



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS CONÇALO MONIZ

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE E
MEDICINA INVESTIGATIVA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

TRIAGEM DOS ANTÍGENOS RECOMBINANTES DE *LEISHMANIA*
INFANTUM UTILIZANDO A TÉCNICA DE MULTI-ANTÍGENOS IMPRESSOS
(MAPIA) NO DESENVOLVIMENTO DE IMUNODIAGNÓSTICO PARA
LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

ISAAC QUEIROZ DE OLIVEIRA

Salvador – Brasil

2013

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ

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

**TRIAGEM DOS ANTÍGENOS RECOMBINANTES DE *LEISHMANIA INFANTUM*
UTILIZANDO A TÉCNICA DE MULTI-ANTÍGENOS IMPRESSOS (MAPIA) NO
DESENVOLVIMENTO DE IMUNODIAGNÓSTICO PARA LEISHMANIOSE
VISCERAL CANINA**

ISAAC QUEIROZ DE OLIVEIRA

Orientadora: Dra. PATRÍCIA SAMPAIO TAVARES VERAS

Co-orientadora: Dra. DEBORAH BITTENCOURT MOTHÉ FRAGA

Dissertação apresentada para a obtenção do grau de mestre em Biotecnologia aplicada a Saúde, no Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa/FIOCRUZ

SALVADOR, BA

2013

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

O48t Oliveira, Isaac Queiroz
Triagem dos antígenos recombinantes de leishmania infantum utilizando a técnica de multi-antígenos impressos(mapia) no desenvolvimento de imunodiagnóstico para leishmaniose visceral canina.[manuscrito] / Isaac Queiroz de Oliveira.- 2013.
87 f.; 30 cm

Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz. Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz. Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa, 2013.
Orientadora: Prof^a Dr^a: Patrícia Sampaio Tavares Veras
Co-orientadora: Dr^a Deborah Bittencourt Mothé Fraga

1. Leishmaniose 2. Diagnóstico 3. Proteínas recombinantes I. Título

CDU 616.993.163-08

“TRIAGEM DE ANTÍGENOS RECOMBINANTES DE *Leishmania infantum* UTILIZANDO A TÉCNICA DE MULTI-ANTÍGENOS IMPRESSOS (MAPIA) NO DESENVOLVIMENTO DE IMUNODIAGNÓSTICO PARA LEISHMANIA VISCERAL CANINA”

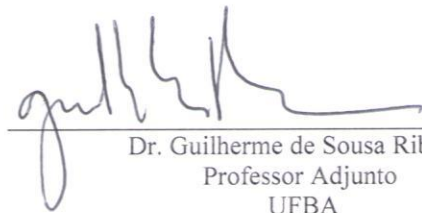
ISAAC QUEIRÓZ DE OLIVEIRA

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. Marco Alberto Medeiros
Tecnologista Senior
FIOCRUZ/RJ



Dr. Guilherme de Sousa Ribeiro
Professor Adjunto
UFBA



Dr. Edson Duarte Moreira Júnior
Pesquisador Titular
FIOCRUZ/BA

Agradecimentos

São muitos aos que devo agradecer para a realização deste trabalho. Tantos que não existiriam adjetivos suficientes para cada uma destas pessoas que me acompanharam ao longo desta nobre jornada.

Agradeço a minha orientadora Dra. Patrícia Sampaio Tavares Veras, pelas horas dedicadas ao entusiasmo, puxões de orelha, conselhos, compreensão, liberdade e tempo dedicado a leitura e realização deste trabalho.

A minha co-orientadora Deborah Bitencourt Mothé Fraga, por ter partilhado além da experiência profissional e de vida, outros tantos momentos de bancada, leitura, sugestões e festas.

Ao meu eterno colega e amigo de faculdade, mestrado e bancada Rodrigo de Araujo Silva, pelo companheirismo, discussões, experimentos, ensinamentos. Momentos compartilhados no âmbito formacional, maturação profissional, pessoal e, como não poderia faltar, nas baladas.

Aos meus colegas do LPBI-1, Niara, Marcos, Lairton, Bia, Vick (baby), Antonio Petersen, José Geraldo, Leila, Manuela, Marcelo, Samira, Luciano, Junior Guedes Kércia e Carlos (quase um google do laboratório), por saberem na prática o significado da palavra união. Pelos momentos compartilhados de dúvidas e incertezas, bancada, aprendizado, risadas, inúmeros momentos “cafezinho”, discussões curtas e também as sem fim. Pelos vários momentos extra trabalho: LPBI's Fest, clube do bolinha, MMA, viagens, dentre outros momentos que contribuíram para a minha formação profissional e pessoal.

Aos outros colegas do LPBI, pesquisadores e colegas da Fiocruz que de algum modo compartilharam com o meu dia a dia na instituição, seja com palpites em relação aos experimentos, as sugestões em nossos inúmeros encontros de sessão científica, discussão de artigos, empréstimos de reagentes e equipamentos ou pelos momentos de lazer, como o sempre presente baba das terças (os fiocraques), o vôlei e como não podia faltar as fiocretes. E mais uma vez, o nosso momento “cafezinho”.

A Flávia Paixão, administradora do nosso laboratório, profissional de excelente competência e que em muitas ocasiões foi a responsável por desenrolar os trâmites burocráticos e compras de reagentes. E como não poderia deixar de citar a sua praticidade e o seu humor irreverente.

Como não poderia deixar de ser, agradecer aos meus pais pelos ensinamentos do dia a dia, exemplos de caráter, esforço e dedicação. Por acreditar num sonho de um garotinho que queria voar alto, e assim sendo, construíram asas para que ele alcançasse o seu sonho. Sem eles, realmente, nada teria sido possível.

A minha avó, matriarca da família, personagem central e multiplicadora de pessoas com caráter e sinceridade.

Aos meus irmãos, Vinicius e Rogério, companheiros de aventuras, estresse e felicidade. Aos meus tios e primos por igualmente acreditar e incentivar o sonho de um garotinho.

Aos meus amigos e companheiros de vida, principalmente aos amigos-irmãos Emanuel e Markeo, pelos momentos de diversão, debates e outros inúmeros momentos compartilhados de felicidade e tristeza, sem o qual, dificilmente o estresse do dia a dia, como as decepções de bancadas, poderiam ser superadas.

Por fim, gostaria de compartilhar com todos, supracitados ou não (ou, até mesmo, os eventualmente esquecidos) a emoção de dar mais um passo na minha vida, um momento incomensurável, inenarrável e de grande importância. É com muita satisfação que eu vos falo: MUITO OBRIGADO!

RESUMO

As leishmanioses são antropozoonoses causadas por diferentes protozoários do gênero *Leishmania*. Estima-se que cerca de 350 milhões de pessoas estejam em áreas de risco, com uma incidência anual de aproximadamente dois milhões de novos casos no mundo. O cão é o principal reservatório dos centros urbanos e o flebótomo é o vetor responsável por sua transmissão. No Brasil, de acordo com as recomendações do Ministério da Saúde, cães soropositivos para leishmaniose devem ser sacrificado. O diagnóstico recomendado pelo Ministério da Saúde é feito com o teste rápido DPP-LVC® para triagem e o ELISA para confirmação. Trabalhos demonstram que o DPP-LVC® não é capaz de detectar uma parcela da população de cães, o que pode contribuir para a perpetuação da doença nestas áreas. Doze proteínas recombinantes (Lci1A, Lci2B, Lci3, Lci4, Lci5, Lci6, Lci7, Lci8, Lci10, Lci11, Lci12, Lci13) foram clonadas e sequenciadas em um estudo anterior, porém não foram completamente caracterizadas quanto à antigenicidade. Nossa hipótese é que um conjunto de antígenos selecionados a partir dessas proteínas recombinantes de *L. infantum* poderá ampliar a identificação de animais infectados em áreas endêmicas. O objetivo deste estudo foi identificar um conjunto de antígenos recombinantes de *L. infantum*, a partir de 12 antígenos previamente selecionados, quanto ao reconhecimento por soros de cães infectados para futuramente compor um teste imunodiagnóstico para leishmaniose visceral canina. No presente estudo, os 12 antígenos recombinantes previamente selecionados foram produzidos em nosso laboratório e purificados em Bio-Manguinhos. O ensaio de MAPIA (*Multi-Antigen Print ImmunoAssay*), que consiste em uma plataforma de triagem de antígenos em papel de nitrocelulose, mais próxima do teste rápido DPP-LVC®, foi utilizado para avaliação do reconhecimento dos 12 antígenos recombinantes por soros de cães infectados. Na triagem foram utilizados soros caninos positivos para leishmaniose visceral (n = 39), obtidos em estudo epidemiológico de corte transversal em área endêmica. Para avaliação da reatividade cruzada foram utilizados soros de cães com outras patologias: leishmaniose tegumentar (n = 10), tripanossomíase canina (n = 10), babesiose (n = 10) e erliquiose (n = 11), além de soros de animais negativos (n = 40). Inicialmente, foi definido o melhor protocolo para ser utilizado nos ensaios de MAPIA. Posteriormente, a triagem dos antígenos foi realizada com os soros e, para avaliar, a confiabilidade dos resultados obtidos, os

testes foram lidos por dois observadores de maneira independente. A concordância entre as leituras visuais dos dois observadores foi avaliada utilizando o índice Kappa. O teste exato de Fisher foi empregado para avaliar diferenças estatísticas entre o índice de positividade das proteínas avaliadas. As proteínas Lci1A e Lci2B foram reconhecidas por 74% e 69%, respectivamente. As Lci4, Lci5 e Lci12 obtiveram reconhecimento de 33%, 31% e 33%, respectivamente pelos anticorpos presentes nos soros. Baixa reatividade dos soros de cães com babesiose, erliquiose, tripanossomíase canina foi observada com as 12 proteínas recombinantes avaliadas. Soros de cães com leishmaniose tegumentar foram os que apresentaram mais reatividade com as proteínas recombinantes. Análises combinatórias foram realizadas para identificar a partir dos 12 antígenos previamente selecionados, o conjunto destes capaz de identificar o maior número de soros de cães com leishmaniose visceral canina testados. Foram identificadas duas combinações compostas por cinco antígenos, Lci1A, Lci2B, Lci8, Lci12, Lci4 e Lci1A, Lci2B, Lci8, Lci12, Lci5. Quando comparado o reconhecimento desses conjuntos com a combinação de Lci1A e Lci2B foi observado um aumento de 77% para 87%, no entanto não foi observada diferença estatística ($p= 0,098$) apesar desse incremento. Esse achado aponta para possibilidade de avaliar os dois conjuntos em um teste imunocromatográfico no formato do teste final (DPP). Em resumo, utilizando o teste de triagem MAPIA foi possível selecionar dois conjuntos de cinco proteínas recombinantes de *L. infantum* que mostraram potencial para compor um teste imunodiagnóstico no formato DPP multi-antígenos.

ABSTRACT

Leishmaniasis is an antropozoonosis caused by different protozoa of the genus *Leishmania*. It is estimated that approximately 350 million of people are at risk areas, with annual incidence of approximately two million new cases worldwide. The dog is the main reservoir in urban centers and the sandfly is the vector responsible for transmission. In Brazil, according to the recommendations of the Ministry of Health, seropositive dogs for leishmaniasis should be euthanized. The diagnosis is made by the DPP-LVC® as screening and ELISA as confirmatory. Studies have shown that DPP-LVC® is not able to detect a portion of the dog population, which may contribute to the perpetuation of the disease in these areas. Twelve recombinant proteins (Lci1A, Lci2B, Lci3, Lci4, Lci5, Lci6, Lci7, Lci8, Lci10, Lci11, Lci12, Lci13) were cloned and sequenced in a previous study, but were not fully characterized for antigenicity. Our hypothesis is that a set of selected recombinant antigens of *L. infantum* may increase the identification of infected animals in endemic areas. The aim of this study was identify a set of recombinant antigens of *L. infantum* from 12 previously selected for recognition by sera from infected dogs to compose an immunodiagnostic test for canine visceral leishmaniasis. The 12 recombinant antigens were produced in our laboratory and purified in Bio-Manguinhos. MAPIA (Multi-Antigen Print ImmunoAssay), which consists in a screening platform for antigen in nitrocellulose paper, was used to assess the recognition of recombinant antigens for 12 sera of dogs infected. MAPIA is closer to rapid test DPP-CVL® than other screening tests. We used this screening method with sera positive for canine visceral leishmaniasis (n = 39) obtained in a cross-sectional epidemiological study in endemic area. For evaluation of cross-reactivity, sera from dogs with other diseases: cutaneous leishmaniasis (n = 10), canine trypanosomiasis (n = 10) babesiosis (n = 10) and ehrlichiosis (n = 11), and animal sera negative (n = 40) were used. Initially, was decided that the best protocol to be used in the assays. Subsequently, screening of antigens was performed with sera and to evaluate the reliability of the results, the tests were read by two observers independently. The agreement between visual readings of the two observers was assessed using the kappa index. The Fisher exact test was used to evaluate statistical differences between the positivity rate of the proteins studied. The proteins Lci1A and Lci2B were recognized by 74% and 69%, respectively. Lci4 (33%), Lci5 (31%) and Lci12 (33%) achieved a good degree of

recognition by antibodies present in serum. We observed low reactivity of sera from dogs with babesiosis, ehrlichiosis, and canine trypanosomiasis with the 12 recombinant proteins. Sera from dogs with cutaneous leishmaniasis were most likely reacted with the recombinant proteins. Combinatorial analyzes were performed to identify a set of antigens from the 12 previously selected, that can identify the larger number of sera from dogs with canine visceral leishmaniasis. We identified two combinations composed of five antigens, Lci1A, Lci2B, Lci8, Lci12, Lci4 and Lci1A, Lci2B, Lci8, Lci12, Lci5 that were most recognized by serums. When compared recognition of combination of Lci1A + Lci2B and two sets of 5 proteins, sensitivity increased from 77% to 87%, however this increase was not statistically different ($p = 0.098$). Despite this finding did not reach statistical significance, points us to evaluate the possibility of two sets in an immunoassay format of the final test (DPP). In summary, using MAPIA, two sets of five recombinant proteins of *L. infantum* showed potential to be used in immunodiagnostic test in multi-antigens DPP.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Esquema da produção das tiras de nitrocelulose com antígenos recombinantes impregnados. Os antígenos recombinantes são impregnados paralelamente em membranas de nitrocelulose. As membranas posteriormente são cortadas em tiras perpendiculares a impregnação na membrana (Lyashenko *et al.*, 2000).29
- Figura 2 - Imagem do resultado do MAPIA, ilustrando as tiras impregnadas com antígenos após a incubação com soros, evidenciando a presença e ausência de bandas. A seta 1 indica a presença de reatividade (presença de banda) e a seta 2 indica ausência de reatividade (ausência de banda).37
- Figura 3 - Padronização do MAPIA em relação a diluição dos soros controle positivo (C+) na diluição 1:100 (tira A), na diluição 1:300 (tira B) e na diluição 1:400 (tira C). Controle negativo (C-) na diluição 1:100 e soros teste utilizados nas diluições de 1:100 (tira D), 1:200 (tira E), 1:300 (tira F) e 1:400 (tira G).40
- Figura 4 - Padronização do MAPIA em relação à diluição do conjugado. Soro controle positivo (C+) e diluição do conjugado de 1:6.000 (tira A), soro controle negativo (C-) e conjugado na diluição de 1:6.000 (tira B), soros teste e conjugados nas diluições de 1:6.000 (tira C), 1:7.500 (tira D), 1:9.000 (tira E) e 1:10.500 (tira F).41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Reatividade dos soros de cães com diferentes quadros clínicos de leishmaniose visceral aos antígenos recombinantes avaliados por MAPIA	43
Tabela 2 - Reatividade dos soros de cães com outras infecções e cães não infectados por <i>L. infantum</i> aos antígenos recombinantes avaliados por MAPIA	43
Tabela 3 - Análise combinatória realizada entre a sensibilidade e especificidade das proteínas recombinantes avaliadas no MAPIA.....	45
Tabela 4 - Índice Kappa de concordância entre as leituras realizadas por diferentes observadores dos resultados do MAPIA.	46
Tabela 5 – Análise estatística da sensibilidade das proteínas recombinantes avaliadas no MAPIA, utilizando o teste exato de Fischer.....	46

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Quadro comparativo dos protocolos testados na padronização do MAPIA.
Original - protocolo de operação padrão estabelecido por Bio-Manguinhos, obtido através de colaboração com o Laboratório de Tecnologia diagnóstica (LATED).
Protocolos A, B e C - modificações realizadas nas etapas e condições de execução do MAPIA em relação ao protocolo original.36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

cDNA	DNA complementar
CombiA	Combinação dos antígenos recombinantes de <i>L. infantum</i> : Lci1A, Lci2B, Lci4, Lci8 e Lci12
CombiB	Combinação dos antígenos recombinantes de <i>L. infantum</i> : Lci1A, Lci2B, Lci5, Lci8 e Lci12
DPP	<i>Dual Path Plataform</i>
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
INPI	Instituto Nacional da Propriedade Industrial
LATED	Laboratório de Tecnologia Diagnóstica
MAPIA	<i>Multi-Antigen Print Immunoassay</i>
NNN	Meio Novy-MacNeal-Nicolle
PBS	Tampão fosfato-salina
PBS-T	Tampão fosfato-salina/Tween
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
rK39	Proteína recombinante K39
SDS-PAGE	Eletroforese de Gel de Poliacrilamida
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
USAMRU	Meio <i>United States Army Medical Research Units</i>

Sumário

1.	Introdução	16
1.	Revisão de literatura.....	20
1.1.	Epidemiologia	20
1.2.	Agente causal.....	21
1.3.	Leishmaniose visceral	21
1.3.1.	Humana.....	21
1.3.2.	Canina	22
1.4.	Diagnóstico.....	24
1.4.1.	Diagnóstico Parasitológico.....	24
1.4.2.	Diagnóstico Sorológico	24
1.4.3.	Diagnóstico Molecular	27
1.5.	Proteínas recombinantes.....	28
1.6.	MAPIA	28
2.	Objetivos	30
2.1.	Objetivo Geral.....	30
2.2.	Objetivos Específicos	30
3.	Metodologia	31
3.1.	Antígenos recombinantes.....	31
3.1.1.	Produção proteica	31
3.1.2.	Purificação proteica	33
3.2.	Soros	34
3.3.	Ensaio imunológico com multi-antígenos impressos (MAPIA)	35
3.4.	Padronização do MAPIA	35
3.5.	Analises dos resultados.....	38
4.	Resultados.....	39

4.1. Produção e purificação das proteínas recombinantes.....	39
4.2. Padronização do MAPIA	40
4.3. Análise do MAPIA.....	41
5. Discussão	47
6. Conclusão	52
Referências	53
Anexo	61

1. Introdução

As leishmanioses são antropozoonoses causadas por diferentes espécies de parasitos protozoários do gênero *Leishmania* e consideradas como negligenciadas pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 2010). Elas são amplamente distribuídas nos cinco continentes. Estima-se que cerca de 350 milhões de pessoas estejam em áreas de risco, com uma incidência anual de aproximadamente dois milhões de novos casos.

Os parasitos são transmitidos ao hospedeiro mamífero, sejam eles cães, raposas, macacos, ratos ou homem, através da picada de fêmeas de flebotomos, que ao realizar o repasto sanguíneo inocula as formas promastigotas flageladas do protozoário na pele desses animais (ALVAR *et al.*, 2004). Os parasitos infectam células de defesa, principalmente, os macrófagos. No interior das células hospedeiras, promastigotas diferenciam-se em formas amastigotas aflageladas. Ao serem ingeridas pelo inseto vetor, no interior do trato digestório desses insetos, amastigotas de *Leishmania* transformam-se novamente em promastigotas que na forma metacíclicas infectante serão inoculadas no hospedeiro mamífero durante o repasto sanguíneo (SACKS, 2001).

No homem, a infecção pode evoluir e ocasionar um espectro de doenças com apresentações clínicas diferentes: i) leishmaniose tegumentar que pode ser localizada, difusa, disseminada ou cutâneo-difusa e ii) leishmaniose visceral que acomete órgãos internos como, medula óssea, baço, fígado e linfonodos (BERN *et al.*, 2008).

No Novo Mundo, a forma visceral da doença é, principalmente, causada pela *Leishmania infantum*. O cão é considerado o principal reservatório da doença nos centros urbanos. A doença no cão é caracterizada por alterações nos fâneros, tais como, onicogrifose, alopecia, úlceras e dermatites podendo também causar emagrecimento, anorexia, apatia, disfunções oculares e motoras, além de acometer órgãos internos, como baço, fígado e linfonodos, podendo levar o animal a óbito (ALVAR *et al.*, 2004). No entanto, alguns desses sinais clínicos são comumente encontrados em outras doenças infecciosas, tais como, erliquiose, babesiose e tripanossomíase canina (GREENE, 2006). Há controvérsias sobre a correlação da

forma clínica do cão e a transmissibilidade da leishmania para o vetor. De acordo com as recomendações do Ministério da Saúde do Brasil (2006), cães positivos para a leishmaniose visceral devem ser eutanasiados, como uma medida de controle da doença. Assim, o diagnóstico por avaliação dos sinais clínicos é insuficiente, sendo necessário o uso de exames laboratoriais complementares para o diagnóstico de cães com leishmaniose visceral canina.

Existem diversas técnicas diagnósticas para a leishmaniose visceral. Recentemente, foi recomendado pelo Ministério da Saúde do Brasil, que o teste rápido imunocromatográfico DPP-LVC® (do inglês, Dual-Path Plataform®) seja utilizado como teste de triagem para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina, e o ensaio imunoenzimático (ELISA, do inglês, *Enzime-Linked Immunosorbent Assay*) como teste confirmatório (Ministério da Saúde, 2011).

O DPP-LVC® para leishmaniose visceral canina foi desenvolvido pela Chembio Diagnostic System, Inc. e é produzido no Brasil por Bio-Manguinhos/Fiocruz. O teste rápido DPP-LVC® tem o papel de nitrocelulose como substrato para o antígeno e é utilizado para detectar a presença de anticorpos nos soros de cães infectados contra a proteína recombinante rK28. O teste DPP-LVC® apresenta alta sensibilidade para o diagnóstico de cães sintomáticos, entretanto baixa sensibilidade para detecção de cães assintomáticos (GRIMALDI *et al.*, 2012).

Diferentes indivíduos, quando infectados por um mesmo parasito, podem produzir anticorpos distintos contra um mesmo conjunto de antígenos. Assim, a utilização de mais de um antígeno recombinante pode ser mais eficiente na detecção da leishmaniose visceral, quando comparado ao emprego de um simples antígeno (TEIXEIRA *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2011). Diversas estratégias vêm sendo empregadas para identificar novas proteínas recombinantes, que elevem a eficiência do diagnóstico de doenças (TEIXEIRA *et al.*, 2007; WANG *et al.*, 2011). Doze antígenos recombinantes de *L. infantum* (Lci1A, Lci2B, Lci3, Lci4, Lci5, Lci6, Lci7, Lci8, Lci10, Lci11, Lci12 e Lci13) que tem patente depositada no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) [PCT/BR2010/000083 (Internacional) e PI0900961-2 (Nacional)] para o uso em métodos de diagnóstico, vacina e terapia para leishmaniose foram anteriormente identificados a partir de biblioteca genômica de promastigotas e de biblioteca de cDNA de amastigotas de *L. infantum*. Estes

antígenos recombinantes foram obtidos utilizando o método de soros falso negativos. Proteínas recombinantes obtidas através de fagos contendo genes de *L. infantum* foram testados em membranas de nitrocelulose para avaliar sua reatividade frente aos soros utilizados. Os soros que apresentaram resultados falso negativos foram novamente testados frente as proteínas recombinantes produzidas, identificando assim novos antígenos. Ao final do processo, um painel de antígenos capaz de reconhecer os soros testados foi obtido (TEIXEIRA *et al.*, 2007).

Os antígenos recombinantes Lci1A, Lci2B, Lci3, Lci4 e Lci5 foram anteriormente avaliados por ELISA e mostraram resultados promissores para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina (OLIVEIRA *et al.*, 2011). Mais recentemente o MAPIA (do inglês, *multi-antigen print immunoassay*) foi desenvolvido como um imunoenensaio, que emprega papel de nitrocelulose como substrato, para triagem de antígenos recombinantes a serem utilizados em testes imunocromatográficos rápidos (LYASHCHENKO *et al.*, 2000), como o teste rápido DPP-LVC[®] implementado pelo Ministério da Saúde do Brasil para inquéritos epidemiológicos da leishmaniose visceral canina. O presente estudo empregou o MAPIA para triagem dos antígenos recombinantes Lci1A, Lci2B, Lci3, Lci4, Lci5, Lci6, Lci7, Lci8, Lci10, Lci11, Lci12 e Lci13 para utilização em um teste rápido imunocromatográfico contendo múltiplos antígenos para aumentar a cobertura do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em nosso país.

Nossa hipótese é que o conjunto de antígenos recombinantes múltiplos de *L. infantum* selecionados por MAPIA nesse estudo, será reconhecido pela maioria dos soros de cães com leishmaniose visceral canina. Nosso objetivo principal foi identificar o conjunto de antígenos recombinantes de *L. infantum* com potencial para compor um teste multi-antígenos para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina.

1. Revisão de literatura

1.1. Epidemiologia

As leishmanioses são endêmicas em 98 países, sendo que seis deles detêm cerca de 90% dos casos de leishmaniose visceral. No Velho Mundo, a *Leishmania donovani* é responsável pela maioria dos casos de leishmaniose visceral em países como Sudão, Somália, Bangladesh e Índia, localidades onde a doença possui um caráter antroponótico. Já em países como Afeganistão, Irã, Paquistão e países da Ásia Central, a doença adquire um caráter zoonótico, cujo agente causal é a *L. infantum*. Nessas localidades do Velho Mundo, a doença tem uma distribuição rural, podendo ocorrer também em regiões periurbanas (BERN *et al.*, 2010; POSTIGO, 2010; WHO, 2010). No Novo Mundo, a *L. infantum* também é o principal agente etiológico da leishmaniose visceral, entretanto essa enfermidade não tem uma distribuição rural, mas sim, urbana e periurbana (HARHAY *et al.*, 2011). Dentre os países do Novo Mundo, o Brasil apresenta o registro da maior prevalência, com média anual de 3.500 casos confirmados pelo Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), na última década. A doença no país encontra-se amplamente disseminada, distribuída por 21 estados nas cinco regiões, sendo o nordeste a região com o maior número de casos. Entretanto, a incidência no país vem aumentando em outras regiões com concomitante redução percentual de casos no Nordeste, o que pode provocar uma falsa ideia de melhora dos índices nessa região, apesar da incidência bastante elevada observada, com cerca de 1.800 casos por ano registrados pelo SINAN. A leishmaniose visceral se encontra bastante disseminada no Brasil, com prevalências elevadas em grandes centros urbanos como Cuiabá (DE SANTIS *et al.*, 2011), São Luiz (FELIPE *et al.*, 2011), Brasília (CARRANZA-TAMAYO *et al.*, 2010), Rio de Janeiro (SILVA *et al.*, 2011) e Teresina (SOARES *et al.*, 2011).

1.2. Agente causal

As leishmanioses são causadas por diversos parasitos protozoários do gênero *Leishmania*, que possuem um ciclo heteróxico. As formas flageladas, motoras, são chamadas de promastigotas e vivem dentro do trato digestório de flebotomíneos, estas passam por diversos estágios de diferenciação, até atingir a forma infectiva, conhecida como promastigotas metacíclicas. Estas formas são as que são inoculadas pela fêmea do inseto vetor em um hospedeiro vertebrado, no momento do repasto sanguíneo. Na pele do hospedeiro mamífero, as promastigotas inoculadas são fagocitadas por células do sistema imunitário, neutrófilos e macrófagos, onde o parasito pode estabelecer a infecção. No interior dessas células hospedeiras, *Leishmania* pode se diferenciar em formas aflageladas, chamadas de amastigotas. Estas células parasitadas ao serem ingeridas pelas fêmeas do inseto vetor serão lisadas liberando as formas amastigotas no trato digestivo do flebotomíneo, completando o ciclo de vida do parasito *Leishmania* (KAYE;SCOTT, 2011).

1.3. Leishmaniose visceral

1.3.1. Humana

A leishmaniose visceral é uma doença infecto-parasitária potencialmente fatal e é causada por parasitos do complexo *Leishmania donovani* – *Leishmania infantum*. Anualmente, ocorrem cerca de 500 mil novos casos de leishmaniose visceral e aproximadamente 50 mil mortes no mundo relacionadas à leishmaniose visceral. A *L. donovani* é o agente etiológico no leste da África e no subcontinente indiano e a *L. infantum* na Europa, norte da África e na América Latina (DESJEUX, 2004). No homem é caracterizada pela hiperplasia de órgãos como baço, fígado e linfonodos, podendo também afetar a medula óssea. Alterações sanguíneas como trombocitopenia, além de distúrbios bioquímicos como hipoalbuminemia são frequentemente descritas. Além de febre e diarreia, a doença pode vir associada a outras doenças como pneumonia, disenteria e tuberculose. Em áreas endêmicas, a

doença acomete, frequentemente, indivíduos muito jovens, como crianças com idade inferior a cinco anos, e a doença tende a se apresentar de forma crônica (WHO, 2010; SRIVIDYA *et al.*, 2011)

1.3.2. Canina

L. infantum é a responsável pela ocorrência da forma visceral da doença e diversos mamíferos são descritos como hospedeiros do parasito: cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) (DA SILVA TENÓRIO *et al.*, 2011), sariguê (*Didelphis marsupialis*) (SCHALLIG *et al.*, 2007), rato (*Rattus norvegicus*) (PAPADOGIANNAKIS *et al.*, 2010) e lobo guará (*Chrysocyon brachyurus*) (LUPPI *et al.*, 2008). Normalmente, esses animais se restringem ao ciclo silvestre e, raramente, são descritos como potencial fonte de dispersão da doença para humanos.

Desde a descoberta da leishmaniose visceral canina na Tunísia por Nicolle & Comte (1908), diversos relatos evidenciaram que cão e homem compartilham de um mesmo agente etiológico, sendo o cão considerado o principal reservatório da leishmaniose visceral em centros urbanos (ADLER;THEODOR, 1932). Alguns estudos realizados em regiões endêmicas, onde a leishmaniose visceral possui um ciclo zoonótico, apontam para a existência de uma prevalência de aproximadamente 20% de cães positivos, como na China (SHANG *et al.*, 2011), Grécia (ATHANASIOU *et al.*, 2012) e México (PASTOR-SANTIAGO *et al.*, 2012).

Os sinais clínicos e o tempo de aparecimento da doença pode variar de acordo com a resposta imunológica individual do cão infectado. Há relatos de cães que adoeceram cerca de sete anos após o animal visitar uma área endêmica (SLAPPENDEL, 1988). A doença no cão é caracterizada por alterações nos fâneros, tais como, onicogribose, alopecia, úlceras e dermatites podendo também causar emagrecimento, caquexia, anorexia, conjuntivite, além de acometer órgãos internos, como baço, fígado e linfonodos, podendo levar o animal a óbito (ALVAR *et al.*, 2004). Alguns autores classificam os animais apenas como assintomáticos e sintomáticos, de acordo com a ausência ou presença de sinais, respectivamente (METTLER *et al.*, 2005; VERÇOSA *et al.*, 2008; GRIMALDI *et al.*, 2012). Outros autores incluem mais uma categoria na classificação dos cães, chamando de

oligossintomáticos os animais que possuem de um a três sinais (MANCIANTI *et al.*, 1988; MICHALSKY *et al.*, 2007; SOARES *et al.*, 2011).

Cães assintomáticos infectados por *Leishmania* tendem a não ser diagnosticados sorologicamente. Em um estudo realizado em Belo Horizonte – MG, área endêmica para leishmaniose visceral, 1.443 cães foram avaliados e 230 (15,3%) destes mostraram sorologia positiva para infecção por *Leishmania* sp, enquanto 1.213 (84,7%) animais mostraram sorologia negativa. Dentre os cães sorologicamente negativos, 296 (24,4%) mostraram-se positivos utilizando diagnóstico molecular. Nesse grupo, 289 (97,6%) animais eram assintomáticos (COURA-VITAL *et al.*, 2011).

Alguns estudos evidenciam a correlação entre presença de sinais clínicos no animal infectado e transmissibilidade do parasito para o vetor e a correlação com casos humanos. De acordo com essa ideia, Verçosa e colaboradores (2008) mostraram que cães assintomáticos possivelmente não transmitem o parasito para o vetor da doença. Entretanto, existem controvérsias em relação a esse dado, pois outros trabalhos demonstraram que o cão tem capacidade de transmitir *Leishmania* para o vetor independente de seu quadro clínico. No entanto, evidências apontam que o animal sintomático é mais propenso a dispersar a doença. Com base nesses dados, quanto maior a presença de sinais clínicos maior será a capacidade do animal transmitir o parasito para o vetor e por conseguinte a outro animal ou homem (Soares *et al.*, 2011; Michalsky *et al.*, 2007; Moshfe *et al.*, 2009; Banuls *et al.*, 2001). Com base nos dados que mostram que o cão pode transmitir a doença independente da forma clínica, alguns países como o Brasil, implementaram a eutanásia de cães com sorologia positiva para *Leishmania*, como uma das medidas de saúde pública para o controle da doença humana.

A avaliação clínica de cães mostra que o diagnóstico de animais sintomáticos é difícil, pois alguns sinais clínicos são comuns a outras doenças caninas, como babesiose, erliquiose e tripanossomíase canina, tornando difícil um diagnóstico clínico preciso da doença (ALVAR *et al.*, 2004; GREENE, 2006).

1.4. Diagnóstico

Existem diversos métodos de diagnóstico laboratorial para leishmaniose: métodos de visualização direta do parasito por microscopia, exames sorológicos indiretos, diagnóstico molecular e ensaio de imunidade celular, sendo este último não muito aplicado à rotina de diagnóstico (MAIA; CAMPINO, 2008; SRIVASTAVA *et al.*, 2011).

1.4.1. Diagnóstico Parasitológico

A visualização direta dos parasitos pode ser feita em esfregaços de aspirado do tecido esplênico, linfonodo e medula óssea corados pela técnica de hematoxilina/eosina. Formas amastigotas de *Leishmania* são visualizadas nesses esfregaços utilizando microscopia óptica. A cultura de tecidos como o esplênico, de linfonodo ou medula óssea permite a identificação de formas promastigotas. A cultura é feita, preferencialmente, em meio de cultura bifásico, tendo como fase sólida o meio Novy-MacNeal-Nicolle (NNN), o meio modificado de Tobie ou o meio *United States Army Medical Research Units* (USAMRU) e como fase líquida, mais comumente, o meio *Schneider* (WHO, 2010). Esses testes diagnósticos por identificação direta do parasito apresentam alta especificidade, porém baixa sensibilidade (Barrouin-Melo *et al.* 2004; Fraga *et al.*, 2010; da Silva *et al.*, 2010; Sundar *et al.* 2002; Dos-Santos *et al.*, 2008) e são considerados padrão ouro no diagnóstico da leishmaniose. No entanto, os testes parasitológicos são dispendiosos para serem empregados em inquéritos sorológicos, pois necessitam de utilização de mão de obra especializada e insumos caros, além da baixa sensibilidade.

1.4.2. Diagnóstico Sorológico

O ELISA e a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) são testes amplamente utilizados em rotina diagnóstica para doenças infecto-contagiosas. Esses testes têm a vantagem de serem altamente sensíveis, ou seja, são capazes

de identificar um elevado número de indivíduos soro positivos com boa fidedignidade. Ambos os testes permitem a detecção de anticorpos específicos em amostras de soro.

No ensaio de ELISA, os anticorpos são revelados por anticorpos anti-imunoglobulinas marcados com uma enzima, como por exemplo a peroxidase, que catalisa a oxidação de um cromógeno incolor que adquire cor na presença do substrato H_2O_2 . A conversão do substrato é quantificada em um leitor de placas, por medida de densidade óptica. A absorbância da cor é medida utilizando um espectrofotômetro, utilizando um comprimento de onda específico. A maior parte dos ELISAs para diagnóstico da leishmaniose utiliza como antígeno o lisado bruto de *Leishmania* spp. Atualmente, novos ensaios de ELISA foram estabelecidos utilizando como antígenos proteínas recombinantes, como a rK39. Este teste apresenta sensibilidade que varia entre 68% e 100% e especificidade de 71% e 100% (Kumar *et al.*, 2001; Carvalho *et al.*, 2003; Moreira *et al.*, 2006; Porozzi *et al.*, 2007; Pedras *et al.*, 2008; Romero *et al.*, 2009).

A identificação de anticorpos utilizando RIFI é feita pela incubação do soro testes com antígenos fixados em uma lâmina de vidro. A reação é revelada por anticorpo anti-imunoglobulinas marcado com fluorocromos e a fluorescência emitida é captada em um microscópio de fluorescência. O RIFI para diagnóstico da leishmaniose visceral é um teste que apresenta sensibilidade que varia de 21,7% a 100% e especificidade de 78% a 92% (Ciaramella *et al.* 1997; Silva *et al.* 2001; Alves and Bevilacqua, 2004; Ferroglio *et al.*, 2006; Moreira *et al.*, 2007). O RIFI é um método diagnóstico de baixa sensibilidade e alta especificidade. Este método foi por muitos anos utilizado no protocolo do Ministério da Saúde brasileiro como teste diagnóstico confirmatório da leishmaniose visceral canina.

Recentemente, testes imunodiagnósticos rápidos vêm sendo empregados como rotina laboratorial para detecção de doenças como a leishmaniose. Os antígenos recombinantes do parasito são impregnados em membranas de nitrocelulose e as amostras de soro são aplicadas no teste. As imunoglobulinas específicas presentes em soro de indivíduos infectados reagem com os antígenos presentes na membrana e a reação é revelada pela interação de proteína A, acoplada a partículas de ouro coloidal, com a porção Fc das imunoglobulinas. Esses

testes são de fácil manuseio e podem dispensar o uso de equipamentos para a leitura de seus resultados. Além disso, são de fácil armazenamento, sem necessidade de manutenção em baixas temperaturas. Estes testes, já são amplamente usados para detecção de infecção pelo HIV (VUYLSTEKE *et al.*, 2012), H1N1 (WU *et al.*, 2010) e, mais recentemente, estão sendo utilizados para diagnóstico de leishmaniose visceral humana e leishmaniose visceral canina (BADARO *et al.*, 1996; CARVALHO *et al.*, 2003; OTRANTO *et al.*, 2004; OTRANTO *et al.*, 2005).

A proteína recombinante rK39 contém sequências repetitivas de 39 aminoácidos de uma proteína relacionada a cinesina de cinetoplasto de *Leishmania* (BURNS *et al.*, 1993). Ela vem sendo empregada em diversos testes imunocromatográficos comercialmente disponíveis para o diagnóstico de leishmaniose visceral humana (BADARO *et al.*, 1996; SCHALLIG *et al.*, 2002; CARVALHO *et al.*, 2003) e canina (OTRANTO *et al.*, 2005; DE LIMA *et al.*, 2010; GRIMALDI *et al.*, 2012). Esses testes imunocromatográficos contendo rK39 para diagnóstico da leishmaniose visceral humana (CHAPPUIS *et al.*, 2006) e canina (LEMOS *et al.*, 2008; DE LIMA *et al.*, 2010) apresentam resultados de sensibilidade que variam de 83% a 97% e especificidade de 91% a 100%.

O teste rápido imunocromatográfico DPP® é um kit pronto para uso desenvolvido pela Chembio Diagnostic System, Inc para diagnóstico da leishmaniose visceral canina. Esse teste é recomendado atualmente pelo protocolo do Ministério da Saúde do Brasil como teste de triagem para leishmaniose visceral canina. Esse teste é produzido por Bio-Manguinhos/Fiocruz e sua utilização está sendo implementado na rede pública de saúde. Esta plataforma é composta por um cassete de plástico, contendo duas membranas de nitrocelulose conectadas entre si em forma de um “T”. Uma dessas tiras é destinada à amostra sanguínea e a outra ao tampão que carreará micropartículas de ouro coloidal acoplada à proteína A para revelar a reação. O DPP® para leishmaniose visceral canina é utilizado para detectar anticorpos presentes em soros de cães infectados. Os anticorpos reagem com o antígeno recombinante quimérico rK28 (K39/K26/K9) impregnado na membrana de nitrocelulose.

Grimaldi e colaboradores (2012) demonstraram que o teste imunocromatográfico rápido DPP® baseado no antígeno recombinante rK28 possui uma sensibilidade (98%) para detecção de cães infectados com sinais clínicos da doença. No entanto, para detecção de cães sem sinais clínicos da doença o teste apresentou baixa sensibilidade (47%). Em relação aos cães avaliados com outras patologias o teste apresentou especificidade de 98%. Sendo assim, o DPP® para leishmaniose visceral canina deixa de detectar uma parcela significativa de animais assintomáticos. Portanto, se faz necessário a implementação de testes sorodiagnósticos mais efetivos para que ocorra uma detecção mais ampla de animais com infecção por *L. infantum* nos serviços de saúde pública, contribuindo para maior eficiência do controle da leishmaniose visceral canina.

1.4.3. Diagnóstico Molecular

Nos últimos anos, graças ao avanço das técnicas de biologia molecular, a reação em cadeia da polimerase (PCR) passou a ser empregada no diagnóstico da leishmaniose visceral. Essa técnica consiste na amplificação em cadeia (exponencial) de uma determinada sequência gênica. No diagnóstico da leishmaniose visceral canina a sensibilidade da técnica é dependente do tecido utilizado. Solano-Gallego e colaboradores (2001) evidenciaram que a pele seria o tecido de maior sensibilidade, entretanto Lombardo e colaboradores (2012) demonstraram que o linfonodo seria o melhor tecido para o diagnóstico. Sangue, conjuntiva, medula óssea e baço são algumas outras amostras empregadas no diagnóstico molecular da infecção por *Leishmania* (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2001; SOLCA *et al.*, 2012). A especificidade da PCR varia de acordo com o método de amplificação empregado e o alvo utilizado, sendo este geralmente um fragmento do DNA circular do cinetoplasto (LACHAUD *et al.*, 2002; SOLCA *et al.*, 2012). Estudos mostraram que a PCR para *Leishmania* apresenta alta sensibilidade, em geral acima de 90%, e alta especificidade podendo chegar a 100% (Lachaud *et al.*, 2002; Gomes *et al.* 2007; Moreira *et al.*, 2007; Ferreira *et al.* 2008). Porém por ser uma técnica de alto custo e complexidade, sua utilização na rotina laboratorial é limitada.

1.5. Proteínas recombinantes

A tecnologia do DNA recombinante foi de fundamental importância no desenvolvimento e avanço da biotecnologia, pois possibilitou a produção de proteínas em larga escala de maneira mais fácil, pura e homogênea. Assim, proteínas recombinantes passaram a ser melhor estudadas e utilizadas em diversos segmentos, dentre eles na composição de testes diagnósticos mais acurados (PORROZZI *et al.*, 2007; COSTA *et al.*, 2012).

Doze antígenos recombinantes foram selecionados por Teixeira e colaboradores (2007) e tiveram o seu cDNA sequenciado. Um pedido de patente no INPI foi feito sobre o número PCT/BR2010/000083 (Internacional) e PI0900961-2 (Nacional) para o uso desses antígenos em métodos de diagnóstico, vacina e terapia para leishmaniose. Cinco destas proteínas foram previamente testadas por ELISA frente a soros de cães e de humanos infectados por *Leishmania*, apresentando resultados promissores no diagnóstico da leishmaniose, evidenciando assim a sua possibilidade na utilização de um futuro teste diagnóstico (Oliveira *et al.*, 2011). De Souza e colaboradores (2012) avaliaram duas dessas proteínas, denominadas Lci1A e Lci2B, que apresentaram excelentes resultados no ensaio demonstrando elevados valores de sensibilidade e especificidade. Essas proteínas não apresentaram reações cruzadas com soros de cães infectados por *Trypanosoma caninum*, *Babesia canis* e *Ehrlichia canis*. Esses dados indicam a potencialidade das proteínas recombinantes quanto ao seu uso em testes imunodiagnósticos, sugerindo a possibilidade de sua utilização na composição de um teste sorológico complementar ou mesmo alternativo ao DPP® para leishmaniose visceral canina.

1.6. MAPIA

O MAPIA é um imunoensaio que consiste em impregnar uma membrana de nitrocelulose com múltiplos antígenos em paralelo, posteriormente estas membranas são cortadas perpendicularmente aos antígenos impregnados na membrana (Figura 1). A banda contendo a proteína recombinante apresentará coloração quando houver reação de ligação do complexo antígeno/anticorpo após incubação em

presença de cromógeno. Esta metodologia vem sendo empregada no desenvolvimento de testes imunocromatográficos para doenças infecciosas devido ao seu custo-benefício, como evidenciado por Lyashchenko e colaboradores (2000) ao descreverem a técnica. Em uma membrana de nitrocelulose de 15 x 15 cm utilizada no MAPIA podem ser avaliadas mais de 50 bandas impregnadas com antígenos, que podem ser testadas com mais de 50 amostras de soros. Além disso no MAPIA é utilizado um volume cerca de dez vezes menor de soro, 40 vezes menos antígenos e até dez vezes menos conjugado e substrato, quando comparado ao ELISA. Aliado ao fato que a utilização da membrana de nitrocelulose, configura uma plataforma mais próxima a presente no produto final, um teste imunocromatográfico rápido. O MAPIA vem sendo utilizado, principalmente, na triagem e seleção de antígenos para detecção de tuberculose causada por *Mycobacterium* spp em diversos animais como primatas não humanos (LYASHCHENKO, GREENWALD, ESFANDIARI, GREENWALD, *et al.*, 2007), felinos (RHODES *et al.*, 2011), bisões (HIMSWORTH *et al.*, 2010) e elefantes (DUNCAN *et al.*, 2009).

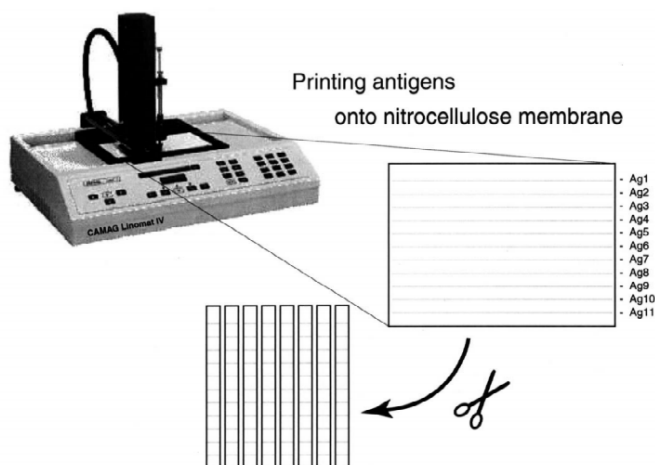


Figura 1 - Esquema da produção das tiras de nitrocelulose com antígenos recombinantes impregnados. Os antígenos recombinantes são impregnados paralelamente em membranas de nitrocelulose. As membranas posteriormente são cortadas em tiras perpendiculares a impregnação na membrana (Lyashenko *et al.*, 2000).

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

- Identificar o conjunto dos antígenos recombinantes de *L. infantum* quanto ao reconhecimento por soros de cães infectados para compor o teste imunocromatográfico rápido para leishmaniose visceral canina

2.2. Objetivos Específicos

- Realizar triagem dos 12 antígenos recombinantes de *Leishmania* utilizando MAPIA
- Avaliar a reatividade cruzada dos antígenos recombinantes selecionados por MAPIA com soros de cães com outras patologias caninas

3. Metodologia

3.1. Antígenos recombinantes

Doze antígenos recombinantes de *Leishmania infantum* (Lci1A, Lci2B, Lci3, Lci4, Lci5, Lci6, Lci7, Lci8, Lci10, Lci11, Lci12 e Lci13) foram utilizados neste estudo. Esses antígenos foram produzidos em nosso laboratório a partir de bibliotecas de cDNA de amastigotas e biblioteca genômica de promastigotas de *Leishmania infantum*. Esses antígenos foram inicialmente avaliados por ELISA quanto a capacidade de serem reconhecidos por soros de cães infectados, tendo apresentado resultados promissores.

3.1.1. Produção proteica

Bactérias *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS (Invitrogen, Carlsbad, California, EUA) foram transformadas com a técnica do choque térmico, utilizando-se de plasmídeos pRSET (Invitrogen) contendo sequência gênica de interesse dos antígenos recombinantes de *L. infantum*. As bactérias transformadas foram plaqueadas em meio sólido ágar Luria-Bertani (LB) contendo os antibióticos ampicilina e cloranfenicol em estufa bacteriológica a 37°C por 16 horas para o crescimento das colônias bacterianas, que internalizaram os plasmídeos. Estas colônias foram utilizadas na expansão do cultivo das bactérias transformadas. No processo de expansão das culturas bacterianas, cada colônia foi colocada em um erlenmeyer de 250 ml, contendo 50 ml de meio de cultura líquido LB que foi incubado sob agitação constante à 37°C por 14 a 16 horas (*overnight*). No dia seguinte, cada erlenmeyer teve sua densidade de observância (D.O.) checada no espectrofotômetro, e os cultivos foram transferidos para um erlenmeyer com capacidade de 2 L, contendo 500 mL de meio LB com as bactérias com D.O. inicial de 0,1. Esses cultivos foram acompanhados até que a D.O. atingisse valores entre 0,4 e 0,8. Ao alcançar a D.O. esperada, os cultivos bacterianos foram submetidos a indução de produção proteica por adição de isopropil- β -D tiogalactopiranosídeo à 0,1 mM (IPTG, Invitrogen). Após o processo de produção, as bactérias foram

centrifugadas para a retirada do meio LB e o sedimento bacteriano foi congelado imediatamente a -20°C . Amostras de cultivos bacterianos foram colhidas no início e no fim da produção. Essas amostras foram submetidas à centrifugação para descarte do meio, ressuspendidas em tampão Laemmli (LAEMMLI, 1970) e aquecidas a 95°C em banho maria por 5 minutos, para promover a lise da bactéria, desnaturação e redução das proteínas. Posteriormente, foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 10%-15% (SDS-PAGE) e coradas com azul de Coomassie para confirmação da expressão proteica.

3.1.2. Purificação proteica

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

3.2.Soros

Foram utilizados soros provenientes da soroteca canina estabelecida no Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz/Fiocruz-BA, Laboratório de Patologia e Biointervenção. Estes soros foram obtidos em coletas de sangue realizadas em regiões endêmicas para leishmaniose visceral canina, como Jequié, Dias d'Ávila e Camaçari na Bahia. Todos animais passaram por uma criteriosa avaliação clínica em buscas de sinais da doença como: linfadenopatia, onicogrifose, ceratoconjutivite, alopecia, emagrecimento, dentre outros. Cada um destes sinais foram avaliados quanto a sua intensidade (leve, moderada ou intensa). Em seguida os animais foram classificados em três grupos: i) Assintomáticos, ausência total de sinais clínicos. ii) Oligossintomáticos, presença de um à três sinais, independente da sua intensidade. iii) Polissintomáticos, presença de quatro ou mais sinais. O sangue foi coletado a partir de venopunção e foram acondicionados em tubos com acelerador de coagulação e tubos com EDTA. Os tubos com acelerador de coagulação foram utilizados na obtenção de soro, que posteriormente foi utilizado na realização do ELISA para *Leishmania*. A partir do sangue coletado nos tubos com EDTA foi realizada a extração de DNA utilizando o kit DNeasy (Qiagen), seguindo as recomendações do fabricante. Posteriormente o DNA proveniente das amostras sanguíneas foi utilizado na realização do diagnóstico, por PCR, de hemoparasitoses (erliquiose e babesiose). Além disso, foi feita a coleta de aspirado esplênico para a realização de extração de DNA e cultura parasitológica. A realização da extração de DNA foi feita com o kit DNeasy (Qiagen). O DNA extraído da amostra esplênica foi utilizado na realização da PCR para detecção do DNA de *Leishmania*. A cultura do aspirado esplênico foi feita com a lavagem das seringas contendo o material com meio Schneider's suplementado com soro bovino fetal (SBF) e a transferência deste para garrafas de cultura contendo meio bifásico NNN-Schneider's.

A soroteca também possui soros controle de animais negativos de áreas endêmicas e não endêmicas, não infectados por *Leishmania* ou com outras patologias testadas nos critérios de inclusão para a soroteca (*Babesia* e *Ehrlichia*). Além de contar com soros de animais com leishmaniose tegumentar ou doença de Chagas, doados por Alexandre Barbosa Reis da Universidade Federal de Ouro

Preto. Todos os soros inclusos na soroteca são devidamente identificados e armazenados em freezer -80°C.

A partir desta soroteca, foram selecionados 120 soros de cães com diferentes características; 39 soros de animais parasitologicamente confirmados para leishmaniose visceral canina com diferentes manifestações clínicas (2 soros de animais assintomáticos, 15 soros de cães oligossintomáticos e 22 soros de cães polissintomáticos), 10 soros de animais com leishmaniose tegumentar, 10 soros de animais com doença de Chagas, 10 com babesiose, 11 com erliquiose, e 40 soros de animais negativos, provenientes de áreas endêmicas e não endêmicas para LVC.

3.3. Ensaio imunológico com multi-antígenos impressos (MAPIA)

Folhas de membranas de nitrocelulose HiFlow Plus HFB24004 (Millipore, Massachusetts, EUA) foram impregnadas com os antígenos utilizando um aparelho semi-automático de microaerolisação (Automatic TLC sample 4, CAMAG, Muttenz, Suíça) que gerou bandas paralelas a partir de soluções de antígenos recombinantes nas seguintes concentrações: Lci1A = 0,236 mg/mL, Lci2B = 0,222 mg/mL, Lci3 = 0,530 mg/mL, Lci6 = 0,347 mg/mL, Lci7 = 0,097 mg/mL, Lci8 = 0,125 mg/mL, Lci10 = 0,139 mg/mL, Lci12 = 0,236 mg/mL, Lci4 = 0,055 mg/mL, Lci5 = 0,139 mg/mL, Lci11 = 0,055 mg/mL, Lci13 = 0,180 mg/mL. Foram também impregnados lisado total de *L. infantum* (7,620 mg/mL), a proteína recombinante CRA&FRA (0,290 mg/mL) para possível detecção de anticorpos anti *Trypanosoma cruzi*, além da proteína A (0,200 mg/mL) como controle interno da reação. Em seguida, as folhas foram cortadas em tiras no sentido perpendicular em relação às linhas impregnadas (Figura 1).

3.4. Padronização do MAPIA

O protocolo padrão de realização do MAPIA, obtido pela colaboração com o LATED – Bio-Manguinhos/Fiocruz, consistiu em incubar, individualmente, as tiras do MAPIA em 2 ml de Tampão de Ensaio imunoenzimático para leishmaniose visceral canina (formulação mantida sobre sigilo) suplementado com 5% de lecitina de leite, adicionado do soro do cão teste na diluição de 1:100 (Figura 2). A reação foi

realizada em uma canaleta com agitação a 37°C por 30 minutos. Após esse período de incubação, as membranas foram submetidas ao processo de lavagem com tampão fosfato-salina com 10% de Tween-20 (PBS-T), por 5 minutos a 37°C por três vezes. Em seguida, as fitas foram novamente incubadas a 37°C por 30 minutos em Tampão de Ensaio imunoenzimático contendo IgG anti-cão conjugado à peroxidase (anticorpo secundário) na diluição de 1:6.000. Posteriormente, o processo de lavagem por duas vezes com PBS-T foi repetido e mais uma vez com PBS para, a seguir, serem incubadas em solução reveladora contendo 4 mg/ml de 2,4-ácido diaminobutírico (DAB, Sigma-Aldrich) e 0,004% de H₂O₂. Por fim, a reação foi interrompida com a lavagem da membrana com água destilada.

Com o objetivo de definir se o protocolo original do MAPIA era ideal para identificar e analisar as bandas obtidas após a imunorreação, foram realizados diferentes testes. A resolução e intensidade das bandas, assim como a reprodutibilidade dos resultados do teste foram avaliados comparando o protocolo padrão em relação a três diferentes protocolos.

Quadro 1 - Quadro comparativo dos protocolos testados na padronização do MAPIA. Original - protocolo de operação padrão estabelecido por Bio-Manguinhos, obtido através de colaboração com o Laboratório de Tecnologia diagnóstica (LATED). Protocolos A, B e C - modificações realizadas nas etapas e condições de execução do MAPIA em relação ao protocolo original.

Etapas	Condições	Protocolos			
		Original	A	B	C
Bloqueio Prévio	Temperatura ambiente por 1h				X
	37°C por 30 minutos		X		
Soro	Temperatura ambiente por 1h			X	X
	37°C por 30 minutos	X	X		
Anticorpo secundário	Temperatura ambiente por 1h			X	X
	37°C por 30 minutos	X	X		
Lavagem	Temperatura ambiente por 5 minutos			X	X
	37°C por 5 minutos	X	X		
Revelação	Temperatura ambiente por 5 minutos			X	X
	37°C por 5 minutos	X	X		

Após a definição do protocolo de incubações e lavagens foi avaliada qual era a melhor concentração dos soros a serem utilizados no ensaio. Assim foram testados: i) soro do cão teste nas diluições - 1:100, 1:200, 1:300 ou 1:400; ii) anticorpo secundário nas diluições - 1:6.000, 1:7.500, 1:9.000 ou 1:10.500. As leituras das membranas foram feitas por dois observadores de maneira independente, em caráter qualitativo, que identificaram a presença de bandas (positivos) ou a ausência delas (negativos) (Figura 2).

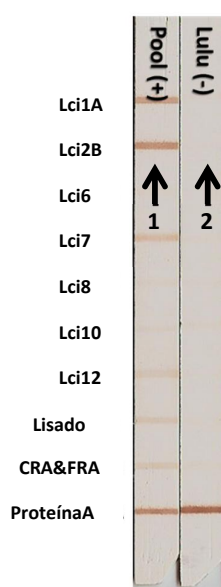


Figura 2 - Imagem do resultado do MAPIA, ilustrando as tiras impregnadas com antígenos após a incubação com soros, evidenciando a presença e ausência de bandas. A seta 1 indica a presença de reatividade (presença de banda) e a seta 2 indica ausência de reatividade (ausência de banda).

3.5. Análises dos resultados

Foi realizado o cálculo do índice Kappa para avaliação da concordância entre as leituras visuais (qualitativas) dos resultados do MAPIA realizadas por dois observadores independentemente. Estas análises foram feitas cegamente, sem que nenhum dos dois observadores soubessem quais grupos de amostras pertenciam a tira do MAPIA que estava sendo lida. Além disso, um observador não conhecia o resultado atribuído pelo outro. Também foi realizada análise combinatória dos resultados, para avaliação da performance conjunta dos antígenos avaliados, com o intuito de estabelecer um conjunto de antígenos recombinantes capaz de aumentar a sensibilidade de um futuro teste imunocromatográfico diagnóstico, na plataforma DPP® multi-antígenos. Essa análise consistiu em associar os resultados da proteína com melhor desempenho individual de sensibilidade/especificidade com suas subseqüentes, uma a uma em ordem decrescente de acurácia, para avaliar se os antígenos associados levavam a um aumento da acurácia. Para avaliar possíveis diferenças estatísticas em relação à sensibilidade das proteínas, foi realizado o teste exato de Fisher.

4. Resultados

4.1. Produção e purificação das proteínas recombinantes

Todas 12 proteínas recombinantes avaliadas no estudo foram produzidas e purificadas. A figura 3 mostra um gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) do antígeno recombinante Lci2B durante a produção proteica e no final do processo ao se obter o antígeno purificado.

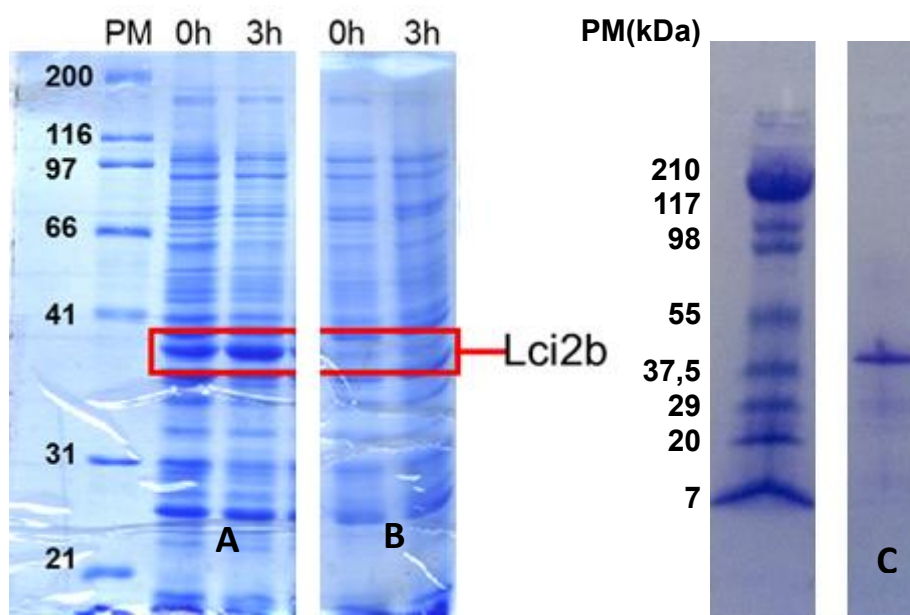


Figura 3 A – Gel SDS-PAGE 10% da expressão proteica da *E. coli* BL21(DE3)pLysS com inserto de Lci2B. 3 B – Gel SDS-PAGE 10% da expressão proteica da *E. coli* BL21(DE3)pLysS sem o inserto de Lci2B. 3 C – Gel SDS-PAGE 10% da purificação do antígeno Lci2B, após separação cromatográfica.

4.2. Padronização do MAPIA

Para avaliar se as condições de realização do ensaio de MAPIA padronizado por Bio-Manguinhos eram as ideais, diferentes condições de temperatura, tempo de incubação, etapa prévia de bloqueio, diluição do soro e do conjugado (Quadro 1) foram testadas. Na avaliação das quatro condições relacionadas à temperatura e tempo de incubação, presença ou ausência de uma etapa de bloqueio, utilizando soros controle, não foram observadas diferenças na identificação e na intensidade das bandas referentes às 12 proteínas recombinantes (dado não mostrado).

Também não foram observadas diferenças da identificação e intensidade das bandas correspondentes às 12 proteínas, quando foi avaliada a diluição do soro teste (canaleta A = 1:100, B = 1:200, C = 1:300 ou D = 1:400) (Figura 4) e do conjugado (1:6.000, 1:7.500, 1:9.000 ou 1:10.500) (Figura 5). Desta forma, o protocolo padrão estabelecido por Bio-Manguinhos foi mantido, com a utilização do soro teste na diluição 1:100 e do conjugado na diluição de 1:6.000.

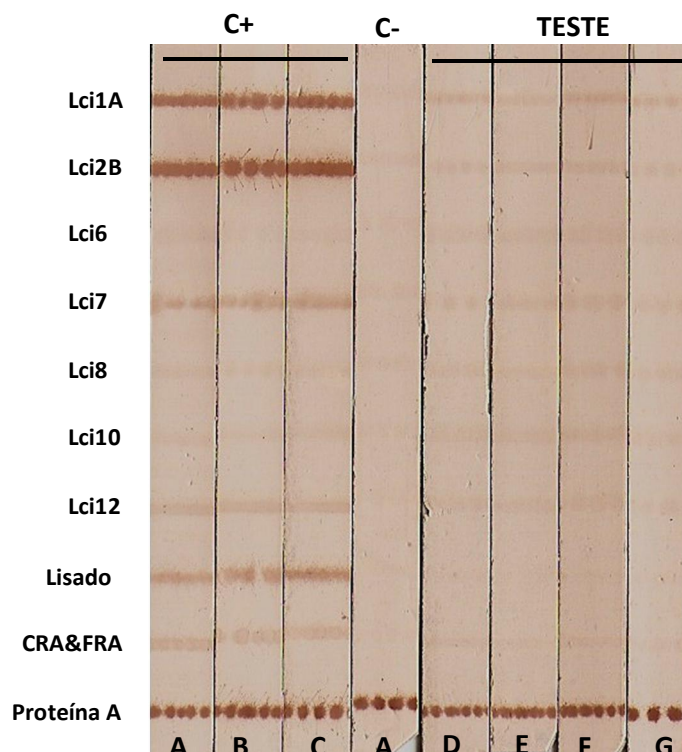


Figura 3 - Padronização do MAPIA em relação a diluição dos soros controle positivo (C+) na diluição 1:100 (tira A), na diluição 1:300 (tira B) e na diluição 1:400 (tira C). Controle negativo (C-) na diluição 1:100 e soros teste utilizados nas diluições de 1:100 (tira D), 1:200 (tira E), 1:300 (tira F) e 1:400 (tira G).

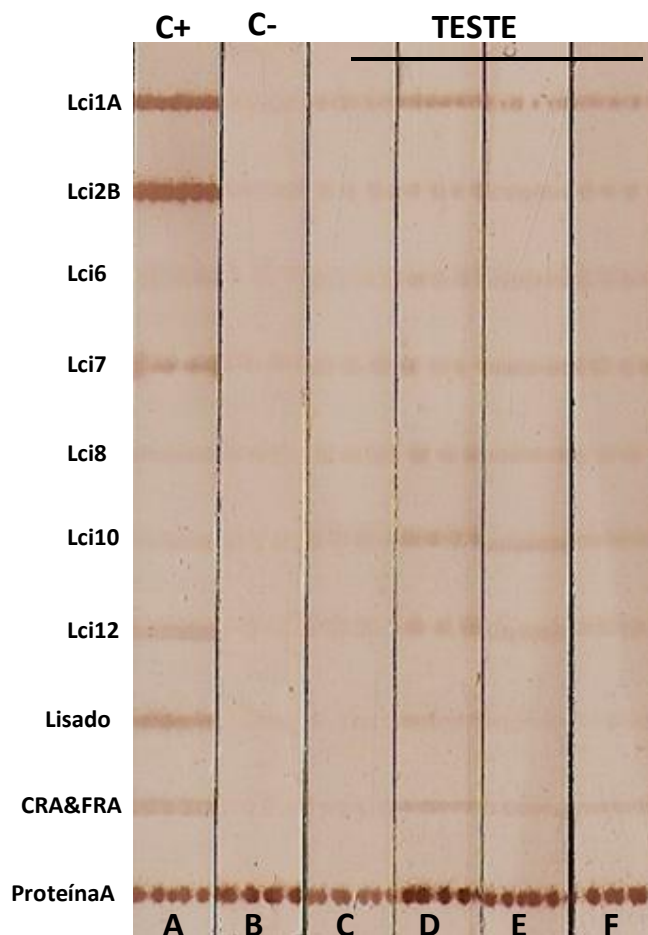


Figura 4 - Padronização do MAPIA em relação à diluição do conjugado. Soro controle positivo (C+) e diluição do conjugado de 1:6.000 (tira A), soro controle negativo (C-) e conjugado na diluição de 1:6.000 (tira B), soros teste e conjugados nas diluições de 1:6.000 (tira C), 1:7.500 (tira D), 1:9.000 (tira E) e 1:10.500 (tira F).

4.3. Análise do MAPIA

Em seguida, foi realizada a triagem dos antígenos recombinantes de *L. infantum* reconhecidos por soros de cães com leishmaniose visceral canina utilizando o MAPIA. A proporção de 87% dos soros de cães com leishmaniose visceral canina reconheceu pelo menos uma das proteínas recombinantes de *L. infantum* avaliadas no presente estudo. Lci2B e Lci1A foram os antígenos recombinantes mais reconhecidos pelos soros de cães com leishmaniose visceral canina, 74% e 69% respectivamente (Tabela 1). No entanto, não houve diferença significativa entre o reconhecimento dessas proteínas ($p = 0,80$) (Tabela 5). A proporção de soros que reconheceu os demais antígenos foi inferior a 50%: 33%

reconheceram Lci4 e Lci12, 31% Lci5, 23% Lci3, 21% Lci7 e Lci11, 8% Lci8, Lci10 e Lci13 e apenas 3% Lci6.

A avaliação da reatividade das proteínas recombinantes frente aos soros de cães negativos evidenciou que a Lci12 foi identificada por 4 dos 40 soros negativos, seguida pela Lci7 e Lci13 que, individualmente, foram reconhecidas por 3 dos 40 soros testados. Cada uma das proteínas Lci3, Lci4, Lci5, Lci10 e Lci11 foram reconhecidas por 2 dos 40 soros, enquanto que Lci2B, Lci6 e Lci8 foram reconhecidas por apenas 1 dos 40 soros negativos para a leishmaniose visceral canina. A única proteína recombinante que não foi reconhecida por nenhum dos soros negativos foi a Lci1A. Quando consideradas as 12 proteínas juntas o reconhecimento dos antígenos pelos soros negativos foi de 6 dos 40 (Tabela 2).

Quando a especificidade das proteínas foi avaliada frente aos soros de cães com diagnóstico positivo para outras doenças como babesiose (n = 10), erliquiose (n = 11), leishmaniose tegumentar (n = 10) e tripanossomíase canina (n = 10), Lci6 e Lci8 não foram reconhecidas por nenhum dos soros analisados, Lci10 foi reconhecida por apenas 1 dos 41 soros, Lci13 foi reconhecida por 3 dos 41 soros, Lci3 e Lci7 foram reconhecidas por 4 dos 41 soros cada uma, seguida pela Lci11 que foi reconhecida por 5 dos 41 soros. Lci2B e Lci12 foram reconhecidas, individualmente, por 6 dos 41 soros e Lci4 e Lci5 foram reconhecidas por 7 dos 41 soros avaliados. Lci1A foi a proteína recombinante com maior reconhecimento por este grupo de soros, sendo reconhecida por 8 dos 41 soros analisados. Quando foi realizada análise combinatória dos antígenos recombinantes, eles foram reconhecidos por 15 dos 41 soros utilizados no ensaio (Tabela 2).

Tabela 1 – Reatividade dos soros de cães com diferentes quadros clínicos de leishmaniose visceral aos antígenos recombinantes avaliados por MAPIA

Quadro Clínico	Lci1A	Lci2B	Lci3	Lci4	Lci5	Lci6	Lci7	Lci8	Lci10	Lci11	Lci12	Lci13	12 Lcis
Assintomático (n=2)	1	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Oligossintomático (n=15)	10	11	4	5	5	1	3	2	2	4	5	2	14
Polissintomático (n=22)	16	17	4	7	7	-	5	1	1	4	8	1	20
Total (n=39)	27 (69%)	29 (74%)	9 (23%)	13 (33%)	12 (31%)	1 (3%)	8 (21%)	3 (8%)	3 (8%)	8 (21%)	13 (33%)	3 (8%)	34 (87%)

Tabela 2 - Reatividade dos soros de cães com outras infecções e cães não infectados por *L. infantum* aos antígenos recombinantes avaliados por MAPIA

	Lci1A	Lci2B	Lci3	Lci4	Lci5	Lci6	Lci7	Lci8	Lci10	Lci11	Lci12	Lci13	12 Lcis
Negativo (n=40)	-	1	2	2	2	1	3	1	2	2	4	3	6
Babesia (n=10)	1	2	3	3	3	-	1	-	1	3	2	2	4
Erlíquia (n=11)	-	-	-	1	1	-	1	-	-	1	1	1	2
Tegumentar (n=10)	6	3	-	2	2	-	1	-	-	-	-	-	6
Tripanossoma (10)	1	1	1	1	1	-	1	-	-	1	3	-	3
Total (n=81)	8 (90%)	7 (91%)	7 (91%)	11 (86%)	9 (89%)	1 (99%)	7 (91%)	1 (99%)	3 (96%)	7 (91%)	10 (88%)	6 (93%)	21 (74%)

Foi realizada análise combinatória entre a proteína recombinante melhor reconhecida pelos soros e as demais proteínas recombinantes em ordem decrescente de acurácia, com o objetivo de identificar o conjunto de antígenos recombinantes capaz de ser detectado pela maioria dos soros de cães com leishmaniose visceral canina utilizados no ensaio. A análise combinada das proteínas mostrou que as proteínas Lci1A e a Lci2B foram as que apresentaram melhor desempenho, com sensibilidade de 77% e especificidade de 88%. Quando acrescentada a Lci8 a essas duas proteínas, foi observado aumento da sensibilidade, passando para 79%. Ao analisarmos uma combinação de cinco proteínas, as três supracitadas somadas às proteínas Lci12 e Lci4 ou Lci5 a sensibilidade aumentou para 87% ($p= 0,54$) (Tabela 3).

Para avaliar a concordância entre as leituras realizadas pelos leitores, foi utilizado o índice Kappa. As proteínas recombinantes Lci1A e Lci2B, foram os antígenos que obtiveram melhor concordância entre os leitores, apresentando valores de 0,9797 e 0,9206, respectivamente. Em seguida, os antígenos recombinantes que apresentaram maior índice de concordância foram: Lci8, Lci10, Lci7, Lci11, Lci13 e Lci6, em ordem decrescente. As proteínas Lci5 e Lci4, foram os antígenos recombinantes que obtiveram menor índice de concordância entre os leitores (Tabela 4).

Tabela 3 - Análise combinatória realizada entre a sensibilidade e especificidade das proteínas recombinantes avaliadas no MAPIA.

Combinações (n=120)	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)
12 proteínas juntas	34/39 (87)	60/81 (74)
Lci1A	27/39 (69)	73/81 (90)
Lci2B	29/39 (74)	75/81 (93)
Lci1A e Lci2B	30/39 (77)	71/81 (88)
Lci1A, Lci2B e Lci8	31/39 (79)	70/81 (86)
Lci1A, Lci2B e Lci12	32/39 (82)	67/81 (83)
Lci1A, Lci2B, Lci8 e Lci3	32/39 (82)	68/81 (84)
Lci1A, Lci2B, Lci8 e Lci10	32/39 (82)	69/81 (85)
Lci1A, Lci2B, Lci8 e Lci11	32/39 (82)	67/81 (83)
Lci1A, Lci2B, Lci8 e Lci12	33/39 (85)	67/81 (83)
Lci1A, Lci2B, Lci8, Lci3 e Lci12	33/39 (85)	62/81 (77)
Lci1A, Lci2B, Lci8, Lci11 e Lci12	33/39 (85)	62/81 (77)
Lci1A, Lci2B, Lci8, Lci12 e Lci4	34/39 (87)	62/81 (77)
Lci1A, Lci2B, Lci8, Lci12 e Lci5	34/39 (87)	62/81 (77)
Lci1A, Lci2B, Lci8, Lci10 (ou Lci3 ou Lci11), Lci12 e Lci4 (ou Lci5)	34/39 (87)	62/81 (77)

Tabela 4 - Índice Kappa de concordância entre as leituras realizadas por diferentes observadores dos resultados do MAPIA.

	Lci1A	Lci2B	Lci3	Lci4	Lci5	Lci6	Lci7	Lci8	Lci10	Lci11	Lci12	Lci13
Observador 1	36	37	15	23	22	2	15	4	6	15	23	9
Observador 2	34	36	18	48	46	4	20	6	9	20	36	5
Kappa	0,980	0,921	0,640	0,504	0,531	0,659	0,767	0,792	0,787	0,767	0,624	0,714

Tabela 5 – Análise estatística da sensibilidade das proteínas recombinantes avaliadas no MAPIA, utilizando o teste exato de Fischer.

Proteína	Lci2B (74%)	Lci4 (33%)	Lci5 (31%)	Lci12 (33%)	Lci1A e Lci2B (77%)	Lci1A, Lci2B e Lci8 (79%)	Lci1A, Lci2B, Lci8 e Lci12 (83%)	Combi A ¹ (87%)	Combi B ² (87%)
Lci1A (69%)	0,80	0,003*	0,0014*	0,003*	0,61	0,44	0,29	0,098	0,098
Lci2B (74%)		0,0003*	0,0001*	0,0003*	1	0,79	0,58	0,25	0,25
Lci4 (33%)			1	1	0,0002*	0,0001*	0,0001*	0,0001*	0,0001*
Lci5 (31%)				1	0,0001*	0,0001*	0,0001*	0,0001*	0,0001*
Lci12 (33%)					0,0002*	0,0001*	0,0001*	0,0001*	0,0001*
Lci1A e Lci2B (77%)						1	0,78	0,38	0,38
Lci1A, Lci2B e Lci8 (79%)							1	0,54	0,54
Lci1A, Lci2B, Lci8 e Lci12 (83%)								0,75	0,75
Combi A¹ (87%)									1

¹CombiA = (Lci1A, Lci2B, Lci8, Lci12 e Lci4); ²CombiB = (Lci1A, Lci2B, Lci8, Lci12 e Lci5); *Diferença significativa

5. Discussão

Em resumo, o presente estudo objetivou a seleção/identificação de um conjunto de antígenos de *L. infantum* para serem utilizados na rotina do diagnóstico de leishmaniose visceral canina em laboratórios de saúde pública. Desta maneira foram utilizados para essa triagem 12 antígenos recombinantes de *L. infantum*, empregando a técnica de MAPIA. Esta ferramenta evidenciou que há dois antígenos recombinantes (Lci1A e Lci2B) com um alto potencial para o uso diagnóstico.

Recentemente, um novo teste diagnóstico imunocromatográfico que utiliza o antígeno recombinante (rK39) vêm sendo utilizado em alguns países do mundo (OTRANTO *et al.*, 2005; RITMEIJER *et al.*, 2006; OZERDEM *et al.*, 2009). Adicionalmente, o teste imunocromatográfico rápido DPP-LVC[®] é recomendado pelo Ministério da Saúde no Brasil como teste de triagem para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina. O DPP-LVC[®] é composto pelo antígeno recombinante quimérico rK28, formado por fragmentos das proteínas recombinantes de *Leishmania donovani* K9/K26/K39 (Ministério da Saúde, 2011). Recentemente, Grimaldi e colaboradores (2012) demonstraram que apesar do antígeno recombinante utilizado no teste imunocromatográfico ter uma especificidade de aproximadamente 96% e sensibilidade de cerca de 98% para soros de cães sintomáticos, a sensibilidade para o diagnóstico em soros de cães assintomáticos foi de apenas 47%. Como na população canina em área endêmica para LVC, há uma parcela de animais assintomáticos, parte dos cães infectados por *L. infantum* podem não ser detectados em inquéritos sorológicos realizados. Este fator pode contribuir para a manutenção do ciclo do parasito nestas regiões, reduzindo a eficácia das medidas de controle da doença no local. Soares e colaboradores (2011) evidenciaram a ocorrência de transmissão da *Leishmania* para o inseto vetor, mesmo quando o cão é assintomático, perpetuando o ciclo do parasito. Portanto, a utilização de novos antígenos recombinantes para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina, torna-se fundamental para ampliar a detecção de animais até então diagnosticados como falso-negativos, aumentando assim a acurácia dos testes aplicados pelo Ministério.

No presente estudo utilizando o MAPIA, seis antígenos recombinantes (Lci1A e Lci2B, Lci4, Lci5, Lci8 e Lci12) foram reconhecidos pela maior parte dos soros. Nesta etapa de triagem, dois destes antígenos, Lci1A e Lci2B, apresentaram maior sensibilidade. Estes dados estão consonantes com o estudo realizado por Oliveira e colaboradores (2011), onde as proteínas recombinantes Lci1A, Lci2B, Lci3, Lci4 e Lci5, foram avaliadas, por ELISA, frente a soros de cães com leishmaniose visceral canina. A Lci1A apresentou sensibilidade de 72,2% e especificidade de 93,8%, a Lci2B apresentou sensibilidade de 97,2% e especificidade de 97,3%, a Lci3A apresentou sensibilidade de 36,4% e especificidade de 96,5%, a Lci4 apresentou sensibilidade de 81,8% e especificidade de 93,9% e a Lci5 apresentou sensibilidade de 86,4% e especificidade de 90,4%. Adicionalmente, De Souza e colaboradores (2012) mostraram a eficácia de dois dos 12 antígenos recombinantes, Lci1A e Lci2B, utilizando ELISA para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina. Eles observaram sensibilidade de 96% e especificidade de 92% para Lci1A e sensibilidade de 100% e especificidade de 95% para Lci2B.

No estudo realizado por De Souza e colaboradores (2012) não foram observadas reações cruzadas com soros de cães com *Babesia canis* e *Ehrlichia canis*. No entanto, foi detectada reatividade cruzada com soros de cães infectados com *L. braziliensis*, agente etiológico da leishmaniose tegumentar. Esses dados são consonantes com os encontrados no presente estudo, tendo os antígenos Lci1A e Lci2B apresentado baixa reatividade frente aos soros de animais com babesiose, erliquiose e tripanossomíase canina, mas sendo reconhecidos por 60% e 30% dos soros de animais infectados por *L. braziliensis*, respectivamente. Esse percentual de reconhecimento encontrado nos dois estudos, pode ser devido ao fato de ambos os parasitos pertencerem ao mesmo gênero. Assim, há a possibilidade de homologia entre as proteínas dessas espécies, levando as mesmas a serem detectadas.

Os achados em conjunto de sensibilidade e especificidade reforçam a potencialidade desses novos antígenos em serem utilizados em um teste para diagnóstico da leishmaniose visceral canina. No entanto, devido a baixa especificidade apresentada pelos antígenos, é necessária a otimização destes mantendo os epítomos dominantes que não apresentem reações cruzadas com outros patógenos e removendo de sua estrutura regiões que reduzam sua especificidade. Essas alterações tendem a melhorar o desempenho destas proteínas

recombinantes e conseqüentemente do teste diagnóstico que será desenvolvido. Uma outra possibilidade é o desenvolvimento de proteínas recombinantes quiméricas com os epitópos selecionados dos antígenos triados pelo MAPIA. Pattabhi e colaboradores (2010) realizaram um estudo com as proteínas recombinantes rK9, rK26 e rK39, comparando com a proteína recombinante fusionada a partir dessas três, rK28, e evidenciaram um aumento de sensibilidade desta última quando comparada com as anteriores. Esse resultado, sugere que as proteínas utilizadas no presente estudo possam ser também otimizadas a partir da construção de um antígeno quimérico, podendo elevar o seu potencial para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina.

É importante chamar a atenção que nenhuma das proteínas utilizadas no ensaio de triagem foram individualmente identificadas por 100% dos soros. Esse dado reforça a necessidade de se produzir um teste diagnóstico composto por múltiplos antígenos. Em um estudo anterior, Teixeira e colaboradores (2007) demonstraram que antígenos recombinantes quando utilizados conjuntamente podem levar ao aumento da sensibilidade e especificidade de um teste diagnóstico, pois diferentes indivíduos quando infectados por um mesmo parasita, podem apresentar perfis de respostas imunológicas distintas. Assim, uma combinação de mais de um antígeno em um mesmo teste diagnóstico pode aumentar a detecção de animais. Quando empregado em políticas de saúde pública, um teste diagnóstico com múltiplos antígenos pode ser bastante vantajoso (TEIXEIRA *et al.*, 2007). Os resultados aqui apresentados mostraram que as proteínas recombinantes Lci1A e Lci2B, foram os antígenos recombinantes que, individualmente, obtiveram melhor reconhecimento pelos soros dos animais infectados por *Leishmania*. No entanto, as proteínas recombinantes Lci4, Lci5, Lci8 e Lci12, avaliadas no presente estudo, foram reconhecidas por soros de animais infectados que não foram identificados pelas Lci1A e Lci2B. Assim, na análise combinatória realizada, a utilização conjunta de cinco proteínas CombiA (Lci1A, Lci2B, Lci8, Lci12 e Lci4) ou CombiB (Lci1A, Lci2B, Lci8, Lci12 e Lci5) foram responsáveis pelo reconhecimento máximo pelos soros de cães infectados no ensaio realizado (Tabela 6). As análises combinatórias de CombiA e CombiB demonstraram um aumento na sensibilidade do ensaio quando comparadas a utilização de Lci1A e Lci2B individualmente, Lci1A e Lci2B juntas, Lci1A, Lci2B e Lci8 juntas ou Lci1A, Lci2B, Lci8 e Lci12 juntas. Apesar

dessas avaliações não apresentarem diferenças significativas, utilizando o MAPIA, as diferenças de positividade tem relevância biológica, pois resultariam em um maior número de cães sendo diagnosticados. Além disso o MAPIA é um método utilizado para triagem dos antígenos com potencial para utilização em um teste diagnóstico, é possível que utilizando os antígenos selecionados em um teste diagnóstico robusto como o DPP® contra um maior número de soros as diferenças estatísticas possam ser identificadas. Estudos empregando estes antígenos selecionados no formato DPP em diferentes concentrações, com diferentes tampões deverão ser realizados, para avaliar a sensibilidade e especificidade de um teste desenvolvido a partir deles.

Estudos desenvolvidos demonstraram a aplicabilidade do MAPIA como ferramenta de triagem de antígenos recombinantes a serem utilizados em testes diagnósticos (Lyashchenko *et al.* 2000; Greenwald *et al.* 2003; Lyashchenko *et al.* 2006; Lyashchenko *et al.* 2007a; Lyashchenko *et al.* 2007b; Lyashchenko *et al.* 2008; Fenton *et al.* 2010; Handali *et al.* 2010; Ireton *et al.* 2010; Veerasami *et al.* 2012). Alguns destes estudos demonstraram o aumento da sensibilidade das detecções sorológicas com a utilização de mais de um antígeno (Lyashchenko *et al.* 2007b; Handali *et al.* 2010; Ireton *et al.* 2010). Assim, uma melhor forma de combinar antígenos para detecção pode ser o modelo multi-antígenos, pois manteria a sensibilidade de cada antígeno individualmente, como o modelo proposto pelo presente trabalho. Adicionalmente, estudos desenvolvidos confirmaram a eficiência do MAPIA como modelo de triagem, demonstraram a celeridade em transpor os antígenos de um modelo de triagem para um modelo de teste diagnóstico de uso final. Além da brevidade da mudança entre os modelos, outro ponto que vale ressaltar é o aumento de performance obtido pelo modelo de uso final, obtendo ganho de sensibilidade em relação a triagem dos antígenos realizada no MAPIA (Lyashchenko *et al.* 2003; Lyashchenko *et al.* 2007b). Assim, é de se esperar que os antígenos recombinantes aqui estudados venham a obter resultados melhores em um modelo multi-antígeno.

Uma limitação encontrada no estudo se deve ao fato da utilização de poucos soros de animais positivos para leishmaniose visceral canina e classificados como assintomáticos. A utilização de poucos soros de animais assintomáticos ocorreu devido a dificuldade de encontrar este grupo de animais, nas áreas endêmicas avaliadas, livres de doenças hemoparasitárias como babesiose e erliquiose. Os

parasitas que causam estas doenças coexistem com a Leishmania nas regiões onde foram realizadas as coletas de soros, e quando foi detectada infecção por estes hemoparasitas os soros não foram utilizados no ensaio do MAPIA. Além disso, outro fator relevante foi o rigor utilizado na identificação dos sinais clínicos presentes nos animais. Pois, a presença de qualquer sinal clínico, independente da sua intensidade, foi determinante para classificação do animal como sintomático. Novos estudos epidemiológicos vêm sendo desenvolvidos em nosso laboratório. Desta forma, novos soros obtidos de animais assintomáticos, provenientes destes novos estudos, poderão ser incluídos na soroteca. Além disso, na tentativa de sanar esta limitação, colaborações com outros pesquisadores vêm sendo estabelecidas na tentativa da obtenção de mais soros de animais positivos para leishmaniose visceral canina classificados como assintomáticos.

6. Conclusão

Seis proteínas recombinantes de *L. infantum*, dentre as dozes avaliadas foram selecionadas utilizando MAPIA. Estas proteínas deverão ser avaliadas no teste imunodiagnóstico no formato DPP multi-antígenos.

Referências

ADLER, S.; THEODOR, O. Investigations on Mediterranean Kala Azar. VI.—Canine Visceral Leishmaniasis. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 110, n. 768, p. 402-412, 1932.

ALVAR, J.; CANAVATE, C.; MOLINA, R.; MORENO, J.; NIETO, J. Canine leishmaniasis. **Adv Parasitol**, v. 57, p. 1-88, 2004.

ATHANASIOU, L. V.; KONTOS, V. I.; SARIDOMICHELAKIS, M. N.; RALLIS, T. S.; DIAKOU, A. A cross-sectional sero-epidemiological study of canine leishmaniasis in Greek mainland. **Acta Trop**, Feb 16 2012.

BADARO, R.; 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 antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral leishmaniasis. **J Infect Dis**, v. 173, n. 3, p. 758-61, Mar 1996.

BERN, C.; COURTENAY, O.; ALVAR, J. Of cattle, sand flies and men: a systematic review of risk factor analyses for South Asian visceral leishmaniasis and implications for elimination. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 4, n. 2, p. e599, 2010.

BERN, C.; MAGUIRE, J. H.; ALVAR, J. Complexities of assessing the disease burden attributable to leishmaniasis. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 2, n. 10, p. e313, 2008.

BURNS, J. M., JR.; SHREFFLER, W. G.; BENSON, D. R.; GHALIB, H. W.; BADARO, R.; REED, S. G. Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 90, n. 2, p. 775-9, Jan 15 1993.

CARRANZA-TAMAYO, C. O.; CARVALHO MDO, S.; BREDT, A.; BOFIL, M. I.; RODRIGUES, R. M.; SILVA, A. D.; CORTEZ, S. M.; ROMERO, G. A. Autochthonous visceral leishmaniasis in Brasilia, Federal District, Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 43, n. 4, p. 396-9, Jul-Aug 2010.

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

CHAPPUIS, F.; RIJAL, S.; SOTO, A.; MENTEN, J.; BOELAERT, M. A meta-analysis of the diagnostic performance of the direct agglutination test and rK39 dipstick for visceral leishmaniasis. **BMJ**, v. 333, n. 7571, p. 723, Oct 7 2006.

COSTA, M. M.; PENIDO, M.; DOS SANTOS, M. S.; DORO, D.; DE FREITAS, E.; MICHALICK, M. S.; GRIMALDI, G.; GAZZINELLI, R. T.; FERNANDES, A. P. Improved

canine and human visceral leishmaniasis immunodiagnosis using combinations of synthetic peptides in enzyme-linked immunosorbent assay. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6, n. 5, p. e1622, 2012.

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

DA SILVA TENÓRIO, M.; DE OLIVEIRA E SOUSA, L.; PAIXÃO, M. D. S.; ALVES, M. F.; DE CÁSSIA PAULAN, S.; LIMA, F. L.; JUSI, M. M. G.; TASCA, K. I.; MACHADO, R. Z.; STARKE-BUZETTI, W. A. Visceral Leishmaniasis in a Captive Crab-Eating Fox *Cerdocyon thous*. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 42, n. 4, p. 608-616, 2011.

DE LIMA, V. M.; FATTORI, K. R.; MICHELIN ADE, F.; DA SILVEIRA NETO, L.; VASCONCELOS RDE, O. Comparison between ELISA using total antigen and immunochromatography with antigen rK39 in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Vet Parasitol**, v. 173, n. 3-4, p. 330-3, Oct 29 2010.

DE SANTIS, B.; SANTOS, E. G.; CUPOLILLO, E.; PORROZZI, R.; CAVALCANTI ADOS, S.; DOS SANTOS, B. N.; DE MOURA, S. T.; MALHADO, K.; CHAVES, S. A. Characterization of Leishmania infantum species in dogs from the urban area of Cuiaba, State of Mato Grosso, Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 44, n. 6, p. 771-3, Nov-Dec 2011.

DE SOUZA, C. M.; SILVA, E. D.; ANO BOM, A. P. D.; BASTOS, R. C.; NASCIMENTO, H. J.; DA SILVA JUNIOR, J. G. Evaluation of an ELISA for canine leishmaniasis immunodiagnostic using recombinant proteins. **Parasite Immunology**, v. 34, n. 1, p. 1-7, 2012.

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

DUNCAN, A. E.; LYASHCHENKO, K.; GREENWALD, R.; MILLER, M.; BALL, R. Application of Elephant TB STAT-PAK assay and MAPIA (multi-antigen print immunoassay) for detection of tuberculosis and monitoring of treatment in black rhinoceros (*Diceros bicornis*). **J Zoo Wildl Med**, v. 40, n. 4, p. 781-5, Dec 2009.

DUTHIE, M. S.; IRETON, G. C.; KANAUIA, G. V.; GOTO, W.; LIANG, H.; BHATIA, A.; BUSCETI, J. M.; MACDONALD, M.; NEUPANE, K. D.; RANJIT, C.; SAPKOTA, B. R.; BALAGON, M.; ESFANDIARI, J.; CARTER, D.; REED, S. G. Selection of antigens and development of prototype tests for point-of-care leprosy diagnosis. **Clin Vaccine Immunol**, v. 15, n. 10, p. 1590-7, Oct 2008.

FENTON, K. A. et al. Comparison of three immunodiagnostic assays for antemortem detection of Mycobacterium bovis stimulation in domestic cats. **J Vet Diagn Invest**, v. 22, n. 5, p. 724-9, Sep 2010.

FELIPE, I. M.; AQUINO, D. M.; KUPPINGER, O.; SANTOS, M. D.; RANGEL, M. E.; BARBOSA, D. S.; BARRAL, A.; WERNECK, G. L.; CALDAS ADE, J. Leishmania infection in humans, dogs and sandflies in a visceral leishmaniasis endemic area in Maranhao, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 2, p. 207-11, Mar 2011.

GREENE, C. E. Ehrlichiosis, Neorickettiosis, Anaplasmosis, and Wolbachia Infection ;Trypanosomiasis; Babesiosis. In: ELSEVIER, S. (Ed.). **Infectious Diseases of the Dog and Cat**, 2006. cap. 28; 72; 77, p.209-210; 678-679; 728-729.

GREENWALD, R. et al. Improved serodetection of Mycobacterium bovis infection in badgers (Meles meles) using multiantigen test formats. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 46, n. 3, p. 197-203, 2003.

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

HANDALI, S. et al. Multiantigen print immunoassay for comparison of diagnostic antigens for Taenia solium cysticercosis and taeniasis. **Clin Vaccine Immunol**, v. 17, n. 1, p. 68-72, Jan 2010.

HARHAY, M. O.; OLLIARO, P. L.; COSTA, D. L.; COSTA, C. H. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. **Trends Parasitol**, v. 27, n. 9, p. 403-9, Sep 2011.

HIMSWORTH, C. G.; ELKIN, B. T.; NISHI, J. S.; EPP, T.; LYASHCHENKO, K. P.; SURUJBALLI, O.; TURCOTTE, C.; ESFANDIARI, J.; GREENWALD, R.; LEIGHTON, F. A. Comparison of test performance and evaluation of novel immunoassays for tuberculosis in a captive herd of wood bison naturally infected with Mycobacterium bovis. **J Wildl Dis**, v. 46, n. 1, p. 78-86, Jan 2010.

IRETON, G. C. et al. Identification of Mycobacterium tuberculosis antigens of high serodiagnostic value. **Clin Vaccine Immunol**, v. 17, n. 10, p. 1539-47, Oct 2010.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nat Rev Microbiol**, v. 9, n. 8, p. 604-15, Aug 2011.

LACHAUD, L.; MARCHERGUI-HAMMAMI, S.; 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, n. 1, p. 210-5, Jan 2002.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-5, Aug 15 1970.

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

LESELLIER, S.; CORNER, L.; COSTELLO, E.; SLEEMAN, P.; LYASHCHENKO, K. P.; GREENWALD, R.; ESFANDIARI, J.; GLYN HEWINSON, R.; CHAMBERS, M.; GORMLEY, E. Immunological responses following experimental endobronchial infection of badgers (*Meles meles*) with different doses of *Mycobacterium bovis*. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 127, n. 1-2, p. 174-80, Jan 15 2009.

LOMBARDO, G.; PENNISI, M. G.; LUPO, T.; MIGLIAZZO, A.; CAPRI, A.; SOLANO-GALLEGO, L. Detection of *Leishmania infantum* DNA by real-time PCR in canine oral and conjunctival swabs and comparison with other diagnostic techniques. **Vet Parasitol**, v. 184, n. 1, p. 10-7, Feb 28 2012.

LUPPI, M. M.; MALTA, M. C.; SILVA, T. M.; SILVA, F. L.; MOTTA, R. O.; MIRANDA, I.; ECCO, R.; SANTOS, R. L. Visceral leishmaniasis in captive wild canids in Brazil. **Vet Parasitol**, v. 155, n. 1-2, p. 146-51, Aug 1 2008.

LYASHCHENKO, K. P. et al. Animal-side serologic assay for rapid detection of *Mycobacterium bovis* infection in multiple species of free-ranging wildlife. **Vet Microbiol**, v. 132, n. 3-4, p. 283-92, Dec 10 2008.

LYASHCHENKO, K. P. et al. PrimaTB STAT-PAK assay, a novel, rapid lateral-flow test for tuberculosis in nonhuman primates. **Clin Vaccine Immunol**, v. 14, n. 9, p. 1158-64, Sep 2007.

LYASHCHENKO, K. P. et al. Antibody responses in New World camelids with tuberculosis caused by *Mycobacterium microti*. **Vet Microbiol**, v. 125, n. 3-4, p. 265-73, Dec 15 2007.

LYASHCHENKO, K. P. et al. Tuberculosis in elephants: antibody responses to defined antigens of *Mycobacterium tuberculosis*, potential for early diagnosis, and monitoring of treatment. **Clin Vaccine Immunol**, v. 13, n. 7, p. 722-32, Jul 2006.

LYASHCHENKO, K. P. et al. A multi-antigen print immunoassay for the development of serological diagnosis of infectious diseases. **J Immunol Methods**, v. 242, n. 1-2, p. 91-100, Aug 28 2000.

MAIA, C.; CAMPINO, L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. **Vet Parasitol**, v. 158, n. 4, p. 274-87, Dec 20 2008.

MANCIANTI, F.; GRAMICCIA, M.; GRADONI, L.; PIERI, S. Studies on canine leishmaniasis control. 1. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 82, n. 4, p. 566-7, 1988.

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, Nov 2005.

MICHALSKY, E. M.; ROCHA, M. F.; DA ROCHA LIMA, A. C.; FRANCA-SILVA, J. C.; PIRES, M. Q.; OLIVEIRA, F. S.; PACHECO, R. S.; DOS SANTOS, S. L.; BARATA, R. A.; ROMANHA, A. J.; FORTES-DIAS, C. L.; DIAS, E. S. Infectivity of seropositive dogs, showing different clinical forms of leishmaniasis, to *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sand flies. **Vet Parasitol**, v. 147, n. 1-2, p. 67-76, Jun 20 2007.

Ministério da Saúde. Nota Técnica Conjunta N° 01/2011 - CGDT-CGLAB/DEVIT/SVS/MS: Esclarecimentos sobre substituição do protocolo diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC) 2011.

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

NICOLLE, C.; COMTE, C. Origine du Kala azar. *Comptes Rendues de l'Academie des Sciences de Paris*, v.146, p.789, 1908.

OLIVEIRA, G. G.; MAGALHAES, F. B.; TEIXEIRA, M. C.; PEREIRA, A. M.; PINHEIRO, C. G.; SANTOS, L. R.; NASCIMENTO, M. B.; BEDOR, C. N.; ALBUQUERQUE, A. L.; DOS-SANTOS, W. L.; GOMES, Y. M.; MOREIRA, E. D., JR.; BRITO, M. E.; PONTES DE CARVALHO, L. C.; DE MELO NETO, O. P. Characterization of novel *Leishmania infantum* recombinant proteins encoded by genes from five families with distinct capacities for serodiagnosis of canine and human visceral leishmaniasis. **Am J Trop Med Hyg**, v. 85, n. 6, p. 1025-34, Dec 2011.

OTRANTO, D.; PARADIES, P.; SASANELLI, M.; LEONE, N.; DE CAPRARIIS, D.; CHIRICO, J.; SPINELLI, R.; CAPELLI, G.; BRANDONISIO, O. Recombinant K39 dipstick immunochromatographic test: a new tool for the serodiagnosis of canine leishmaniasis. **J Vet Diagn Invest**, v. 17, n. 1, p. 32-7, Jan 2005.

OTRANTO, D.; PARADIES, P.; SASANELLI, M.; SPINELLI, R.; BRANDONISIO, O. Rapid immunochromatographic test for serodiagnosis of canine leishmaniasis. **J Clin Microbiol**, v. 42, n. 6, p. 2769-70, Jun 2004.

OZERDEM, D.; EROGLU, F.; GENÇ, A.; DEMIRKAZIK, M.; KOLTAS, I. S. Comparison of microscopic examination, rK39, and PCR for visceral leishmaniasis diagnosis in Turkey. **Parasitol Res**, v. 106, n. 1, p. 197-200, Dec 2009.

PAPADOGIANNAKIS, E.; SPANAKOS, G.; KONTOS, V.; MENOUNOS, P. G.; TEGOS, N.; VAKALIS, N. Molecular detection of *Leishmania infantum* in wild rodents (*Rattus norvegicus*) in Greece. **Zoonoses Public Health**, v. 57, n. 7-8, p. e23-5, Dec 2010.

PASTOR-SANTIAGO, J. A.; CHAVEZ-LOPEZ, S.; GUZMAN-BRACHO, C.; FLISSER, A.; OLIVO-DIAZ, A. American visceral leishmaniasis in Chiapas, Mexico. **Am J Trop Med Hyg**, v. 86, n. 1, p. 108-14, Jan 2012.

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

PEDRAS, M. J.; DE GOUVEA VIANA, L.; DE OLIVEIRA, E. J.; RABELLO, A. Comparative evaluation of direct agglutination test, rK39 and soluble antigen ELISA and IFAT for the diagnosis of visceral leishmaniasis. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 102, n. 2, p. 172-8, Feb 2008.

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

POSTIGO, J. A. Leishmaniasis in the World Health Organization Eastern Mediterranean Region. **Int J Antimicrob Agents**, v. 36 Suppl 1, p. S62-5, Nov 2010.

RHODES, S. G.; GUNN-MOORE, D.; BOSCHIROLI, M. L.; SCHILLER, I.; ESFANDIARI, J.; GREENWALD, R.; LYASHCHENKO, K. P. Comparative study of IFN γ and antibody tests for feline tuberculosis. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 144, n. 1-2, p. 129-34, Nov 15 2011.

RITMEIJER, K.; MELAKU, Y.; MUELLER, M.; KIPNGETICH, S.; O'KEEFFE, C.; DAVIDSON, R. N. Evaluation of a new recombinant K39 rapid diagnostic test for Sudanese visceral leishmaniasis. **Am J Trop Med Hyg**, v. 74, n. 1, p. 76-80, Jan 2006.

SACKS, D. L. *Leishmania*-sand fly interactions controlling species-specific vector competence. **Cell Microbiol**, v. 3, n. 4, p. 189-96, Apr 2001.

SAÚDE, M. D. SAÚDE, S. D. V. E. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. 2006.

SCHALLIG, H. D.; CANTO-CAVALHEIRO, M.; DA SILVA, E. S. Evaluation of the direct agglutination test and the rK39 dipstick test for the sero-diagnosis of visceral leishmaniasis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1015-8, Oct 2002.

SCHALLIG, H. D.; DA SILVA, E. S.; VAN DER MEIDE, W. F.; SCHOONE, G. J.; GONTIJO, C. M. *Didelphis marsupialis* (common opossum): a potential reservoir host for zoonotic

leishmaniasis in the metropolitan region of Belo Horizonte (Minas Gerais, Brazil). **Vector Borne Zoonotic Dis**, v. 7, n. 3, p. 387-93, Fall 2007.

SHANG, L. M.; PENG, W. P.; JIN, H. T.; XU, D.; ZHONG, N. N.; WANG, W. L.; WU, Y. X.; LIU, Q. The prevalence of canine *Leishmania infantum* infection in Sichuan Province, southwestern China detected by real time PCR. **Parasit Vectors**, v. 4, n. 1, p. 173, 2011.

SILVA, D. A.; MADEIRA, M. F.; TEIXEIRA, A. C.; DE SOUZA, C. M.; FIGUEIREDO, F. B. Laboratory tests performed on *Leishmania* seroreactive dogs euthanized by the leishmaniasis control program. **Vet Parasitol**, v. 179, n. 1-3, p. 257-61, Jun 30 2011.

Sistema de informação de agravo de Notificação. Ministério da Saúde. Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/index.php> Acessado em, 20 de novembro de 2012

SLAPPENDEL, R. J. Canine leishmaniasis. A review based on 95 cases in The Netherlands. **Vet Q**, v. 10, n. 1, p. 1-16, Jan 1988.

SOARES, M. R.; DE MENDONCA, I. L.; DO BONFIM, J. M.; RODRIGUES, J. A.; WERNECK, G. L.; COSTA, C. H. Canine visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil: Relationship between clinical features and infectivity for sand flies. **Acta Trop**, v. 117, n. 1, p. 6-9, Jan 2011.

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

SOLCA, M. S.; GUEDES, C. E.; NASCIMENTO, E. G.; OLIVEIRA, G. G.; SANTOS, W. L.; FRAGA, D. B.; VERAS, P. S. Qualitative and quantitative polymerase chain reaction (PCR) for detection of *Leishmania* in spleen samples from naturally infected dogs. **Vet Parasitol**, v. 184, n. 2-4, p. 133-40, Mar 23 2012.

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

SRIVIDYA, G.; KULSHRESTHA, A.; SINGH, R.; SALOTRA, P. Diagnosis of visceral leishmaniasis: developments over the last decade. **Parasitol Res**, Nov 9 2011.

TEIXEIRA, M. C.; OLIVEIRA, G. G.; SILVANY, M. A.; ALCANTARA-NEVES, N. M.; SOARES, M. B.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R.; JERONIMO, S. M.; COSTA, C. H.; DOS-SANTOS, W. L.; EICHINGER, D.; PONTES-DE-CARVALHO, L. A strategy for identifying serodiagnostically relevant antigens of *Leishmania* or other pathogens in genetic libraries. **Biologicals**, v. 35, n. 1, p. 51-4, Mar 2007.

VEERASAMI, M. et al. Multi-antigen print immunoassay for seroepidemiological surveillance of bovine tuberculosis on Indian cattle farms. **Vet Ital**, v. 48, n. 3, p. 253-67, Jul-Sep 2012.

VERÇOSA, B. L.; LEMOS, C. M.; MENDONCA, I. L.; SILVA, S. M.; DE CARVALHO, S. M.; GOTO, H.; COSTA, F. A. Transmission potential, skin inflammatory response, and parasitism of symptomatic and asymptomatic dogs with visceral leishmaniasis. **BMC Vet Res**, v. 4, p. 45, 2008.

VUYLSTEKE, B.; SEMDE, G.; SIKA, L.; CRUCITTI, T.; ETTIEGNE TRAORE, V.; BUVE, A.; LAGA, M. High prevalence of HIV and sexually transmitted infections among male sex workers in Abidjan, Cote d'Ivoire: need for services tailored to their needs. **Sex Transm Infect**, Feb 11 2012.

WANG, Y.; WU, W.; NEGRE, N. N.; WHITE, K. P.; LI, C.; SHAH, P. K. Determinants of antigenicity and specificity in immune response for protein sequences. **BMC Bioinformatics**, v. 12, p. 251, 2011.

WHO. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases. p. 202, 2010.

WU, L. T.; CURRAN, M. D.; ELLIS, J. S.; PARMAR, S.; RITCHIE, A. V.; SHARMA, P. I.; ALLAIN, J. P.; JALAL, H.; ZAMBON, M.; LEE, H. H. Nucleic acid dipstick test for molecular diagnosis of pandemic H1N1. **J Clin Microbiol**, v. 48, n. 10, p. 3608-13, Oct 2010.

1 Anexo

2

3 **ARTIGO**

4 **Título**

5 TRIAGEM DOS ANTÍGENOS RECOMBINANTES DE *LEISHMANIA INFANTUM*
6 UTILIZANDO A TÉCNICA DE MULTI-ANTÍGENOS IMPRESSOS (MAPIA) NO
7 DESENVOLVIMENTO DE IMUNODIAGNÓSTICO PARA LEISHMANIOSE
8 VISCERAL CANINA

9

10 **Nome dos autores e Afiliações**

11 Isaac Queiroz de Oliveira¹; Rodrigo Araujo Silva¹; Michel Vergne Sucupira³; Silva, Edmilson Domingos
12 da Silva³; Deborah Bittencourt Mothé Fraga²; Patrícia Sampaio Tavares Veras¹

13

14 ¹*Centro de pesquisa Gonçalo Moniz/Fundação Oswaldo Cruz*

15 ²*Escola de Medicina veterinária/ Universidade Federal da Bahia*

16 ³*Bio-Manguinhos/Fundação Oswaldo Cruz*

17

18 ***Autor correspondente**

19 Patrícia Sampaio Tavares Veras, PhD, MD

20 Laboratório de Patologia e Biointervenção, CPqGM, FIOCRUZ

21 Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal

22 Salvador/BA, Brazil; CEP 40296-710

23 Tel: + 55 (71) 3176-2263

24 Fax: + 55 (71) 3176-2290

25 E-mail: pveras@bahia.fiocruz.br

26

27 **Resumo**

28 As leishmanioses são antropozoonoses causadas por diferentes protozoários
29 do gênero *Leishmania*. O cão é o principal reservatório dos centros urbanos. No
30 Brasil, as medidas de controle da leishmaniose visceral (LV) recomendado pelo
31 Ministério da Saúde, são focados principalmente na eutanásia dos cães
32 soropositivos para LV detectados pelo DPP®-LVC e confirmados pelo ELISA.
33 Trabalhos demonstram que o DPP®-LVC não é capaz de detectar uma parcela da
34 população de cães, devido a sua baixa sensibilidade em cães assintomáticos o que
35 pode contribuir para a perpetuação da doença nestas áreas. A nossa hipótese é que
36 um conjunto de antígenos recombinante de *L. infantum* selecionados por MAPIA,
37 será reconhecido pela maioria dos soros de cães com leishmaniose visceral canina
38 (LVC). O objetivo do estudo foi identificar o conjunto dos antígenos recombinantes
39 de *L. infantum* quanto ao reconhecimento por soros de cães infectados para compor
40 o teste imunodiagnóstico para LVC. Doze proteínas recombinantes (Lci1A, Lci2B,
41 Lci3, Lci4, Lci5, Lci6, Lci7, Lci8, Lci10, Lci11, Lci12, Lci13) estudadas neste trabalho
42 foram analisadas utilizando o ensaio de triagem dos antígenos MAPIA (*Multi-Antigen*
43 *Print ImmunoAssay*). Foram utilizados nessa triagem soros caninos positivos para
44 LVC (n = 39), soros de cães com leishmaniose tegumentar (n = 10), tripanossomíase
45 canina (n = 10), babesiose (n = 10), erliquiose (n = 11) e soros de animais negativos
46 (n = 40). Os testes foram lidos por dois observadores de maneira independente e a
47 concordância entre as leituras visuais foi avaliada utilizando o índice Kappa. O teste
48 exato de Fisher foi empregado para avaliar as diferenças estatísticas entre o índice
49 de positividade das proteínas estudadas. As proteínas Lci1A e Lci2B foram
50 reconhecidas por 74% e 69% dos soros, respectivamente. As Lci4 (33%), Lci5 (31%)
51 e Lci12 (33%) também obtiveram um bom grau de reconhecimento pelos anticorpos
52 presentes no soro. Lci8, apesar de ter sido reconhecida por poucos soros (8%), foi
53 identificada por um soro, que não identificou nenhum outro antígeno. Análises
54 combinatórias foram realizadas para identificar o conjunto de proteínas ideal para
55 compor o teste imunodiagnóstico. Foram identificadas duas combinações compostas
56 por cinco antígenos, Lci1A, Lci2B, Lci8, Lci12, Lci4 e Lci1A, Lci2B, Lci8, Lci12, Lci5,
57 que apresentaram maior sensibilidade. Quando comparado com a combinação de
58 Lci1A e Lci2B o reconhecimento dos dois conjuntos de 5 proteínas aumentou de
59 77% para 87% (p= 0,098). Apesar desse achado, com o teste de triagem MAPIA foi

60 possível selecionar dois conjuntos de cinco proteínas recombinantes de *L. infantum*
61 que mostraram potencial para compor um teste imunodiagnóstico no formato DPP
62 multi-antígenos.

63 **Abstract**

64

65 Leishmaniasis are antropozoonoses caused by different protozoa of the genus
66 *Leishmania*. The dog is the main reservoir of urban centers and the sandfly is the
67 vector responsible for transmission. In Brazil, according to the recommendations of
68 the Ministry of Health, leishmaniasis seropositive dogs should be euthanized. The
69 diagnosis is made by the DPP®-CVL and ELISA. Studies shown that DPP®-CVL is
70 not able to detect portion of the dog population, which may contribute to the
71 perpetuation of the disease in these areas. Twelve recombinant proteins (Lci1A,
72 Lci2B, Lci3, Lci4, Lci5, Lci6, Lci7, Lci8, Lci10, Lci11, Lci12, Lci13) studied in this work
73 were analyzed using the screening assay MAPIA (Multi-Antigen Print Immunoassay).
74 Our hypothesis is that using MAPIA, you can select from these 12 recombinant
75 proteins of *L. infantum*, that is recognized by the majority of sera from dogs infected
76 for composing an immunodiagnostic test for canine visceral leishmaniasis (CVL). The
77 goal was identify the set of recombinant antigens of *L. infantum* as the recognition by
78 sera from infected dogs to compose the immunodiagnostic test for CVL. We used
79 this canine serum screening positive for CVL (n = 39), sera from dogs with
80 leishmaniasis (n = 10), canine trypanosomiasis (n = 10), babesiosis (n = 10),
81 ehrlichiosis (n = 11) and serum negative animals (n = 40). The tests were read by
82 two observers independently and agreement between visual readings was assessed
83 using the Kappa index. The Fisher exact test was used to evaluate statistical
84 differences between the positivity rate of the proteins studied. The proteins and Lci1A
85 and Lci2B were recognized by 74% and 69%, respectively. The Lci4 (33%), Lci5
86 (31%) and Lci12 (33%) achieved a good degree of recognition by antibodies present
87 in serum. The Lci8 (8%), although it has been recognized by few sera, was identified
88 by serum, which did not identify any other antigen. Sera from dogs with leishmaniasis
89 were most likely reacted with the recombinant proteins, this may be due to the fact
90 that phylogenetic proximity between the species. Combinatorial analyzes were
91 performed to identify the optimal set of proteins for composing the immunodiagnosis.

92 We identified two combinations composed of five antigens, Lci1A, Lci2B, Lci8, Lci12,
93 and Lci4 Lci1A, Lci2B, Lci8, Lci12, Lci5 capable of being recognized by serums.
94 When compared with the combination of Lci1A + Lci2B recognition of two sets of five
95 proteins increased from 77% to 87% ($p = 0.098$). Despite this finding did not reach
96 statistical significance, points us to evaluate the possibility of two sets in an
97 immunoassay format of the final test (DPP). In summary, using the screening test
98 MAPIA was possible to select two sets of five recombinant proteins of *L. infantum*
99 showed that potential immunodiagnostic test to compose a multi-format DPP
100 antigens.

101

102 **1. Introdução**

103 No novo mundo, o agente da leishmaniose visceral (LV) é a *Leishmania*
104 *infantum*, sendo o cão o principal reservatório da doença nos centros urbanos. A
105 doença no cão geralmente é caracterizada por alterações nos fâneros, tais como,
106 onicogribose, alopecia, úlceras e dermatites podendo também causar
107 emagrecimento, anorexia, apatia, disfunções oculares e motoras, além de acometer
108 órgãos internos, como baço, fígado e linfonodos, podendo levar o animal a óbito
109 (ALVAR *et al.*, 2004). Esses sinais são comumente encontrados em outras
110 doenças infecciosas em cães, logo sinais clínicos não são suficientes para o
111 diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC).

112 No Brasil, as técnicas empregadas pelo Ministério da Saúde no diagnóstico
113 da LVC em inquéritos sorológicos são o teste rápido imunocromatográfico Dual-Path
114 Plataforma® (DPP®) para LVC, como teste de triagem e o ensaio imunoenzimático
115 ELISA como confirmatório (21).

116 O DPP®–LVC detecta anticorpos contra a proteína rK28. Esse teste apresenta
117 alta sensibilidade para o diagnóstico de cães sintomáticos, entretanto baixa
118 sensibilidade para detecção de cães assintomáticos (GRIMALDI *et al.*, 2012). Esta
119 falha compromete o controle da LV pois os cães assintomáticos não detectados
120 podem contribuir para a perpetuação da doença (MICHALSKY *et al.*, 2007; SOARES
121 *et al.*, 2011). Esses dados evidenciam a necessidade da implementação de novos

122 testes mais fidedignos que ajudem os programas de saúde pública a serem mais
123 efetivos no diagnóstico da LVC.

124 Diversas estratégias vêm sendo empregadas para identificar novas proteínas
125 recombinantes, que elevem a eficiência de testes para o diagnóstico de doenças,
126 (TEIXEIRA *et al.*, 2007; WANG *et al.*, 2011) como o *multi-antigen print immunoassay*
127 (MAPIA) que consiste em um imunoenensaio utilizado para triagem dos antígenos
128 recombinantes no desenvolvimento de novos testes imunodiagnósticos
129 (LYASHCHENKO *et al.*, 2000). Esta metodologia apresenta a vantagem na triagem
130 dos antígenos por ser uma plataforma que se aproxima dos testes rápidos
131 imunocromatográficos que estão sendo implantados pelo Ministério da Saúde do
132 Brasil, além disso é mais rápido.

133 Estudos tem demonstrado que diferentes indivíduos, quando infectados por
134 um mesmo parasito, podem produzir diferentes anticorpos contra um mesmo
135 conjunto de antígenos. Assim, a utilização de mais de um antígeno recombinante
136 pode ser mais eficiente na detecção de cães com LVC, quando comparados a um
137 teste com somente um antígeno (TEIXEIRA *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2011).

138 Doze antígenos recombinantes de *L. infantum* (Lci1A, Lci2B, Lci3, Lci4, Lci5,
139 Lci6, Lci7, Lci8, Lci10, Lci11, Lci12 e Lci13) (Tabela 1) foram selecionados a partir
140 de biblioteca genômica de promastigotas e de biblioteca de cDNA de amastigotas de
141 *L. infantum* (TEIXEIRA *et al.*, 2007) para serem utilizados no diagnóstico para LVC.

142 Nossa hipótese é que um conjunto de antígenos recombinante de *L. infantum*
143 selecionados por MAPIA, será reconhecido pela maioria dos soros de cães com
144 LVC. O objetivo deste estudo foi identificar o conjunto dos antígenos recombinantes
145 de *L. infantum* quanto ao reconhecimento por soros de cães infectados para compor
146 o teste imunodiagnóstico para leishmaniose visceral canina. Esses antígenos
147 recombinantes foram produzidos em nosso laboratório e, no presente estudo,
148 utilizados para serem avaliados quanto ao potencial para compor um teste
149 imunodiagnóstico para LVC.

150

151 2. Metodologia

152

153 2.1. Antígenos recombinantes

154 Doze antígenos recombinantes de *L. infantum* (Tabela 1) foram avaliados no
155 MAPIA. Bactérias *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS (Invitrogen, Carlsbad, California,
156 EUA) foram transformadas com plasmídeos pRSET (Invitrogen) contendo a
157 sequência gênica de interesse dos antígenos recombinantes de *L. infantum*. Essas
158 bactérias foram cultivadas em meio Luria-Bertani (LB) e induzidas por isopropil- β -D
159 tiogalactopiranosídeo (IPTG, Invitrogen) para produção proteica. Após o processo de
160 produção, o meio de cultivo das bactérias foi centrifugado para a retirada do meio LB
161 e o sedimento bacteriano foi congelado imediatamente a -20°C . Amostras de cultivos
162 bacterianos foram colhidas no início e no fim da produção, foram submetidas à
163 centrifugação para descarte do meio, ressuspendidas em tampão Laemmli
164 (LAEMMLI, 1970) e aquecidas a 95°C em banho maria por 5 minutos, para provocar
165 a lise da bactéria, desnaturaçãõ e redução das proteínas. Posteriormente, esse
166 produto foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida 10%-15% (SDS-
167 PAGE) que quando corado com azul de Coomassie permitiu a confirmação da
168 expressão proteica.

169 A purificação das proteínas recombinantes foi realizada em Bio-
170 Manguinhos/LATED, utilizando cromatografia de afinidade, em colunas de níquel-
171 sefarose PD-10 Desalting Workmate (Amersham Pharmacia Biotech AB, Sweden).
172 Para purificação o sedimento bacteriano foi ressuspendido na razão de 3 ml de
173 tampão de ligação (Na_2HPO_4 a 20 mM, NaCl a 500 mM e imidazol a 20 mM, pH 7,4)
174 para cada 1 g de sedimento com auxílio de um agitador vortex. Em seguida, para
175 digerir a parede bacteriana, foi adicionada lisozima (Sigma-Aldrich, St. Louis,
176 Missouri, EUA) na concentração final de 1 mg/ml. Cada suspensão foi incubada à
177 temperatura ambiente por 20 minutos, sob agitação constante. Posteriormente,
178 visando a solubilização das membranas lipídicas, para cada 1 g de sedimento, foram
179 acrescentados 4 mg de desoxicolato de sódio (Sigma-Aldrich) e cada suspensão foi
180 incubada à temperatura ambiente por 30 minutos. Com o objetivo de fragmentar o
181 DNA genômico bacteriano, cada suspensão foi submetida à sonicação no gelo. A
182 sonicação foi realizada pela aplicação de seis pulsos, com potência de 200 Watts

183 cada um com duração de 20 segundos e intervalo de 60 segundos entre cada dois
184 pulsos consecutivos. Cada lisado bacteriano foi centrifugado a 17.000 x g, a 4°C, por
185 15 minutos. O sobrenadante e o sedimento contendo a proteína recombinante
186 depois de solubilizados em tampão de ligação (20mM Na₂HPO₄, 150mM NaCl,
187 20mM imidazol, pH 8,0 e 2 M de uréia) foram filtrados em filtros de 0,22 µm e
188 aplicados em colunas cromatográficas de níquel-sefarose. As colunas haviam sido
189 previamente equilibradas com uma solução tampão (20mM Na₂HPO₄, 150mM NaCl
190 e 20mM imidazol, pH 8,0 e com 2 M de uréia). As colunas foram eluídas com tampão
191 contendo Na₂HPO₄ (20 mM) NaCl (150 mM), imidazol (500 mM) e uréia (2 M) em pH
192 8,0. Durante o processo de eluição, frações de 3 mL foram obtidas e armazenadas a
193 4°C e alíquotas dessas frações foram analisadas por SDS-PAGE. As frações que
194 continham a proteína alvo com um bom grau de pureza foram misturadas. A
195 concentração de cada proteína recombinante foi determinada utilizando o kit DC™
196 Protein Assay (Bio-Rad, Califórnia, EUA), seguindo-se recomendações do
197 fabricante.

198

199 **2.2. Soros**

200

201 Para avaliação da reatividade frente aos antígenos foram utilizados 120 soros
202 de cães com diferentes características; 39 soros de animais parasitologicamente
203 confirmados para LVC com cultura de aspirado esplênico, 10 com diagnóstico de
204 leishmaniose tegumentar, 10 com doença de Chagas, 10 com babesiose e 11 com
205 erliquiose e 40 soros de cães negativos para estas patologias. Os soros de cães
206 com LVC foram obtidos de animais com diferentes manifestações clínicas, 2 são de
207 animais sem sinais clínicos (assintomáticos), 15 de cães com até 3 sinais
208 (oligossintomáticos) e 22 com mais de 3 sinais (polissintomáticos). Estes soros
209 foram obtidos em coletas em regiões endêmicas e não-endêmicas para LVC e
210 fazem parte da soroteca canina estabelecida no Laboratório de Patologia e
211 Biointervenção/Fiocruz-BA. Todos os soros são armazenados em freezer -80°C.

212

213 **2.3. Ensaio imunológico com multi-antígenos impressos** 214 **(MAPIA)**

215

216 Membranas de nitrocelulose HiFlow Plus HFB24004 (Millipore,
217 Massachusetts, EUA) foram impregnadas (CAMAG automatic TLC sample 4) com
218 soluções de antígenos recombinantes nas seguintes concentrações: Lci1 = 0,236
219 mg/mL, Lci2 = 0,222 mg/mL, Lci3 = 0,530 mg/mL, Lci6 = 0,347 mg/mL, Lci7 = 0,097
220 mg/mL, Lci8 = 0,125 mg/mL, Lci10= 0,139 mg/mL, Lci12 = 0,236 mg/mL, Lci4 =
221 0,055 mg/mL, Lci5 = 0,139 mg/mL, Lci11 = 0,055 mg/mL, Lci13 = 0,180 mg/mL, em
222 bandas paralelas. Foram também impregnados na membrana uma solução na
223 concentração de 7,620 mg/mL de lisado total de *L. major*, a proteína recombinante
224 CRA&FRA (0,290 mg/mL) para detecção de anticorpos anti-*Trypanossoma cruzi*,
225 além da proteína A (0,200 mg/mL) como controle interno da reação. Em seguida, as
226 membranas foram cortadas em tiras no sentido perpendicular em relação às linhas
227 impregnadas.

228 **2.4. Análises dos resultados**

229

230 A reatividade dos soros aos antígenos recombinantes foi detectada através de
231 observação visual do aparecimento de coloração no local correspondente a
232 impregnação de cada antígeno. Essa leitura visual das fitas do MAPIA é uma
233 medida qualitativa, então para reduzir a possibilidade de erros, ela foi realizada por
234 dois observadores independentes. Foi realizado o cálculo do índice Kappa para a
235 avaliação da concordância entre as leituras visuais realizadas pelos dois
236 observadores.

237 Uma análise combinatória dos resultados individuais da reatividade de cada
238 proteína foi realizada com o intuito de estabelecer um conjunto de antígenos
239 recombinantes capaz de aumentar a sensibilidade de um futuro teste diagnóstico,
240 numa plataforma multi-antígenos. Foi realizado o teste exato de Fisher para
241 evidenciar possíveis diferenças estatísticas entre a sensibilidade de cada antígeno.

242

243 3. Resultados

244

245 3.1. Produção e purificação das proteínas recombinantes

246

247 Foram produzidas e purificadas 12 proteínas recombinantes. A figura 1
248 mostra um gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) do antígeno recombinante Lci2B ao
249 final de sua produção e após sua purificação.

250 3.2. Análise do MAPIA

251

252 A triagem dos antígenos recombinantes de *L. infantum* reconhecidos pelos
253 soros de cães com LVC foi realizada utilizando o MAPIA. Nesse estudo 87% dos
254 soros de cães com LVC foram capazes de reconhecer pelo menos uma das
255 proteínas recombinantes de *L. infantum* avaliadas. Quando analisados
256 individualmente, os antígenos recombinantes mais reconhecidos foram Lci2B por
257 74% e Lci1A por 69% dos soros, no entanto não houve diferença significativa entre o
258 reconhecimento destas duas proteínas ($P= 0,80$) (Tabela 6). A proporção de soros
259 que reconheceram os demais antígenos foi de 33% para Lci4, 33% para Lci12, 31%
260 para Lci5, 23% para Lci3, 21% para Lci7, 21% para Lci11, 8% para Lci8, 8% para
261 Lci10, 8% para Lci13 e 3% para a Lci6 (Tabela 2).

262 A avaliação da reatividade das proteínas recombinantes frente aos soros de
263 cães negativos e com outras patologias (Tabela 3) evidenciou que a Lci4 foi
264 identificada por 11 de 81 soros, seguido pela Lci12 identificada por 10 dos 81, Lci 5
265 por 9 dos 81, Lci1A por 8 dos 81 soros avaliados. Lci2B, Lci3, Lci7, e Lci11 que
266 foram reconhecidas por 7 de 81 soros testados. Lci13 e Lci10 foram reconhecidas
267 por 6 e 3 dos 81 soros, respectivamente. Enquanto que Lci8 e Lci6 só foram
268 reconhecidas por 1 dos 81 soros.

269 Ao realizar análise combinatória das diferentes proteínas, a Lci1A e a Lci2B
270 foram aquelas que apresentaram melhores desempenhos conjuntamente, com
271 sensibilidade de 77% e especificidade de 90%. Quando a estes antígenos foi
272 acrescentada a Lci8, a sensibilidade aumentou para 79%.

273 Várias combinações possíveis entre os antígenos foram avaliadas, tendo sido
274 detectada como as melhores, duas variações compostas por Lci1A, Lci2B, Lci8,
275 Lci12 e Lci4 ou Lci5. Estas duas possíveis combinações elevaram a sensibilidade
276 para 87% (Tabela 4).

277 O índice Kappa foi utilizado para avaliar a concordância entre as leituras do
278 MAPIA realizadas pelos dois leitores independentes. As proteínas recombinantes
279 Lci1A e Lci2B foram os antígenos que obtiveram melhor concordância entre os
280 observadores, apresentando valores de 0,9797 e 0,9206, respectivamente. Em
281 seguida os antígenos recombinantes que apresentaram maior índice de
282 concordância na leitura foram: Lci8, Lci10, Lci7, Lci11, Lci13 e Lci6, em ordem
283 decrescente. As proteínas Lci5 e Lci4, foram os antígenos recombinantes que
284 obtiveram menor concordância entre as leituras dos observadores (Tabela 5).

285

286 **4. Discussão**

287

288 Em resumo, o presente estudo visa a seleção/identificação de um conjunto de
289 antígenos de *L. infantum* para serem utilizados em um teste diagnóstico para LVC.
290 Desta maneira foram utilizados para a triagem utilizando a técnica do MAPIA 12
291 antígenos recombinantes de *L. infantum* previamente selecionados. Esta ferramenta
292 evidenciou que há dois conjuntos de antígenos recombinantes (Lci1A, Lci2B, Lci8,
293 Lci12 e Lci4 ou Lci1A, Lci2B, Lci8, Lci12 e Lci5) com um alto potencial para o uso no
294 diagnóstico de LVC.

295 O MAPIA é uma ferramenta de triagem e vem sendo utilizada nos últimos
296 anos para seleção de antígenos recombinantes para diagnóstico de doenças
297 infecciosas. Essa técnica tem se mostrado mais vantajosa que o ELISA, devido ao
298 melhor custo-benefício apresentado, assim como, a obtenção de resultados em
299 menor espaço de tempo (LYASHCHENKO *et al.*, 2000; LYASHCHENKO,
300 GREENWALD, ESFANDIARI, GREENWALD, *et al.*, 2007). Além disso, a utilização
301 da membrana de nitrocelulose impregnada com antígenos recombinantes no MAPIA
302 tende a simular o desempenho destes antígenos em um teste diagnóstico

303 imunocromatográfico rápido, como o DPP®, devido a similaridade entre os ensaios
304 (LYASHCHENKO *et al.*, 2000).

305 Recentemente, um novo teste diagnóstico imunocromatográfico com a
306 utilização de antígeno recombinante (rK39) vêm sendo utilizado em alguns países do
307 mundo apresentando diferentes performances (OTRANTO *et al.*, 2005; RITMEIJER
308 *et al.*, 2006; OZERDEM *et al.*, 2009). No Brasil o teste imunocromatográfico rápido
309 DPP®-LVC tem como antígeno recombinante a proteína quimérica rK28. Esse é o
310 teste diagnosticado recomendado pelo Ministério da Saúde atualmente para triagem
311 de cães para o diagnóstico da LVC (Ministério da Saúde, 2011). No entanto, um
312 estudo demonstrou que apesar do DPP®-LVC apresentar especificidade de 96% e
313 sensibilidade de 98% para cães sintomáticos, no diagnóstico de LVC em cães
314 assintomáticos a detecção foi de apenas 47% dos cães (GRIMALDI *et al.*, (2012).
315 Assim, parte dos cães infectados por *L. infantum* podem não ser detectados em
316 inquéritos sorológicos realizados em regiões endêmicas utilizando o DPP®-LVC.
317 Este fator pode contribuir para a manutenção do ciclo do parasito nestas regiões,
318 dificultando a efetividade das medidas de controle da doença nesses locais.
319 Portanto, a utilização de novos antígenos recombinantes para o diagnóstico da LVC,
320 torna-se fundamental para ampliar a detecção de animais até então diagnosticados
321 como falso negativos aumentando assim a acurácia dos testes diagnósticos
322 aplicados pelo Ministério.

323 Dois antígenos recombinantes, aqui estudados, mostraram anteriormente
324 eficácia em ELISA para o diagnóstico da LVC, com sensibilidade de 96% e
325 especificidade de 92% para Lci1A e sensibilidade de 100% e especificidade de 95%
326 para Lci2B. Não observando-se reações cruzadas com soro de animais com
327 babesiose ou erliquiose, além de apresentar uma baixa reatividade cruzada com *L.*
328 *braziliensis* (2012). Em outro estudo que avaliou a reatividade das proteínas
329 recombinantes Lci1A, Lci2B, Lci3, Lci4 e Lci5, frente a soros de cães infectados por
330 *Leishmania*, foi observada sensibilidade de 72% e especificidade de 94% para
331 Lci1A, sensibilidade de 97% e especificidade de 97% para Lci2B, Lci3 apresentou
332 sensibilidade de 36% e especificidade de 97%, Lci4A apresentou sensibilidade de
333 82% e especificidade de 94% e Lci5A apresentou sensibilidade de 86% e
334 especificidade de 90% (2011). Esses dados são consonantes com os encontrados
335 no presente estudo, reforçando a potencialidade destes novos antígenos serem

336 empregados em testes diagnósticos, evidenciando que as proteínas recombinantes
337 Lci1A e Lci2B são fortes candidatas a comporem um futuro teste diagnóstico para
338 LVC. Além dessas duas proteínas recombinantes, outras podem vir a contribuir para
339 o aumento da efetividade do diagnóstico, como Lci4 e Lci5 que demonstraram
340 possuir relevância para compor um futuro teste diagnóstico. Nenhuma das proteínas
341 utilizadas individualmente foi capaz de identificar 100% dos soros utilizados no
342 ensaio, evidenciando a possibilidade de que um teste multi-antígenos pode ser uma
343 alternativa para um diagnóstico mais eficiente para LVC, conforme observamos nos
344 conjuntos de antígenos formados (Tabela 4).

345 Antígenos recombinantes quando utilizados conjuntamente podem aumentar
346 a sensibilidade e especificidade de um teste diagnóstico, principalmente pelo fato de
347 que diferentes indivíduos quando infectados por um mesmo parasita, podem
348 apresentar perfis de respostas imunológicas distintas (2007). Assim, uma
349 combinação de antígenos, em um mesmo teste diagnóstico, pode aumentar a
350 detecção de animais soropositivos.

351 Os antígenos recombinantes Lci1A e Lci2B obtiveram o melhor desempenho
352 na triagem por MAPIA, evidenciando um alto potencial para o uso no diagnóstico de
353 LVC. Sendo que quando associados a outros antígenos recombinantes estudados,
354 com a adição de mais três proteínas recombinantes (Lci8, Lci12, Lci4 ou Lci5),
355 ocorreu aumento da sensibilidade do teste, evidenciando assim, a importância de
356 um teste multi-antígeno.

357 Com o MAPIA foi possível identificar dois conjuntos de cinco antígenos
358 recombinantes cada dentre as dozes proteínas avaliadas no teste. Estas proteínas
359 deverão ter sua performance avaliada em um teste imunodiagnóstico DPP no
360 formato multi-antígenos para detecção de LVC.

361

362 5. Referências

363

364 ADLER, S.; THEODOR, O. Investigations on Mediterranean Kala Azar. VI.--Canine Visceral
365 Leishmaniasis. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 110, n. 768, p. 402-412,
366 1932.

367

368 ALEXANDER, J.; SATOSKAR, A. R.; RUSSELL, D. G. Leishmania species: models of intracellular
369 parasitism. **J Cell Sci**, v. 112 Pt 18, p. 2993-3002, Sep 1999.

370

371 ALVAR, J. et al. Canine leishmaniasis. **Adv Parasitol**, v. 57, p. 1-88, 2004.

372

373 ATHANASIOU, L. V. et al. A cross-sectional sero-epidemiological study of canine leishmaniasis in
374 Greek mainland. **Acta Trop**, Feb 16 2012.

375

376 BADARO, R. et al. rK39: a cloned antigen of Leishmania chagasi that predicts active visceral
377 leishmaniasis. **J Infect Dis**, v. 173, n. 3, p. 758-61, Mar 1996.

378

379 BERN, C.; COURTENAY, O.; ALVAR, J. Of cattle, sand flies and men: a systematic review of risk factor
380 analyses for South Asian visceral leishmaniasis and implications for elimination. **PLoS Negl Trop Dis**,
381 v. 4, n. 2, p. e599, 2010.

382

383 BERN, C.; MAGUIRE, J. H.; ALVAR, J. Complexities of assessing the disease burden attributable to
384 leishmaniasis. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 2, n. 10, p. e313, 2008.

385

386 BURNS, J. M., JR. et al. Molecular characterization of a kinesin-related antigen of Leishmania chagasi
387 that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. **Proc Natl Acad Sci U S**
388 **A**, v. 90, n. 2, p. 775-9, Jan 15 1993.

389

390 CARRANZA-TAMAYO, C. O. et al. Autochthonous visceral leishmaniasis in Brasilia, Federal District,
391 Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 43, n. 4, p. 396-9, Jul-Aug 2010.

392

393 CARVALHO, S. F. et al. Performance of recombinant K39 antigen in the diagnosis of Brazilian visceral
394 leishmaniasis. **Am J Trop Med Hyg**, v. 68, n. 3, p. 321-4, Mar 2003.

395

396 CHAPPUIS, F. et al. A meta-analysis of the diagnostic performance of the direct agglutination test
397 and rK39 dipstick for visceral leishmaniasis. **BMJ**, v. 333, n. 7571, p. 723, Oct 7 2006.

398

399 COSTA, M. M. et al. Improved canine and human visceral leishmaniasis immunodiagnosis using
400 combinations of synthetic peptides in enzyme-linked immunosorbent assay. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6,
401 n. 5, p. e1622, 2012.

402

- 403 COURA-VITAL, W. et al. Prevalence and factors associated with *Leishmania infantum* infection of
404 dogs from an urban area of Brazil as identified by molecular methods. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 5, n. 8,
405 p. e1291, Aug 2011.
- 406
407 DA SILVA TENÓRIO, M. et al. Visceral Leishmaniasis in a Captive Crab-Eating Fox *Cerdocyon thous*.
408 **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 42, n. 4, p. 608-616, 2011.
- 409
410 DE LIMA, V. M. et al. Comparison between ELISA using total antigen and immunochromatography
411 with antigen rK39 in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Vet Parasitol**, v. 173, n. 3-4, p.
412 330-3, Oct 29 2010.
- 413
414 DE SANTIS, B. et al. Characterization of *Leishmania infantum* species in dogs from the urban area of
415 Cuiaba, State of Mato Grosso, Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 44, n. 6, p. 771-3, Nov-Dec 2011.
- 416
417 DE SOUZA, C. M. et al. Evaluation of an ELISA for canine leishmaniasis immunodiagnostic using
418 recombinant proteins. **Parasite Immunology**, v. 34, n. 1, p. 1-7, 2012.
- 419
420 DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comp Immunol Microbiol Infect**
421 **Dis**, v. 27, n. 5, p. 305-18, Sep 2004.
- 422
423 DUNCAN, A. E. et al. Application of Elephant TB STAT-PAK assay and MAPIA (multi-antigen print
424 immunoassay) for detection of tuberculosis and monitoring of treatment in black rhinoceros (*Diceros*
425 *bicornis*). **J Zoo Wildl Med**, v. 40, n. 4, p. 781-5, Dec 2009.
- 426
427 FELIPE, I. M. et al. *Leishmania* infection in humans, dogs and sandflies in a visceral leishmaniasis
428 endemic area in Maranhao, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 2, p. 207-11, Mar 2011.
- 429
430 FENTON, K. A. et al. Comparison of three immunodiagnostic assays for antemortem detection of
431 *Mycobacterium bovis* stimulation in domestic cats. **J Vet Diagn Invest**, v. 22, n. 5, p. 724-9, Sep 2010.
- 432
433 GREENE, C. E. Ehrlichiosis, Neorickettiosis, Anaplasmosis, and Wolbachia Infection ;Trypanosomiasis;
434 Babesiosis. In: ELSEVIER, S. (Ed.). **Infectious Diseases of the Dog and Cat**, 2006. cap. 28; 72; 77,
435 p.209-210; 678-679; 728-729.
- 436
437 GRIMALDI, G., JR. et al. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path
438 Platform technology (DPP(R) CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis.
439 **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 106, n. 1, p. 54-9, Jan 2012.
- 440
441 HANDALI, S. et al. Multiantigen print immunoassay for comparison of diagnostic antigens for *Taenia*
442 *solium* cysticercosis and taeniasis. **Clin Vaccine Immunol**, v. 17, n. 1, p. 68-72, Jan 2010.
- 443

- 444 HARHAY, M. O. et al. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. **Trends Parasitol**, v. 27, n. 9,
445 p. 403-9, Sep 2011.
- 446
447 HIMSWORTH, C. G. et al. Comparison of test performance and evaluation of novel immunoassays for
448 tuberculosis in a captive herd of wood bison naturally infected with *Mycobacterium bovis*. **J Wildl**
449 **Dis**, v. 46, n. 1, p. 78-86, Jan 2010.
- 450
451 KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nat Rev Microbiol**, v.
452 9, n. 8, p. 604-15, Aug 2011.
- 453
454 LACHAUD, L. et al. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine
455 visceral leishmaniasis. **J Clin Microbiol**, v. 40, n. 1, p. 210-5, Jan 2002.
- 456
457 LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
458 **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-5, Aug 15 1970.
- 459
460 LEMOS, E. M. et al. Canine visceral leishmaniasis: performance of a rapid diagnostic test (Kalazar
461 Detect) in dogs with and without signs of the disease. **Acta Trop**, v. 107, n. 2, p. 205-7, Aug 2008.
- 462
463 LOMBARDO, G. et al. Detection of *Leishmania infantum* DNA by real-time PCR in canine oral and
464 conjunctival swabs and comparison with other diagnostic techniques. **Vet Parasitol**, v. 184, n. 1, p.
465 10-7, Feb 28 2012.
- 466
467 LUPPI, M. M. et al. Visceral leishmaniasis in captive wild canids in Brazil. **Vet Parasitol**, v. 155, n. 1-2,
468 p. 146-51, Aug 1 2008.
- 469
470 LYASHCHENKO, K. P. et al. PrimaTB STAT-PAK assay, a novel, rapid lateral-flow test for tuberculosis in
471 nonhuman primates. **Clin Vaccine Immunol**, v. 14, n. 9, p. 1158-64, Sep 2007.
- 472
473 LYASHCHENKO, K. P. et al. A multi-antigen print immunoassay for the development of serological
474 diagnosis of infectious diseases. **J Immunol Methods**, v. 242, n. 1-2, p. 91-100, Aug 28 2000.
- 475
476 MAIA, C.; CAMPINO, L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to
477 infection. **Vet Parasitol**, v. 158, n. 4, p. 274-87, Dec 20 2008.
- 478
479 MANCIANTI, F. et al. Studies on canine leishmaniasis control. 1. Evolution of infection of different
480 clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v.
481 82, n. 4, p. 566-7, 1988.
- 482
483 METTLER, M. et al. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, an immunofluorescent-
484 antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and gel tests) for serological

- 485 diagnosis of symptomatic and asymptomatic Leishmania infections in dogs. **J Clin Microbiol**, v. 43, n.
486 11, p. 5515-9, Nov 2005.
- 487
- 488 MICHALSKY, E. M. et al. Infectivity of seropositive dogs, showing different clinical forms of
489 leishmaniasis, to Lutzomyia longipalpis phlebotomine sand flies. **Vet Parasitol**, v. 147, n. 1-2, p. 67-
490 76, Jun 20 2007.
- 491
- 492 OLIVEIRA, G. G. et al. Characterization of novel Leishmania infantum recombinant proteins encoded
493 by genes from five families with distinct capacities for serodiagnosis of canine and human visceral
494 leishmaniasis. **Am J Trop Med Hyg**, v. 85, n. 6, p. 1025-34, Dec 2011.
- 495
- 496 OTRANTO, D. et al. Recombinant K39 dipstick immunochromatographic test: a new tool for the
497 serodiagnosis of canine leishmaniasis. **J Vet Diagn Invest**, v. 17, n. 1, p. 32-7, Jan 2005.
- 498
- 499 OTRANTO, D. et al. Rapid immunochromatographic test for serodiagnosis of canine leishmaniasis. **J**
500 **Clin Microbiol**, v. 42, n. 6, p. 2769-70, Jun 2004.
- 501
- 502 OZERDEM, D. et al. Comparison of microscopic examination, rK39, and PCR for visceral leishmaniasis
503 diagnosis in Turkey. **Parasitol Res**, v. 106, n. 1, p. 197-200, Dec 2009.
- 504
- 505 PAPADOGIANNAKIS, E. et al. Molecular detection of Leishmania infantum in wild rodents (Rattus
506 norvegicus) in Greece. **Zoonoses Public Health**, v. 57, n. 7-8, p. e23-5, Dec 2010.
- 507
- 508 PASTOR-SANTIAGO, J. A. et al. American visceral leishmaniasis in Chiapas, Mexico. **Am J Trop Med**
509 **Hyg**, v. 86, n. 1, p. 108-14, Jan 2012.
- 510
- 511 PATTABHI, S. et al. Design, development and evaluation of rK28-based point-of-care tests for
512 improving rapid diagnosis of visceral leishmaniasis. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 4, n. 9, 2010.
- 513
- 514 PORROZZI, R. et al. Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays based on crude
515 and recombinant leishmanial antigens for serodiagnosis of symptomatic and asymptomatic
516 Leishmania infantum visceral infections in dogs. **Clin Vaccine Immunol**, v. 14, n. 5, p. 544-8, May
517 2007.
- 518
- 519 POSTIGO, J. A. Leishmaniasis in the World Health Organization Eastern Mediterranean Region. **Int J**
520 **Antimicrob Agents**, v. 36 Suppl 1, p. S62-5, Nov 2010.
- 521
- 522 RHODES, S. G. et al. Comparative study of IFN γ and antibody tests for feline tuberculosis. **Vet**
523 **Immunol Immunopathol**, v. 144, n. 1-2, p. 129-34, Nov 15 2011.
- 524
- 525 RITMEIJER, K. et al. Evaluation of a new recombinant K39 rapid diagnostic test for Sudanese visceral
526 leishmaniasis. **Am J Trop Med Hyg**, v. 74, n. 1, p. 76-80, Jan 2006.

- 527
528 SACKS, D. L. Leishmania-sand fly interactions controlling species-specific vector competence. **Cell**
529 **Microbiol**, v. 3, n. 4, p. 189-96, Apr 2001.
- 530
531 SAÚDE, M. D. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. SAÚDE, S. D. V. E. 2006.
- 532
533 SCHALLIG, H. D.; CANTO-CAVALHEIRO, M.; DA SILVA, E. S. Evaluation of the direct agglutination test
534 and the rK39 dipstick test for the sero-diagnosis of visceral leishmaniasis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.
535 97, n. 7, p. 1015-8, Oct 2002.
- 536
537 SCHALLIG, H. D. et al. Didelphis marsupialis (common opossum): a potential reservoir host for
538 zoonotic leishmaniasis in the metropolitan region of Belo Horizonte (Minas Gerais, Brazil). **Vector**
539 **Borne Zoonotic Dis**, v. 7, n. 3, p. 387-93, Fall 2007.
- 540
541 SHANG, L. M. et al. The prevalence of canine Leishmania infantum infection in Sichuan Province,
542 southwestern China detected by real time PCR. **Parasit Vectors**, v. 4, n. 1, p. 173, 2011.
- 543
544 SILVA, D. A. et al. Laboratory tests performed on Leishmania seroreactive dogs euthanized by the
545 leishmaniasis control program. **Vet Parasitol**, v. 179, n. 1-3, p. 257-61, Jun 30 2011.
- 546
547 SLAPPENDEL, R. J. Canine leishmaniasis. A review based on 95 cases in The Netherlands. **Vet Q**, v. 10,
548 n. 1, p. 1-16, Jan 1988.
- 549
550 SOARES, M. R. et al. Canine visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil: Relationship between clinical
551 features and infectivity for sand flies. **Acta Trop**, v. 117, n. 1, p. 6-9, Jan 2011.
- 552
553 SOLANO-GALLEGO, L. et al. Prevalence of Leishmania infantum infection in dogs living in an area of
554 canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. **J Clin Microbiol**, v. 39, n.
555 2, p. 560-3, Feb 2001.
- 556
557 SOLCA, M. S. et al. Qualitative and quantitative polymerase chain reaction (PCR) for detection of
558 Leishmania in spleen samples from naturally infected dogs. **Vet Parasitol**, v. 184, n. 2-4, p. 133-40,
559 Mar 23 2012.
- 560
561 SRIVASTAVA, P. et al. Diagnosis of visceral leishmaniasis. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 105, n. 1, p.
562 1-6, Jan 2011.
- 563
564 SRIVIDYA, G. et al. Diagnosis of visceral leishmaniasis: developments over the last decade. **Parasitol**
565 **Res**, Nov 9 2011.
- 566
567 TEIXEIRA, M. C. et al. A strategy for identifying serodiagnostically relevant antigens of Leishmania or
568 other pathogens in genetic libraries. **Biologicals**, v. 35, n. 1, p. 51-4, Mar 2007.

- 569
570 VERÇOSA, B. L. et al. Transmission potential, skin inflammatory response, and parasitism of
571 symptomatic and asymptomatic dogs with visceral leishmaniasis. **BMC Vet Res**, v. 4, p. 45, 2008.
- 572
573 VUYLSTEKE, B. et al. High prevalence of HIV and sexually transmitted infections among male sex
574 workers in Abidjan, Cote d'Ivoire: need for services tailored to their needs. **Sex Transm Infect**, Feb 11
575 2012.
- 576
577 WANG, Y. et al. Determinants of antigenicity and specificity in immune response for protein
578 sequences. **BMC Bioinformatics**, v. 12, p. 251, 2011.
- 579
580 WHO. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control
581 of Leishmaniases. p. 202, 2010.
- 582
583 WU, L. T. et al. Nucleic acid dipstick test for molecular diagnosis of pandemic H1N1. **J Clin Microbiol**,
584 v. 48, n. 10, p. 3608-13, Oct 2010.
- 585

- 586 Tabela 1- Informações referentes aos antígenos recombinantes produzidos e purificados
- 587 Tabela 2 – Reatividade em MAPIA dos soros selecionados de cães com diferentes quadros clínicos
588 de LVC
- 589 Tabela 3 – Reatividade em MAPIA dos soros selecionados de cães com infecção heteróloga e
590 negativos
- 591 Tabela 4 – Análise combinatória entre as proteínas recombinantes
- 592 Tabela 5 – Índice de concordância entre as leituras realizadas por diferentes avaliadores.
- 593 Tabela 6 – Tabela contendo a análise estatística das proteínas recombinantes em relação a
594 sensibilidade encontrada no MAPIA
- 595

596 Figura 1 – Imagem do resultado do MAPIA, ilustrando as tiras impregnadas com antígenos após a
597 incubação com soros, evidenciando a presença e ausência de bandas. Seta 1 indica a presença de
598 reatividade (presença de banda). Seta 2 indica ausência de reatividade (ausência de banda).

599 Figura 2 – Gel SDS-PAGE 10% da expressão proteica da *E. coli* BL21(DE3)pLysS com o inserto de
600 Lci2B durante produção. B – Gel SDS-PAGE 10% da expressão proteica da *E. coli* BL21(DE3)pLysS
601 sem o inserto de Lci2B. C – Gel SDS-PAGE 10% da purificação do antígeno Lci2B, após separação
602 cromatográfica.

603

604

605

Tabela 1

Proteína	Função da Proteína
Lci1A	HSP70
Lci2B	Proteína motora, N-cinesina
Lci3	Proteína hipotética
Lci4	Poli-ubiquitina
Lci5	Proteína hipotética
Lci6	Proteína associada a Microtúbulo GB4
Lci7	Proteína 1 induzida por estresse ST11
Lci8	Proteína de membrana
Lci10	Proteína hipotética
Lci11	Proteína hipotética
Lci12	Proteína hipotética
Lci13	HSP70mit

606

607

Tabela 2

Quadro Clínico	Lci1A	Lci2B	Lci3	Lci4	Lci5	Lci6	Lci7	Lci8	Lci10	Lci11	Lci12	Lci13	12 Lcis
Assintomático (n=2)	1	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Oligossintomático (n=15)	10	11	4	5	5	1	3	2	2	4	5	2	14
Polissintomático (n=22)	16	17	4	7	7	-	5	1	1	4	8	1	20
Total (n=39)	27 (69%)	29 (74%)	9 (23%)	13 (33%)	12 (31%)	1 (3%)	8 (21%)	3 (8%)	3 (8%)	8 (21%)	13 (33%)	3 (8%)	34 (87%)

609 Tabela 3

Soros	Lci1A	Lci2B	Lci3	Lci4	Lci5	Lci6	Lci7	Lci8	Lci11	Lci10	Lci12	Lci13	12 Lcis
Negativo (n=40)	-	1	2	2	2	1	3	1	2	2	4	3	6
Babesia (n=10)	1	2	3	3	3	-	1	-	3	1	2	2	4
Erliquia (n=11)	-	-	-	1	1	-	1	-	1	-	1	1	2
Tegumentar (n=10)	6	3	-	2	2	-	1	-	-	-	-	-	6
Tripanossoma (n=10)	1	1	1	1	1	-	1	-	1	-	3	-	3
Total (n=81)	8 (90%)	7 (91%)	7 (91%)	11 (86%)	9 (89%)	1 (99%)	7 (91%)	1 (99%)	7 (91%)	3 (96%)	10 (88%)	6 (93%)	21 (74%)

610

611 Tabela.4

Combinações (n=120)	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)
12 proteínas juntas	34/39 (87)	60/81 (74)
Lci1	27/39 (69)	73/81 (90)
Lci2	29/39 (74)	75/81 (93)
Lci1 e Lci2	30/39 (77)	71/81 (88)
Lci1, Lci2 e Lci8	31/39 (79)	70/81 (86)
Lci1, Lci2, Lci8 e Lci10	32/39 (82)	69/81 (85)
Lci1, Lci2, Lci8 e Lci3	32/39 (82)	68/81 (84)
Lci1, Lci2, Lci8 e Lci11	32/39 (82)	67/81 (83)
Lci1, Lci2, Lci8, Lci10 e Lci12	33/39 (85)	63/81 (78)
Lci1, Lci2, Lci8, Lci3 e Lci12	33/39 (85)	62/81 (77)
Lci1, Lci2, Lci8, Lci11 e Lci12	33/39 (85)	62/81 (77)
Lci1, Lci2, Lci8, Lci12 e Lci4	34/39 (87)	62/81 (77)
Lci1, Lci2, Lci8, Lci12 e Lci5	34/39 (87)	62/81 (77)
Lci1, Lci2, Lci8, Lci10 (ou Lci3 ou Lci11), Lci12 e Lci4 (ou Lci5)	34/39 (87)	62/81 (77)

612

613

Tabela 5

	Lci1A	Lci2B	Lci3	Lci4	Lci5	Lci6	Lci7	Lci8	Lci10	Lci11	Lci12	Lci13
Observador 1	36	37	15	23	22	2	15	4	6	15	23	9
Observador 2	34	36	18	48	46	4	20	6	9	20	36	5
Kappa	0,980	0,921	0,640	0,504	0,531	0,659	0,767	0,792	0,787	0,767	0,624	0,714

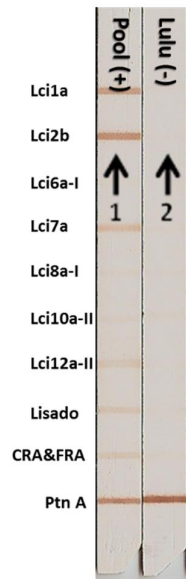
614

615 Tabela 6

Proteína	Lci2B (74%)	Lci1A e Lci2B (77%)	Lci4 (33%)	Lci5 (31%)	Lci12 (33%)	Combi A ¹ (87%)	Combi B ² (87%)
Lci1A (69%)	0,80	0,61	0,003*	0,0014*	0,003*	0,098	0,098
Lci2B (74%)		1	0,0003*	0,0001*	0,0003*	0,25	0,25
Lci1A e Lci2B (77%)			0,0002*	0,0001*	0,0002*	0,38	0,38
Lci4 (33%)				1	1	0,0001*	0,0001*
Lci5 (31%)					1	0,0001*	0,0001*
Lci12 (33%)						0,0001*	0,0001*
Combi A (87%)							1

616 ¹CombiA = (Lci1A, Lci2B, Lci8, Lci12 e Lci4); ²CombiB = (Lci1A, Lci2B, Lci8, Lci12 e Lci5); *Diferença significativa

617



618

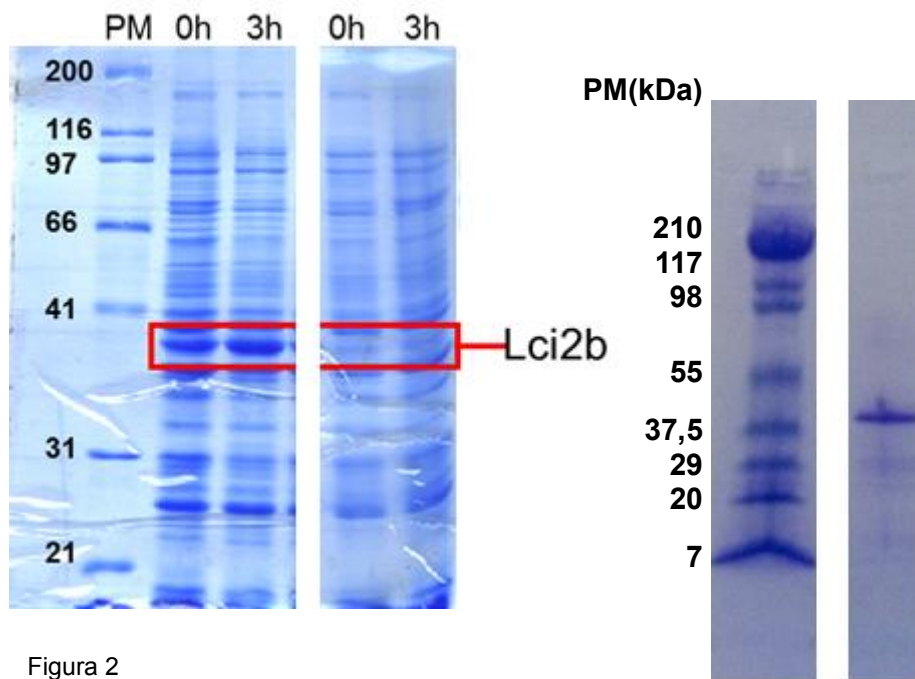
619

Figura 1

620

621

622



623

624

Figura 2