

Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina: grandes avanços tecnológicos e baixa aplicação prática

Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: major technological advances and few practical applications

Diagnóstico de la Leishmaniasis Visceral Canina: grandes avances tecnológicos y baja aplicación práctica

Angélica Rosa Faria

Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil

Hélida Monteiro de Andrade

Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil

RESUMO

A leishmaniose visceral é a mais severa dentre as leishmanioses e sua forma zoonótica, causada por *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*, representa 20% do registro de casos da leishmaniose visceral humana mundial. Nas áreas urbanas e periurbanas dos trópicos, a incidência dessa doença é crescente. Uma das medidas de controle da leishmaniose visceral adotada no Brasil é a identificação e eliminação de cães infectados, considerados os principais reservatórios da doença urbana. Nesse contexto, o diagnóstico confiável nesses animais desempenha um papel fundamental no controle da doença. Entretanto, ainda não se dispõe de um método com sensibilidade e especificidade ideais, que forneça um diagnóstico rápido e seguro para a leishmaniose visceral canina. Neste trabalho foram revisadas as vantagens e desvantagens dos principais métodos atualmente disponíveis para o diagnóstico canino, as perspectivas com relação a novas metodologias e a novos antígenos a serem utilizados no diagnóstico da leishmaniose visceral canina e, por fim, discutimos as dificuldades para aplicação prática dessas novas metodologias.

Palavras-chave: Diagnóstico; Leishmaniose Visceral Canina; *Leishmania infantum chagasi*.

INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças infecciosas, causadas por diferentes espécies de protozoários digenéticos da ordem Kinetoplastidae, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania*. Esse grupo de doenças é transmitido pela picada do inseto vetor, dípteros da família Psychodidae, subfamília Phlebotominae¹. Elas constituem doenças endêmicas em países tropicais, subtropicais e temperados, ocorrendo em 98 países do mundo². Segundo o índice DALY (*Disability-Adjusted Life Years*), que foi desenvolvido pela Organização Mundial de Saúde (OMS) para avaliar a relevância de cada doença, são perdidos 2 milhões de anos de vida devido às leishmanioses. Esse índice reflete o tempo perdido de vida devido a doença debilitante ou devido a morte prematura³. Ultimamente tem ocorrido uma expansão das áreas endêmicas, o que acarreta aumento no número de casos registrados da doença. Considerando que em poucos países a notificação é compulsória, estima-se que a incidência das leishmanioses seja subestimada. De acordo com a OMS, estima-se que 2 milhões de novos casos ocorram anualmente⁴.

As leishmanioses são classicamente divididas em leishmaniose visceral (LV) e leishmaniose tegumentar (LT), sendo causadas por diferentes espécies do parasito. A infecção, nas diferentes formas da doença, caracteriza-se por parasitismo de células do sistema fagocítico mononuclear da derme, mucosas ou vísceras, como fígado, baço e medula óssea⁵. A LV pode ser zoonótica ou antroponótica, sendo que esta última forma de transmissão ocorre apenas em países onde o agente etiológico é *Leishmania donovani* como Bangladesh, Índia e Nepal⁶. Nos países onde a LV é zoonótica, como é o caso do Brasil, os cães desempenham papel fundamental na epidemiologia, sendo considerados os principais reservatórios para a doença humana, principalmente devido à riqueza de formas amastigotas na pele do animal⁷. A detecção precoce de cães infectados é fundamental para impedir a expansão da doença e é uma prerrogativa essencial para o controle da mesma⁸. Como medidas preconizadas pelo Ministério da Saúde (MS) para o controle da LV, além da eutanásia de cães infectados, são indicadas também o controle de vetores, o diagnóstico e o tratamento de casos humanos⁹.

O processo de eliminação de reservatórios infectados requer métodos de diagnóstico confiáveis. Entretanto, o desempenho insatisfatório dos métodos de diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC) tem subestimado o número de cães infectados, o que dificulta o controle da doença¹⁰. Existe atualmente uma grande variedade de

Correspondência / Correspondence / Correspondencia:

Angélica Rosa Faria
Av. Antônio Carlos, 6627.
Bairro: Pampulha Belo Horizonte-Minas Gerais-Brasil
Tel.: +55 (31) 3409-3010
E-mail: angelicarosafaria@gmail.com

métodos para diagnóstico canino que empregam diversos antígenos. Porém, ainda não está disponível um antígeno altamente específico e que seja empregado com um método de fácil execução. Por essa razão, o diagnóstico correto da LVC ainda é um desafio, apesar dos progressos observados no desenvolvimento de vários métodos⁸. Atualmente, realizam-se testes parasitológicos, testes sorológicos e testes moleculares, cada um apresentando os seus pontos positivos, mas também os negativos.

DIAGNÓSTICO CLÍNICO

O diagnóstico clínico da LVC é bastante complexo. Apesar da ausência de sinais clínicos patognomônicos, aqueles mais comuns são: alterações cutâneas, linfadenomegalia local ou generalizada, perda de peso, aumento do tamanho do baço e do fígado, onicogribose e apatia⁸. A suspeita clínica é relativamente simples em cães sintomáticos, o que não representa a totalidade dos cães soropositivos^{11,12}. Em torno de 60% a 80% dos cães que vivem em áreas endêmicas podem ter contato com o parasito e não desenvolver sinais clínicos da doença, que pode permanecer inaparente por longos períodos¹³. Entretanto, já foi demonstrado que cães infectados assintomáticos podem transmitir o parasito para flebotomíneos, tendo um papel ativo na transmissão da doença^{14,15,16}. Além disso, a maioria dos sinais observados é comum a outras patologias caninas, como por exemplo, erliquiose e babesiose¹⁷, e a imunossupressão causada pela infecção pode gerar infecções oportunistas, dificultando ainda mais o diagnóstico clínico¹⁸. Desta maneira, a associação entre os parâmetros clínicos, epidemiológicos, parasitológicos e sorológicos faz-se necessária para o diagnóstico definitivo¹⁹.

DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO

Métodos parasitológicos que envolvem a punção de órgãos, apesar de fornecerem a certeza da infecção, por possibilitarem a visualização do parasito, são bastante invasivos. Estes métodos podem apresentar especificidades que chegam a 100%; entretanto, a sensibilidade é variável, uma vez que a distribuição tecidual não é homogênea²⁰. Formas amastigotas do parasito podem ser observadas em biópsia de pele; aspirados de linfonodos, medula óssea e baço; e biópsia hepática. O material obtido é corado com corantes de rotina, tais como Giemsa, Wright e Panótico⁹. Os aspirados de medula e linfonodos são os mais usados pelos clínicos veterinários para diagnosticar a LVC²¹. Mas esses métodos podem gerar resultados falso-negativos devido ao baixo número de parasitos contidos nas amostras, especialmente em cães assintomáticos¹⁷.

A punção medular pode apresentar sensibilidades variando entre 60 e 85%^{22,23}. Entretanto, valores de sensibilidade mais elevados (até 98%) são alcançados quando se utiliza aspirado do baço, mas o risco deste procedimento é maior, requerendo profissional experiente para realizar tal punção²³.

Outros métodos parasitológicos consistem na cultura *in vitro* de fragmentos de tecidos ou aspirados e na inoculação em animais de laboratório, principalmente

hamsters. Esses testes não são normalmente empregados na rotina, uma vez que são necessários alguns meses para se verificar a positividade de uma inoculação. Juntamente com a análise histopatológica de tecidos infectados, esses métodos carecem de sensibilidade e aplicabilidade em campo, além de serem bastante invasivos⁵. A análise histopatológica alcança sensibilidade de até 40% quando realizada em linfonodos poplíteos²⁴, enquanto a cultura de parasitos pode apresentar sensibilidade de até 77%²⁵.

Variantes dos métodos parasitológicos são a imunohistoquímica e os métodos moleculares, descritos a seguir.

IMUNO-HISTOQUÍMICA

A imunohistoquímica é uma técnica de diagnóstico direto que se baseia na detecção do parasito em secções coradas de tecidos. Em 1988, foi descrita a identificação de amastigotas de *L. donovani* em cortes histológicos de pele, fígado e baço de cães, dentre outros locais, pela incubação com soro de cães infectados, que atuaram como anticorpos primários, e posterior revelação por anticorpos secundários marcados com peroxidase. Essa técnica, desde o seu desenvolvimento, forneceu resultados consistentes no diagnóstico canino²⁶. Todavia, a utilização de anticorpos monoclonais como anticorpos primários foi posteriormente difundida, o que atribuiu maior reprodutibilidade ao teste, em detrimento do custo²⁷. Recentemente, uma técnica descrita por Tafuri e colaboradores em 2004, utilizando soro hiperimune de cão naturalmente infectado com *L. chagasi* (como anticorpo primário), tornou o teste mais aplicável e menos oneroso, quando comparado com os que usam anticorpos monoclonais. A detecção é feita utilizando anticorpo secundário biotinilado de cabra anticamundongo, e demonstrando especificidades compatíveis com aquelas obtidas empregando-se anticorpos monoclonais²⁸. Analisando biópsia de pele de diferentes regiões anatômicas, a imunohistoquímica obteve sensibilidade 62,1%²⁹. De maneira similar, em linfonodos poplíteos, a mesma técnica apresentou sensibilidade de 92,6%; 60% e 73,9% em cães sintomáticos, oligossintomáticos e assintomáticos, respectivamente²⁴.

DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Após a década de 1980, foram desenvolvidas diversas técnicas de biologia molecular para detectar e identificar parasitos do gênero *Leishmania*, sem a necessidade de se isolar o parasito em uma cultura^{20,30,31,32}. Essa vertente molecular, conduzida, sobretudo, pela reação em cadeia da polimerase (PCR), é baseada na amplificação de oligonucleotídeos que formam uma sequência conhecida do parasito. Este teste pode ser realizado em diferentes amostras, tais como aspirados de medula, aspirados de linfonodos, sangue e urina e biópsias de pele. Isso é uma grande vantagem, pois torna o método menos invasivo⁷.

A sensibilidade da PCR é bastante variável de acordo com a amostra utilizada na reação, bem como do iniciador empregado³³. Em amostras de sangue total, apesar da vantagem de ter uma coleta menos invasiva, a sensibilidade mostra-se inferior àquela obtida com outros

tecidos. Em um estudo que utilizou sangue total de cães positivos para leishmaniose por meio da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) (n = 18) e iniciadores cujo alvo foi a região conservada do DNA do cinetoplasto (kDNA), nenhum deles mostrou-se positivo pela PCR³⁴. Uma hipótese para explicar tal resultado é o baixo número de parasitos presentes no sangue, o que já foi demonstrado por outros autores^{35,36}. Resultados variáveis e conflitantes com relação à sensibilidade da PCR podem ser observados em diferentes amostras caninas. A distribuição heterogênea dos parasitos em cada tecido, devido ao tropismo da cepa e também à resposta imune local, pode explicar tais variações⁸. Quinell e colaboradores demonstraram, num estudo longitudinal em cães naturalmente infectados, que a sensibilidade da PCR era mais elevada logo após a infecção; posteriormente, declinou à metade³⁷. Além disso, há evidências da interferência dos grupos heme, que atuam como inibidores da enzima *Taq polimerase*^{38,39}. A pele tem sido um dos tecidos mais utilizados e apresenta como vantagens, além do alto parasitismo, a facilidade de obtenção e a distribuição homogênea de parasitos independente da região do corpo na qual foi coletada, como já demonstrado²⁹.

O método de PCR em tempo real, técnica desenvolvida por Christian A. Heid em 1996⁴⁰, também pode ser utilizado para diagnóstico da LVC. A vantagem apresentada por esse método consiste no monitoramento contínuo da amplificação do DNA do parasito, o que permite a quantificação parasitária em diferentes amostras⁸. Dessa maneira, a quantificação dos parasitos por essa técnica pode ser usada para elucidar o *status* de cães positivos para a PCR convencional, especialmente em áreas endêmicas⁴¹. Ao contrário da PCR convencional, que fornece apenas resultado qualitativo, o método de PCR em tempo real fornece uma gama de resultados refletindo a carga parasitária do animal. Essa técnica permite a quantificação do parasito desde um número mínimo de 0,03 parasitos por reação, o que corresponde a aproximadamente 2 fg de DNA⁴². Quaresma e colaboradores, em um estudo realizado com 217 cães com sorologia positiva para LVC, observaram que a carga parasitária não apresentava diferença significativa entre cães sintomáticos e assintomáticos. Além disso, foi determinado que a carga parasitária obtida de amostras de medula óssea foi mais elevada que aquela obtida de amostras de sangue periférico⁴³.

A investigação de métodos não invasivos tem sido uma abordagem explorada na busca por uma coleta menos traumática para os cães envolvidos. A coleta de material exfoliativo do epitélio conjuntival de cães para realização de PCR demonstrou ser um método bastante sensível, tendo sido capaz de detectar o parasito em 80% dos cães testados⁴⁴. Em outro trabalho, a sensibilidade alcançou 97% e a especificidade, 67%⁴⁵. Além disso, alguns grupos pesquisam a utilização de urina de cães para avaliação do prognóstico da doença. Esse tipo de amostra é utilizada para realização de PCR em tempo real⁴⁶ e *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA)⁴⁷. Além disso, já foi

demonstrado o achado de DNA de *Leishmania* em sêmen de cães infectados⁴⁸. A utilização de um swab que coleta amostras da mucosa oral canina foi avaliada, demonstrando a presença de DNA de *Leishmania* por PCR, mas apresentando baixa sensibilidade (15%)⁴⁹. Isso demonstra algumas perspectivas da utilização de diferentes amostras a serem utilizadas no diagnóstico da LVC.

DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO

No Brasil, a eliminação de cães infectados é recomendada pelo MS como medida de controle da LV; por isso um diagnóstico de baixo custo e alta confiabilidade é necessário para a triagem desses reservatórios. Com a intenção de se evitar o uso de métodos invasivos e considerando que a resposta humoral na LVC é geralmente muito intensa, com altos níveis de imunoglobulinas, o diagnóstico passou a ser focado em métodos sorológicos^{7,17}. Assim, diversos métodos sorológicos foram desenvolvidos e são bastante utilizados para o diagnóstico canino.

A reação de fixação do complemento, atualmente em desuso, foi bastante realizada no Brasil nas décadas de 1940 e 1950^{50,51}. Com a demonstração da possibilidade de se realizar essa reação em eluatos de sangue colhidos em papel de filtro, essa técnica tornou-se largamente difundida nesse período⁵². A ativação do sistema de complemento por ligação antígeno-anticorpo resulta na geração de complexos de ataque à membrana, capaz de destruir membranas celulares. Havendo ligação dos anticorpos anti-*Leishmania* a hemácias, ocorrerá hemólise, o que é usado para mensuração (análise qualitativa) dos níveis de anticorpos⁵³. Esse método pode apresentar reações cruzadas com outros tripanossomatídeos em títulos baixos, além de ser uma técnica complexa e trabalhosa.

A hemaglutinação, teste desenvolvido na década de 1980 por Tomizawa⁵⁴, permite a detecção de imunoglobulinas contra uma grande variedade de parasitos, dentre eles parasitos do gênero *Leishmania*. Esse método, também denominado por *direct agglutination test* (DAT), utiliza promastigotas íntegras, é simples de ser executado e apresenta baixo custo, o que o torna ideal para uso em laboratório e em campo. A técnica possui grande validade intrínseca e é de fácil execução; entretanto, a padronização da técnica e o controle de qualidade do antígeno são bastante complexos²⁰. Muitos pesquisadores obtêm elevadas sensibilidades ao utilizar essa técnica, mas os valores de especificidade frequentemente são baixos; esses podem variar desde 58% até 72%^{55,56,57}.

Uma das desvantagens do teste de hemaglutinação direta consiste no longo período de incubação (18 h) e na necessidade de se fazer diluições seriadas, o que torna o método laborioso e demorado. O método *fast agglutination screening test* (FAST) é bastante parecido com o DAT, diferindo apenas pela maior concentração de parasitos e um menor volume total de reação. Por esse motivo, após uma única diluição do soro, o resultado pode ser acessado após 3 h⁸. Utilizando esse método, Schallig e colaboradores obtiveram sensibilidade e especificidade de

93,6% e 89%, respectivamente, em soros caninos obtidos de diferentes países, dentre eles Brasil e Turquia⁵⁸.

Dentre os métodos imunológicos mais utilizados atualmente, destaca-se a RIFI, empregada a partir da década de 1960⁵⁹. Este teste, que utiliza o parasito íntegro como antígeno, é bastante útil em estudos epidemiológicos⁷. Entretanto, sua aplicação requer alto nível de habilidade, experiência e também equipamento especializado e de alto custo. Além disso, as diluições seriadas do soro tornam o teste laborioso e inviável para uma triagem com grande número de amostras. Sua sensibilidade varia de 83 a 100% e sua especificidade é de aproximadamente 80% para amostras de soro^{60,61,62}. Todavia, esse método pode apresentar reações cruzadas principalmente com leishmaniose tegumentar americana (LTA) e tripanossomíase americana²⁰. No Brasil, os títulos obtido na RIFI, sendo iguais ou superiores a 1:40, são considerados positivos⁹.

O teste de ELISA é bastante utilizado para triagem de amostras para o diagnóstico de LVC. Essa técnica, que foi desenvolvida na década de 1970⁶³, pode ser aplicada para um grande número de amostras em curto espaço de tempo. Além disso, pode ser adaptada para o uso com diversos antígenos, como antígenos brutos, sintéticos ou recombinantes⁸, comportando assim inesgotáveis possibilidades de variação. Com a sua introdução, testes de maior complexidade técnica, como a reação de fixação do complemento, por exemplo, caíram em desuso para o diagnóstico da LV⁶⁴ e muitos esforços foram e estão sendo concentrados na melhoria dos antígenos para ELISA.

Recentemente, vários antígenos recombinantes de *Leishmania* têm sido testados como ferramentas para melhorar o diagnóstico da LVC. A proteína K39, membro da família das cinesinas, que é bastante conservada entre as espécies viscerotrópicas de *Leishmania*⁶⁵, tem sido amplamente avaliada sob a forma recombinante (rK39) como antígeno em ELISA. Badaró e colaboradores demonstraram a utilidade do antígeno rK39 no diagnóstico sorológico da LVC por meio de ELISA, detectando cães com doença ativa⁶⁶. Scalone e colaboradores, trabalhando com cães provenientes de uma área endêmica no sul da Itália, obtiveram 97,1% de sensibilidade e 98,8% de especificidade⁶⁷.

O uso de antígenos recombinantes, de um modo geral, aumenta a especificidade de testes diagnósticos se comparado ao uso de antígenos brutos⁸. Antígenos brutos fornecem especificidade de 87%, enquanto os antígenos recombinantes rK26 e A2 fornecem especificidades de 90 e 96%, respectivamente, em testes de ELISA realizados em cães⁶⁸. Entretanto, dados publicados por Rosário e colaboradores apresentam resultados bastante similares para ELISA com antígeno bruto (especificidade de 100%), os recombinantes rK26 (especificidade de 96%) e rK39 (especificidade de 100%). A limitação do uso de antígenos brutos consiste na ocorrência de reações cruzadas com outras doenças que frequentemente ocorrem em áreas endêmicas para LVC, o que levou à sugestão de que a associação do uso de antígenos brutos e recombinantes é

uma estratégia interessante a ser utilizada em programas de controle da doença⁶⁹.

O desempenho do teste ELISA no diagnóstico da LVC está relacionado não só com o tipo de antígeno utilizado, mas também com o estado clínico do cão em teste. Carvalho e colaboradores relataram bons resultados utilizando o antígeno recombinante A2 com soros de cães sintomáticos e também registraram que a ocorrência de reação cruzada com outras patologias (rickettsiose, ehrlichiose e tripanossomíase americana) foi insignificante⁷⁰. Mettler e colaboradores demonstraram que o antígeno rK39 apresentou 58% de sensibilidade em cães assintomáticos e 96,7% em sintomáticos, enquanto com o antígeno solúvel de promastigotas não houve diferença entre sintomáticos e assintomáticos (sensibilidades de 100% em ambos os grupos), assim como no teste em que foi utilizado o antígeno solúvel de amastigotas⁷¹.

O diagnóstico molecular pode se associar ao diagnóstico sorológico em um ensaio desenvolvido recentemente por pesquisadores europeus. Nessa técnica, a reação de PCR é realizada utilizando *primers* marcados com biotina e digoxigenina. O produto da PCR pode ser detectado posteriormente por um teste de ELISA, utilizando anticorpos antidigoxigenina. A sensibilidade dessa técnica é de 0,3 fg de DNA do parasito por reação, correspondendo a 0.004 parasitos⁷².

Na década de 1990, houve a introdução de técnicas cromatográficas no diagnóstico imunológico, surgindo assim a imunocromatografia para LV. Essa técnica possui vários pontos positivos, como a rapidez com que o resultado é indicado, a facilidade de uso e a aplicabilidade em campo⁷³. Para o diagnóstico da LVC, o antígeno rK39 foi avaliado em ensaios imunocromatográficos realizados com amostras de cães provenientes do Município de Capitão Enéas, Estado de Minas Gerais, apresentando sensibilidade que variou entre 72 e 77% e especificidade que variou entre 61 e 75%⁷⁴. Outro estudo conduzido também em Minas Gerais forneceu melhores resultados, com sensibilidade entre 94 e 96% e especificidade de 100%, em teste realizado em 50 amostras de soro canino⁷⁵.

Apesar da grande variedade de métodos diagnósticos disponíveis, no Brasil, os testes sorológicos ELISA e RIFI (disponíveis em kits específicos produzidos pelo Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio-Manguinhos e autorizados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) são recomendados e distribuídos pelo MS para a avaliação da soroprevalência em inquéritos caninos. O teste ELISA é recomendado para a triagem de cães e a RIFI para a confirmação dos cães reagentes ao teste de ELISA⁹. O MS, por meio da Nota Técnica Conjunta 01/2011, substituiu o protocolo de diagnóstico da LVC, sendo utilizado o DPP[®] como teste de triagem e o ELISA como teste confirmatório. Falhas nesses resultados podem causar a eliminação de um número desconhecido de animais não infectados, e, por outro lado, não detectar casos positivos^{76,77}. Observa-se então que, apesar da grande variedade de métodos disponíveis para diagnóstico canino, ainda não se dispõe de um método

bastante sensível, simultaneamente específico e de fácil execução.

PERSPECTIVAS NO DIAGNÓSTICO DA LVC

Nos últimos anos, um número crescente de estudos tem focado na busca pelo diagnóstico mais acurado da LVC. Alguns autores visaram o desenvolvimento de novas técnicas de coleta de amostras ou novos métodos diagnósticos. Entretanto, a maioria dos estudos se concentra na busca por novos antígenos de *Leishmania*.

A melhor perspectiva no campo de diagnóstico seria a identificação de antígenos altamente específicos que possam ser utilizados em testes simples de aplicação em campo, dispensando o uso de equipamentos caros e de técnicos altamente especializados, e, ainda, de baixo custo. Apesar de parecer uma utopia, alguns fatos indicam que conseguimos caminhar um pouco nessa direção: o desenvolvimento de testes imunocromatográficos simples e rápidos, a evolução tecnológica que contribuiu para a identificação, purificação e/ou produção de antígenos específicos, bem como os projetos GENOMA e PROTEOMA.

A tecnologia de produção de proteínas recombinantes tem sido bastante empregada na busca por novos antígenos na LVC. Todolí e colaboradores produziram e testaram as proteínas KMP-11 (*kinetoplastid membrane protein-11*) e LACK (*Leishmania homologue of receptors for activated C kinase*), consideradas bastante conservadas em *L. infantum*. Foram obtidos valores de sensibilidade de 93% e de especificidade de 97% ao empregá-las em ELISA⁷⁸. Pinheiro e colaboradores investigaram o desempenho da cisteína proteinase recombinante, indicando o uso potencial desse antígeno para o diagnóstico da LVC, pois a sensibilidade obtida foi de 98% e especificidade de 96% em ELISA⁷⁷. Com resultados igualmente animadores, cinco novas proteínas recombinantes de *Leishmania* (incluindo duas classificadas como hipotéticas) foram empregadas em ELISA com sensibilidades de até 97,2% e especificidades de até 97,3%⁷⁹.

Outra alternativa utilizada por diferentes pesquisadores como metodologia para a produção de antígenos a serem empregados em imunodiagnóstico é a síntese de peptídeos. Esses fragmentos protéicos são desenhados a partir das sequências de aminoácidos de proteínas potencialmente antigênicas. Sendo assim, produzindo essas regiões por síntese química, as chances de um peptídeo conter um ou mais epitopos são grandes⁸⁰. Os peptídeos sintéticos oferecem grandes vantagens, pois são relativamente simples de serem sintetizados e são geralmente mais baratos para produzir, se comparados à produção de uma proteína inteira⁸¹. Em geral, o uso de peptídeos sintéticos aumenta a especificidade de imunoenaios se comparado a antígenos brutos. A técnica de produção desses peptídeos fornece ferramentas confiáveis, reprodutíveis e econômicas na obtenção de antígenos para aqueles ensaios⁸².

Os peptídeos sintéticos constituem excelentes antígenos a serem utilizados em vários testes sorológicos, dentre eles o ELISA. Para diagnóstico das leishmanioses, existem poucos registros da avaliação de peptídeos sintéticos. Fargeas e colaboradores utilizaram peptídeos sintéticos derivados da sequência do gene gp-63 e verificaram que 97% das amostras de soro dos pacientes infectados por *L. donovani* possuíam anticorpos detectáveis por um ou mais peptídeos⁸³. Quijada e colaboradores relataram a síntese de 43 peptídeos sintéticos pertencentes à proteína HSP-70, sendo um desses peptídeos reconhecido por soros de humanos infectados por *L. chagasi* e não reconhecidos por soros de humanos infectados por *T. cruzi*⁸⁴. Larreta e colaboradores, utilizando uma coleção de 39 peptídeos sintéticos que cobre toda a sequência da proteína GRP94 (*glucose-regulated protein 94*, membro da família HSP83) de *L. chagasi*, determinou que quatro deles foram reconhecidos por soros humanos, caninos e de hamsters, todos com LV⁸⁵.

A combinação de diferentes antígenos em um mesmo ensaio também é uma abordagem a ser explorada no diagnóstico da LVC. A formação de um antígeno quimérico, produzido por múltiplos epitopos, demonstrou sensibilidade e especificidade maiores que 95% quando aplicado em ELISA⁸⁶. Além disso, o uso de múltiplos epitopos também pode ser utilizado em imunocromatografia. Recentemente, foi avaliado o teste DPP[®], produzido pelo Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio-Manguinhos, que une dois antígenos recombinantes (rK39 e rK26). Essa perspectiva bastante promissora, entretanto, apresentou elevada sensibilidade apenas para cães sintomáticos (98%), pois em assintomáticos ela foi baixa (47%)⁸⁷.

A análise proteômica de *Leishmania* tem sido muito útil na busca por novos antígenos, nos últimos anos. A utilização da eletroforese bidimensional, *western blot* com soros caninos e bioinformática permitiu a identificação de mais de 40 proteínas imunogênicas e quase 50 peptídeos potencialmente úteis no diagnóstico da LVC⁸⁸. Partindo de proteínas identificadas nesse mesmo estudo, foram avaliados 360 diferentes epitopos para células B, sendo possível eleger dez antígenos de ótimo desempenho para diagnóstico sorológico da LVC por meio do ELISA. Os valores de acurácia, AUC, obtidos pela curva ROC, foram altos, alcançando 0,902. Além disso, a porcentagem de cães assintomáticos detectados por esses peptídeos foi bastante elevada, o que apresenta grande interesse epidemiológico, tendo em vista a importância desses cães na cadeia de transmissão da doença⁸⁹. Diversos outros estudos utilizam a abordagem proteômica para seleção de novos antígenos, principalmente para diagnóstico humano. Forgber e colaboradores mapearam a antigenicidade de *L. donovani*⁹⁰; Kumar e colaboradores identificaram uma proteína de 37 kDa, também de *L. donovani*, por meio de eletroforese bidimensional. Esse antígeno demonstrou ser bastante específico (97%) em ELISA⁹¹. Isso indica que a abordagem proteômica é uma ferramenta promissora para a busca por novos antígenos para diagnóstico canino.

Outra técnica que tem sido investigada para o diagnóstico da LVC é o uso de imunossensores de quartzo ou níquel. Alguns pesquisadores avaliaram o uso desses sensores, que são capazes de realizar medições ultrasensíveis ao se ligar um antígeno a esses sensores. Dessa maneira, a ligação antígeno-anticorpo pode ser mensurada mesmo acontecendo em baixos níveis⁹².

Recentemente, foi descoberta uma nova classe de ligantes, bastante semelhantes a anticorpos, denominados aptâmeros. Essas estruturas são fragmentos de ácido nucleicos selecionados em bibliotecas gênicas por evolução sistemática de ligantes por enriquecimento exponencial (tecnologia SELEX), que promove a ligação em moléculas alvo com elevada especificidade⁹³. Aptâmeros podem ser desenvolvidos contra diferentes alvos, incluindo proteínas imunogênicas. Haverá ligação aptâmero-proteína bastante semelhante a uma ligação anticorpo-antígeno⁹⁴. Baseando-se nisso, foi produzida uma mistura de aptâmeros, que se ligam especificamente às regiões variáveis das histonas de *L. infantum*. Essa mistura, quando testada em ensaios imunoenzimáticos e em *western blot*, exibiu especificidade de ligação às histonas, apresentando uma aplicação em potencial desses aptâmeros no diagnóstico da leishmaniose causada por *L. infantum*^{95,96}.

CONCLUSÃO

O diagnóstico da LVC ainda enfrenta sérios desafios. Sabe-se que um teste diagnóstico ideal deve ser de fácil execução, de baixo custo e que apresente sensibilidade e especificidade bastante elevadas, características possíveis de serem encontradas em diversos estudos na literatura. Entretanto, apesar dos avanços obtidos nessa área e da intensa busca por novos métodos / antígenos na pesquisa acadêmica, muitos testes ainda não passaram pela validação realizada em estudos de campo. Essa falta de dados limita o diagnóstico canino a ser realizado com as técnicas atualmente disponíveis. Portanto, a seleção do método a ser realizado deve ser feita sob a luz dessas considerações.

As técnicas moleculares representam um grande avanço no diagnóstico canino, principalmente devido a sua elevada acurácia. Entretanto, o custo dessas técnicas ainda é elevado. Deve-se ressaltar que a redução de custos ainda configura um grande desafio para a aplicação de métodos diagnósticos em áreas endêmicas de países em desenvolvimento. Tendo em vista essa limitação, a maior perspectiva consiste no desenvolvimento de novos antígenos bastante sensíveis e específicos, que possam ser empregados em técnicas com boa aplicabilidade em campo.

A utilização das técnicas imunocromatográficas abriu um novo panorama no diagnóstico realizado em campo. O MS substituiu o protocolo de diagnóstico da LVC pelo

DPP® (imunocromatográfico) como opção de triagem e o ELISA como teste confirmatório. Entretanto, a sensibilidade dos antígenos empregados nessas técnicas ainda deixa a desejar, o que leva a crer que o uso de novos antígenos a serem empregados em tiras imunocromatográficas apresenta uma perspectiva bastante animadora para o desenvolvimento de testes de campo.

Apesar da enorme variedade de novos antígenos que são testados com bons resultados em pesquisa, o MS recomenda a realização da triagem sorológica por meio de ELISA com antígeno bruto e a confirmação de casos positivos por meio da RIFI. São considerados oficiais para fins diagnósticos os resultados obtidos somente pelos kits distribuídos por esse Ministério, sendo realizados por laboratórios municipais ou estaduais. Atualmente está disponível comercialmente outro teste para diagnóstico canino, que consiste em um kit de ELISA empregando uma proteína recombinante derivada da HSP70. Mas o resultado fornecido por esse teste ainda não é reconhecido pelo MS, apesar de o kit ser registrado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, que regulamenta todos os produtos a serem utilizados em animais.

Desse modo, questiona-se: por que, apesar de termos tantas publicações demonstrando a identificação de antígenos com boa especificidade usados em testes com boa sensibilidade, eles ainda não foram disponibilizados? Podemos observar que há falta de validação desses dados. Dessa forma, sugerimos que os esforços devem se concentrar na validação dos testes/antígenos que já apresentaram bons resultados em estudos conduzidos em laboratório. A aplicação de um teste em estudos de campo permite a confirmação de resultados obtidos em bancada, bem como a verificação da necessidade de melhorias que podem ser feitas no mesmo. O interesse de indústrias privadas pode trazer facilidades nessa fase, pois um protótipo industrial já seria testado em campo, via transferência de tecnologia universidade/empresa privada. Após registrar o produto no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, o que inclui a produção industrial do produto seguindo as boas práticas de fabricação, deverá ser feito um acordo com o MS, com o objetivo de implementar o teste como recomendação desse órgão. A distribuição em laboratórios públicos se mostra necessária principalmente quando se considera a epidemiologia da leishmaniose visceral e sua grande relação com áreas de maior pobreza.

Em suma, considerando que a eliminação de cães deve se basear em um diagnóstico confiável e que os antígenos empregados para diagnóstico de LVC atualmente disponíveis e recomendados pelo MS não apresentam a eficácia desejada, observa-se ainda uma grande necessidade de validação de novos antígenos / testes a serem usados na rotina, com distribuição em laboratórios públicos.



Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: major technological advances and few practical applications

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis is the most severe type of leishmaniasis, and its zoonotic form, caused by *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*, accounts for 20% of the reported cases of human leishmaniasis in the world. Its incidence rates are increasing in urban and peri-urban tropical areas. One of the monitoring policies adopted in Brazil is the identification and elimination of infected dogs, which are considered the main reservoir hosts of the disease in cities. Consequently, reliable analyses and diagnoses of these animals are very important for the control of the disease. However, there is not a fast and safe diagnostic method with optimal sensitivity and specificity rates for canine visceral leishmaniasis. This study discussed the advantages and disadvantages of the most common methods available for the evaluation of dogs and the expectations raised by new methods and new antigens for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. Finally, we reviewed the difficulties in the practical applications of these new methodologies.

Keywords: Diagnosis; canine visceral leishmaniasis; *Leishmania infantum chagasi*.

Diagnóstico de la Leishmaniasis Visceral Canina: grandes avances tecnológicos y baja aplicación práctica

RESUMEN

La leishmaniasis visceral es la más severa entre las leishmaniasis y su forma zoonótica, causada por *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*, representa 20% del registro de casos de leishmaniasis visceral humana mundial. En las áreas urbanas y periurbanas de los trópicos, la incidencia de esa enfermedad es creciente. Una de las medidas de control de la leishmaniasis visceral adoptada en Brasil es la identificación y eliminación de perros infectados, considerados los principales reservorios de la enfermedad urbana. En ese contexto, el diagnóstico confiable en esos animales desempeña un papel fundamental en el control de la enfermedad. Sin embargo, todavía no se dispone de un método con la sensibilidad y especificidad ideales, que ofrezca un diagnóstico rápido y seguro para la leishmaniasis visceral canina. En este trabajo se revisaron las ventajas y desventajas de los principales métodos actualmente disponibles para el diagnóstico canino, las perspectivas con relación a nuevas metodologías y a nuevos antígenos a ser utilizados en el diagnóstico de la leishmaniasis visceral canina y, por fin, discutimos las dificultades para la aplicación práctica de esas nuevas metodologías.

Palabras clave: Diagnóstico; Leishmaniose Visceral Canina; *Leishmania infantum chagasi*.



REFERÊNCIAS

- 1 Lainson R, Shaw JJ. Epidemiology and ecology of leishmaniasis in Latin-America. *Nature*. 1978 Jun;273(5664):595-600.
- 2 den Boer M, Argaw D, Jannin J, Alvar J. Leishmaniasis impact and treatment access. *Clin Microbiol Infect*. 2011 Oct;17(10):1471-7.
- 3 Schramm JM, Oliveira A, Leite IC, Valente J, Gadelha AM, Portela M, et al. Transição epidemiológica e o estudo de carga de doença no Brasil. *Ciência & Saúde Coletiva*. 2004;9(4):897-908.
- 4 World Health Organization. Leishmaniasis [Internet]. Geneva. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>.
- 5 Quinnell RJ, Courtenay O. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. *Parasitology*. 2009 Dec;136(14):1915-34.
- 6 Herwaldt BL. Leishmaniasis. *Lancet*. 1999 Oct;354(9185):1191-9.
- 7 Alvar J, Cañavate C, Molina R, Moreno J, Nieto J. Canine leishmaniasis. *Adv Parasitol*. 2004;57:1-88.
- 8 Maia C, Campino L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Vet Parasitol*. 2008 Dec;158(4):274-87.
- 9 Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Brasília: Ministério da Saúde; 2006.
- 10 Berrahal F, Mary C, Roze M, Berenger A, Escoffier K, Lamouroux D, et al. Canine leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting. *Am J Trop Med Hyg*. 1996 Sep;55(3):273-7.
- 11 Brandonisio O, Carelli G, Ceci L, Consenti B, Fasanella A, Puccini V. Canine leishmaniasis in the Gargano promontory (Apulia, South Italy). *Eur J Epidemiol*. 1992 Mar;8(2):273-6.
- 12 Dantas-Torres F, Brandão-Filho SV. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 2006 May-Jun;48(3):151-6.
- 13 Queiroz NM, Assis J, Oliveira TM, Machado RZ, Nunes CM, Starke-Buzetti WA. Canine visceral

- leishmaniasis diagnosis by immunohistochemistry and PCR in skin tissues in association with IFAT and ELISA-test. Rev Bras Parasitol Vet. 2010 Jan-Mar;19(1):32-8.
- 14 Alvar J, Molina R, San Andres M, Tesouro M, Nieto J, Vitutia M, et al. Canine leishmaniasis: clinical, parasitological and entomological follow-up after chemotherapy. Ann Trop Med Parasitol. 1994 Aug;88(4):37-8.
 - 15 Molina R, Amela C, Nieto J, San-Andrés M, González F, Castillo JÁ, et al. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1994 Jul-Aug;88(4):491-3.
 - 16 Abranches P, Campino L, Santos-Gomes GM. Canine leishmaniasis. New concepts of epidemiology and immunopathology: their impact in the control of human visceral leishmaniasis. Acta Med Port. 1998 Oct;(10):871-5.
 - 17 Gomes YM, Cavalcanti MP, Lira RA, Abath FG, Alves LC. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: biotechnological advances. Vet J. 2008 Jan;175(1):45-52.
 - 18 Silva FS. Patologia e patogênese da leishmaniose visceral canina. R Trop Ci Agr Biol. 2007;1(1):20-31.
 - 19 Freitas JC, Nunes-Pinheiro DC, Neto B, Santos G, Abreu C, Braga R, et al. Alterações clínicas e laboratoriais em cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi*. Rev Soc Bras Med Trop. 2012;45(1):24-9.
 - 20 Gontijo CM, Melo MN. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. Rev Bras Epidemiol. 2004;7(3):338-49.
 - 21 Silva SM. Avaliação clínica e laboratorial de cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi* (cunha & chagas, 1937), submetidos a um protocolo terapêutico em clínica veterinária de Belo Horizonte [Dissertação]. Belo Horizonte (MG): Universidade Federal de Minas Gerais, Setor de Parasitologia; 2007.
 - 22 Ferrer L. Clinical aspects of canine leishmaniasis: an update. In: Proceedings of the International Canine Leishmaniasis Forum, 1999. Sevilla: Hoechst Roussel Vet; 2002. p. 6-10.
 - 23 Sundar S, Rai M. Laboratory diagnosis of Visceral Leishmaniasis. Clin Diag Lab Immunol. 2002 Sep;9(5):951-8.
 - 24 Moreira M, Luvizotto M, Garcia J, Corbett C, Laurenti M. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. Vet Parasitol. 2007 Apr;145(3-4):245-52.
 - 25 Maia C, Ramada J, Cristóvão J, Campino L. Diagnosis of canine leishmaniasis: conventional and molecular techniques using different tissues. Vet J. 2009 Jan;179(1):142-4.
 - 26 Kenner JR, Aronson NE, Bratthauer GL, Turnicky RP, Jackson JE, Tang DB, et al. Immunohistochemistry to identify *Leishmania* parasites in fixed tissues. J Cutan Pathol. 1999 Mar;26(3):130-6.
 - 27 Tafuri WL, Santos RL, Arantes RM, Gonçalves R, Melo MN, Michalick MS, et al. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. J Immunol Methods. 2004 Sep;292(1-2):17-23.
 - 28 Xavier SC, Andrade HM, Monte SJ, Chiarelli IM, Lima WG, Michalick MS, et al. Comparison of paraffin-embedded skin biopsies from different anatomical regions as sampling methods for detection of *Leishmania* infection in dogs using histological, immunohistochemical and PCR methods. BMC Vet Res. 2006 Jun;8(2):17.
 - 29 Ferrer L, Rabanal RM, Domingo M, Ramos JA, Fondevila D. Identification of *Leishmania donovani* amastigotes in canine tissues by immunoperoxidase staining. Res Vet Sci. 1988 Mar;44(2):194-6.
 - 30 Jackson PR, Lawrie JM, Stiteler JM, Hawkins DW, Wohlhieter JA, Rowton ED. Detection and characterization of *Leishmania* species and strains from mammals and vectors by hybridization and restriction endonuclease digestion of kinetoplast DNA. Vet Parasitol. 1986;20(1-3):195-215.
 - 31 Degrave W, Fernandes O, Thiemann O, Wincker P, Britto C, Cardoso A, et al. Detection of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* using the polymerase chain reaction. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1994 Jul-Sep;89(3):367-8.
 - 32 Bozza M, Fernandes O, Degrave WM, Lopes UG. Characterization of 'Old World' *Leishmania* species using amplified minicircle variable regions as molecular probes. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1995 May-Jun;89(3):333-4.
 - 33 Lachaud L, Marchergui-Hammami S, Chabbert E, Dereure J, Dedet JP, Bastien P. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. J Clin Microbiol. 2002 Jan;40(1):210-5.
 - 34 Santos JM, Dantas-Torres F, Mattos MR, Lino FR, Andrade LS, Souza RC, et al. Prevalence of anti-*Leishmania* spp antibodies in dogs from Garanhuns, in the middle scrub zone (Agreste) of Pernambuco. Rev Soc Bras Med Trop. 2010 Jan-Feb;43(1):41-5.
 - 35 Fisa R, Riera C, Gállego M, Manubens J, Portús M. Nested PCR for diagnosis of canine leishmaniasis in peripheral blood, lymph node and bone marrow aspirates. Vet Parasitol. 2001 Aug;99(2):105-11.
 - 36 Manna L, Vitale F, Reale S, Caracappa S, Pavone LM, Morte RD, et al. Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniasis. Vet Parasitol. 2004 Nov;125(3-4):251-62.

- 37 Quinnell RJ, Courtenay O, Davidson S, Garcez L, Lambson B, Ramos P, et al. Detection of *Leishmania infantum* by PCR, serology and cellular immune response in a cohort study of Brazilian dogs. *Parasitology*. 2001 Mar;122(Pt 3):253-61.
- 38 Reithinger R, Lambson BE, Barker DC, Davies CR. Use of PCR to detect *Leishmania (Viannia)* spp. in dog blood and bone marrow. *J Clin Microbiol* 2000 Feb;38(2):748-51.
- 39 Al-Soud WA, Radstrom P. Capacity of nine thermostable DNA polymerases to mediate DNA amplification in the presence of PCR-inhibiting samples. *Appl Environ Microbiol*. 1998 Oct;64(10):3748-53.
- 40 Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res*. 1996 Oct;6(10):986-94.
- 41 Francino O, Altet L, Sánchez-Robert E, Rodriguez A, Solano-Gallego L, Alberola J, et al. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniasis. *Vet Parasitol*. 2006 Apr;137(3-4):214-21.
- 42 Galletti E, Bonilauri P, Bardasi L, Fontana MC, Ramini M, Renzi M, et al. Development of a minor groove binding probe based real-time PCR for the diagnosis and quantification of *Leishmania infantum* in dog specimens. *Res Vet Sci*. 2011 Oct;91:243-5.
- 43 Quaresma P, Murta S, Ferreira E, Rocha-Lima A, Xavier A, Gontijo C. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: identification of *Leishmania* species by PCR-RFLP and quantification of parasite DNA by real-time PCR. *Acta Tropica*. 2009 Sep;111(3):289-94.
- 44 Leite RS, Ferreira SA, Ituassu LT, Melo MN, Andrade AS. PCR diagnosis of visceral leishmaniasis in asymptomatic dogs using conjunctival swab samples. *Vet Parasitol*. 2010 Jun;170(3-4):201-6.
- 45 Almeida Ferreira S, Leite RS, Ituassu LT, Almeida GG, Souza DM, Fujiwara RT, et al. Canine skin and conjunctival swab samples for the detection and quantification of *Leishmania infantum* DNA in an endemic urban area in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012 Apr;6(4):e1596.
- 46 Manna L, Reale S, Picillo E, Vitale F, Gravino AE. Urine sampling for real-time polymerase chain reaction based diagnosis of canine leishmaniasis. *J Vet Diagn Invest*. 2008 Jan;20(1):64-7.
- 47 Todolí F, Solano-Gallego L, Ojeda A, Quintana J, Lloret A, Roura X, et al. Anti-*Leishmania* IgA in urine samples from dogs with clinical leishmaniasis. *Vet Parasitol*. 2009;159(1):17-23.
- 48 Diniz SA, Melo MS, Borges AM, Bueno R, Reis BP, Tafuri WL, et al. Genital lesions associated with visceral leishmaniasis and shedding of *Leishmania* sp. in the semen of naturally infected dogs. *Vet Pathol*. 2005 Sep;42(5):650-8.
- 49 Lombardo G, Pennisi MG, 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*. 2012 Feb;184(1):10-7.
- 50 Pellegrino J, Brener Z. Reação de fixação de complemento com sangue dessecado no diagnóstico do calazar canino. *Rev Bras Malariol Doenças Trop*. 1958;10:39-44.
- 51 Cunha RV, Alencar JE, Andrade FB. Uso da reação de fixação de complemento para diagnóstico do Calazar canino em inquérito de massa. *Rev Bras Malariol Doenças Trop*. 1963;15:405-10.
- 52 Nussenzeig V, Nussenzeig RS, Alencar JE. Leishmaniose visceral nos arredores de Fortaleza, Estado do Ceará: inquérito sorológico utilizando a reação de fixação do complemento com antígeno extraído do bacilo de tuberculose. Observações sobre o diagnóstico e epidemiologia da doença. *O Hospital*. 1957;52:47-69.
- 53 Tizard IR. *Veterinary immunology: an introduction*. 5th ed. Philadelphia: Saunders; 1996.
- 54 Reis MM. *Testes imunológicos: manual ilustrado para profissionais da saúde*. Porto Alegre: Senac; 1999.
- 55 Boelaert M, El Safi S, Goetghebeur E, Gomes-Pereira S, Le Ray D, Van der Stuyft P. Latent class analysis permits unbiased estimates of the validity of DAT for the diagnosis of visceral leishmaniasis. *Trop Med Int Health*. 1999 May;4(5):395-401.
- 56 Zijlstra EE, Siddig Ali M, El-Hassan AM, el-Toum IA, Satti M, Ghalib HW, et al. Direct agglutination test or diagnosis and sero-epidemiological survey of kala-azar in the Sudan. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1991 Jul-Aug;85(4):474-6.
- 57 Chappuis F, Rijal S, Singh R, Acharya P, Karki BM, Das ML, et al. Prospective evaluation and comparison of the direct agglutination test and an rK39-antigen-based dipstick test for the diagnosis of suspected kala-azar in Nepal. *Trop Med Int Health*. 2003 Mar;8(3):277-85.
- 58 Schallig H, Schoone G, Beijer E, Kroon C, Hommers M, Özbel Y, et al. Development of a fast agglutination screening test (FAST) for the detection of anti-*Leishmania* antibodies in dogs. *Vet Parasitol*. 2002 Oct;109(1):1-8.
- 59 Duxbury RE, Sadun EH. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*. 1964 Jul;13(4):525-9.
- 60 Harith AE, Kolk AH, Kager PA, Leeuwenburg J, Faber FJ, Muigai R, et al. Evaluation of a newly developed direct agglutination test (DAT) for serodiagnosis and sero-epidemiological studies of visceral leishmaniasis: comparison with IFAT and ELISA. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1987 Jul-Aug;81(4):603-6.

- 61 Almeida MA, Jesus EE, Sousa-Atta ML. Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Vet Parasitol.* 2005 Feb;127(3-4):227-32.
- 62 Lira RA. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina: avaliação do desempenho dos kits EIE-Leishmaniose-Visceral-Canina-Bio-Manguinhos e IFI-Leishmaniose-Visceral-Canina-Bio-Manguinhos [dissertação]. Recife (PE): Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Departamento de Saúde Coletiva; 2005.
- 63 Engvall E, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry.* 1971 Sep;8(9): 871-4.
- 64 Grimaldi G Jr, Tesh RB. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. *Rev Clin Microbiol.* 1993 Jul;6(3):230-50.
- 65 Burns JM Jr, Shreffler WG, Benson DR, Ghalib HW, Badaro R, Reed SG. Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. *Proc Natl Acad Sci.* 1993 Jan;90(2):775-9.
- 66 Badaró R, Benson D, Eulalio MC, Freire MC, Cunha S, Netto EM, et al. rk39: a cloned antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral leishmaniasis. *J Infect Dis.* 1996 Mar;173(3):758-61.
- 67 Scalone A, Luna R, Oliva G, Baldi L, Satta G, Vesco G, et al. Evaluation of the *Leishmania* recombinant K39 antigen as a diagnostic marker for canine leishmaniasis and validation of a standardized enzyme-linked immunosorbent assay. *Vet Parasitol.* 2002 Apr;104(4):275-85.
- 68 Porrozzì R, Costa MV, Teva A, Falqueto A, Ferreira A, Santos CD, et al. Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays based on crude and recombinant leishmanial antigens for serodiagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania infantum* visceral infections in dogs. *Clin Vacc Immunol.* 2007 May;14(5):544-8.
- 69 Rosário EY, Genaro O, França-Silva JC, Costa RT, Mayrink W, Reis AB. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay using crude *Leishmania* and recombinant antigens as a diagnostic marker for canine visceral leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2005 Apr;100(2):197-203.
- 70 Carvalho FA, Charest H, Tavares CAP, Matlashewskif G, Valente EP, Rabello A, et al. Diagnosis of American visceral leishmaniasis in humans and dogs using the recombinant *Leishmania donovani* A2 antigen. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2002 Aug;43(4):289-95.
- 71 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.* 2005 Nov;43(11):5515-9.
- 72 Kobets T, Badalová J, Grekov I, Havelková H, Svobodová M, Lipoldová M. *Leishmania* parasite detection and quantification using PCR-ELISA. *Nat Protoc.* 2010 Jun;5(6):1074-80.
- 73 Gradoni L. The diagnosis of canine leishmaniasis. In: *Canine leishmaniasis: moving towards a solution. Proceedings of the second international canine leishmaniasis forum.* Sevilla: Hoechst Roussel Vet; 2002. p.7-14.
- 74 Reithinger R, Quinnell RJ, Alexander B, Davies CR. Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic dipstick test, enzyme-linked immunosorbent assay, and PCR. *J Clin Microbiol.* 2002 Jul;40(7):2352-6.
- 75 Costa RT, França JC, Mayrink W, Nascimento E, Genaro O, Campos-Neto A. Standardization of a rapid immunochromatographic test with the recombinant antigens K39 and K26 for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Trans Royal Soc Trop Med Hyg.* 2003 Nov-Dec;97(6):678-82.
- 76 Moreno J, Alvar J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends Parasitol.* 2002 Sep;18(9):399-405.
- 77 Pinheiro PH, Pinheiro AN, Ferreira JHL, Costa FA, Katz S, Barbiéri CL. A recombinant cysteine proteinase from *Leishmania (Leishmania) chagasi* as an antigen for delayed-type hypersensitivity assays and serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol.* 2009 May;162(1-2):32-9.
- 78 Todolí F, Pérez-Filgueira M, Galindo I, Gómez-Sebastián S, Escribano JM, Rodríguez-Cortés A, et al. Seroreactivity against raw insect-derived recombinant KMP11, TRYP, and LACK *Leishmania infantum* proteins in infected dogs. *Vet Parasitol.* 2009 Oct;164(2-4):154-61.
- 79 Oliveira GG, Magalhães FB, Teixeira MC, Pereira AM, Pinheiro CG, Santos LR, et al. 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.* 2011 Dec;85(6):1025-34.
- 80 Oliveira EJ. Desenvolvimento de um método sorológico para o diagnóstico laboratorial de esquistossomose mansoni baseado em peptídeos sintéticos [Tese de Doutorado]. São Paulo (SP): Universidade Federal de São Paulo, Setor de Ciências Farmacêuticas; 2005.
- 81 González L, Boyle RW, Zhang M, Castillo J, Whittier S, Della-Latta P, et al. Synthetic-peptide-based enzyme-linked immunosorbent assay for screening human serum or plasma for antibodies to human immunodeficiency virus type 1 and type 2. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1997 Sep;4(5):598-603.

- 82 Ferrer E, Benitez L, Foster-Cuevas M, Bryce D, Wamae LW, Onyango-Abuje JA, et al. *Taenia saginata* derived synthetic peptides with potential for the diagnosis of bovine cysticercosis. *Vet Parasitol.* 2003 Jan;111(1):83-94.
- 83 Fargeas C, Hommel M, Maingon R, Dourado C, Monsigny M, Mayer R. Synthetic peptide-based enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol.* 1996 Feb;34(2):241-8.
- 84 Quijada L, Requena JM, Soto M, Alonso C. Analysis of the antigenic properties of the *L. infantum* Hsp70: design of synthetic peptides for specific serodiagnosis of human leishmaniasis. *Immunol Lett.* 1998 Oct;63(3):169-4.
- 85 Larreta R, Guzman F, Patarroyo ME, Alonso C, Requena JM. Antigenic properties of the *Leishmania infantum* GRP94 and mapping of linear B-cell epitopes. *Immunol Lett.* 2002 Mar;80(3):199-205.
- 86 Boarino A, Scalone A, Gradoni L, Ferroglio E, Vitale F, Zanatta R, et al. Development of recombinant chimeric antigen expressing immunodominant B epitopes of *Leishmania infantum* for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Clin Diag Lab Immun.* 2005 May;12(5):647-53.
- 87 Grimaldi G Jr, Teva A, Ferreira A, Santos C, Pinto ID, Azevedo CT, et al. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2012 Jan;106(1):54-9.
- 88 Costa MM, Andrade HM, Bartholomeu DC, Freitas L, Pires SF, Chapeaurouge AD, et al. Analysis of *Leishmania chagasi* by 2-D difference Gel electrophoresis (2-D DIGE) and immunoproteomic: identification of novel candidate antigens for diagnostic tests and vaccine. *J Proteome Res.* 2011 May;10(5):2172-84.
- 89 Faria AR, Costa MM, Giusta MS, Grimaldi G Jr, Penido ML, Gazzinelli RT, et al. High-throughput analysis of synthetic peptides for the immunodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011 Sep;5(9):e1310.
- 90 Forgher M, Basu R, Roychoudhury K, Theinert S, Roy S, Sundar S, et al. Mapping the antigenicity of the parasites in *Leishmania donovani* infection by proteome serology. *PLoS One.* 2006 Dec;1(1):e40.
- 91 Kumar S, Kumar D, Chakravarty J, Sundar S. Identification and characterization of a novel, 37-Kilodalton *Leishmania donovani* antigen for diagnosis of Indian visceral leishmaniasis. *Clin Vaccine Immunol.* 2011 May;18(5):772-5.
- 92 Ramos-Jesus J, Carvalho KA, Fonseca RA, Oliveira GG, Melo SM, Alcântara-Neves NM, et al. A piezoelectric immunosensor for *Leishmania chagasi* antibodies in canine serum. *Anal Bioanal Chem.* 2011 Aug;401(3):917-25.
- 93 Ellington AD, Szostak JW. Selection *in vitro* of single-stranded DNA molecules that fold into specific ligand-binding structures. *Nature.* 1992 Feb;355(27):850-2.
- 94 Hermann T, Patel DJ. Adaptive recognition by nucleic acid aptamers. *Science.* 2000 Feb;287(5454):820-5.
- 95 Ramos E, Piñeiro D, Soto M, Abanades DR, Martín ME, Salinas M, et al. A DNA aptamer population specifically detects *Leishmania infantum* H2A antigen. *Lab Invest.* 2007 May;87:409-16.
- 96 Ramos E, Moreno M, Martín ME, Soto M, Gonzalez VM. *In vitro* selection of *Leishmania infantum* H3-binding ssDNA aptamers. *Oligonucleotides.* 2010;20(4):207-13.

Recebido em / Received / Recibido en: 16/8/2012
 Aceito em / Accepted / Aceito en: 15/2/2013