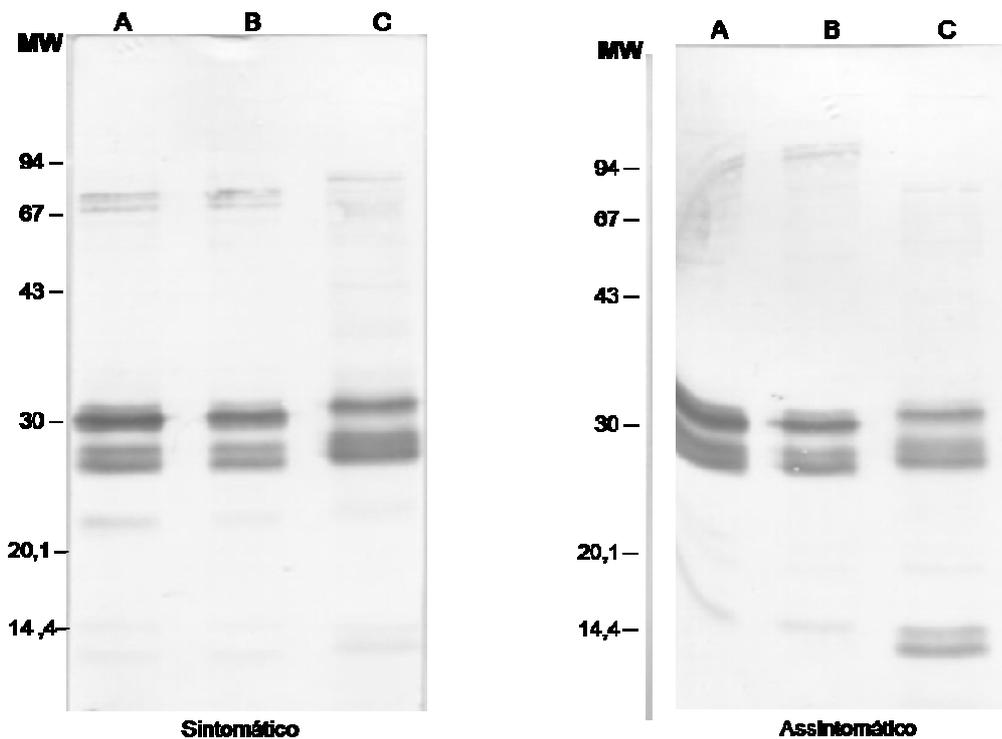


Figura 19- Perfis de reatividade do IBleish-ES das 3 espécies de *Leishmania*: A) *L. (L.) amazonensis*, B) *L. (V.) braziliensis*, e C) *L. (L.) chagasi*, com soros de cão com parasitologia positivo e clinicamente classificados como sintomático e assintomático. MW= padrão de peso molecular Low-Sigma.

4.4.1. Análise da reatividade do IBleish-*L. (L.) chagasi*

Uma vez conhecido o perfil de bandas obtidas com os soros de cão com leishmaniose visceral, com diagnóstico parasitológico positivo, o próximo objetivo foi avaliar a porcentagem de positividade do IBleish-*L. (L.) chagasi* em um número maior de amostras.

Nesta etapa a positividade do IBleish-*L. (L.) chagasi* foi de 100% quando se analisou 20 amostras de soros de cão (10 sintomáticos e 10 assintomáticos) com diagnóstico parasitológico positivo. A sensibilidade do IBleish-*L. (L.) chagasi* foi de 100%. Todos os 20 cães apresentaram o mesmo perfil de reatividade, reconhecimento as 3 bandas de PM 27, 28 e 31 kDa.

4.4.2 Análise da reatividade cruzada do IBleish-*L. (L.) chagasi*

A próxima etapa foi testar o IBleish-*L. (L.) chagasi* para verificar a porcentagem de positividade ou reatividade cruzada utilizando amostras de cães infectados com outras parasitoses. Um soro de cão com *T. cruzi* reagiu com o IBleish-*L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* e não reagem com o IBleish-*L. (L.) chagasi* (Figura 20). Nesta etapa utilizou-se 41 soros incluindo: 20 de animais saudáveis e 21 de cães com outras doenças [*Babesia* sp (n=3), *Ehrlichia* sp (n=3), *Neospora* sp (n=3), *Toxoplasma gondii* (n=3), *Trypanosoma cruzi* (n=7) e *Trypanosoma evansi* (n=2)].

Os resultados nos indicaram que:

Soros de animais saudáveis e com outras doenças não reagem com o IBleish-*L. (L.) chagasi*, não havendo nenhuma reação considerada positiva, portanto 100% de especificidade, reatividade com as 3 bandas de PM 27, 28 e 31 kDa. Dois cães infectados com *T. evansi* (Figura 20 e 21) e um cão infectado com *T. cruzi* (Figura 20) reagiram com uma banda de PM 28 kDa.

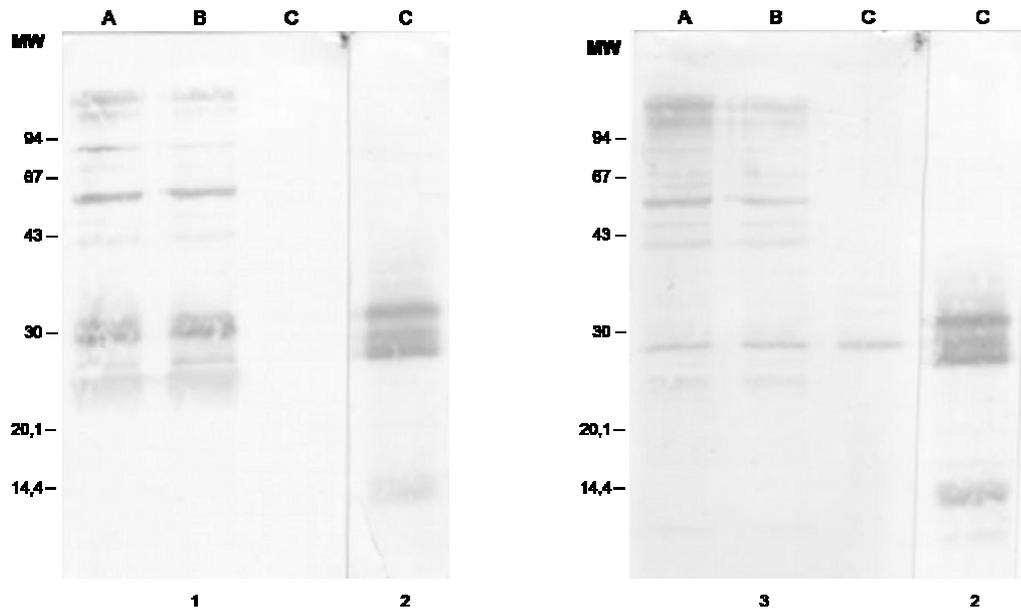


Figura 20- Perfil de reatividade do IBleish-ES das três espécies de *Leishmania*: A) *L. (L.) amazonensis*, B) *L. (V.) braziliensis*, C) *L. (L.) chagasi*, 1-Soro de cão infectado com *T. cruzi*, 2- Soro de cão infectado com LV -controle positivo, 3- Soro de cão infectado com *T. evansi*. MW= padrão de peso molecular Low-Sigma.

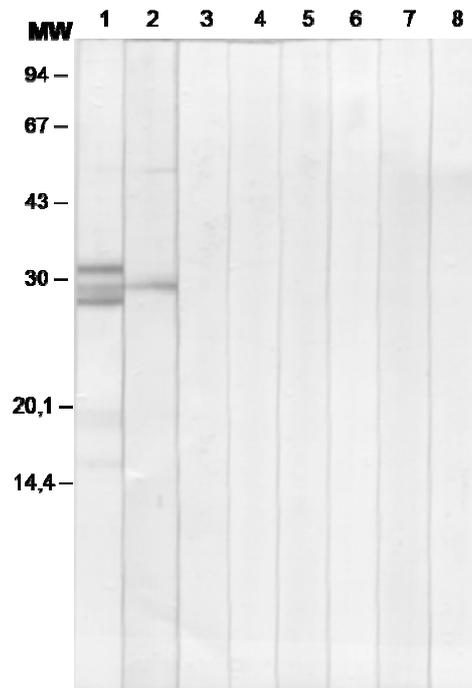


Figura 21- Perfil de reatividade apresentado por cães com outras parasitoses [IBleish- *L. (L.) chagasi*]. MW= padrão de peso molecular Low-Sigma. 1- soro controle positivo, 2- soro com *T. evansi*, 3- soro com *T. cruzi*, 4-soro com *Babesia* sp, 5- soro com *Ehrlichia* sp, 6- soro com *Neospora* sp, 7- soro com *Toxoplasma gondii*, 8- soro controle negativo.

4.4.3 Perfil de reatividade dos cães com suspeita de leishmaniose por IBleish-*L.(L.) chagasi*

Esta etapa de nosso trabalho consistiu em avaliar os soros de 32 cães com suspeita de Leishmaniose canina os quais apresentavam diagnóstico parasitológico negativo e sorologia discordante, amostras previamente analisadas no item 4.2.5 (Tabela 7). A avaliação das 32 amostras [sintomáticos (n=20) e assintomáticos (n=12)] pelo IBleish-*L.(L.) chagasi* (Tabela 8) mostrou que:

- 1) 62,5% (20/32) das amostras foram positivas no IBleish-*L.(L.) chagasi*, sendo 50% (10/20) dos sintomáticos e 83,3% (10/12) dos assintomáticos;
- 2) 37% (12/32) das amostras foram negativas no IBleish-*L.(L.) chagasi* quando se considerou a positividade simultânea para o ELISA e IBleish-*L.(L.) chagasi*, os resultados mostram que:
 - a) 53% (17/32) dos casos foram simultaneamente positivos para os dois testes (ELISA e IB);
 - b) 12,5% (4/32) foram simultaneamente negativos para os dois testes (ELISA e IB);
 - c) 34,4% (11/32) são amostras consideradas discordantes, uma vez que apresentam reações positivas em pelo menos um teste (Tabela 9);
 - d) 40% (8/20) dos sintomáticos e 75% (9/12) dos assintomáticos apresentaram positividade simultânea nos dois testes (Tabela 8).

Tabela 8- Porcentagem de positividade (%) do IBleish-*L.(L.) chagasi* em amostras de cães com suspeita de Leishmaniose.

	IBleish-ES (+)			IBleish-ES (-)			Total
	ELISA (ES e AT)*			ELISA (ES e AT)*			
Clínica	(+)	(-)	(d)	(+)	(-)	(d)	
Sintomáticos	8(40)	1(5)	1(5)	2(10)	4(20)	4(20)	20
Assintomáticos	9(75)	0	1(5)	0	0	2(16,6)	12
Total	17(53)	1(31)	2(6,3)	2(6,3)	4(12,5)	6(18,8)	32

A = *L.(L.) amazonensis*, B = *L.(V.) braziliensis*, C = *L.(L.) chagasi*

*(+)= positivo nos 6 ELISAs (ES e AT), (-)= negativo nos 6 ELISAs (ES e AT), (d)= discordante.

Na tabela 9 estão apresentados os 11 casos [34,4% (11/32)] com resultados discordantes entre o ELISAs (ES e AT) e o IBleish- *L. (L.) chagasi*, tendo como critério os que apresentam uma reação positiva em pelo menos um teste.

Tabela 9- Número de casos positivos discordantes nos ELISAs (ES e AT) comparada com IBleish- *L. (L.) chagasi*, positivo ou negativo.

IBleish (+)		ELISA-ES			ELISA-AT		
		A	B	C	A	B	C
Sintomático	1(d)	1	1	1	0	0	0
Sintomático	1 (-)	0	0	0	0	0	0
Assintomático	1 (d)	1	1	1	0	0	0
Falso negativo	3(27,3)	2(18)	2(18)	2(18)	0	0	0
IBleish (-)							
Sintomático	6 (d)	3	5	1	3	5	5
Assintomático	2 (+)	1	1	1	1	1	0
Falso positivo	8(72,7)	4(36)	6(55)	2(18)	4(36)	6(55)	5(45)

A= *L. (L.) amazonensis*, B= *L. (V.) braziliensis*, C= *L. (L.) chagasi*

No grupo dos 11 casos discordantes concluiu-se que:

- 27,3% (3/11) com IBleish-*L. (L.) chagasi* positivo foram discordantes no ELISA, estas amostras foram negativas no ELISA-AT, portanto casos falso-negativos. Um caso foi negativo para todos os ELISAs;
- 72,7% (8/11) dos casos foram negativos para o IBleish-*L. (L.) chagasi*, mas positivos no ELISA-ES e/ou AT, neste caso consideramos como falsos positivos.

4.5 IMMUNOBLOTTING (IBleish-ES) – HOSPEDEIRO HUMANO

A primeira etapa desta fase consistiu em avaliar a influencia da clínica do paciente com LV (sintomático, oligossintomático e assintomático) na reatividade no IBleish-ES das 3 espécies de *Leishmania* (diluição de 1: 100).

O perfil de bandas reativas dos IBleish-ES das 3 espécies reconhecidas por um paciente sintomático foi:

- a) IB de *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* apresentaram 3 bandas imunodominantes de PM de 26,5; 27,5 e 30 kDa;
- b) IB de *L. (L.) chagasi* apresentou 3 bandas imunodominantes de PM de 27, 28 e 31 kDa (Figura 22).

O perfil de bandas reativas no IBleish-ES reconhecida por um paciente oligossintomático foi:

- a) IBleish-*L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* apresentaram perfis similares com 3 bandas imunodominantes de PM de 26,5; 27,5 e 30 kDa e várias bandas de 43 a 94 kDa;
- b) IBleish-*L. (L.) chagasi* apresentou 3 bandas reativas de PM 27, 28 e 31kDa e adicionalmente outras bandas de PM no intervalo de 35 a 94kDa (Figura 23).

O perfil de bandas reativas no IBleish-ES reconhecida por um paciente assintomático foi:

- a) IBleish-*L. (L.) amazonensis* apresentou 2 bandas distintas com PM de 54 kDa e 14 kDa;
- b) IBleish-*L. (L.) braziliensis* apresentou uma banda reativa de 54 kDa e 3 bandas de PM 26,5; 27,5 e 30 kDa;
- c) IBleish-*L. (L.) chagasi* apresentou 3 bandas reativas de PM 27, 28 e 31 kDa, adicionalmente outras bandas de PM no intervalo de 43 a 67kDa, e duas bandas distintas de PM 10 e 14 kDa (Figura 23).

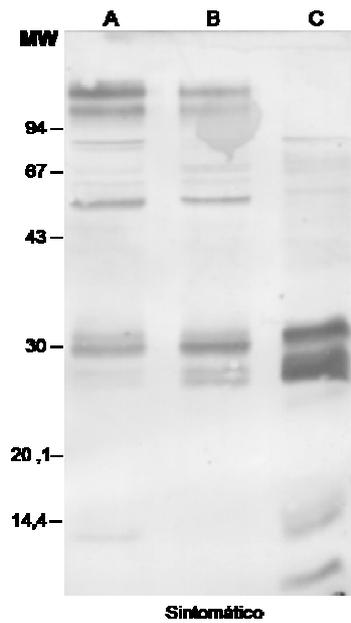


Figura 22- Perfis de reatividade, por Immunoblotting do ES (IBleish-ES) das 3 espécies de *Leishmania*: A) *L. (L.) amazonensis*, B) *L. (V.) braziliensis*, C) *L. (L.) chagasi*; com soro de paciente sintomático para LV com parasitologia positiva. MW= padrão de peso molecular Low-Sigma.

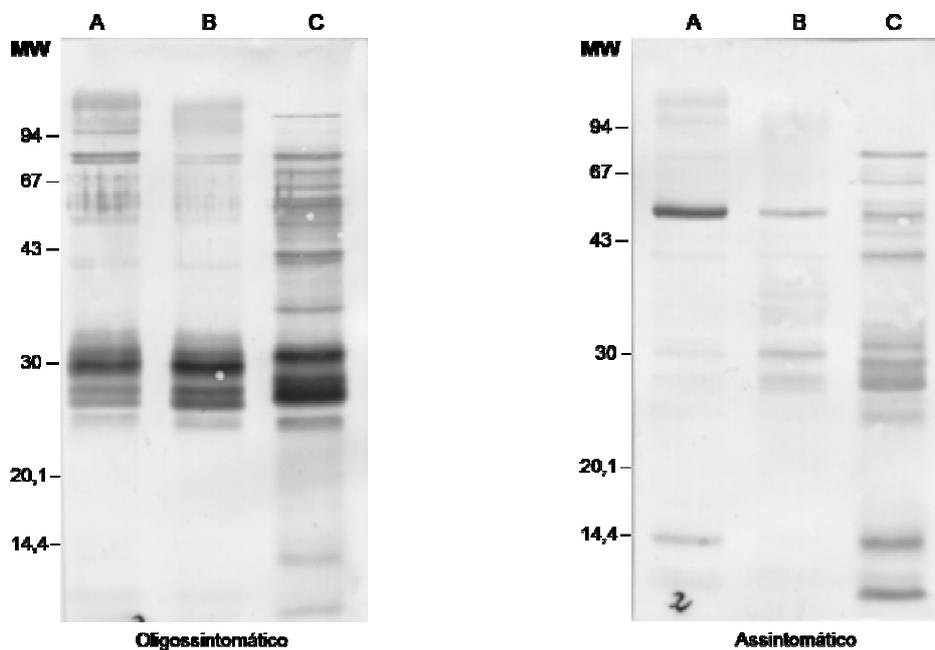


Figura 23- Perfis de reatividade, por Immunoblot do ES (IBleish-ES) das três espécies de *Leishmania*: A) *L. (L.) amazonensis*, B) *L. (V.) braziliensis*, C) *L. (L.) chagasi*; com amostras de soro de paciente com LV oligossintomático e assintomático. MW= padrão de peso molecular Low-Sigma.

A avaliação da porcentagem de positividade do IBleish-ES de *L. (L.) chagasi* foi efetuada em um grupo de 24 pacientes com LV, clinicamente considerados sintomáticos ($n=15$), oligossintomáticos ($n=5$) e assintomáticos ($n=4$) e com diagnóstico parasitológico positivo.

Os dados obtidos no IBleish-*L. (L.) chagasi* foram:

- a) obtenção de positividade de 100% em todos os grupos de pacientes;
- b) concluindo, a sensibilidade do IBleish-*L. (L.) chagasi* foi portanto de 100%;
- c) todos os 24 pacientes reconheceram as bandas de PM 27, 28 e 31 kDa.

4.5.1 Análise da reatividade cruzada do IBleish-ES

A reatividade cruzada do IBleish-ES foi avaliada com 125 amostras de soros de 10 indivíduos sadios e 115 soros de indivíduos com outras doenças [16 com leishmaniose cutânea (LC), 16 com leishmaniose mucocutânea (LMC), 20 chagásicos na fase crônica (DC), 63 com outras doenças (OD) [lúpus eritematoso sistêmico ($n=4$), doença autoimune com fator anti-núcleo positivo ($n=14$); com artrite reumatóide ($n=3$); anti-streptolisina O positiva ($n=5$); infectados com *S. mansoni* ($n=5$), *T. gondii* ($n=6$), *Toxocara canis* ($n=3$), *Plasmodium* sp ($n=13$), pacientes com paracoccidiodomicose ($n=6$) e tuberculose ($n=4$)].

Os resultados obtidos no IBleish-*L. (L.) chagasi* foram:

- a) 100% dos casos foram negativos para *L. (L.) chagasi* quando foram analisados indivíduos sadios e com outras doenças, excetuando os com leishmaniose cutânea (LC) e leishmaniose mucocutânea (LMC). Nestes dois últimos casos houve uma reatividade quantitativamente mais fraca (Figura 24) das bandas de PM 27, 28 e 31 kDa;
- b) Os pacientes com doença de Chagas não reagiram (sem bandas) com o IBleish-*L. (L.) chagasi* de *L. (L.) chagasi*, mas reagiram com IBleish de *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* (Figura 25).

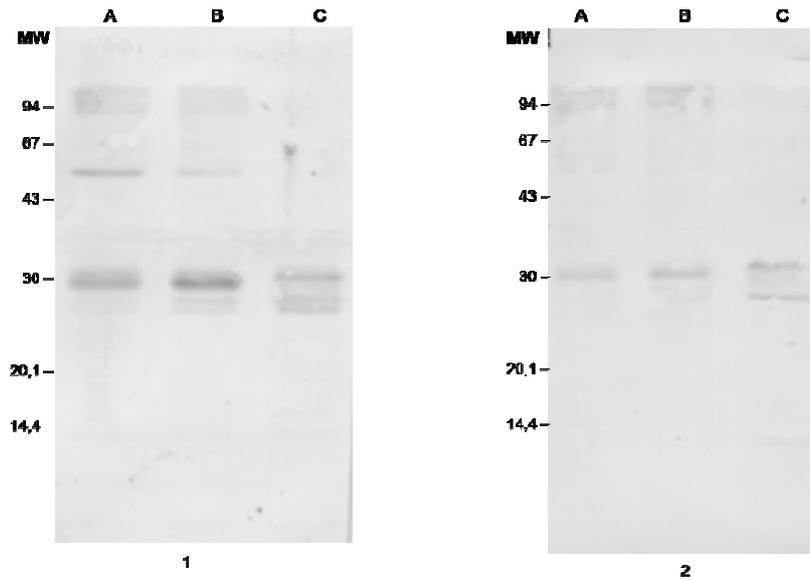


Figura 24- Perfil protéico da positividade dos antígenos ES das três espécies de *Leishmania*: A) *L. (L.) amazonensis*, B) *L. (V.) braziliensis*, C) *L. (L.) chagasi*; com amostras de soros de pacientes 1- com Leishmaniose cutânea, 2- com Leishmaniose mucocutânea.

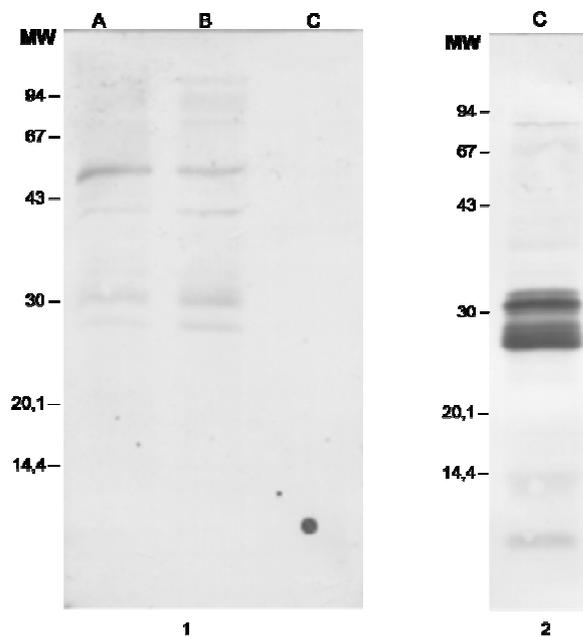


Figura 25- Perfis protéico da positividade do IBleish-ES das 3 espécies de *Leishmania*: A) *L. (L.) amazonensis*, B) *L. (V.) braziliensis*, C) *L. (L.) chagasi*; com amostra de soros de paciente 1- com doença de Chagas, 2- com Leishmaniose visceral (padrão positivo). MW= padrão de peso molecular Low-Sigma.

A comparação da positividade de pacientes com LC e LMC nos testes IBleish e ELISA de *L. (L.) chagasi* podem ser vistos na tabela 10.

Tabela 10- Comparação da reatividade do IB e ELISA - ES de *L. (L.) chagasi* com pacientes com LC e LMC.

		LC (n=16)			LMC (n=16)		
		IBleish n (%)		Total	IBleish n (%)		Total
ELISA-ES n (%)		+	-		+	-	
	+	3(19)	2(13)	5(31)	2(13)	5(31)	7(44)
	-	6(38)	5(31)	11(69)	5(31)	4(25)	9(56)
Total		9(56)	7(44)	16 (100)	7(44)	9 (56)	16(100)

LC= leishmaniose cutânea, LMC= leishmaniose mucocutânea

No grupo dos pacientes com LC (n=16) concluiu-se que:

- de 56% (9/16) amostras positivas pelo IBleish-*L. (L.) chagasi* 38% (6/16) foram negativas no ELISA e somente 19% foi positiva para ELISA e IB;
- de 44% (7/44) das amostras negativas pelo IB, 13% (2/7) foram discordantes entre os 2 testes e somente 31% foi negativo para os 2 testes.

No grupo dos pacientes com LMC (n=16) concluiu-se que:

- das 44% (7/16) amostras positivas pelo ELISA, 31% (5/16) foram negativas no IBleish-*L. (L.) chagasi*. Somente 13% (2/16) das amostras de soros foram simultaneamente positivas para os dois testes;
- 56% (9/16) das amostras negativas para IB 31% (5/16) são amostras discordantes e 25% (4/16) são negativas para os 2 testes.

Nossos dados mostram a dificuldade do diagnóstico da LV em regiões que ocorrem concomitantemente a LC e LMC.

5 DISCUSSÃO

5.1 ELISA – HOSPEDEIRO HUMANO

A grande vantagem do uso de testes sorológicos no diagnóstico da Leishmaniose visceral humana é a presença de altos níveis de anticorpos IgG anti-*Leishmania* nos indivíduos infectados (BADARÓ et al., 1983) facilmente detectados por diferentes técnicas imunodiagnósticas (MOHAMMED et al., 1986; ANAM et al., 1999a). No entanto várias anormalidades imunológicas são dificilmente detectadas pelos testes sorológicos tais como hiperglobulinemia (REZAI et al., 1978), ausência de resposta a testes intradérmicos (ANDRADE et al., 1982), diminuição do número de linfócitos T (REZAI et al., 1978; CARVALHO, TEIXEIRA e JOHNSON, 1981) e presença de complexos imunes circulantes (KHARAZMI et al., 1982; CARVALHO et al., 1983).

As limitações dos testes sorológicos que não utilizam antígenos recombinantes, em relação à sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade podem estar relacionadas à falta de uma padronização (ANTHONY et al., 1980). Mas, muitas destas limitações são desconhecidas, podendo estar relacionadas com a metodologia de obtenção (físicos ou químicos) do antígeno, os quais inadvertidamente podem alterar sua estrutura primária e assim comprometer sua antigenicidade (MARTIN et al., 1998; RYAN et al., 2002).

Muitos autores baseados no fato de que diferentes espécies de *Leishmania* apresentam uma homologia genética que podem variar de 69 a 90% (HADMAN, 2001) sugerem a utilização de antígenos heterólogos no imunodiagnóstico da Leishmaniose visceral e de outras Leishmanioses para melhorar os índices imunodiagnósticos. O mesmo acontece em relação à produção de vacinas (RACHAMIM e JAFFE, 1993; VEXENAT et al., 1996; LASRI et al., 1999; BARBOSA DE DEUS et al., 2002; VALE et al., 2009).

No entanto não podemos nos esquecer que algumas moléculas quando utilizadas como antígeno nos testes diagnósticos podem ser responsáveis pela reatividade cruzada por estar compartilhadas entre a família *Trypanosomatidae*, interferindo nos índices de

especificidade (GARDINER et al., 1984). Assim, Gomes-Silva et al. (2008) mostraram que, epitopos de carboidratos presentes nestes parasitas são responsáveis, em parte, pelos elevados níveis de reatividade cruzada, no diagnóstico de pacientes com Leishmaniose tegumentar americana (LTA), doença de Chagas (DC) e Leishmaniose visceral (LV). Epitopos de superfície de microtubulos do citoesqueleto das leishmanias, os quais estão em estreita associação com a membrana celular, são moléculas presentes em todos os tripanosomatídeos, explicando em parte a reatividade cruzada entre os diferentes membros da família *Trypanosomatidae* (DWYER, 1980).

Porém, os resultados variados obtidos no diagnóstico de rotina laboratorial da LVH, levaram vários autores a sugerir que a espécie de *Leishmania* e o tipo de molécula antigênica empregado é que estariam diretamente relacionados à eficácia dos mesmos (BADARÓ et al., 1983; 1986; BARBOSA DE DEUS et al., 2002; ROSÁRIO et al., 2005; BALEEIRO et al., 2006).

Inúmeros são os trabalhos científicos que abordam o tema: “Diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral”, que avaliam a resposta humoral utilizando diferentes antígenos de diferentes espécies, quer sejam extratos totais, ou de moléculas purificadas (BADARÓ et al., 1986; ALVES e BEVILACQUA, 2004; BALEEIRO et al., 2006). Entretanto, aqueles que avaliam comparativamente testes que empregam moléculas excretadas-secretadas (MARTIN et al., 1998; RAJASEKARIAH et al., 2001; RYAN et al., 2002), de diferentes espécies de *Leishmania* são poucos (RAJASEKARIAH et al., 2008) ou inexistentes, portanto foco de um dos nossos objetivos.

Exoantígenos, citadas como fatores de excreção, já se mostravam ser antigênicas quando utilizadas por Schnur, Zuckerman e Greeblatt em 1972 e por EL-ON et al. em 1979, quando utilizaram exoantígenos de *L. donovani* e por testes de precipitação foram reconhecidos por anticorpos específicos. Uma fosfatase ácida (SACP), metabólito excretado, testada por Bates et al. (1987) mostrou acentuada atividade antigênica levando os autores a concluir que poderia ser utilizada no imunodiagnóstico da LVH.

Mais recentemente, a fração de exoantígenos, que contém moléculas solúveis nativas de Leishmanias vem despertando grande interesse de inúmeros pesquisadores e vem sendo empregada como vacina e na terapêutica da LV (LEMESRE et al., 2005, 2007). Os estudos estruturais mostraram que estes contém moléculas cuja conformação estrutural induz imunidade mediada pelas células T e B estimulando a produção de elevados níveis de IgG anti-leishmania (LEMESRE et al., 2007). Assim como a conformação estrutural é

importante para o desenvolvimento de vacinas (LEMESRE et al., 2005, 2007) esta também poderia estar relacionada com o aumento da sensibilidade/especificidade dos testes sorológicos que utilizam exoantígenos (RAJASEKARIAH et al., 2001; RYAN et al., 2002).

Em 1998, Martin e colaboradores utilizaram, pela primeira vez, no diagnóstico sorológico da LVH exoantígenos da *Leishmania donovani* e concluíram que estes eram mais sensíveis e específicas do que o extrato bruto. No decorrer desta década este grupo vem utilizando exoantígenos no diagnóstico sorológico das leishmanioses (RAJASEKARIAH et al., 2001; RYAN et al., 2002; RAJASEKARIAH et al., 2008).

Nosso estudo, para esclarecer se a espécie de Leishmanias [*L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) chagasi*] e/ou a forma da obtenção dos antígenos podem influenciar o diagnóstico da LV humana e LV canina, mostrou que, ELISAs que utilizam exoantígenos ou antígeno total apresentaram sensibilidades de 100%, independente da espécie de *Leishmania* (Figura 8), o que nos levou a concluir que o sorodiagnóstico da leishmaniose visceral humana não é influenciado pela espécie de leishmania utilizada no teste.

Nossos dados estão próximos aos relatados na literatura, uma vez que antígenos totais (AT) preparados com diferentes espécies de leishmanias apresentam sensibilidade de 100%. No entanto quando se utilizou antígenos preparados diferentemente (exoantígenos ou extrato total) foram observadas significativas diferenças estatísticas na reatividade ou seja na média ou mediana da reatividade ($p < 0.05$) entre o ELISA-ES e o ELISA-AT quando preparados com a *L. (L.) chagasi* (Figura 8 e 10).

Outros autores como Baleeiro e colaboradores (2006) chegaram à mesma conclusão quando compararam a eficiência antigênica (antígeno total) de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. chagasi*. Obtiveram maiores títulos quando se empregou a *L. chagasi*. Vários autores exploraram esta temática, mostrando que o uso de parasitas espécie-específica resultam em melhores resultados no diagnóstico de pacientes infectados com *L. (L.) chagasi*. Nesta abordagem, Badaró et al. (1983) mostraram, por imunofluorescência uma sensibilidade de 100% quando utilizou *L. chagasi* e de 80% quando utilizou *L. mexicana*. Outros estudos até consideram que a procedência geográfica de uma cepa pode influenciar na sensibilidade do diagnóstico da LVH, como demonstrado por Badaró et al. (1986) que constatou que o ELISA preparado com uma cepa de *L. (L.) chagasi* proveniente da mesma região do soro do doador foi capaz de reagir melhor do que quando utilizou um parasita isolado de outra região.

Uma comparação mais abrangente entre os nossos dados com os publicados seria extremamente cansativa, pois os dados de positividade sempre variam de 94 a 100%, dependendo de cada autor e da região analisada, incluindo que possivelmente até a cepa de *Leishmania* utilizada pode influenciar na positividade (BADARÓ et al., 1986).

Concluimos que tanto nossos resultados como os resultados publicados mostram que antígenos totais preparados com a *L. (L.) chagasi* apresentaram títulos mais altos de anticorpos IgG anti-leishmania quando utilizados no diagnóstico da Leishmaniose visceral humana (VEXENAT et al., 1996; BARBOSA DE DEUS et al., 2002; PASSOS et al., 2005). Nossos dados mostram também que tal sensibilidade, de 100%, foi também obtida quando se utilizou as espécies *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* no diagnóstico da LVH.

Não esqueçamos que altas sensibilidades de 100% também podem ser apresentadas por proteínas recombinantes, como a rK39 (MAALEJ et al., 2003) .

A eficácia de diferentes antígenos foi observada não só no imunodiagnóstico mas também na reação intradérmica de Montenegro, a sensibilidade de 100% foi obtida quando se utilizou um extrato solúvel de *L. (L.) chagasi* e 82% com a *L. amazonensis* , em uma análise de indivíduos com história de LV progressiva (REED et al., 1986).

Martin et al. (1998) também obtiveram a sensibilidade de 100% quando utilizaram exoantígenos de *L. donovani*, na detecção do kalazar em pacientes do Quênia e Nepal, posteriormente obtiveram sensibilidades de 100% e 94,57% na detecção de anticorpos respectivamente de IgG e IgM (RYAN et al., 2002). Altos índices de sensibilidades do exoantígeno no diagnóstico da LVH também foram relatados por outros autores (RAJASEKARIAH et al., 2001; RYAN et al., 2002). Outros sugerem que estes exoantígenos, devido a sua alta antigenicidade, podem ser detectados por soros de pacientes com *Leishmania* diluídos a 1: 2000, obtendo testes com maior especificidade, pela eliminação de resultados falso-negativos (RYAN et al., 2002).

No entanto nossos objetivos não englobaram a problemática da correlação entre evolução e prognóstico da LVH, segundo vários autores esta correlação estaria ligada com o nível de imunoglobulinas de diferentes sub-classes de IgG (IgG1, IgG3 e IgG4) (ELASSAD et al., 1994; ANAM et al., 1999a,b). Segundo Anam e colaboradores (1999a) a IgG1 seria predominante na fase aguda da doença. A presença de IgG3, estimulada pelos antígenos de membrana da *Leishmania*, seria considerada um marcador de diagnóstico da leishmaniose visceral na Índia. Para Ellassad e colaboradores (1994) as imunoglobulinas IgG1 e IgG3

estariam significativamente reduzidas após o tratamento de pacientes Sudaneses com leishmaniose (ELASSAD et al., 1994), e em 1999b Anam e colaboradores mostraram que a diminuição de anticorpos IgG1 e IgG4 indicaria eficácia do tratamento quimioterápico no kalazar humano. Badaró et al. (1985) descreveram que durante a fase ativa da doença é comum que os pacientes apresentem títulos elevados de anticorpos anti-leishmania.

Os problemas sobre a reatividade cruzada dos testes diagnósticos para a LVH, que resultam em testes com baixas especificidades podem ser devido à utilização de antígenos como um extrato total. Principalmente quando se analisam simultaneamente pacientes com leishmaniose provenientes de regiões endêmicas para doença de Chagas e ou leishmaniose tegumentar (BADARÓ et al., 1983; VEXENAT et al., 1996; MARTIN et al., 1998; BRITO et al., 2000).

Apesar da sensibilidade alta obtida com proteínas recombinantes, por exemplo com a rK39 que apresenta uma sensibilidade de 100% o mesmo mantém uma especificidade de 97% quando comparada com o extrato total de 94%, quando avaliada em uma região com ausência de infecções por outras tripanossomíases (MAALAJ et al., 2003).

A resposta humoral na Leishmaniose tegumentar americana (LTA) é insuficiente para desencadear altos níveis de anticorpos anti-Leishmania, sendo que nas infecções humanas a resposta imune é predominantemente celular. A resposta CD4+, do tipo 1, estimula a produção de INF γ , o que determina resistência à infecção por Leishmania, com baixa resposta humoral e observada em pacientes curados ou recém infectados (AJDARY et al., 2000). A resposta do tipo 2, estimula a produção de IL4 e promove a diferenciação da resposta humoral (SILVEIRA, LAINSON e CORBETT, 2004). No entanto, este fato permanece controverso, pela baixa quantidade de anticorpos séricos detectáveis pelos métodos tradicionais e pela infinidade de reações cruzadas observadas, principalmente quando se utilizam técnicas imunoenzimáticas que apresentam alta sensibilidade.

Nossos dados sobre índice de especificidade relativa, que representa o número de amostras que apresentaram reatividade cruzada, foi calculado com 147 amostras de soros incluindo [indivíduos sadios (n=32), leishmaniose cutânea e muco-cutanea (n= 32), doença de Chagas (n=20) e outras doenças (n=63)] cujas especificidades dos exoantígenos foram de 92,5%, 92,5% e 91,2%. Menores índices de especificidade foram obtidos com os antígenos totais respectivamente de 74,2%, 75,5% e 77,6% para *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) braziliensis* e

L. (L.) chagasi (Tabela 3), mostrando uma maior reatividade cruzada quando se utilizou o antígeno total do parasita.

Quando, desta análise, se omitiu o grupo de pacientes infectados com *Leishmania* spp a especificidade para o teste que utilizou exoantígenos foi de 92,2% a 99,1% semelhante ao obtido na análise geral. Entretanto para o antígeno total a especificidade encontrada foi de 82,6% a 87% (Tabela 3). Estes dados indicam claramente que a reatividade cruzada maior se encontra entre os pacientes infectados com *Leishmania* spp que reagem cruzadamente com as 3 diferentes espécies de *Leishmania*, aqui analisadas, não havendo uma correlação espécie-específica.

Ao analisar os dados da tabela 4A e 4B chegamos à conclusão que além dos pacientes com leishmaniose os infectados com *T. cruzi* também reagem com o antígeno total de parasitas das 3 espécies de leishmanias utilizadas no teste. Um dos problemas abordados constantemente no sorodiagnóstico da Leishmaniose (BADARÓ et al., 1983; REED et al., 1987).

A especificidade obtida com os exoantígenos foi elevada (Tabela 3, 4A e 4B) e semelhante ao obtido com uma proteína recombinante a rK39.

Embora os resultados com os exoantígenos se mostrem de excelente sensibilidade e melhores especificidades, nossas técnicas, particularmente aquele que utilizam exoantígenos de *L. (L.) chagasi*, não discriminaram indivíduos com leishmaniose cutânea (LC) dos com leishmaniose mucocutânea (LMC).

Pacientes com LC apresentaram maior positividade (56,3%) com extrato total de *L. (L.) amazonensis* e pacientes com LMC (81,3%) com o de *L. (L.) chagasi*. Diferentemente do obtido para LV, um número maior de pacientes com leishmaniose tegumentar reagiram com as espécies heterólogas (Tabela 4A e 4B).

Resultados não concordantes foram encontrados no diagnóstico da LC por Romero et al. (2004) que encontraram sensibilidade para exoantígenos de *L. mexicana* de 89% e para *L. braziliensis* de 71%; Ryan et al. (2002) encontraram sensibilidade para exoantígenos de *L. mexicana* de 92,3%, e discute que estes soros não regiram com os exoantígenos de *L. donovani* (dados não mostrados).

No diagnóstico da Leishmaniose mucocutânea que empregaram antígeno total Vexenat et al. (1996) encontraram 100% de positividade no ELISA de *L. (L.) chagasi* e/ou *L. braziliensis*. Em 2003 Frank e colaboradores relataram que pacientes com Leishmaniose

cutânea ou mucocutânea apresentaram positivities de 66,3% utilizando *T. cruzi* e 78,2% no ELISA empregando *L. (V.) braziliensis*. Ambos mostraram elevada reatividade cruzada (positividade) no teste (ELISA) diagnóstico que empregaram antígeno total e independente da espécie de *Leishmania* utilizada.

Na Leishmaniose tegumentar americana, Gomez-Silva et al. (2008) obtiveram maior reatividade quando empregaram antígeno total de *L. braziliensis* do que de *L. amazonensis* ($p < 0.001$), sendo que a sensibilidade do ELISA variou de 60 a 95% para o *L. braziliensis* e de 38 a 84% para o *L. amazonensis*.

Nossos resultados mostram que os exoantígenos apresentam uma baixa reatividade cruzada (5% a 10%) com indivíduos chagásicos, mas maior reatividade cruzada (55% a 65%) foi obtida com os antígenos totais, corroborando os resultados obtidos por outros pesquisadores (BADARÓ et al., 1986; REED et al., 1987; MARTIN et al., 1998). Concluindo que a utilização de exoantígenos nos testes diagnósticos pode eliminar também a reatividade cruzada com indivíduos chagásicos.

Dados prévios de Martin et al. (1998) mostraram que pacientes com tripanossomíase africana não apresentaram reatividade cruzada com exoantígenos de *L. donovani*, no ELISA. No entanto nossos dados mostram que as maiores reatividades cruzadas (55% a 65%) foram obtidos quando se empregou antígenos totais, corroborando os resultados obtidos por outros pesquisadores quando empregam antígenos totais de *L. mexicana* (BADARÓ et al., 1983, 1986), *L. major-like* (BARBOSA DE DEUS et al., 2002; LIRA et al., 2006), *L. chagasi* (REED et al., 1987, VEXENAT et al., 1996), *L. amazonensis* e *L. braziliensis* (GOMEZ-SILVA et al., 2008).

A reatividade cruzada com pacientes apresentando outras doenças que não doença de Chagas e LMC ou LC é polemica. Por exemplo, Martin e colaboradores (1998) quando utilizaram no ELISA exoantígenos de *L. donovani* não diagnosticaram reatividade cruzada com pacientes com malária, filarioses e equinococoses. Outros autores entretanto relatam reação cruzada quando utilizaram antígeno total de *Leishmania* spp, com pacientes com Toxoplasmose e Malária (ABRAMO et al., 1995; SUNDAR e RAI 2002; KOHANTEB e ARDEHALI, 2005; MENDES et al., 2007).

A reatividade cruzada entre os diferentes antígenos, tanto com soros de indivíduos com calazar (Figura 8) ou com indivíduos patologias não relacionadas (Figura 9), mostra padrões de reatividade semelhantes entre todos os antígenos Este fato está de acordo com

relatos da literatura onde se reconhece que esta reatividade cruzada observada entre as diferentes espécies de *Leishmania* é decorrente do compartilhamento de epitopos antigênicos, por protozoários relacionados (VEXENAT et al., 1996; GOMES-SILVA et al., 2008; VALE et al., 2009).

Os exoantígenos e o antígeno total de *L. (L.) chagasi* não apresentaram reatividade cruzada com pacientes apresentando outras variadas doenças (Figura 9). No entanto, o antígeno total de *L. (L.) amazonensis* mostrou reatividade cruzada com pacientes com *T. gondii*, *Plasmodium* sp, Anti-streptolisina O positiva e doença autoimune com fator anti-núcleo positivo e os antígenos totais de *L. (V.) braziliensis* reagiram com pacientes com *T. gondii*, Anti-streptolisina O positiva e doença autoimune com fator anti-núcleo positivo (Tabela 4B). A reatividade cruzada observada entre os antígenos totais de *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*, com os soros de pacientes anti-streptolisina O positiva e doença autoimune com fator anti-núcleo positivo, pode ser fruto da reatividade anti-DNA dos cinetoplastos das mesmas com os soros uma vez que o tripanosomatídeo *Crithidia luciliae* tem sido utilizado para a detecção destes anticorpos anti-DNA, por Imunofluorescência (GRIEMBERG et al., 2006).

5.2 ELISA – HOSPEDEIRO CANINO

A Leishmaniose visceral canina (LVC) apresenta atualmente uma tendência de expansão geográfica, atestada pelas referências mais recentes (RAJASAKARIAH et al., 2008; MAIA e CAMPINO, 2008), sendo que os países endêmicos têm pelo menos uma espécie animal como reservatório. Sendo o cão o principal reservatório doméstico da *L. (L.) chagasi* na América Central e América do Sul (EVANS et al., 1990; DIETZE et al., 1995; MILES et al., 1999), incluindo o Brasil (PARANHOS-SILVA et al., 1996).

Dentre as várias medidas de controle da Leishmaniose visceral humana, preconizadas pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 1990), está a eliminação de cães infectados ou sororeativos. No entanto esta medida é ainda polêmica quanto a sua eficiência (TESH, 1995; DIETZE et al., 1995; ASHFORD et al., 1998) além de ser de difícil execução é socialmente inaceitável (ASFORD et al., 1998; PALATNIK DE SOUSA et al., 2001).

Estudos matemáticos mais avançados apontam que um controle mais eficiente da LV seria vacinar tanto cães como humanos (DYE, 1996) e outros consideram que a associação vacinar animais e aplicar um teste diagnóstico mais sensível, seriam as medidas mais acertadas e bem vinda no âmbito da Medicina Veterinária. Tais medidas teriam reflexo na Saúde Pública humana, prevenindo o aparecimento de novos casos humanos (HOMMEL et al., 1995). Somente cães sorologicamente positivos são considerados infectados e são eliminados, cães infectados e assintomáticos com sorologia negativa podem contribuir com a continuidade do ciclo de transmissão do parasita (COURTENAY et al., 2002).

Um dos principais fatores destas discussões e discordâncias de opiniões está na sensibilidade dos testes diagnósticos utilizados nos inquéritos epidemiológicos (IFI e ELISA), metodologias que para muitos apresentam baixa sensibilidade e especificidade (GOMES-SILVA et al., 2008). Nos últimos anos os inquéritos sorológicos no Brasil para identificação de cães infectados com leishmaniose canina, foram realizados com testes comerciais (ELISA-Bio-Manguinhos e IFI-Biomanguinhos) que empregam como antígenos da *L. major-like* que apresentam sensibilidades e especificidades variáveis, mas que são os indicados pelo Ministério de Saúde do Brasil (LIRA et al., 2006).

Outra problemática no diagnóstico da LVC é a incapacidade de detectar anticorpos nas diferentes fases da doença (CABRERA et al., 2003), assim como a ocorrência de

resultados falsos positivos, devido à reatividade cruzada com leishmaniose tegumentar, doença de Chagas, erliquioses, rickettsioses e toxoplasmose (EL AMIN et al., 1986; HARITH et al., 1987; COSTA et al., 1991; BARBOSA DE DEUS et al., 2002).

Muitos autores concordam que os testes atualmente aplicados no diagnóstico da LVC apresentam altos índices de sensibilidade com positivities que variam de 72 a 98%, quando empregam antígenos totais e também independentes da espécie de *Leishmania* empregada (BARBOSA DE DEUS et al., 2002; METTLER et al., 2005; ROSÁRIO et al., 2005; PORROZI et al., 2007; FERREIRA et al., 2007).

Os dados obtidos em nosso trabalho mostram que tal eficiência diagnóstica pode ser alcançada em testes elaborados com antígenos totais ou exoantígenos das diferentes espécies de *Leishmania* com sensibilidade de 100% (Figura 12).

Várias abordagens têm sido utilizadas para caracterizar as moléculas excretadas-secretadas pelas leishmanias no estabelecimento da imunidade (LEMESRE et al., 2005, 2007), e seu papel protetor em estudos de vacina (PRIGIONE et al., 2000; SHAMS et al., 2004). No entanto, assim como para humanos o uso dos exoantígenos no diagnóstico da LVC foi pouco explorado. Embora o trabalho publicado por Rajasakariah et al. (2008) mostre excelentes resultados de sensibilidade (100%) ao utilizar uma mistura de três espécies de *Leishmania* (*L. infantum*, *L. donovani* e *L. major*), poucos dados são considerados em relação à especificidade do teste.

Os índices de especificidade obtidas em nosso trabalho mostram estas são dependentes do preparado antigênico utilizado. A especificidade dos exoantígenos foi de 88,1% a 94,9% e com os antígenos totais das 3 espécies foi de 86,4% (Tabela 5). O exoantígeno de *L. (L.) chagasi* apresentou a maior especificidade de 94,9%, sendo semelhante ao obtido em testes que utilizam proteínas recombinantes tais como: rK36, rK39 respectivamente, com índices de 94% a 100% (ROSÁRIO et al., 2005; PORROZI et al., 2007).

Embora o emprego das proteínas recombinantes no sorodiagnóstico da LVC tenha aumentado os índices de especificidade, estes ainda apresentam problemas de sensibilidade. Quando Mettler et al. (2005) utilizaram antígeno recombinante rk39 este apresentou uma sensibilidade de 96,7% em cães com clínica (sintomáticos) e sensibilidade de 52,9% a 64,7% em animais sem clínica (assintomáticos).

A reatividade cruzada observada durante o sorodiagnóstico da LVC ocorre em hospedeiros que vivem em regiões que se sobrepõe a outras doenças (ROSÁRIO et al., 2005;

FERREIRA et al., 2007; GOMES-SILVA et al., 2008; RAJASAKARIAH et al., 2008). Cães infectados com *T. cruzi* reagem principalmente com preparados antigênicos totais (FERREIRA et al., 2007; MAIA e CAMPINO, 2008) assim como cães infectados com outras parasitoses como erliquioses, rickettsioses, toxoplasmose e babesioses (EL AMIN et al., 1986; HARITH et al., 1987; COSTA et al., 1991; BARBOSA DE DEUS et al., 2002).

Nossa análise mostrou que os cães infectados com *T. cruzi* (n=7) reagem tanto com extrato total como com exoantígenos de *L. (L.) amazonensis* e *braziliensis*, mas somente uma amostra de cão reagiu com exoantígeno de *L. (L.) chagasi*.

Cães (FRANKE et al., 1994; UMEZAWA et al., 2009) podem estar infectados com o *T. evansi* e estes por compartilharem epitopos com diferentes protozoários, pertencente à ordem *kinetoplastidade*, podem reagir cruzadamente, o que na realidade ocorreu, a duas amostras de utilizadas neste trabalho, de cães infectados com *T. evansi* reagiram em altos títulos com o antígeno total e exoantígenos das 3 espécies de *Leishmanias* e com títulos para os exoantígenos.

Embora não tenhamos avaliado os ELISAs com amostras de cães com Leishmaniose cutânea, alguns dados da literatura mostram que a distinção entre animais com Leishmaniose cutânea e LVC ainda não é possível através do diagnóstico sorológico (MAIA e CAMPINO, 2008; SANTIAGO et al., 2008).

Os resultados obtidos por nós correspondem aos já publicados por outros autores (SOUZA et al., 2004; RAJASAKARIAH et al., 2008) que mostram a eficiência do exoantígeno (ES) de *L. (L.) chagasi* para ser utilizado na triagem diagnóstica da Leishmaniose canina ou em estudos epidemiológicos. Nossos resultados de altos títulos e 100% de positividade do antígeno ES *L. (L.) chagasi* e a ausência de reatividade cruzada com cães infectados com outras parasitoses (*Babesia* sp, *Erlichia* sp, *Neospora* sp, *Toxoplasma* sp e *T. cruzi*) mostram esta alta eficiência diagnóstica.

A resposta humoral em cães não é considerada útil para aferir resistência à infecção, mas sim para detectar animais sensíveis, na maioria dos casos sintomáticos (PINELLI et al., 1994). Por sua vez, alguns estudos apontam que diferentes classes de IgG podem estar relacionadas com a evolução da doença, assim Deplazes et al. (1995) sugerem uma associação entre IgG2 e forma assintomática; de IgG1 e aparecimento de doença. Mas estes resultados não foram corroborados por outros estudos, porque encontraram positividade variável no teste de hipersensibilidade retardada a antígenos de leishmania, exibindo uma

resposta humoral polimórfica, variando de soronegativos para positivos (BOURDOISEAU et al., 1997; SOLANO-GALLEGO et al., 2000). Cães sintomáticos apresentando altos níveis de IgG2 (LEANDRO et al., 2001).

Reis (2001) demonstrou que IgG1, em cães naturalmente infectados, parecem estar associado com mecanismos imunoprotetores, pois encontrou elevados níveis de IgG1 em cães assintomáticos. Por outro lado, IgG2 parecera estar associado com as formas mais graves da infecção. Dados recentes também mostraram uma alta expressão de IgE, além de IgG1 em cães sintomáticos de diferentes áreas endêmicas, abrindo perspectivas para o seu uso potencial como marcadores da doença ativa em cães (ALMEIDA et al., 2005; INIESTA et al., 2005). Estas observações, embora a princípio controversas, demonstram que a evolução da doença provavelmente está associada aos diferentes isotipos de imunoglobulinas, o que pode ser um valioso indicador da evolução da imunidade ou da doença na leishmaniose canina, teoria que ainda não foi avaliado com a utilização de exoantígenos.

Segundo outros autores os níveis de IgG2 são elevados também em cães vacinados (LEMESRE et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2009). Assim, a predominância de subclasses de IgG pode ser um reflexo da existência de um padrão de imunidade distinto, conseqüência de um perfil diferenciado de citocinas, como já descrito em outras doenças infecto-parasitárias (KAWANO et al., 1994).

Desta forma o padrão de imunoproteção requer o estabelecimento de uma resposta imune celular, antígeno-específica, com a produção de um padrão de citocinas do tipo 1, via IFN- γ , e a produção diferenciada de IgG1 e IgG2 antígeno-específicas. O conhecimento destas informações representa uma base importante para a busca dos antígenos capazes de intervir no sistema imune do cão, favorecendo o desenvolvimento de eventos imunológicos específicos com a capacidade de combater o parasito durante os estádios iniciais da infecção.

As diferenças no desempenho dos testes utilizando diferentes espécies de parasito observado neste estudo, juntamente com as observações relatadas na literatura, podem ser considerados na concepção de novos testes diagnósticos ou para a avaliação da resposta imune na leishmaniose canina.

Mas, isto é válido se estes testes forem projetados para uso geral ou nas regiões onde mais de uma espécie de parasito está presente. A reatividade cruzada da resposta

imune observada entre diferentes espécies de *Leishmania* (Figura 12) neste estudo pode ser levada em consideração para o desenvolvimento de novas vacinas contra a LVC.

Segundo Lemesre et al. (2007) o cão é o melhor modelo animal para o estudo da LV, para realizar estudos imunológicos e vacinas. Uma vez que o padrão da doença em cães e seres humanos é semelhante, com um longo período de infecção assintomática seguido de perda de peso, anemia, linfonodos aumentados e febre. Nos seres humanos, a infecção permanece assintomática assim como em alguns cães (RAVINDRAN e ALI, 2004). Uma das poucas diferenças é a presença de lesões cutâneas nos cães, apenas detectado em seres humanos gravemente imunossuprimidos (GARG e DUBE, 2006).

Conhecendo os parâmetros imunodiagnósticos para cada preparado antigênico, fizemos uma avaliação diagnóstica em um grupo cães com suspeita de leishmaniose os quais tinham diagnóstico parasitológico negativo (Tabela 7). A porcentagem de soropositividade de 55% a 70% foi detectada em animais sintomáticos, que pela literatura são considerados a maior fonte potencial de infecção para os flebótomos (MAIA e CAMPINO, 2008).

Também em nossos resultados se observou uma elevada porcentagem de cães assintomáticos soropositivos de 75% a 92%. Os cães assintomáticos se constituem a maioria na população canina com leishmaniose e podem ser reservatórios do parasito, para alguns autores nestes casos existe uma pequena chance de infectar o vetor (BERRAHAL et al., 1996; CABRAL et al., 1998; MAIA e CAMPINO, 2008).

Há uma controversia no diagnóstico da Leishmaniose canina, no sentido de que cães sintomáticos podem apresentar altos títulos de anticorpos, e não apresentam proliferação específica de linfócitos frente à *Leishmania*. E cães infectados assintomáticos mostram uma proliferação específica de linfócitos com títulos variáveis de anticorpos (BARBERIE, 2006). Nestes casos os anticorpos podem ser detectados pelos testes sorológicos, mas não são detectados através de testes parasitológicos. Como o encontrado em nossos resultados (Tabela 7, Figura 14). Portanto à necessidade de um teste imunodiagnóstico confirmatório.

De nossos dados concluímos que a avaliação do ELISA para o diagnóstico da LVC é melhor com os exoantígenos da espécie *L. (L.) chagasi* que além de mostrar-se altamente sensível e específica, tem a vantagem de ser facilmente obtida sem a necessidade de quaisquer espécies de purificação química ou física. A reprodutibilidade dos diferentes lotes foi também satisfatória (Figura 15).

5.3 IMMUNOBLOTTING – HOSPEDEIRO CANINO

A metodologia do Immunoblotting (IB) tem sido proposta como teste confirmatório no imunodiagnóstico de algumas doenças, tais como: doença de Chagas (UMEZAWA et al., 1996a), infecções pelo HIV (CHAN et al., 1996) e Toxoplasmose (FRANCK et al., 2008). O IB, por ser uma metodologia qualitativa, permite visualizar e identificar padrões de bandas reativas que podem ser específicas para uma determinada doença.

Um dos principais desafios para o controle da leishmaniose canina é o desenvolvimento de um teste confiável para identificar animais infectados dos não infectados, para a construção de um panorama epidemiológico mais seguro, pois cães portadores da leishmaniose classificados clinicamente como assintomáticos são capazes de infectar flebotomíneos (FERREIRA et al., 2007).

Há vários trabalhos na literatura que utilizam o IB com o intuito de definir quais moléculas de formas promastigotas de *Leishmania* deveriam ser consideradas no imunodiagnóstico da LV em cães (CARRERA et al., 1992; CIBRELLUS et al., 1999; LEMESRE et al., 2005, 2007), em humanos (MARTIN et al., 1998; RYAN et al., 2002), no seguimento sorológico de pacientes submetidos à quimioterapia e no diagnóstico da LV assintomática (WHITE et al., 1992).

O IB aplicado no estudo da LV em hospedeiros infectados naturalmente ou experimentalmente (GOTTSTEIN et al., 1988; BARREHAL et al., 1996; AISA et al., 1998), mostrou ser adequado para discriminar fases da infecção, principalmente no diagnóstico da fase inicial da doença (DA COSTA et al., 1996; CARRERA et al., 1996; AISA et al., 1998). Existe um consenso entre alguns autores de que o IB poderia ser sugerido como teste confirmatório, principalmente por resolver casos discordantes entre testes sorológicos tais como entre a IFI e o ELISA (HOERAUF et al., 1992; MARY et al., 1992). Da Silva e colaboradores (2005) e De Paula e colaboradores (2003) concordam que o IB é um teste mais sensível que a IFA, mostrando que cães soronegativos pelo IFA, até 8 meses antes da soroconversão, foram previamente positivos no IB. Possivelmente animais resistentes à doença apresentem baixos níveis de anticorpos, não detectáveis pelo IFA, mas que são detectados pelo IB. No entanto, ainda está aberta a discussão, pois, não há um consenso geral quanto ao perfil protéico a ser considerado nos casos acima citados.

Muitos trabalhos mencionam a importância das bandas de baixo peso molecular (PM) no IB que utiliza parasitas totais, principalmente na região entre PM 14 e 36 kDa, bandas que são consideradas espécie-específicas (MARY et al., 1992; MARTY et al., 1995; CARRERA et al., 1996; AISA et al., 1998; DE PAULA et al., 2003; DA SILVA et al., 2005; SAKRU et al., 2007).

Outros pesquisadores identificaram e caracterizaram proteínas de baixo PM com potencialidade e probabilidade de serem fortes candidatas para o diagnóstico e vacina na LV, como as proteínas de PM 30 e 36 kDa que estão associadas à membrana das formas promastigotas da *Leishmania infantum* (KAMOUM-ESSGHAIER et al., 2005). Outros ainda descreveram que as Leishmanias exibem uma família multi-antigênica de 6 a 9 membros de moléculas (PM 20 a 36 kDa) que são reconhecidas por pacientes com LV ou com leishmaniose cutânea (BRITO et al., 2000). Concluiu ainda que estas pudessem variar de PM de acordo com os protocolos utilizados (COUVREUR et al., 1997; KAMOUM-ESSGHAIER et al., 2005). As proteínas de baixo PM (12 e 14 kDa) que são reconhecidas por cães assintomáticos no IB preparado com *L. infantum* (AISA et al., 1998), podem corresponder a duas proteínas nucleares designadas como p14 e p18 (PM 14 e 18 kDa), descritas em um estudo anterior (SUFFIA et al., 1995).

Outros concluem que o IB é o teste mais eficaz na detecção de pacientes com LV assintomáticos, quando comparado com a IFI e o ELISA, em um estudo com pacientes turcos assintomáticos (7/82; um sintomático e 6 assintomáticos) Sakru e colaboradores (2007) mostraram que 9,5% reconheciam as bandas de PM 14 e 18 kDa, por outro lado Carrera e colaboradores (1996), detectaram uma forte reatividade dos peptídeos de PM 50-57 e 29 kDa por cães experimentalmente infectados com *L. infantum* e bandas de PM 26, 34 e 35,4 kDa pelos animais na fase aguda, quando utilizou como antígeno formas promastigotas de *L. infantum*. Segundo outros pesquisadores, cães verdadeiramente infectados, com diagnóstico parasitológico positivo, reconhecem as proteínas de PM 29 e 32 kDa, no IB preparado com antígenos total de *Leishmania* spp, concluindo que o reconhecimento destas bandas poderia ser utilizado como sinal de infecção (DE PAULA et al., 2003; DA SILVA et al., 2005).

Em realidade, vários são os autores que utilizaram a metodologia do IB para o diagnóstico da LV canina, mas segundo os relatos quando *Leishmania* íntegra é utilizada como fonte de antígeno 20 e até mais de 50 polipeptídios podem ser detectados (DA COSTA

et al., 1996; CARRERA et al., 1996; AISA et al., 1998; DE PAULA et al., 2003; RAMI et al., 2005; ALMEIDA et al., 2005). Este perfil complexo no IB foi também observado em nossos experimentos que utilizou parasitos íntegros (Figura 17). Por outro lado, menos bandas reativas foram observadas quando utilizamos o preparado antigênico denominado AT (extrato total alcalino), com uma banda imunodominante de PM 14 kDa (Figura 17). Concluimos então que tal variabilidade de bandas reativas no IB para o diagnóstico sorológico da LVC vai depender da espécie e do tipo de antígeno utilizado. Em um ponto concordamos com os dados de outros autores, nossos experimentos mostraram também um perfil protéico complexo quando utilizamos parasitos íntegros (Figura 17).

Contudo, estudos de IB que utilizam exoantígenos (excreta-secreta) de leishmanias no imunodiagnóstico da LV são mais raros e/ou apresentam resultados incompletos (MARTIN et al., 1998; CIBRELUS et al., 1999; RYAN et al., 2002) e raros são os estudos transversais comparativos da performance diagnóstica destas moléculas.

Cibrelus e colaboradores (1999) mostraram que tanto cães como pacientes infectados com *L. infantum* reconheceram um perfil complexo de 11 bandas (155, 96, 78, 72, 66, 50, 46, 38, 34, 32, 26 kDa) no IB efetuado com antígenos excretados secretados de formas amastigotas de *L. infantum* e quando utilizou exoantígenos de formas promastigotas outras proteínas foram detectadas (PM 120, 78, 74, 72, 65, 63, 50, 44, 40, 38, 32 kDa). Um perfil menos complexo foi obtido por Ryan e colaboradores (2002), em um estudo mais recente, no qual trabalhando com exoantígenos de formas promastigotas de *L. donovani*, detectaram 6 bandas imunodominantes (PM 132, 108, 96, 41, 38, 30 kDa).

Nossos dados, no entanto, indicaram que o IB que utiliza exoantígenos (ES) de *L. (L.) chagasi* apresentaram uma reatividade menos complexa reagindo somente com 3 proteínas imunodominantes de PM 27, 28 e 31 kDa. Bandas muito semelhantes de PM 26,5; 27,5 e 30 kDa foram também observadas quando se utilizou as espécies *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*. Estas 3 bandas foram reconhecidas por todos os cães considerados infectados com leishmaniose visceral, portanto o IBleish de *L. (L.) chagasi* atingiu o índice imunodiagnóstico de 100% de sensibilidade.

Os peptídeos de PM 27, 28 e 31 kDa reconhecidos quando utilizamos o exoantígenos de *L. (L.) chagasi* são em parte concordantes com os relatados dos diferentes autores (CIBRELUS et al., 1999; RYAN et al., 2002; CHENIK et al., 2006), sendo a que estas diferenças de PM podem estar relacionadas com a espécie de *Leishmania* utilizada, a forma de

obtenção dos exoantígenos assim como o tipo de meio de cultura empregada para a obtenção dos exoantígenos. Pois, Chenik e colaboradores (2006) sugerem que bandas de PM 30 e 55 kDa são detectadas quando se utiliza sobrenadante de cultura de *L. major* incubada à temperatura de 35 °C e pH 5.5, sugerindo que havia componentes do vacúolo parasitóforo.

Apesar de cães tanto sintomáticos como assintomáticos (parasitologicamente positivos) reconhecerem as três bandas imunodominantes, no IB com exoantígenos de *L. (L.) chagasi*, alguns reagiram fracamente com as proteínas de PM 12 e 14 kDa. Estas proteínas foram também observadas no IB com parasitas íntegros e previamente descritas por outros autores. Tal discordância nos levou a especular se o reconhecimento eventual e a reatividade quantitativamente mais fraca para estas bandas poderiam ser resultantes da presença de componentes de parasitas que foram lisados no momento da preparação dos exoantígenos. Portanto, esta possibilidade será avaliada no futuro, no qual parasitas íntegros serão titulados para saber a quantos parasitas corresponderiam a esta fraca reatividade.

Quando cães com suspeita de leishmaniose (n=32), os quais tinham diagnóstico parasitológico negativo, foram avaliados simultaneamente com o ELISA e IBleish-*L. (L.) chagasi* os nossos resultados mostraram que 53% (17/32) dos casos eram simultaneamente positivos para os dois testes, 12,5% (4/32) simultaneamente negativos para os dois testes, mas 34,4% (11/32) apresentaram discordância entre os dois testes.

A eficácia do IB em detectar casos falso-positivos e/ou falso-negativos foi obtida ao analisarmos estes 11 casos discordantes. Destes casos 72,7% (8/11) foram positivos no ELISA (ES e/ou AT), mas negativos para o IBleish-*L. (L.) chagasi*, portanto consideramos tratar-se de casos falso positivos; 27,3% (3/11) apresentaram discordância entre os ELISAs (negativos nos ELISA-AT) mas positivos no IBleish-*L. (L.) chagasi*, estes casos foram considerados falso-negativos. No momento temos um caso que foi positivo no IBleish e com resultado negativo para todos os ELISAs (Tabelas 8 e 9). Estes dados, que concordam em parte com os relatados da literatura, vêm mostrar mais uma vez que o IB é um teste além de sensível é mais específico, principalmente quando comparado com outras metodologias imunodiagnósticas (HOREAUF et al., 1992; MARY et al., 1992; CARDEÑOSA et al., 1995; AISA et al., 1998; DE PAULA et al., 2003; DA SILVA et al., 2005).

De acordo com estudos prévios, as bandas de alto peso molecular são as que apresentam a maior reatividade cruzada e são comuns entre as diferentes espécies de *Leishmania* (LEPAY et al., 1983; COLOMER-GOULD et al., 1985; REED et al., 1987) e com outros parasitas, por exemplo com *Plasmodium* (RAVINDRAN et al., 2004). Algumas destas bandas podem também ser reconhecidas por hospedeiros (animais ou humanos) sadios (DA COSTA et al., 1996; RAVINDRAN et al., 2004). Outros descrevem que são bandas que perduram no hospedeiro após o tratamento configurando como uma cicatriz sorológica (EVANS et al., 1989; KUMAR et al., 2002; LASRI et al., 2003; RAVINDRAN et al., 2004).

Nossos dados indicam uma reatividade mais complexa quando se utilizou exoantígenos de *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*, pois estes antígenos apresentaram reatividade cruzada com os cães infectados com *T. evansi* e com *T. cruzi* (Figura 20). Por exoantígeno de *L. (L.) chagasi* apresentou somente uma banda reativa de PM 28 kDa observada somente nos cães infectados com *T. evansi* (n=2) e somente em um cão infectado com *T. cruzi* (Figura 20 e 21). Autores como Savani e colaboradores (2005) descreveram que cães provenientes de zona endêmica de Chagas (Mato Grosso do Sul, Brasil) podem estar infectados simultaneamente com *T. evansi* e *T. cruzi*, neste caso o cão diagnosticado como chagásico (1/7) e que reagiu com a banda de PM 28 kDa, é proveniente da zona endêmica de Chagas (Mato Grosso do Sul, Brasil), portanto não está descartada a possibilidade deste animal estar co-infectado simultaneamente com *T. cruzi* e *T. evansi*.

Uma vez que o Ibleish de *L. (L.) chagasi* não apresentou nenhum caso positivo com reatividade simultânea para as 3 bandas (27, 28 e 31 kDa) quando testados com amostras de animais infectados por outras parasitoses consideramos que este teste alcançou a especificidade de 100% (Figura 21).

5.4 IMMUNOBLOTTING – HOSPEDEIRO HUMANO

O homem com LV apresenta elevado nível de imunoglobulinas IgG, portanto facilmente diagnosticado por técnicas sorológicas, mas, as diferentes formas clínicas das Leishmanioses só podem ser efetuada por critérios clínicos e/ou parasitológicos (EVANS et al., 1989) e recentemente empregando tecnologias moleculares como a PCR (SPANAKOS et al., 2008). Os resultados, por nós obtidos pelo ELISA, mostraram que a sorologia não foi capaz de discriminar pacientes com LV daqueles com Leishmaniose tegumentar cutânea ou mucocutânea e doença de Chagas. Os diferentes antígenos avaliados neste estudo, pelo ELISA, mostraram 100% de positividade nos casos de leishmaniose visceral e variadas reatividades cruzadas com as outras espécies de leishmanias.

Na tentativa de determinar quais seriam as moléculas específicas para serem empregadas no diagnóstico sorológico os pesquisadores utilizaram o IB de formas promastigotas de *Leishmania* e aplicaram em pacientes com a infecção ativa (REED et al., 1987; EVANS et al., 1989; MARY et al., 1992; MARTIN et al., 1998; RYAN et al., 2002; KAMOUN-ESSGHAIER et al., 2005), no seguimento quimioterápico da LV (KUMAR et al., 2002) e em pacientes com infecção assintomática (MARTY et al., 1995).

O grande problema encontrado foi decidir qual o perfil de reatividade de consenso geral, pois mais de 50 polipeptídios de variados PM (14 a 201 kDa) foram reconhecidos por pacientes sintomático da LV, algumas destas moléculas inclusive são também compartilhada por indivíduos com outras doenças, como doença de Chagas (EVANS et al., 1989; MARY et al., 1992; MARTY et al., 1995; TIWARI et al., 1995; KUMAR et al., 2002).

Martin e colaboradores (1998) publicaram um trabalho pioneiro sobre a avaliação do imunoblotting que utiliza exoantígenos de diferentes espécies de *Leishmania*: *L. amazonensis*, *L. major*, *L. tarentolae* e *L. donovani* concluindo que muitas bandas apesar de serem comuns entre as diferentes espécies, estariam associadas aos variados perfis imunogênicos dos pacientes utilizados neste estudo.

Cibrelus e colaboradores (1999) por sua vez, mostraram que exoantígenos de formas promastigotas e amastigotas de *L. infatum* apresentavam uma reatividade preferencial com um peptídeo de PM 63 kDa tanto com pacientes com LV como cães com LV.

Mais recentemente Ryan e colaboradores (2002) mostraram que o perfil eletroforetico de exoantígenos de *L. donovani* apresentado por pacientes com LV é mais complexo (PM 130, 108, 104, 96, 78, 37 e 30 kDa) e semelhante tanto para cães como para humanos, a única diferença observada foi quantitativa, com intensidade na reatividade mais intensa para cães do que para humanos. Contrário aos nossos dados que a reatividade para humanos foi quantitativamente maior e mais complexa para humanos do que para cães (FIGURA 17). Nossos resultados mostram que o exoantígeno obtido de formas promastigotas de *L. (L.) chagasi* apresenta somente três bandas imunodominantes reconhecidas por todos os pacientes com LV.

Pesquisadores como Reed e colaboradores (1987) consideram que bandas encontradas na região entre 32 a 35 kDa seriam as bandas de maior interesse para o diagnóstico da LV humana, por serem espécie específica e apresentarem imunogenicidade, concordando com dados apresentados por Cardeñosa e colaboradores (1995) e Mary e colaboradores em (1992) que afirmam que proteínas entre PM 40 - <14 kDa são as mais sensíveis e específicas para o diagnóstico da LV.

Quanto a reatividade cruzada com outras doenças, nossos dados mostraram forte inespecificidade com pacientes chagásicos, no IB realizado com exoantígenos de *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*, com reatividade para várias bandas, mas nenhuma reatividade cruzada (ausência de bandas) foi encontrada quando foi utilizado exoantígenos de *L. (L.) chagasi* (Figura 25).

No entanto, tanto o ELISA como o IB que utilizaram exoantígeno não foram capazes de distinguir entre pacientes com leishmaniose tegumentar das com LV, as três espécies de leishmanias apresentaram um perfil de reatividade similar àquela encontrada para os pacientes com LV. A banda reconhecida por pacientes com LC e LMC era quantitativamente mais fraca, refletindo possivelmente a baixa resposta humoral destes pacientes (KAR, 1995; ROMERO et al., 2004).

Os resultados comparativos entre ELISA e IB mostraram que 56% (9/16) dos pacientes com LC foram positivas com os exoantígenos de *L. (L.) chagasi* sendo que 38% (6/16) foram negativas pelo ELISA (Tabela 10). Somente 19% (3/16) foram positivas para os dois testes. Resultado similar ocorreu quando se analisou o grupo com LMC (n=16) dos quais 44% (7/16) foram positivas no IB sendo 31% (5/16) negativas para o ELISA (Tabela 10).

A reatividade cruzada encontrada entre pacientes infectados com as diferentes leishmanioses já foi descrita por vários pesquisadores (GUIMARAES et al., 1991; MALCHIODI et al., 1994), para contornar esta inespecificidade alguns laboratórios trabalham com altas diluições das amostras de soros de pacientes com doença de Chagas ou Leishmaniose cutânea (MALCHIODI et al., 1994). Outros como Handman e colaboradores (2001) identificaram antígenos compartilhados entre *L. tropica*, *L. mexicana* e *L. donovani*, assim como com um antígeno presente em *Crithidia fasciculata*, justamente por esses epitopos comuns entre as espécies de leishmanias se justifica a utilização de diferentes espécies no diagnóstico da LV humana ou canina.

Embora o IBleish de *L. (L.) chagasi* não discriminou pacientes infectados com diferentes leishmanioses, foi capaz de diferenciar pacientes com doença de Chagas (Figura 25), fato não ocorrido quando se utilizou exoantígenos de *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*. Deste modo acreditamos que o teste pode contribuir de modo significativo no auxílio do diagnóstico da leishmaniose visceral humana, uma vez que o IBleish de *L. (L.) chagasi* não apresentou também nenhuma reatividade quando testado com amostras de pacientes infectados por outras parasitoses.

6 CONCLUSÕES

6.1 HOSPEDEIRO HUMANO

- 1- O diagnóstico da leishmaniose visceral humana pode ser efetuado pelo ELISA que utiliza tanto antígenos preparados com parasitas homólogos como heterólogos, não há uma reação espécie-específica. A sensibilidade obtida pelo ELISA foi de 100% obtida com todas as espécies de leishmanias utilizadas, incluindo os diferentes preparados antigênicos.
- 2- O ELISA que utilizou exoantígenos da *L. (L.) chagasi* apresentou os mais altos títulos.
- 3- O ELISA que utilizou exoantígenos (ES), independente da espécie de *Leishmania*, apresentaram melhores índices de especificidade quando comparados com os antígenos totais (AT).
- 4- A maior reatividade cruzada foi obtida com os ELISAs que utilizaram antígenos totais, independente da espécie de *Leishmania*.
- 5- Não houve discriminação entre indivíduos com Leishmaniose cutânea (LC) dos com Leishmaniose mucocutânea (LMC), quando se utilizou o ELISA com as diferentes espécies de leishmanias.
- 6- O ELISA que utilizou exoantígenos apresentou baixa reatividade cruzada com pacientes chagásicos, independente da espécie de *Leishmania*.
- 7- Pacientes com LV apresentaram reatividade com três bandas protéicas no Immunoblotting preparado com exoantígenos, independente da espécie de *Leishmania* utilizada.
- 8- O IB preparada com exoantígenos de *L. (L.) chagasi* (IBleish) não mostrou reatividade cruzada com os pacientes chagásicos, ao contrário da *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) braziliensis*.

- 9- O Ibleish-*L. (L.) chagasi* não distinguiu entre pacientes com Leishmaniose tegumentar dos com a visceral, as três espécies reagiram com o perfil de reatividade similar àquela encontrada com os pacientes com LV.

6.2 HOSPEDEIRO CANINO

- 1- ELISAs preparados com antígeno total ou exoantígenos, independente da espécie de *Leishmania* e independente da clínica dos cães (sintomáticos ou assintomáticos) apresentaram sensibilidades de 100%.
- 2- ELISAs preparados com exoantígenos da *L. (L.) chagasi* apresentaram altos títulos em cães com LVC-sintomático e assintomático do que as apresentada pelas às duas outras espécies de leishmanias.
- 3- Os exoantígenos independente da espécie de *Leishmania* apresentaram índices mais específicos do que os antígenos totais. A maior especificidade do ELISA foi obtida com os exoantígenos espécie-específica *L. (L.) chagasi* (94,9%).
- 4- Menor reatividade cruzada foi observada com os exoantígenos, independente da espécie de *Leishmania* utilizada.
- 5- Animais com LVC reconheceram três bandas protéicas no IB preparado com exoantígenos de *L. (L.) chagasi*.
- 6- O IB preparado com exoantígenos de *L. (L.) chagasi* apresentou 100% de sensibilidade e especificidade, por outro lado o Ibleish-ES das *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) braziliensis* apresentaram reatividade cruzada com cães infectados com *T. cruzi*.
- 7- O dados de Ibleish-*L. (L.) chagasi* sugerem que este poderia ser utilizado como metodologia confirmatória no diagnóstico sorológico de cães afetados pela Leishmaniose canina.
- 8- O perfil de reatividade correspondente a três bandas imunodominantes (27, 28 e 31 kDa) apresentadas por hospedeiros humano e canino, afetados pela LV é semelhante.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ABRAMO, C.; FONTES, C. J.; KRETTLI, A. U. Cross-reactivity between antibodies in the sera of individuals with leishmaniasis, toxoplasmosis, and Chagas' disease and antigens of the blood-stage forms of *Plasmodium falciparum* determined by indirect immunofluorescence. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 53, n. 2, p. 202-5, 1995.

ADLER, S.; GUNDERS, A. E. Secretion of antigen in cultures of leptomonads and hamster spleen infected with *Leishmania*. **J. Protozool.**, v. 11, p. 42, 1964.

AISA, M. J.; CASTILLEJO, S.; GALLEGO, M.; FISA, R. C.; RIERA, C. M.; DE COLMENARES, M.; TORRAS, S.; ROURA, X.; SENTIS, J.; PORTUS, M. Diagnostic potential of western blot analysis of sera from dogs with leishmaniasis in endemic areas and significance of the pattern. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 58, n. 2, p. 154-159, 1998.

AJDARY, S.; ALIMOHAMMADIAN, M. H.; ESLAMI, M. B.; KEMP, K.; KHARAZMI, A. Comparison of the immune profile of nonhealing cutaneous leishmaniasis patients with those with active lesions and those who have recovered from infection. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 1760-1764, 2000.

ALFIERI, S. C.; SHAW, E.; ZILBERTFARD, V.; RABINOVITH, M. *Leishmania amazonensis*: involvement of cysteine proteinases in the killing of isolated amastigotes by L-leucine methyl ester. **Exp. Parasitol.**, v. 68, n. 4, p. 423-31, 1989.

ALMEIDA, M. A. O.; JESUS, E. E. V.; SOUSA-ATTA, M. L. B.; ALVES, L. C.; BERNE, M. E. A.; ATTA, A. M. Antileishmanial antibody profile in dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 106, p. 151-158, 2005.

ALVAR, J.; MOLINA, R.; SAN ANDRES, M.; TESOURO, M.; NIETO, J.; VITUTIA, M.; GONZALES, F.; SAN ANDRES, M. D.; BOGGIO, J.; RODRIGUEZ, F. Canine leishmaniasis: clinical, parasitological and entomological follow up after chemotherapy. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 88, p. 371-378, 1994.

ALVAR, J.; CANAVETE, C.; MOLINA, R.; MORENO, J.; NIETO, J. Canine leishmaniasis. **Adv. Parasitol.**, v. 57, p. 1-87, 2004.

ALVES, W. A.; BEVILACQUA, P. D. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. **Cad. Saúde Pública**, v. 20, p. 259-265, 2004.

AMATO-NEVES, V. Leishmaniose visceral com período de incubação de, pelo menos, quatro anos. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 20, n. 5, p. 312-314, 1978.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

ANAM, K.; AFRIN, F.; BANERIEE, D.; PRAMANIK, N.; GUHA, S. K.; GOSWAMI, R. P.; GUPTA, P. N.; SAHA, S. K.; ALI, N. Immunoglobulin subclass distribution and diagnostic value of *Leishmania donovani* antigen-specific immunoglobulin G3 in Indian Kala-azar patients. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 6, n. 2, p. 231-5, 1999a.

ANAM, K.; AFRIN, F.; BANERIEE, D.; PRAMANIK, N.; GUHA, S. K.; GOSWAMI, R. P.; SAHA, S. K.; ALI, N. Differential decline in *Leishmania* membrane antigen-specific immunoglobulin G (IgG), IgM, IgE, and IgG subclass antibodies in Indian Kala-azar patients after chemotherapy. **Infect Immun.**, v. 67, n. 12, p. 6663-9, 1999b.

ANDRADE, T. M.; TEIXEIRA, R.; ANDRADE, J. A. F.; PEREIRA C.; CARVALHO, E. M. Hipersensibilidade de tipo retardado na leishmaniose visceral. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 24, p. 298-302, 1982.

ANTHONY, R. L.; CHRISTENSEN, H. A.; JOHNSON, C. M. Micro enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the serodiagnosis of New World leishmaniasis. **Am J. Trop. Med Hyg.**, v. 29, n. 2, p. 194-4, 1980.

ASHFORD, R.W. The Leishmaniasis. In: PALMER, S.R.; SOULSBY, L.; SIMPSON, D.I.H. **Zoonoses Biology, Clinical Practice, and Public Health Control**. Oxford: University Press, 1998. p. 527-43.

AWASTHI, A.; MATHUR, R. K.; SAHA, B. Immune response to *Leishmania* infection. **Indian J. Med. Res.**, v. 119, p. 238-258, 2004.

BADARÓ, R.; REED, S. G.; CARVALHO, E. M. Immunofluorescent antibody test in American visceral leishmaniasis: sensitivity and specificity of different morphological forms of two *Leishmania* species. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 32, n. 3, p. 480-484, 1983.

BADARÓ, R.; CARVALHO, E. M.; ORGE, M. G.; TEIXEIRA, R. S.; ROCHA, H. Imunidade humoral e celular em indivíduos curados de leishmaniose visceral. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 18, n. 2, p. 77-83, 1985.

BADARÓ, R. L.; REDD, S. G.; BARRAL, A.; ORGE, G.; JONES, T. C. Evaluation of the micro enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for antibodies in american visceral leishmaniasis: antigen selection for detection of infection-specific responses. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 35, p. 72-78, 1986.

BADARÓ, R. L.; BENSON, D.; EULALIO, M. C.; FREIRE, M.; CUNHA, S.; NETTO, E. M.; PEDRAL-SAMPAIO, D.; MADUREIRA, C.; BURNS, J. M.; HOUGHTON, R. L.; DAVID, J. R.; REED, S. G. rk39 a cloned antigens of *Leishmania chagasi* that predicts activa visceral leishmaniasis. **J. Infect. Dis.**, v. 173, p. 758-761, 1996.

BALEEIRO, C. O.; PARANHOS-SILVA, M.; DOS SANTOS, J. C.; OLIVEIRA, G. S. G.; NASCIMENTO, G. E.; PONTES-DE-CARVALHO, L.; DOS SANTOS, W. L. C. Montenegro's skin reactions and

antibodies against different *Leishmania* species in dogs from a visceral leishmaniasis endemic area. **Vet. Parasitol.**, v. 139, p. 21-28, 2006.

BANETH, G. Leishmaniasis. In: GREENE, C.E. **Infectious diseases of the dog and cat**. 3 ed. Philadelphia: Elsevier; 2006. p. 685-698.

BANETH, G.; AROCH, I. Canine Leishmaniasis a diagnostic and clinical challenge. **Vet. J.**, v. 175, p. 14-14, 2008.

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

BARBERIE, C. L. Immunology of canine leishmaniasis. **Parasite Immunol.**, v. 28, p. 329-37, 2006.

BATES, P. A.; KURTZ, M. K.; GOTTLIEB, M.; DWYER, D. M. *Leishmania donovani*: generation of monoespecific antibody reagents to soluble acid phosphatase. **Exp. Parasitol.**, v. 64, p. 157-164, 1987.

BATES, P. A.; DWYER, D. M. Biosynthesis and secretion of acid phosphatase by *Leishmania donovani* promastigotes. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 26, n. 3, p. 289-96, 1987.

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

BEVERLEY, S. M.; OWENS, K. L.; SHOWALTER, M.; GRIFFITH, C. L.; DOERING, T. L.; JONES, V. C.; McNEIL, M. R. Eukaryotic UDP-galactopyranose mutase (GLF gene) in microbial and metazoal pathogens. **Eukaryotic. cell.**, v. 4, n. 6, p. 1147-1154, 2005.

BEYRODT, C. G.; PINTO, A. R.; FREYMULLER, E.; BARBIÉRI, C. L. Characterization of an antigen from *Leishmania amazonensis* amastigotes able to elicit protective responses in a murine model. **Infect. Immun.**, v. 65, n. 6, p. 2052-9, 1997.

BOURDOISEAU, G.; BONNEFONT, C.; HOAREAU, E.; BOEHRINGER, C.; STOLLE, T.; CHABANNE, L. Specific IgG1 and IgG2 antibody and lymphocyte subset levels in naturally *Leishmania infantum* infected treated and untreated dogs. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 59, p. 21-30, 1997.

BORGES, V. C.; RUIZ, M. C.; GOMES, P. M.; COLOMBO, A. R.; SILVA LDE, A.; ROMERO, H. D.; PRATA, A. Montenegro intradermoreaction after the test sequential repetitions in Porteirinha, Minas Gerais State, Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 36, p. 249-251, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Brasília: Editora, 2003. p. 120.

BRITO, M. E.; MENDONÇA, M. G.; GOMES, Y. M.; JARDIM, M. L.; ABATH, F. G. Identification of potentially diagnostic *Leishmania braziliensis* antigens in human cutaneous leishmaniasis by immunoblot analysis. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 7; p. 318-21, 2000.

BRITTINGHAM, A.; MORRISON, C. J.; McMASTER, W. R.; McGUIRE, B. S.; CHANG, K. P.; MOSSER, M. D. Role of the Leishmania surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis. **J. Immunol.**, v 155, n. 6, p. 3102-11, 1995.

CABRAL, M.; O'GRADY, J. E.; SOUSA, J. C.; THOMPSON, H., ALEXANDER, J. The immunology of canine leishmaniasis: strong evidence for a developing disease spectrum from asymptomatic dogs. **Vet. Parasitol.**, v. 76, n. 3, p. 173-80, 1998.

CABRAL, A. W. D. **Estudo comparativo entre o diagnóstico por técnicas sorológicas e da PCR para a detecção de *Leishmania* spp.** Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2006.

CABRERA, G. P.; SILVA, V. O.; COSTA, R. T.; GENARO, O. The fucose mannose ligand- Elisa in the diagnosis and prognoses of canine visceral leishmaniasis in Brazil. **Ann. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 61, p. 296-301, 1999.

CABRERA, M. A.; PAULA, A. A.; CAMACHO, L. A.; MARZOCHI, M. C.; XAVIER, S. C.; DA DILVA, A. V.; JANSEN, A. M. Canine visceral leishmaniasis in Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: assessment of risk factors. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 45, n. 2, p. 79-83, 2003.

CAMARGO-NEVES, V. L. F. KATZ, G. Leishmaniose Visceral Americana no Estado de São Paulo. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 32, p. 63-4, 1999.

CARDEÑOSA, N.; RIERA, C.; CORTES, P.; MARCH, F.; MUÑOZ, C.; PORTUS, M.; PRATS, G. Detection and characterization by immunoblot analysis of potentially diagnostic *Leishmania infantum* polypeptides in human visceral leishmaniasis. **Parasite Immunol.**, v. 17, p. 509-516, 1995.

CARRERA, L.; FERMIN, M. L.; TESOURO, M.; GARCIA, P.; ROLLÁN, E.; GONZÁLEZ, J. L.; MÉNDEZ, S.; CUQUERELLA, M.; ALUNDA, J. M.; Antibody response in dogs experimentally infected with *Leishmania infantum*: infection course antigen markers. **Exp. Parasitol.**, v. 82; p. 139-46, 1992.

CARRERA, L.; FERMÍN, M. L.; TESOURO, M.; GARCÍA, P.; ROLLÁN, E.; GONZÁLEZ, J. L.; MÉNDEZ, S.; CUQUERELLA, M.; ALUNDA, J. M. Antibody response in dogs experimentally infected with *Leishmania infantum*: infection course antigen markers. **Exp. Parasitol.**, v. 82, p. 139-46, 1996.

CARVALHO, E. M.; TEIXEIRA, R. S.; JOHNSON, W. D. Cell mediated immunity in American Visceral Leishmaniasis. Reversible immunosuppression during acute infection. **Infect. Immun.**, v. 22, p. 649-656, 1981.

CARVALHO, E. M.; ANDREWS, B. S.; MARTINELLI, R.; DUTRA, M.; ROCHA, H. Circulating immune complexes and rheumatoid factor in visceral leishmaniasis and shistoccomiasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 32, p. 61-68, 1983.

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

CASTELLANI, O.; RIBEIRO, L. V.; FERREIRA, J. F. Differentiation of *Trypanosoma cruzi* in culture. **J. Protozool.**, v. 14, p. 447-451, 1967.

CHAN, E. L.; SIDAWAY, F.; HORSMAN, G. B. A comparison of the genie and western blot assays in confirmatory testing for HIV-1 antibody. **J. Med Microbiol.**, v. 44, n. 3, p. 223-5, 1996.

CHAUDHURI, G.; CHANG, K. P. Acid protease activity of a major surface membrane glycoprotein (gp63) from *Leishmania mexicana* promastigotes. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 27, n. 1, p. 43-52, 1988.

CHENIK, M.; LAKHAL, S.; BEN KHALEF, N.; ZRIBI, L.; LOUZIR, H.; DELLAGI, K. Approaches for the identification of potential excreted-secreted proteins of *Leishmania major* parasites. **Parasitology**, v. 132, 493-509, 2006.

CIBRELUS, P.; PRECIGOUT, E.; SERENO, D.; CAREY, B.; LEMESRE, J. L.; GORENFLOT, A. Secreted antigens of the amastigote and promastigote forms of *Leishmania infantum* inducing a humoral response in humans and dogs. **Parasite**, v. 6, n. 2, p. 121-9, 1999.

CLINTON, B. A.; PALCZUK, N. C.; STAUBER, L. A. *Leishmania donovani*: Partial characterization of some flagellate cytoplasmic immunogens. **J. Immunol.**, v. 108, p. 1570-77, 1972.

COLOMER-GOULD, V.; GLVAO QUINTAO, L.; KEITHLY, J.; NOGUEIRA, N. A common major surface antigen on amastigotes and promastigotes of *Leishmania* species. **J. Exp. Med.**, v. 162, n. 3, p. 902-916, 1985.

COOMBS, G. H. Proteinases of *Leishmania mexicana* and other flagellate protozoa. **Parasitology**, v. 84, n. 1, p. 149-55, 1982.

COSTA, C. A.; GENARO, O.; DE LANA, M.; MAGALHÃES, P. A.; DIAS, M.; MICHALICK, M. S. M.; MELO, M. N.; DA COSTA, R. T. Canine visceral leishmaniasis: evaluation of the serologic method used in epidemiologic studies. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 24, p. 21-25, 1991.

COSTA, S. R.; D'ÓLIVEIRA, JR. A.; BACELLAR, O.; CARVALHO, E.M. T cell response of asymptomatic *Leishmania chagasi* infected subjects to recombinant *Leishmania* antigens. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 3, p. 367-370, 1999.

COURTENAY, O.; QUINNELL, R. J.; GARCEZ, L. M.; SHAW, J. J.; DYE, C. Infectiousness in a cohort of Brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. **J. Infect.**, v. 186, p. 1314-1320, 2002.

COUVREUR, B.; JACQUET, D.; BOLLEN, A.; LE RAY, D. Molecular characterization of antigen 24, a specific immunodominant antigen family from *Leishmania infantum*. **Parasitology**, v. 115, p. 611-9, 1997.

DA COSTA, J. M.; NEOGY, A. B.; VOULDOUKIS, I.; SILVA, M. L.; GENTILINI, M.; MONJOUR, L. Antigenic components of partially purified antigens of *Leishmania donovani infantum* recognized by sera from dogs with asymptomatic or active visceral leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 55, p. 511-515, 1996.

DA SILVA, A. V.; DE PAULA, A. A.; CABRERA, M. A. A.; CARREIRA, J. C. A. Leishmaniasis in domestic dogs: epidemiological aspects. **Cad. Saúde Pública**, v. 21, p. 1-5, 2005.

DA SILVA, E. S.; GONTIJO, C. M. F.; PACHECO, R. S.; BRAZIL, R. P. Diagnosis of human visceral leishmaniasis by PCR using blood samples spotted on filter paper. **Genet. Mol. Res.**, v. 3, p. 251-57, 2004.

DAY, M. J. Immunoglobulin G subclass distribution in canine leishmaniosis: a review and analysis of pitfalls in interpretation. **Vet. Parasitol.**, v. 147, p. 2-8, 2007.

DEANE, M. P.; DEANE, L. M. Natural infection of *Phlebotomus longipalpus* by Leptomonas, probably *Leishmania donovani*, in a focus of kala-azar in Ceará. **Hospital de Rio de Janeiro**, Rio de Janeiro, v. 45, n. 6, p. 697-702, 1954.

DEBORGGRAEVE, S.; LAURENT, T.; ESPINOSA, D.; VAN DER AUWERA, G.; MBUCHI, M.; WASUNNA, M.; EL-SAFI, S.; AL-BASHEER, A. A.; ARÉVALO, J.; MIRANDA-VERÁSTEGUI, C.; LECLIPTEUX, T.; MERTENS, P.; DUJARDIN, J. C.; HERDEWIIN, P.; BÜSCHER, P. A simplified and standardized polymerase chain reaction format for the diagnosis of leishmaniasis. **J. Infect. Dis.**, v. 198, p. 1565-72, 2008.

DE PAULA, A. A.; DA SILVA, A. V. M.; FERNANDES, O.; JANSEN, A. M. The use of immunoblot analysis in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in an endemic area of Rio de Janeiro. **J. Parasitol.**, v. 89, n. 4, p. 832-836, 2003.

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 Immunol.**, v. 17, p. 451-458, 1995.

DESCOTEAUX, A.; TURCO, S. J. Glycoconjugates in Leishmania infectivity. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1455, n. 2-3, p. 342-52, 1999.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 27, n. 5, p. 305-18, 2004a.

DIETZE, R.; FALQUETO, A.; VALLI, L. C.; RODRIGUES, T. P.; BOULOS, M.; COREY, R. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis with a dot-enzyme-linked immunosorbent assay. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 53, n. 1, p. 40-2, 1995

DIETZE, R.; BARROS, G. B.; TEIXEIRA, L.; HARRIS, J.; MICHELSON, K.; FLAQUETO, A.; COREY, R. Effect of eliminating seropositive canines on the transmission of visceral leishmaniasis in Brazil. **Clin. Infect. Dis.**, v. 25, p. 1240-42, 1997.

DISCH, J.; MACIEL, F. C.; OLIVEIRA, M. C.; ORSINI, M.; RABELLO, A. Detection of circulating *Leishmania chagasi* DNA for the non-invasive diagnosis of human infection. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 97, p. 1-5, 2003.

DOYLE, P. S.; DWYER, D. M. *Leishmania*: Immunochemical comparison of the secretory (extracellular) acid phosphatases from various species. **Exp. Parasitol.**, v. 77, p. 435-44, 1993.

DWYER, D. M. Isolation and partial characterization of surface membranes from *Leishmania donovani* promastigotes. **J. Protozool.**, v. 27, p. 176-182, 1980.

DYE, C. The logic of visceral leishmaniasis control. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 55, p.125-130, 1996.

EL AMIN, E. R.; WRIGHT, E. P.; ABDEL RAHMAN, A. M.; KOLK, A.; LAARMAN, J. J.; PONDMAN, K. W. Serodiagnosis of sudanese visceral and mucosal leishmaniasis: comparison of ELISA-immunofluorescence and indirect haemagglutination. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 80, p. 271-4, 1986.

ELASSAD, A. M.; YOUNIS, S. A.; SIDDIG, M.; GRAYSON, J.; PETERSEN, E.; GHALIB, H. H. The significance of blood levels of IgM, IgA, IgG and IgG subclasses in Sudanese visceral leishmaniasis patients. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 95, n. 2, p. 294-9, 1994.

ELLIS, S. L.; SHAKARIAN, A. M.; DWYER, D. M. *Leishmania*: amastigotes synthesize conserved secretory acid phosphatases during human infection. **Exp. Parasitol.**, v. 89, n. 2, p. 161-8, 1998.

EL-ON, J.; SCHNUR, L. F.; GREENBLATT, C. L. *Leishmania donovani*: Physicochemical, Immunological, and Biological Characterization of Excreted Factor from Promastigotes. **Exp. Parasitol.**, v. 47, n. 2, p. 254-69, 1979.

EL-SAFI, S. H.; BUCHETON, B.; KHEIR, M. M.; MUSA, H. A.; EL-OBAID, M.; HAMMAD, A.; DESSEIN, A. Epidemiology of visceral leishmaniasis in Atbara River area, eastern Sudan: the outbreak of Barbar El Fugara village (1996-1997). **Microbes Infect.**, v. 4, p. 1439-1447, 2002.

ENGVALL E, PERLMANN P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. **Immunochemistry**, v. 8, n. 9, p. 87-4, 1971.

ETGES, R.; BOUVIER, J.; BORDIER, C. The major surface protein of *Leishmania* promastigotes is a protease. **J. Biol. Chem.**, v. 261, n. 20, p. 9098-101, 1986.

EVANS, T. G.; KRUG, E. C.; WILSON, M. E.; VASCONCELOS, A. W.; DE ALENCAR, J. E.; PEARSON, R. D. Evaluation of antibody responses in American visceral leishmaniasis by ELISA and immunoblot. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v. 84, n. 2, p. 157-66, 1989.

EVANS, T. G.; VASCONCELOS, A. B.; VASCONCELOS, A. W. Canine visceral leishmaniasis in northeast Brazil: assessment of serodiagnostic methods. **Ann. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 42, p. 118-23, 1990.

FEIJÃO, A. M. M.; LIMA, J. W. O.; VIEIRA, F. C. O.; NATIONS, M. K. O significado do cachorro para a família – estudo qualitativo sobre a estratégia de eliminação de cães infectados com *Leishmania* para o controle do calazar. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 34, 2001. Suppl. 1. Apresentada na Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 230 p.

FERGUSON, M. A. J. The surface glycoconjugates of trypanosomatid parasites. **Philos. Trans. R. Soc. Lond.**, v. 352, p. 1295-1302, 1997.

FERGUSON, M. A. J. The structure, biosynthesis and functions of glycosylphosphatidylinositol anchors, and the contributions of trypanosome research. **J. Cell Sci.**, v. 112, p. 2799-2809, 1999.

FERNÁNDEZ-PÉREZ, F. J.; MENDEZ, S.; FUENTE, C.; GÓMEZ-MUÑOZ, M. T.; CUQUERELLA, M.; ALUANDA, J. M. Short report: improved diagnosis and follow-up of canine leishmaniasis using amastigote-based indirect immunofluorescence. **Ann. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 61, p. 652-3, 1999.

FERREIRA, W. A.; ÁVILA, S. L. M. **Diagnóstico Laboratorial das principais Doenças Infecciosas e Auto-imunes**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2001. p. 1-6.

FERREIRA, E. C.; DE LANA, M.; CARNEIRO, M.; REIS, A. B.; PAES, D. V.; DA SILVA, E. S.; SCHALLIG, H.; GONTIJO, C. M. Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. **Vet. Parasitol.**, v. 146, n. 3-4, p. 235-41, 2007.

FRANK, F. M.; FERNÁNDEZ, M. M.; TARANTO, N. J.; CAJAL, S. P.; MARGNI, R. A.; CASTRO, E.; THOMAZ-SOCCOL, V.; MALCHIODI, E. L. Characterization of human infection by *Leishmania* spp. In the Northwest of Argentina: immune response, double infection with *Trypanosoma cruzi* and species of *Leishmania* involved. **Parasitology**, v. 126, p. 31-9, 2003.

FRANCK, J.; GARIN, Y. J.; DUMON, H. LDBio-Toxo II immunoglobulin G Western blot confirmatory test for anti-toxoplasma antibody detection. **J. Clin. Microbiol.**, v. 46, n. 7, p. 2334-8, 2008.

FRANKE, C. R.; GREINER, M.; MEHLITZ, D. Investigations on naturally occurring *Trypanosoma evansi* infections in horses, cattle, dogs and capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) in Pantanal de Pocone (Mato Grosso, Brazil). **Acta Trop.**, v. 58, p. 159-169, 1994.

GALIMBERTTI, M. Z.; KATZ, G.; CAMRAGO-NEVES, V. L. F.; RODAS, L. A. C.; CASANOVA, C.; COSTA, A. I. Leishmaniose visceral americana no Estado de São Paulo. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 32, p. 1-217, 1999.

GARDINER, P. R.; JAFFE, C. L.; DWYER, D. M. Identification of cross-reactive promastigote cell surface antigens of some leishmanial stocks by 125I labeling and immunoprecipitation. **Infect. Immun.**, v. 43, n. 2, p. 637-643, 1984.

GARG, R.; DUBE, A. Animal models for vaccine studies for visceral leishmaniasis. **Indian J. Med. Res.**, v. 123, n.3, p. 439-54, 2006.

GENARO, O. Leishmaniose visceral. In: NEVES, D.P.; MELO, A.I.; GENARO, O.; LINARDI, P.M. **Parasitologia humana**. 10 ed. São Paulo: Atheneu, 2003. p. 56-72.

GOMES-SILVA, A.; SOUZA, M. A.; AFONSO-CARDOS, S. R.; ANDRADE, L. R.; DIETZE, R.; LEMOS, E.; BELLI, A.; FAVORETO JUNIOR, S.; FERREIRA, M. S. Serological reactivity of different antigenic preparations of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and the *Leishmania braziliensis* complex. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 41, n. 2, p. 135-41, 2008.

GONÇALVES, M. F.; UMEZAWA, E. S.; KATZIN, A. M.; DE SOUZA, W.; ALVES, M. J.; ZINGALES, B.; COLLI, W. *Trypanosoma cruzi*: shedding of surface antigens as membrane vesicles. **Exp. Parasitol.**, v. 72, n. 1, p. 43-53, 1991.

GONTIJO, C. M.; MELO, M. N. Leishmaniose Visceral no Brasil: Quadro Atual, desafios e Perspectivas. **Rev. Bras. Epidemiol.**, v. 7, n. 3, p. 338-349, 2004.

GOTTLIED, M.; DWYER, D. M. Identification and partial characterization of an extracellular acid phosphatase activity of *Leishmania donovani* promastigotas. **Mol. Cell. Biol.**, v. 2, n. 1, p. 76-81, 1982.

GOTTSTEIN, B.; DEPLAZES, P.; ARNOLD, P.; MEHLITZ, D.; REITER, I.; ECKERT, J. Immunodiagnosis of leishmaniasis in dogs by ELISA and mini-Western blot. **Schweiz. Arch. Tierheilkd.**, v. 130, p. 249-62, 1988.

GRIEMBERG, G.; FERRAROTTI, N. F.; SVIBEL, G.; RAVELLI, M. R.; TARANTO, N. J.; MALCHIODI, E. L.; PIZZIMENTI, M.C. Immunofluorescence assay with *Crithidia luciliae* for the detection of anti-DNA antibodies. Atypical images and their relationship with Chagas' disease and leishmaniasis. **Medicina**, B. Aires, v. 66, n. 1, p. 3-8, 2006.

GUERIN, P. J.; OLLIARO, P.; SUNDAR, E.; BOELAERT, M.; CROFT, S. L.; DESJEUX, P.; WASUNNA, M. K.; BRYCESON, A. D. M. Visceral leishmaniasis current status of control, diagnosis and treatment, and a proposed research and development agenda. **Lancet**, v. 83, p. 93-101, 2002.

GUIMARÃES, M. C.; CELESTE, B. J.; CORRALES, E. M.; ANTUNES, C. M. Comparison on the performance of *Leishmania major*-like and *Leishmania braziliensis braziliensis* as antigen for New World leishmaniasis IgG-immunofluorescence tests. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 33, p. 503-8, 1991.

HADMAN, E. Leishmaniasis: current status of vaccine development. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 14, p. 229-243, 2001.

HARITH, A. E.; KOLK, A. H. J.; KAGER, P. A.; LEEUWENBURG, J.; FABER, F. J.; MUIGAI, R.; KIUGU, S.; LAARMAN, J. J. Evaluation of a new developed direct agglutination test (DAT) for serodiagnosis and seroepidemiological studies of visceral leishmaniasis: comparison with IFAT and ELISA. **Trans. R. Soc. Trop. Med Hyg.**, v. 81, p. 603-606, 1987.

HEY, A. S.; THEANDER, T. G.; HVIID, L.; HAZRATI, S. M.; KEMP, M.; KHARAZMI, A. The major surface glycoprotein (gp63) from *Leishmania major* and *Leishmania donovani* cleaves CD4 molecules on human T cells. **J. Immunol.**, v. 1, n. 152, p. 4542-4548, 1994.

HO, M.; LEEUWENBURG, J.; MBUGUA, G.; WAMACHI, A.; VOLLER, A. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for field diagnosis of visceral leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 32, n. 5, p. 943-6, 1983.

HOERAUF, A.; ANDRADE, P. P.; ANDRADE, C. R.; SOLBACH, W.; ROLLINGHOFF, M. Immunoblotting as a valuable tool to differentiate human visceral leishmaniasis from lymphoproliferative disorders and other clinically similar diseases. **Res. Immunol.**, v. 143, p. 375-83, 1992.

HOMMEL, M.; PETERS, W.; RANQUE, J.; QUILICI, M.; LANOTTE, G. The micro-ELISA technique in the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 72, p. 213-8, 1978.

HOMMEL, M.; JAFFE, C.L.; TRAVI, B.; MILON, G. Experimental models for leishmaniasis and for testing anti-leishmanial vaccines. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 89, p. 55-73, 1995.

IKEDA, F. A. **Avaliação hematológica, bioquímica e parasitológica de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, submetidos a diferentes tratamentos.** Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2004.

INIESTA, L.; GÁLLEGO, M.; PORTÚS, M. Immunoglobulin G and E responses in various stages of canine leishmanioses. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 103, p. 77-81, 2005.

JAFFE, C. L.; ZALIS, M. Use of purified parasite proteins from *Leishmania donovani* for the rapid serodiagnosis of visceral leishmaniasis. **J. Infect. Dis.**, v. 157, p.1212-20, 1988.

JAFFE, C. L.; DWYER, D. M. Extracellular release of the surface metalloprotease, gp63, from *Leishmania* and insect trypanosomatids. **Parasitol. Res.**, v. 91, p. 229-237, 2003.

JENSEN, A. T.; GASIN, S.; MOLLER, T.; ISMAIL, A.; GAAFAR, A.; KEMP, M.; EL HASSAN, A. M.; KHARAZMI, A.; ALCE, T. M.; SMITH, D. F.; THEANDE, T. G. Serodiagnosis of *Leishmania donovani* infections: assessment of enzyme-linked immunosorbent assays using recombinant *L. donovani* gene B protein (GBP) and a peptide sequence of *L. donovani* GBP. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 93, n. 2, p. 157-60, 1999.

KAMOUN-ESSGHAIER, S.; GUIZANI, I.; STRUB, J. M.; VAN DORSSELAER, A.; MABROUK, K.; QUELHAZI, L.; DELLAGI, K. Proteomic approach for characterization of immunodominant membrane-associated 30 to 36 kiloDalton fraction antigens of *Leishmania infantum* promastigotas, reacting with sera from Mediterranean visceral leishmaniasis patients. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 12, p. 310-20, 2005.

KAR, K. Serodiagnosis of Leishmaniasis. **Crit. Rev. Microbiol.**, v. 21, p. 123-52, 1995.

KAWANO, Y.; NOMA, T.; YATA, J. Regulation of human IgG subclass production by cytokines IFN- γ and IL-6 act antagonistically in the induction of human IgG1 but additively in the induction of IgG2. **J. Immunol.**, v. 153, p. 4948-4958, 1994.

KHARAZMI, A.; REZAI, H. R.; FANI, M.; BEHFORROUZ, C. C. Evidence for the presence of circulating immune complexes in serum and C3b and C3d on red cells of Kala-azar patients. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 76: 793-96, 1982.

KOHANTEB, J.; ARDEHALI, S. Cross-reaction of sera from patients with various infectious diseases with *Leishmania infantum*. **Med. Princ. Pract.**, v. 14, n. 2, p. 79-82, 2005.

KUMAR, P.; PAI, K.; TRIPATHI, K.; PANDEY, H. P.; SUNDAR, S. Immunoblot immune response to *Leishmania donovani* polypeptides in cases of human visceral leishmaniasis: its usefulness in prognosis. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 9, n. 5, p. 1119-23, 2002.

KURSTAK, E. Progress enzyme immunoassays: production of reagents, experimental design, and interpretation. **Bull. World Health Organ**, v. 63, n. 4, p. 793-811, 1985.

LACHAUD, L.; DEREURE, J.; CHABBERT, E.; MAUBOUSSIN, J. M.; OZIOL, E.; DEDET, J. P.; BASTIEN, P. Optimised PCR using patient blood samples for diagnosis and follow-up of visceral leishmaniasis, with special reference to AIDS patients. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, p. 236, 240, 2000.

LACHAUD, L.; CHABBERT, E.; DUBESSAY, P.; REYNES, J.; LAMOTHE, J.; BASTIEN, P. Comparison of various sample preparation methods for PCR diagnosis of visceral leishmaniasis using peripheral blood. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, n. 2, p. 613-7, 2001.

LACHAUD, L.; HAMMANI, S.M.; CHABBERT, E.; DEREURE, J.; DEDET, J. P.; BASTIEN, P. Comparison of six PCR Methods using peripheral blood for detection of canine Visceral leishmaniasis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, p. 210-5, 2002.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: PETERS, W.; KILLICK-KENDRICK, R. **The Leishmaniasis in biology and medicine**. London: Academic Press, 1987. v. 1, p. 1-120.

LASRI, S.; SAHIBI, H.; NATAMI, A.; RHALEM, A. Western blot analysis of *Leishmania infantum* antigens using sera from pentamidine-treated dogs. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 91, p. 13-8, 2003.

LEANDRO, C.; SANTOS-GOMES, G.M.; CAMPINO, L. ROMÃO, P.; CORTES, S.; ROLÃO, N.; GOMES-PEREIRA, S.; RICA CAPELA, M. J.; ABRANCHES, P. Cell mediated immunity and specific immunity and specific IgG1 and IgG2 antibody responses in natural and experimental canine leishmaniasis. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 79, p. 273-284, 2001.

LEMESRE, J. L.; HOLZMULLER, P.; CAVALEYRA, M.; BRAS-GONÇALVES, R.; HOTTIN, G.; PAPIEROK, G. Protection against experimental visceral leishmaniasis infection in dogs immunized with purified excreted secreted antigens of *Leishmania infantum* promastigotes. **Vaccine**, v. 23, n. 22, p. 2825-40, 2005.

LEMESRE, J. L.; HOLZMULLER, P.; BRAS-GONÇALVES, R.; BOURDOISEAU, G.; HUGNET, C.; CAVALEYRA M.; PAPIEROK, G. Long-lasting protection against canine visceral leishmaniasis using the *LiESAp*-MPD vaccine in endemic areas of France: Double-blind randomized efficacy field trial. **Vaccine**, v. 25, p. 4223-34, 2007.

LEPAY, D. A.; NOQUEIRA, N.; COHN, Z. Surface antigens of *Leishmania donovani* promastigotes. **J. Exp. Med.**, v. 157, p. 1562-72, 1983.

LIRA, R. A.; PAIVA CAVALCANTI, M.; NAKAZAWA, M.; FERREIRA, A. G. P.; SILVA, E.D.; ABATH, F. G. C.; ALVES, L. C.; SOUZA, W. V.; GOMES, Y. M. Canine visceral leishmaniasis: A comparative analysis of the EIE-leishmaniose visceral canina Bio-Manguinhos and the IFI-leishmaniose visceral canina Bio-Manguinhos kits. **Vet. Parasitol.**; v. 137, p. 11-16, 2006.

LOUIS, J.; HIMMELRICH, H.; PARRA-LOPEZ, C.; TACCHINI-COTTIER, F.; LAUNOIS, P. Regulation of protective immunity against *Leishmania major* in mice. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 10, p. 459-464, 1998.

MAALEJ, I. A.; CHENIK, M.; LOUZIR, H.; BEN SALAH, A.; BAHLOUL, C.; AMRI, F.; DELLAGI, K. Comparative evaluation of ELISAs based on ten recombinant or purified *Leishmania* antigens for the serodiagnosis of Mediterranean visceral leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 68, n. 3, p. 312-20, 2003.

MACHADO DE ASSIS, T. S.; BRAGA, A. S.; JUNQUEIRA, M. P.; BARRAL, A. M.; SIQUEIRA, I. C.; COSTA, C. H.; COSTA, L. D.; HOLANDA, T. A.; SOARES, V. Y.; BIÁ, M.; CALDAS, A. J.; ROMERO, G. A.; RABELLO, A. Validation of the Rapid Immunochromatographic Test IT-Leish[®] for the Diagnosis of Human Visceral Leishmaniasis. **Epidemiol. Serv. Saúde**, v. 17, p. 107-116, 2008.

MAIA, C.; CAMPINO, L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. **Vet. Parasitol.**, v. 158, p. 274-287, 2008.

MALCHIODI, E. L.; CHIARAMONTE, M. G.; TARANTO, N. J.; ZWIRNER, N. W.; MARGNI, R. A. Cross-reactivity studies and differential serodiagnosis of human infections caused by *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* spp; use of immunoblotting and ELISA with a purified antigen (Ag163B6). **Clin. Exp. Immunol.**, v. 97, p. 417-23, 1994.

MANCIANTI, F.; MECIANI, N. Specific sero-diagnosis of canine leishmaniasis by indirect immunofluorescence, indirect hemagglutination, and counterimmunoelectrophoresis. **Am. J. Vet. Res.**, v. 49, p. 1409-1411, 1988.

MANSUR, B. G. (Ed.) Atualização em Diagnóstico de Leishmaniose Visceral Canina. Disponível em: < <http://www.santelaboratorio.com.br/informativos/AtualizacaoemDiagnostico.pdf>>. Acesso em: 15 maio 2009.

MARTIN, S. K.; THUTA-HARUN, L.; ANDOYO-ANDOYO, M.; WASUNNA, K. M. A diagnostic ELISA for kala azar based on antigen from *Leishmania donovani* promastigote conditioned media. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 92, n. 5, p. 571-577, 1998.

MARTY, P.; LELIÈVRE, A.; QUARANTA, J. F.; SUFFIA, I.; EULALIO, M.; GAR-TOUSSAINT, M.; LE FICHOUX, Y.; KUBAR, J. Detection by western blot of four antigens characterizing acute clinical leishmaniasis due to *Leishmania infantum*. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 89, n. 6, p. 690-1, 1995.

MARY, C.; LAMOUREUX, D.; DUNAN, S.; QUILICI, M. Western blot analysis of antibodies to *Leishmania infantum* antigens: potencial of the 14-kD and 16-kD antigens for diagnosis and epidemiologic purposes. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 47, p.764-771, 1992.

MARZOCHI, M. C. A.; CHAGASTELLES, S. P.; MEDEIROS DE TOLEDO, L.; MARZOCHI, K. B. F.; TRAMONTANO, C. N.; RANGEL, F. B. Leishmaniose Visceral na cidade de Rio de Janeiro-Brasil. **Cad. Saúde Pública**, v. 1, p. 5-17, 1985.

McCONVILLE, M. J.; FERGUSON, M. A. J. The structure, biosynthesis and function of glycosylphosphatidylinositols in the parasitic protozoa and higher-eukaryotes. **Biochem. J.**, v. 294, p. 305-324, 1993.

McGWIRE, B. S.; O'CONNELL, W. A.; CHANG, K. P.; ENGMAN, D. M. Extracellular release of the glycosylphosphatidylinositol (GPI)-linked *Leishmania* surface metalloprotease, gp63, is independent of GPI phospholipolysis: implications for parasite virulence. **J. Biol. Chem.** V. 277, n. 11, p. 8802-9, 2002.

McGWIRE, B. S.; CHANG, K. P.; ENGMAN, D. M. Migration through the extracellular matrix by the parasitic protozoan *Leishmania* is enhanced by surface metalloprotease gp63. **Infect. Immun.**, v. 71, n. 2, p. 1008-1010, 2003.

MEDINA-ACOSTA, E.; KARESS, R. E.; SCHWARTZ, H.; RUSSELL, D. G. The promastigote surface protease (gp63) of *Leishmania* is expressed but differentially processed and localized in the amastigote stage. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 37, p. 263-274, 1989.

MENDES, D.G.; LAURIA-PIRES, L.; NITZ, N.; LOZZI, S. P.; NASCIMENTO, R. J.; MONTEIRO, P. S.; REBELO, M. M.; ROSA ADE, C.; SANTANA, J. M.; TEIXEIRA, A. R. Exposure to mixed asymptomatic infections with *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania braziliensis* and *Leishmania chagasi* in the human population of the greater Amazon. **Trop. Med. Int. Health**, v. 12, n. 5, p. 629-36, 2007.

METTLER, M.; GRIMM, F.; CAPELLI, G.; CAMP, H.; DEPLAZES, P. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays an immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania* infections in dogs. **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, n. 11, p. 5515-9, 2005.

MILES, M. A.; VEXENAT, J. A.; FURTADO CAMPOS, J. H.; FONSECA DE CASTRO, J. A. Canine leishmaniasis in Latin American: control strategies for visceral leishmaniasis. In Canine Leishmaniasis: An Update. In: PROCEEDINGS OF THE INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM, 1999, Barcelona, Spain. **Anais...** Barcelona: Editora, 1999. p. 46-53.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Brasília: Ministério da Saúde, 2003. p. 120.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Brasília: Ministério da Saúde, 2004. p. 54.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso**. 7 ed. rev. Brasília: Ministério da Saúde, 2008. p. 372.

MOHAMMED, A. R.; WRIGHT, E. P.; ABDEL-RAHMAN, A. M.; KOLK, A.; LAARMAN, J. J.; PONDMAN, K. W. Serodiagnosis of Sudanese visceral and mucosal leishmaniasis: comparision of ELISA-imunofluorescence and indirect hemagglutination. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hig.**, v. 80, p. 271-4, 1986.

MOLINA, R.; AMELA, C.; NIETO, J.; SAN ANDRES, M.; GONZALES, F.; CASTILLO, J. A.; LUCIENTES, J.; ALVAR, J. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. **Trans. Royal Soc. Med. Hyg.**, v. 88, p. 491-493, 1994.

MOODY, S. F.; HANDMAN, E.; McCONVILLE, M. J.; BACIC, A. The structure of *Leishmania major* amastigote lipophosphoglycan. **J. Biol. Chem.**, v. 268, p. 18457-18466, 1993.

NATTAN-LARRIER, L.; GRIMARD-RICHARD, L. Une method de diagnostique de la leishmaniose viscérale. **C. R. Soc. Biol. Paris**, v. 113, p. 1484-92, 1933.

NAVIN, T. R.; ARANA, F. E.; MÉRIDA, A. M.; ARANA, B. A.; CASTILLO, L.; SILVERS, D. N. Cutaneous leishmaniasis in Guatemala: Comparison of diagnostic methods. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 42, p. 36-42, 1990.

NEVES, D. P. Leishmaniose Visceral Americana. In: _____. **Parasitologia Dinâmica**. São Paulo: Atheneu, 2003. p. 101-12.

NOGUEIRA, Y. L.; ODORIZZI, R. M. F. N.; NAKAMURA, P. M. A comparison of the immune parameters of dogs infected with visceral leishmaniasis using western blot and neutralization techniques. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.**, v. 49, n. 6, p. 379-384, 2007.

OLIVEIRA, T. M. F. S.; MINEO, T. W. P.; BASON, M.; DAY, M. J. IgG subclass profile of serum antibodies to *Leishmania chagasi* in naturally infected and vaccinated dogs. **Vet. Parasitol.** V. 162, p. 16-22, 2009.

OZENZÖY, S. Serodiagnosis and epidemiology of visceral leishmaniasis in Turkey. **Ann. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 59, p. 363-9, 1998.

PAIVA, B. R.; PASSOS, L. N.; FALQUETO, A.; MALAFRONTA, R. dos S.; ANDRADE, H. F. Single step polymerase chain reaction (PCR) for the diagnosis of the *Leishmania* (Viannia) subgenus. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 46, n. 6, p. 335-8, 2004.

PALATNIK-DE-SOUSA, C. B.; DOS SANTO, W. R.; FRANÇA-SILVA, J. C.; DA COSTA, R. T.; REIS, A. B.; PALATNIK, M.; MAYRINK, W.; GENARO, O. Impact of canine control in the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 65, p. 510-7, 2001.

PANAMERICAN HEALTH ORGANIZATION-WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Manual on Visceral Leishmaniasis Control, 2005**. Disponível em: <<http://www.paho.org/English/AD/DPC/CD/leishmaniasis-manual.htm>>. Acesso em: 4 abr. 2009.

PAPPAS, M. G.; HAJKOWSKI, R. R.; DIGGS, C. L.; HOCKMEYER, W. T. Development of an antigen conservative enzyme immunoassay (Dot-ELISA) for the rapid diagnosis of visceral leishmaniasis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 77, p. 425-6, 1983.

PAPPAS, M. G.; CANNON, L. T.; HOCKMEYER, W. T.; SMITH, D. H. Evaluation of complement fixation procedures for the diagnosis of visceral leishmaniasis. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 79, p. 147-51, 1985.

PARANHOS-SILVA, M.; FREITAS L. A. R.; SANTOS, W. C.; GRIMALDI, Jr-G.; PONTES-DE-CARVALHO, L. C.; OLIVEIRA-DOS-SANTOS, A. J. A cross-sectional serodiagnostic survey of canine leishmaniasis due to *Leishmania chagasi*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 55, p. 39-44, 1996.

PARANHOS-SILVA, M.; PONTES-DE-CARVALHO, L. C.; DE SA OLIVEIRA, G. G.; NASCIMENTO, E. G.; DOS SANTOS, W. L. Skin reactions to thimerosal and *Leishmania* in dogs from a leishmaniasis endemic area: it is better to keep them apart. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 96, p. 679-681, 2001.

PASSOS, S.; CARVALHO, L. P.; ORGE, G.; JERÔNIMO, S. M.; BEZERRA, G.; SOTO, M.; ALONSO, C.; CARVALHO, E. M. Recombinant leishmania antigens for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 12, n. 10, p. 1164-7, 2005.

PINELLI, E.; KILLICK-KENDRICK, R.; WAGENAAR, J.; BERNADINA, W.; REAL, G.; RUITENBERG, J. Cellular and Humoral Immune Responses in Dogs Experimentally and Naturally Infected with *Leishmania infantum*. **Infect. Immun.**, v. 62, p. 229-235, 1994.

PINTO, A. R.; BEYRODT, C. G.; LOPES R. A.; BARBIÉRI, C. L. Identification of a 30kDa antigen from *Leishmania (L.) chagasi* amastigotes implicated in protective cellular responses in a murine model. **Int. J. Parasitol.**, v. 30, n. 5, p. 599-607, 2000.

PORROZI, R.; DA COSTA, M. V. S.; TEVA, A.; FALQUETO, A.; FERREIRA, A. L.; DOS SANTOS, C. D.; FERNANDES, A. P.; GAZZINELLI, R. T.; CAMPOS-NETO, A.; GRIMALDI, G. Jr. Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays based on crude and recombinant leishmanial antigens for serodiagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania infantum* visceral infections in dogs. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 14, p. 544-548, 2007.

PREVIATO, J. O.; MENDONÇA-PREVIATO, L.; JONES, C.; WAIT, R.; FOURNET, B. Structural characterization of a novel class of glycoposphosphingolipids from the protozoan *Leptomonas samueli*. **J. Biol. Chem.**, v. 267, n. 34, p. 24279-86, 1992.

PRIGIONE, I.; FACCHETTI, P.; LECORDIER, L.; DESLÉE, D.; CHIESA, S.; CESBRON-DELAUW, M. F.; PISTOIA, V. T cell clones raised from chronically infected healthy humans by stimulation with *Toxoplasma gondii* excretory-secretory antigens cross-react with live tachyzoites: characterization of the fine antigenic specificity of the clones and implications for vaccine development. **J. Immunol.**, v. 164, n. 7, p. 3741-8, 2000.

PUPKIS, M. F.; COOMBS, G. H. Purification and characterization of proteolytic enzymes of *Leishmania mexicana mexicana* amastigotes and promastigotes. **J. Gen. Microbiol.**, v. 130, n. 9, p. 2375-83, 1984.

PUPKIS, M. F.; TETLEY L.; COOMBS, G. H. *Leishmania mexicana*: amastigotes hydrolases in unusual lysosomes. **Exp. Parasitol.**, v. 62, n. 1, p. 29-39, 1986.

QUARESMA, P. F.; MURTA, S. M.; DE CASTRO FERREIRA, E.; DA ROCHA-LIMA, A. C.; XAVIER, A. A.; GONTIJO, C. M. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Identification of *Leishmania* species by PCR-RFLP and quantification of parasite DNA by real-time PCR. **Acta Trop.** In press.

RACHAMIN, N.; JAFFES, C. L. Pure protein from *Leishmania donovani* protects mice against both cutaneous and visceral leishmaniasis. **J. Immunol.**, v. 150, p. 2322-31, 1993.

RAJASEKARIAH, G. H.; RYAN, J. R.; HILLIER, S. R.; YI, L. P.; STITELER, J. M.; CUI, L.; SMITHYMAN, A. M.; MARTIN, S. K. Optimisation of an ELISA for the serodiagnosis of visceral leishmaniasis using in vitro derived on soluble promastigote antigens. **J. Immunol. Methods**, v. 252, p. 105-119, 2001.

RAJASEKARIAH, G. H.; CARDOSO, L.; DOGCIO, D. A.; MARTIN, S. K.; SMITHYMAN, A. M. A novel Exo-antigen- based ELISA for the detection of canine Leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 78, n. 4, p. 616-623, 2008.

RAMI, M.; ATARHOUCHE, T.; DAKKAK, A. identification of two highly performing *Leishmania infantum* antigens for serodiagnosis of canine leishmaniosis. **Vet. Parasitol.**, v. 135, p. 25-31, 2005.

RAMIRO, M. J.; ZARATE, J. J.; HANKE, T.; RODRIGUEZ, D.; RODRIGUEZ, J. R.; ESTEBAN, M.; LUCIENTES, J.; CASTILLO, J. A.; LARRAGA, V. Protection in dogs against visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* is achieved by immunization with a heterologous prime-boost regime using DNA and vaccinia recombinant vectors expressing LACK. **Vaccine**, v. 21, p. 2474-2484, 2003.

RAVEL S, CUNY G, REYNES J, VEAS F. A highly sensitive and rapid procedure for direct PCR detection of *Leishmania infantum* within human peripheral blood mononuclear cells. **Acta Trop.**, v. 59, n. 3, p. 187-96, 1995.

RAVINDRAN, R.; ALI, N. Progress in vaccine research and possible effector mechanisms in visceral leishmaniasis. **Curr. Mol. Med.**, v. 4, n. 6, p. 697-709, 2004.

REED, S. G.; BADARÓ, R.; MASUR, H.; CARVALHO, E. M.; LORENÇO, R.; LISBOA, A.; TEIXEIRA, R.; JOHNSON, Jr. W. D.; JONES, T. C. Selection of a skin test antigen for American visceral leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med Hyg.**, v. 35, p. 79-85, 1986.

REED, S. G.; BADARÓ, R.; LLOYD, R. M. Identification of specific and cross-reactive antigens of *Leishmania donovani chagasi* by human infection sera. **J. Immunol.**, v. 138, n. 5, p. 1596-601, 1987.

REIS, A. B. **Avaliação de Parâmetros Laboratoriais e Imunológicos de Cães Naturalmente Infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi* Portadores de Diferentes Formas Clínicas da Infecção.** 200 f. Tese (Doutorado em Parasitologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2001.

REZAI, H. B.; ARDEHALI, S. M.; AMIRHAKIMI, G.; KHARAZMI, A. Immunological features of Kala-azar. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v27, p. 1079-1083, 1978.

ROLLAND, L.; BELKAID, M.; SEYE, A.; SCHENEIDER, P.; GENTILINI, M. Detection of serum antibodies against Leishmania 94kDa antigen in visceral and cutaneous leishmaniosis due to *Leishmania infantum*. **Parasite**, v. 2, n. 1, p. 13-21, 1995.

ROMERO, L. I.; PAZ, H. M.; ORTEGA-BARRÍA, E.; BAYARD, V.; HOCHBERG, L. P.; COLLINS, K. M.; CHAN, A. S. T.; RYAN, R. F. Evaluation of serological assays based on a novel excreted antigen preparation for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis in Panama. **J. Microbiol. Methods**, v. 57, n. 3, p. 391-97, 2004.

ROSÁRIO, E. Y.; GENARO, O.; FRANÇA-SILVA, J. C.; 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. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 2, p. 197-203, 2005.

ROSPAL, A.; ZAJAC, A.; LINDSAY D. Canine visceral leishmaniasis and its emergence in the United States. **Vet. Clin. N. Am. Small. Anim. Pract.**, v. 33, p. 921-937, 2003.

ROUTIER, F. H.; DA SILVEIRA, E. X.; WAIT, R.; JONES, C.; PREVIATO, J. O.; MENDONÇA-PREVIATO, L. Chemical characterisation of glycosylinositolphospholipids of *Herpetomonas samuelpessoai*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 69, p. 81-92, 1995.

RYAN, J. R.; SMITHYAMAM, M. A.; RAJASEKARIAH, G. H.; HOCHBERG, L.; STITELER, M. J.; MARTIN, S. K. Emzime-Linked Immunosorbent Assay based on soluble promastigote antigen detects immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies in sera from cases of visceral and cutaneous Leishmaniasis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, n. 3, p. 1037-43, 2002.

SAKRU, N.; KORKMAZ, M.; OZBEL, Y.; ERTABAKLAR, H.; SENGUL, M.; TOZ, S. O. Investigation of asymptomatic visceral leishmaniasis cases using western blot in an endemic. **New Microbiol.**, v. 30, p. 13-8, 2007.

SALOTRA, P.; RAINA, A.; NEGI, N. S. Immunoblot analysis of the antibody response to antigens of *Leishmania donovani* in Indian kala-azar. **Br. J. Biomed. Sci.**, v. 56, n. 4, p. 263-7, 1999.

SANTIAGO, M. A.; RIBEIRO, F. C.; MOUTA-CONFORT, E.; NASCIMENTO, L. D.; SCHUHACH, A. O.; MADEIRA, M. F.; BERTHO, A. L. Differentiation between canine cutaneous and visceral leishmaniasis by the detection of immunoglobulin G specific for *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* antigens using flow cytometry. **Vet. Parasitol.**, v. 4, p. 341-6, 2008.

SANTOS-GOMES, G.; GOMES-PEREIRA, S.; CAMPINO, L.; ARAÚJO, M. D.; ABRANCHES, P. Performance of immunoblotting in diagnosis of visceral leishmaniasis in human immunodeficiency vírus-Leishmania sp. coinfecting patients. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, n. 1, p. 175-8, 2000.

SÃO PAULO (Estado). Grupo de Estudos em Leishmanioses, Coordenadoria de Controle de Doenças, Superintendência de Controle de Endemias, Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. **Atualização da classificação epidemiológica dos municípios para a leishmaniose visceral americana**. Boletim Epidemiológico Paulista, v. 5, n. 50, p. 18-20, 2008.

SAVANI, E. S. M.; NUNES, V. L. B.; GALATI, E. A. B.; CASTILHO, M. T.; ARAUJO, F. S.; ILHA, I. M. N. CAMARGO, M. C.; D'AURIA, S. R. N.; FLOETER-WINTER, L. M. Occurrence of co-infection by *Leishmania (Leishmania) chagasi* and *Trypanosoma (Trypanozoon) evansi* in a dog in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 739-741, 2005.

SCHALLIG, H. D. F. H.; OSKAN, L. Molecular biological applications in the diagnosis and control of leishmaniasis as parasite identification. **Trop. Med. Int. Health**, v. 7, p. 641-51, 2002.

SCHENEIDER, P.; TREVMANN, A.; MILNE, K. G.; McCONVILLE, M. J.; ZITZMANN, N.; FERGUSON, M. A. J. Structural studies on a lipoarabinogalactan of *Crithidia fasciculata*. **Biochem. J.**, v. 313, p. 963-971, 1996.

SCHNUR, L. F.; ZUCKERMAN, A.; GREENBLATT, C. L. Leishmanial serotypes as distinguished by the gel diffusion of factors excreted in vitro and in vivo. **Isr. J. Med. Sci.**, v. 8, n. 7, p. 932-42, 1972.

SCHNUR, L. F.; ZUCKERMAN, A. Excreted factor (EF) serotypes of Israeli leishmanial strains. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 70, p. 15, 1976.

SEMPREVIVO, L. H.; MACLEOD, M. E. Characterization of the exometabolite of *Leishmania donovani* as a novel glycopeptidophosphosphingolipid. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 103, p. 1179-85, 1981.

SERGEIEV, V. P.; SHIKUNA, E. V. Soluble antigen in *Leishmania tropica major*. **Med. Parazitol.**, v. 38, n. 2, p. 208-212, 1969.

SHAMS, H.; KLUCAR, P.; WEIS, S. E.; LALVANI, A.; MOONAN, P.K.; WIZEL, B.; EWER, K.; NEPOM, G. T.; LEWINSOHN, D. M.; ANDERSEN, P.; BARNES, P. F. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* peptide that is recognized by human CD4+ and CD8+ T cells in the context of Multiple HLA alleles. **J. Immunol.**, v. 173, n. 3, p. 1966-77, 2004.

SHREFFLER, W. G.; BURNS, J. M. JR.; BARDARÓ, R.; GHALIB, H. W.; BUTTON, L. L.; MCMMASTER, W. R.; REED, S. G. Antibody responses of visceral leishmaniasis patients to gp63, a major surface glycoprotein of *Leishmania* species. **J. Infect. Dis.**, v. 167, n. 2, p. 426-30, 1993.

SILVA, E. S.; GONTIJO, C. M.; PIRMEZ, C.; FERNANDES, O.; BRAZIL, R. P. Short report: detection of *Leishmania* DNA by polymerase chain reaction on blood samples from dogs with visceral leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 65, p. 896-8.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; CORBETT, C. E. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 3; p. 239-51, 2004.

SLAPPENDEL, R. J.; TESKE, E. A review of canine leishmaniasis presenting outside endemic areas. Canine Leishmaniasis: An update. In: PROCEEDINGS OF THE INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM, 1999, Barcelona, Spain. **Anais...** Barcelona: Editora, 1999. p. 54-59.

SOLANO-GALLEGO, L.; LLULL, J.; RAMOS, G. RIERA, C.; ARBOIX, M.; ALBEROLA, J.; FERRER, L. The Ibizaian hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection. **Vet. Parasitol.**, v. 90, p. 37-45, 2000.

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

SOLANO-GALLEGO, L.; RIERA, C.; ROURA, X.; INIESTA, L.; GALLEGU, M.; VALLADARES, J. E.; FISA, R.; CASTILLEJO, S.; ALBEROLA, J.; FERRER, L.; ARBOIX, M.; PORTÚS, M. *Leishmania infantum*-specific IgG, IgG1 and IgG2 antibody responses in healthy and ill dogs from endemic areas. Evolution in the course of infection and after treatment. **Vet. Parasitol.**, v. 19, n. 4, p. 265-76, 2001b.

SOUZA, B. M. P. S.; REBOUÇAS, M. F.; OLIVEIRA, L. S.; FREITAS, D. S.; JULIÃO, F. S.; ALCÂNTARA, A. C.; PAULE, B. J. A.; BARROUIN-MELO, S. M.; FRANKE, C. R. Comparação entre diferentes preparados protéicos de *Leishmania chagasi* como antígenos para ELISA indireto. **Rev. Bras. Saúde Prod. An.**, v. 5, p. 31-40, 2004.

SPANAKOS, G.; PIPERAKI, E. T.; MENOUNOS, P. G.; TEGOS, N.; FLEMETAKIS, A.; VAKALIS, N. C. Detection and species identification of Old World *Leishmania* in clinical samples using a PCR-based method. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 102, p. 46-53, 2008.

SUFFIA, I.; QUARANTA, J. F.; EULALIO, M. C.; FERRUA, B.; MARTY, P.; LE FICHOUX, Y.; KUBAR, J. Human T-cell activation by 14 and 18 kilodalton nuclear proteins of *Leishmania infantum*. **Infect Immun.**, v. 63, p. 3765-71, 1995.

SUNDAR, S.; RAI, M. Laboratory Diagnosis of visceral leishmaniasis. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 9, n. 5, p. 951-958, 2002.

TAVARES, C. A. P.; FERNANDES, A. P.; MELO, M. N. Molecular diagnosis of Leishmaniasis. **Expert Rev. Mol. Diagn.**, v. 3, p. 657-67, 2003.

TÁVORA, M. P.; PEREIRA, M. A.; SILVA, V. L.; VITA, G. F. Comparative validation study between the ELISA and RIFI techniques for diagnosing *Leishmania* sp in stray dogs caught in the municipality of Campos de Goytacazes, State of Rio de Janeiro. **Rev. Soc. Brás. Med. Trop.**, v. 40, n. 4, p. 482-3, 2007.

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

TIWARI, V.; JAIN, A.; AGARWAL, M.; MITTAL, B.; PANDEY, H. P. Evaluation of antibody responses in Indian Kala-azar by immunoblot. **Biochem. Mol. Biol. Int.**, v. 37, p. 959-64, 1995.

TURCO, S. J.; DESCOTEAUX, A. The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 45, p. 65-94, 1992.

TURCO, S. J. Trypanosomatid surface and secreted carbohydrates. **Biochem. Cell. Biol. Protoc.**, v. 10, p. 225-240, 2003.

UMEZAWA, E. S.; NASCIMENTO, M. S.; KESPER, JR. N.; COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J.; JUNQUEIRA, C. V.; CAMARGO, M. E. Immunoblot assay using excreted-secreted antigens of *Trypanosoma cruzi* in serodiagnosis of congenital, acute, and chronic Chagas' disease. **J. Clin. Microbiol.**, v. 34, p. 2143-2147, 1996a.

UMEZAWA, E. S.; NASCIMENTO, M. S.; STOLF, A. M. Enzyme-linked immunosorbent assay with *Trypanosoma cruzi* excreted-secreted antigens (TESA-ELISA) for serodiagnosis of acute and chronic Chagas' disease. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 39, n. 3, p. 169-76, 2001.

UMEZAWA, E. S.; PINEDO-CANCINO, V.; TEIXEIRA, M. M. TESA-blot for the diagnosis of Chagas disease in dogs from co-endemic regions for *Trypanosoma evansi* and *Leishmania chagasi*. **Acta Trop.**, v. 30, p. 1-9, 2009.

VALE, A. M.; FUJIWARA, R. T.; DA SILVA NETO, A. F.; MIRET, J. A.; ALVAREZ, D. C. C.; DA SILVA, J. C. F.; 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 Public Health**, v. 56, p. 41-48, 2009.

VEXENAT, A. C.; SANTANA, J. M.; TEIXEIRA, A. R. L. Cross-reactivity in human infections by the kinetoplastid protozoa *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania chagasi* and *Leishmania (vianna) braziliensis*. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 38, n. 3, p. 177-185, 1996.

VÖLLER, A.; BIDWELL, D. E.; BARTLETT, A.; EDWARDS, R. A comparison of isotopic and enzyme-immunoassays for tropical parasitic diseases. **Trans. R. Soc. Trop. Med Hyg.**, v. 71, n. 5, p. 431-7, 1977.

WHITE, A. C. Jr.; CASTES, M.; GARCIA, L.; TRUJILLO, D.; ZAMBRANO, L. *Leishmania chagasi* antigens recognized in cured visceral leishmaniasis and asymptomatic infection. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 46, p. 123-31, 1992.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Control of Leishmaniases**. Geneva: WHO, 1990. p. 793. (Technical Report Series).

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **DCD Annual report 2001**. Disponível em: <<http://www.emro.who.int/dsaf/dsa345.pdf>>. Acesso em: 7 Abr. 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniasis**. 2009. Disponível em: <<http://www.who.int/immunization/topics/leishmaniasis/en/>>. Acesso em: 7 Abr. 2009.

WU, Z.; BAO, Y.; YU, M.; LU, L.; ZHANG, Y. An experimental study on application of PCR in detection of kala-azar. **Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health**, v. 28, p. 169-72, 1997.

ZAMBRANO-VILLA, S.; ROSALES-BORJAS, D.; CARRERO, J. C.; ORTIZ-ORTIZ, L. How protozoan parasites evade the immune response. **Trends Parasitol.**, v. 18, p. 272-278, 2002.

ZANELLA, J. A Leishmaniose avança em São Paulo. [Entrevista a M. LUVIZOTTO]. **J. UNESP**, maio 2007, Saúde n. 222, p. 8-9.

ZIJLSTRA, E. E.; NUR, Y.; DESJEUX, P.; KHALIL, E. A.; EL-HASSAN, A. M.; GROEN, J. Diagnosing visceral leishmaniasis with the recombinant k39 strip test: experience from the Sudan. **Trop. Med. Int. Health**, v. 6, p. 108-113, 2001.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)