

Izabela Ferreira Gontijo de Amorim

**AVALIAÇÃO DO PERFIL HUMORAL DE CÃES VACINADOS COM LEISHMUNE®
E DE CÃES NATURALMENTE INFECTADOS PROCEDENTES DE ÁREA
ENDÊMICA DE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA**

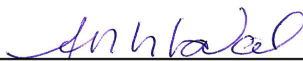
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Veterinária.

Área de concentração: Clínica e Cirurgia Veterinárias.

Orientadora: Adriane Pimenta da Costa Val

Belo Horizonte
UFMG - Escola de Veterinária
2007.

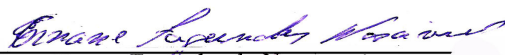
Dissertação defendida e aprovada em 08/03/2007 pela Comissão Examinadora composta por:



Adriane Pimenta da Costa Val



Célia Maria Ferreira Gontijo



Ernane Fagundes do Nascimento

A DEUS por estar sempre ao meu lado.

Aos meus pais que me ensinaram a importância da ética.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Gostaria de agradecer ao programa de Pós Graduação em Clínica e Cirurgia Veterinária da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais pela oportunidade, apoio e incentivo, fundamentais para a realização deste trabalho.

A **DEUS**, meu grande amigo, agradeço: a cada momento que passo,
a cada pessoa que conheço, por amar e sonhar,
por cada dia,
AGRADEÇO POR TUDO!!!

Aos meus pais, acredito que separá-los em José e Marta é o mesmo que dividir o indivisível. Cada um de vocês construiu o que sou. Cada um a seu modo, é claro. Agradeço os ensinamentos básicos de respeito ao próximo, gratidão e fé. Sou muito grata por tudo e sei que o melhor foi e está sendo feito. Amo demais vocês!!!

A Natale, minha querida irmã, minha grande amiga. Exemplo de competência e determinação saiba que você é minha irmã predileta e sempre estará em meu coração. Ao Charles pelo incentivo e amizade.

Ao Fábio pelo amor e companheirismo. Obrigada pelas palavras de incentivo, pela ajuda (gel florzinha!!!) e amizade. Meu grande amigo e amor.

A todos meus tios e tias, primos e primas que torceram por mim e me incentivaram.

A professora Adriane, vulgo Tia. Agradeço por me orientar e me acolher no momento em que mais precisava. Não esqueço que estava um pouco perdida, naquele início de vida profissional, não sabia se ia para a esquerda, direita ou seguia em frente. E depois de muito conversar decidi “embrenhar” pelos estudos da *Leishmania*. Obrigada pela amizade, incentivo e por confiar em meu potencial. Obrigada por tudo.

A professora Marilene Michalick. Grande profissional. Pessoa forte e determinada, grande mulher. Obrigada pelo imenso apoio. Palavras de agradecimento não conseguem expressar a imensa gratidão. Te admiro muito. Muito obrigada.

A professora Norma Melo pela amizade e companheirismo. Te considero uma grande profissional e admiro, a cada dia, seu enorme coração. Obrigada por me ajudar neste início de vida profissional. Agradeço os ensinamentos compartilhados. Muito obrigada.

A Cíntia minha grande amiga. Você foi sem dúvida uma das melhores “coisas” que aconteceram nestes dois anos. Só tenho a agradecer pelos momentos de apoio e compreensão. E diversão também, que ninguém é de ferro. Obrigada por me ajudar em tantos momentos difíceis. Minha amiga muito querida.

Ao Sydnei, cara trabalhador e esforçado. Pessoa que mudou conceitos de minha vida com suas grandes frases de impacto como a “teoria das colisões efetivas”. Obrigada pela amizade e pela ajuda .

A Edilene. Pessoa sensível e dona de um coração de ouro. Gosto muito de você. Obrigada por tudo minha amiga.

A Turma Mexicana. Em especial Ceres minha eterna amiga oculta (meninas não fiquem com ciúmes, de novo!!!). Amo todas vocês que me acolheram e me deram até um nome mexicano “Izabella Graziella”, dá para acreditar. Vocês são demais.

A Eloísa pela consideração, amizade, paciência (... ”Temos que sair as 6:00h da Federal, senão vamos chegar atrasadas”...) e pelo grande desprendimento em compartilhar conhecimentos. Muito obrigada.

Aos colegas do laboratório de biologia e sorologia de *Leishmania*, Janaína, Ângela, Lara e Raul, pela cordial convivência. Muito obrigada.

A Lívia, Mariana, Daniela pela imensa paciência e apoio no desenvolvimento do projeto. Muito obrigada.

Ao Elder, grande amigo. Aquele em que se pode contar a qualquer momento. Obrigada amigo pela ajuda e amizade.

Ao Edem, Ramos e Robson, grandes amigos mesmo!!! Adoro conversar com vocês aqueles “papos cabeça”, no qual ficamos horas. Vocês moram no meu coração.

A Dona Elza. Muito obrigada pela ajuda e pelas palavras de carinho e fé. Obrigada por levar minhas cartinhas lá para Aparecida. Te admiro muito. Que Deus sempre te ilumine.

A Rosa. Tenho que confessar que no início te achava “meio brava”, depois percebi o quanto é doce e sempre disposta a ajudar. Te admiro pela pessoa que é. Obrigada.

A Lilian. Sabe quando nos 45 minutos do segundo tempo você precisa de alguém para te ajudar? Este alguém foi a Lilian. Obrigada por sua amizade e disponibilidade. Continue estudando estatística direitinho, viu.

A Dra. Ingrid Menz, do laboratório Fort Dodge[®], pelo apoio irrestrito no desenvolvimento do projeto. Muito obrigada.

A Rosângela e Soraia pela consideração e conhecimentos compartilhados. Muito obrigada pela enorme ajuda. Admiro muito vocês.

A Sumara pela cordialidade. Por me receber com carinho no Departamento de Parasitologia do ICB. Obrigada por tudo.

Ao Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas por me receber e incentivar meu crescimento profissional.

A Dona Maria do Carmo, Rosemary e Vanessa pelas conversas descompromissadas no corredor, mas que são essenciais para renovar e alegrar o dia.

A Nilda por sua grande competência e paciência, pois me agüentar ligando pelo menos duas vezes por dia, para “tirar dúvidas”, não é para qualquer uma. Obrigada.

Aos amigos da Coopemed: Juliana, Márcia, Lucina, Eliane, Joana, Carolina, Ketlen e Eduardo.

Ao laboratório de Leishmanioses na pessoa do Dr. Edelberto Dias pela consideração e grande apoio.

Ao Dr. Alexandre Reis pela cordialidade e consideração. Muito obrigada.

A Renata do Centro de Pesquisas do René Rachou pela grande gentileza e companheirismo.

Aos veterinários que foram essenciais na realização deste trabalho: Dra. Juliana (Clínica Melhor Amigo); Dra. Carmen e Dra. Leticia (Clínica São Geraldo); Ao Dr. Tales (InterVet/Sete Lagoas); Dr. Vitor e Dr. Fernando (Clínica Santo Agostinho); Dra. Juliana (Clínica São Francisco de Assis/Sete Lagoas); Dra. Ana Raquel e Dr. Alexandre (Clínica Família Animal); Dr. Lasmar e Dr. Ronaldo (Clínica Gutierrez); Dr. Carlos Alberto (Clínica São Francisco de Assis), Dr. Leonardo, Dra. Eliana, Dr. Marcelo Lobão, Dra. Júnia, Tenente Macedo.

Agradeço a todos que direta ou indiretamente me ajudaram a realizar este trabalho.

Meu muito obrigada.

"A fé em ação é amor, e amor em ação é trabalho - portanto,
o 'modo de se viver' é fruto da fé."

Madre Tereza de Calcutá

COLABORADORES

Este trabalho contou com a colaboração da professora Dra. Maria Norma Melo, do Laboratório de Biologia de *Leishmania* do ICB/UFMG; da professora Dra. Marilene Suzan Marques Michalick, do laboratório de Sorologia de Leishmanioses do ICB/UFMG; do professor Dr. Wagner Luiz Tafuri do Laboratório de Neuroimunopatologia Experimental (NIPE) do ICB/UFMG.

FINANCIADORES

Este projeto foi financiado por recursos fornecidos pelo laboratório Fort Dodge[®], recursos obtidos através de projetos de prestação de serviços mantidos pelo Laboratório de Sorologia do Departamento de Parasitologia do ICB-UFMG, e pela CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), através do fornecimento de bolsa de estudo.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	12
LISTA DE GRÁFICOS	12
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	13
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	14
RESUMO	16
ABSTRACT	17
1 INTRODUÇÃO	18
2 LITERATURA CONSULTADA.....	19
2.1 CICLO BIOLÓGICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL	19
2.2 LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA	19
2.3 RESPOSTA IMUNE.....	20
2.4 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA	23
2.4.1 Exames parasitológicos.....	24
2.4.2 Xenodiagnóstico	25
2.4.3 Testes sorológicos.....	25
2.4.4 Testes moleculares	27
2.5 VACINAS CONTRA LEISHMANIOSE VISCERAL	28
2.5.1 Critérios para desenvolvimento de vacinas.....	29
2.5.2 Vacina morta ou inativada de <i>Leishmania</i>	29
2.5.3 Vacina de subunidade ou frações purificadas da <i>Leishmania</i>	30
2.5.4 Vacina de DNA de <i>Leishmania</i>	32
3 HIPÓTESE	32
4 OBJETIVOS	32
4.1 OBJETIVO GERAL.....	32
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
5 MATERIAL E MÉTODOS.....	33
5.1 ANIMAIS	33
5.2 EXAMES LABORATORIAIS	34
5.2.1 Colheita de material	34
5.2.2 Reação de Imunofluorescência Indireta	34
5.2.3 Pesquisa de anticorpos da classe IgG e das subclasses IgG1 e IgG2 através do ELISA com antígeno solúvel de <i>Leishmania</i> (ASL).....	35
5.2.4 Pesquisa de anticorpos da classe IgG e das subclasses IgG1 e IgG2 através do ELISA com a subunidade fucose-manose ligante (FML).....	37
5.2.5 PCR específica para <i>Leishmania chagasi</i>	37
5.2.5.1 Extração de DNA	37
5.2.5.2 Técnica da PCR.....	38
5.2.5.3 Eletrofore em gel de poliacrilamida	38
5.2.6 Imunoistoquímica	38
5.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	39
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
6.1 ASPECTOS CLÍNICOS DOS CÃES VACINADOS E CÃES NATURALMENTE INFECTADOS.....	40

6.2 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL DOS CÃES VACINADOS E CÃES NATURALMENTE INFECTADOS	41
6.3 AVALIAÇÃO PARASITOLÓGICA DOS CÃES VACINADOS E CÃES NATURALMENTE INFECTADOS	48
7 CONCLUSÕES	52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Título obtido para a utilização dos conjugados anti IgG-Total, anti as frações IgG1 e IgG2 para o teste ELISA-ASL e ELISA-FML	41
TABELA 2	Relação das médias de densidade ótica de IgG1 e IgG2 e relação IgG1/IgG2 na ELISA-ASL e na ELISA-FML, dentro de cada grupo experimental.	45

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1	Valores individuais de absorbância de IgGT dos cães vacinados (n=30) na * ELISA-FML e ** ELISA-ASL.	ANEXO D
GRÁFICO 2	Valores individuais de absorbância de IgG1 dos cães vacinados (n=30) na * ELISA-FML e ** ELISA-ASL.	ANEXO D
GRÁFICO 3	Valores individuais de absorbância de IgG2 dos cães vacinados (n=30) na * ELISA-FML e ** ELISA-ASL.	ANEXO D
GRÁFICO 4	Valores individuais de absorbância de IgGT dos cães naturalmente infectados (n=30) na * ELISA-FML e ** ELISA-ASL.	ANEXO D
GRÁFICO 5	Valores individuais de absorbância de IgG1 dos cães naturalmente infectados (n=30) na * ELISA-FML e ** ELISA-ASL	ANEXO D

GRÁFICO 6	Valores individuais de absorbância de IgG2 dos cães naturalmente infectados (n=30) na * ELISA-FML e ** ELISA-ASL.	ANEXO D
-----------	---	---------

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1	Média dos valores de absorbância para a determinação da presença de IgG total em soros de cães vacinados e cães portadores de leishmaniose visceral pela ELISA-ASL e ELISA-FML	42
FIGURA 2	Média dos valores de absorbância para a determinação da presença de IgG1 em soros de cães vacinados e cães portadores de leishmaniose visceral pela ELISA-ASL e ELISA-FML	43
FIGURA 3	Média dos valores de absorbância para a determinação da presença de IgG2 em soros de cães vacinados e cães portadores de leishmaniose visceral pela ELISA-ASL e ELISA-FML	44
FIGURA 4	Gel de poliacrilamida 5%, corado pela prata, mostrando produtos amplificados (PCR) em nove cães vacinados	49
FIGURA 5	Gel de poliacrilamida 5%, corado pela prata, mostrando produtos amplificados (PCR) em dez cães vacinados.	49
FIGURA 6	Gel de poliacrilamida 5%, corado pela prata, mostrando produtos amplificados (PCR) em 11 cães vacinados.	50
FIGURA 7	Gel de poliacrilamida 5%, corado pela prata, mostrando produtos amplificados (PCR) em 14 cães naturalmente infectados.	50
QUADRO 1	Caracterização dos conjugados utilizados na ELISA	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASL	Antígeno Solúvel de <i>Leishmania</i>
CA	Cão Assintomático
CETEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CS	Cão Sintomático
CV	Cão Vacinado
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	deoxinucleotídeo Trifosfato
ELISA	<i>Enzyme lynked immunosorbent assay</i>
FML	Fucose Manose Ligante
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IgG	Imunoglobulina da classe G
IgG1	Imunoglobulina da subclasse G1
IgG2	Imunoglobulina da subclasse G2
IQ	Imunoistoquímica
LC	Leishmaniose cutânea
LV	Leishmaniose Visceral
LVC	Leishmaniose Visceral Canina
NIPE	Laboratório de Neuroimunopatologia Experimental
OIE	<i>Office International dès Epizooties</i>
OPD	Ortofenilenodiamina
pb	Pares de base
PBS	<i>Phoshate buffer saline</i>

PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
PM	Peso molecular
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
TDR	Programa Especial para Pesquisa e Treinamento em Doenças Tropicais
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
WHO	<i>World Health Organization</i>
°C	Graus Celsius
dL	Decilitro
g	Gravidade
kg	Quilograma
mg	Miligramma
mL	Mililitro
mM	Milimolar
N	Normal
ng	Nanograma
nm	Nanômetros
pmol	Picomole
U	Unidade
µg	Micrograma
µL	Microlitro
ω	Frequência
%	Porcentagem

AValiação DO PERFIL HUMORAL DE CÃES VACINADOS COM LEISHMUNE® E DE CÃES NATURALMENTE INFECTADOS PROCEDENTES DE ÁREA ENDÊMICA DE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

RESUMO

A leishmaniose visceral é uma doença grave, sendo fatal quando não tratada. O cão representa o principal reservatório da doença em ambiente urbano e periurbano. A Leishmune® é uma vacina de segunda geração que utiliza a subunidade fucose-manose ligante (FML). Inquéritos soroepidemiológicos visam a detecção de cães soropositivos. Considerando a similaridade de soroconversão de cães vacinados com a de cães naturalmente infectados, o estudo do perfil imune humoral de 30 cães vacinados e 30 cães naturalmente infectados foi feito através do ELISA empregando o antígeno solúvel de *Leishmania* (ASL) e a subunidade FML, para a IgGT e subclasses IgG1 e IgG2. Avaliação clínica e parasitológica, utilizando PCR de sangue estocado em papel filtro e imunoistoquímica, foi feita. Os resultados evidenciaram que dos 30 cães vacinados, 25 (83,3%) não apresentaram sinais clínicos compatíveis com a infecção. Houve diferença estatística significativa entre as médias dos valores de absorbância dos cães vacinados e naturalmente infectados considerando a ELISA-FML para a IgGT e subclasse IgG2 e ELISA-ASL considerando a IgG1. Quando da avaliação do perfil de IgG1 e IgG2, em um mesmo grupo de cães, observou-se que tanto os cães vacinados quanto os cães portadores apresentaram IgG2 superior em relação a IgG1, a exceção dos cães vacinados na ELISA-FML cujas médias foram equivalentes. A relação IgG1/IgG2 foi inferior a um em todos os grupos. Todos os 30 cães vacinados apresentaram resultado negativo na avaliação pela PCR, da mesma forma que os 19 cães que foram avaliados pela imunoistoquímica. Portanto, observou-se diferença entre as médias de densidade ótica dos cães vacinados e cães naturalmente infectados, para todas as imunoglobulinas avaliadas. Desta forma, estes resultados sugerem que o tipo de antígeno empregado altera a percepção de determinada imunoglobulina e que ampliação da população avaliada deve ser feita para estabelecimento de um possível ponto de corte.

Palavra chave: leishmaniose visceral canina, vacina Leishmune®, resposta imune humoral.

EVALUATION OF HUMORAL IMMUNE PROFILE OF DOGS VACCINATED WITH LEISHMUNE[®] AND DOGS NATURALLY INFECTED RESIDENT IN ENDEMIC AREA OF CANINE VISCERAL LEISHMANIASIS

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis is a serious illness, being fatal when not treated. The dog represents the main reservoir of the illness in urban and peri urban environment. The Leishmune[®] is a second generation vaccine that uses subunit Fucose Manose Ligant (FML). Seroepidemiological inquiries aim the detention of soropositive dogs. Considering the similarity between the seroconversion of vaccinated and these of infected dogs the study of the humoral immune profile of 30 vaccinated and 30 naturally infected dogs was performed through enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) using the soluble antigen of *Leishmania chagasi* (ASL) and subunit FML, for the IgG1 and subclasses IgG1 and IgG2. Clinical evaluation and parasitological assessment, using PCR of blood spotted in filter paper and ear skin immunohistochemical profile were also done. The results evidenced that of the 30 vaccinated dogs, 83.3% (25) presented none compatible signals the infection and all of them presented statistical significant difference of the values of absorbency when compared with natural infected dogs considering the ELISA-FML for the IgG1 and IgG2 subclass and for ELISA-ASL considering the IgG1. The evaluation of the IgG1 and IgG2 profiles for every studied animal showed superior optical density for the former subclass, with the exception of the dogs vaccinated in the ELISA-FML, whose averages were equivalents. The IgG1/IgG2 relation it was inferior to one in all the groups. The vaccinated dogs presented negative results in the PCR evaluation as well as and 19 of them in the ear skin immunohistochemical search. So, different optical density averages of the vaccinated and natural infected dogs, for all the immunoglobulins were observed. However, the results suggest that the type of antigen employed modifies the perception of the immunoglobulin, and that enlargement of the evaluated population must be done for establishment of a possible cut of point.

Keywords: canine visceral leishmaniasis, Leishmune[®] vaccine, humoral immune profile.

1 INTRODUÇÃO

Segundo Lainson e Shaw (1987), os parasitos do gênero *Leishmania* (Ross, 1903) são flagelados da Família Trypanosomatidae (Doflein, 1901; Woodcock, 1906), Ordem Kinetoplastida (Honigberg, 1963; Vickerman, 1976) e Filo Protozoa.

Em pacientes humanos as leishmanioses caracterizam-se por ser um grupo de doenças causadas por mais de 20 diferentes espécies do gênero *Leishmania*. De acordo com o quadro clínico apresentado e com a espécie infectante, podem ser classificadas em: leishmaniose cutânea (LC), mucocutânea (LMC) e visceral (LV), também conhecida como calazar (WHO, 2006^b). A LC se caracteriza pela presença de formações ulcerativas na pele que variam em número sendo, usualmente autolimitantes; quando o sistema imune não se mostra capaz de combater a doença efetivamente pode ocorrer a disseminação destas lesões pelo corpo, assinalando a LC difusa. Uma condição que pode surgir posteriormente à LC é a LMC, a qual se caracteriza pela destruição de membranas mucosas na região nasofaríngeal. A LV é a forma mais grave, sistêmica, sendo letal quando não tratada. Eventualmente pode ocorrer uma condição caracterizada pela presença de nódulo na pele, sendo denominada dermatite pós-calazar (WHO, 2006^b).

As leishmanioses constituem um grave problema de Saúde Pública, com prevalência global estimada em 12 milhões de casos e incidência anual de 1,5-2,0 milhões de casos, sendo 1,0 a 1,5 milhões de LC e 500.000 de LV (Desjeux, 1996). Segundo Nieto et al. (1999) um terço da população mundial reside em áreas endêmicas.

No contexto mundial a LV é observada em algumas regiões da Índia, Bengala

Ocidental e extremo sul; norte da China e Indochina. Na Europa aparece muito disseminada no sul da Rússia e em todo o litoral do Mediterrâneo, com focos endêmicos importantes na Grécia, sul da Itália, França e Espanha. Na África a moléstia ocorre ao norte, na Região do Mediterrâneo, em Marrocos e na Argélia e também ao sul em países como Sudão e Quênia. Nas Américas tem sido assinalada nos seguintes países: Brasil, Paraguai, Argentina, Bolívia, Venezuela, Colômbia, Peru, Guatemala e México (FIOCRUZ, 1997).

A emergência da LV como um problema de Saúde Pública, se atribui principalmente a fatores demográficos e ecológicos (Desjeux, 2002). No Brasil, observa-se nítido processo de transição epidemiológica da doença, com incidência crescente nos últimos anos nas áreas onde ocorria tradicionalmente, expansão geográfica para os Estados ao sul do país e também um franco processo de urbanização em cidades localizadas em regiões distintas como o Nordeste e o Sudeste (Alves e Bevilacqua, 2004). Em revisão de literatura, Lainson e Rangel (2005) citam que a distribuição da LV no Brasil inclui os Estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Distrito Federal, Espírito Santo, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio de Janeiro, Rio Grande do Norte, Roraima, Sergipe, São Paulo e Tocantins. Tem-se registrado no Brasil, em média, 3.500 casos por ano. O coeficiente de incidência da doença tem alcançado 20,4 casos/100.000 habitantes em algumas localidades de Estados nordestinos como Piauí, Maranhão e Bahia. As taxas de letalidade, de acordo com os registros oficiais, chegam a 10% em alguns locais (Ministério da Saúde, 2006). A Região Metropolitana de Belo Horizonte tem sofrido expansão da LV causada por *L. chagasi*, com crescente número de casos humanos e caninos, introduzida a partir de

um município vizinho, desde 1992 (Michalick et al., 1993).

Visando o controle da LV a Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda a eutanásia dos cães soropositivos, associada ao tratamento dos casos humanos e combate ao vetor, embora reconheça as limitações do primeiro procedimento (WHO, 1990). O controle do cão portador de LV no Brasil, segundo Barbiéri (2006) está atualmente fundamentado no tratamento e eutanásia. O tratamento tem demonstrado baixa eficácia com as drogas utilizadas em humanos, enquanto a eutanásia é pouco aceita por razões éticas e sociais. Considerando que as medidas de controle centradas no cão têm se mostrado inconsistentes, o desenvolvimento de vacinas contra a LV tem sido prioridade e considerado como urgente pela OMS (Da Silva et al., 2001; Barbieri, 2006).

2 LITERATURA CONSULTADA

2.1 Ciclo biológico da leishmaniose visceral

A *Leishmania (Leishmania) donovani* é o agente etiológico da LV na Índia, Paquistão, China Oriental, Bangladesh, Nepal, Sudão e Quênia; a *L. (L.) infantum* na Região do Mediterrâneo e *L. (L.) chagasi* no Novo Mundo (Guerin et al., 2002). As duas últimas espécies são consideradas co-específicas, dentro do complexo *L. (L.) donovani*, segundo estudos atuais utilizando técnicas bioquímicas e moleculares (Maurício et al., 1999).

No Brasil, a LV é transmitida pela picada de fêmeas de dípteros da família Psychodidae, subfamília Phlebotominae da espécie *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis*. As fêmeas destes flebotomíneos, assim como outros dípteros hematófagos, possuem um caráter oportunista e por ocasião de seu repasto sanguíneo uma ampla variedade de vertebrados faz parte de sua alimentação no

ambiente antrópico. A presença peridomiciliar de animais domésticos e sinantrópicos possui uma grande importância na manutenção da *L. longipalpis* (Desjeux, 2002; Dias et al., 2003). Na epidemiologia da leishmaniose visceral, o cão (*Canis familiares*) constitui o principal reservatório doméstico do parasito, o que lhe confere potencial importância na manutenção da LV no ambiente domiciliar (Deane e Deane, 1962).

A *L. chagasi* é um parasito digenético e a infecção da fêmea de *L. longipalpis* ocorre pela ingestão de formas amastigotas do parasito, existentes no citoplasma de células do sistema fagocítico mononuclear presentes na derme do hospedeiro infectado e componentes do repasto sanguíneo. No intestino médio do flebótomo as formas amastigotas transformam-se em promastigotas, formas móveis que se aderem ao epitélio do tubo digestivo, iniciando então o processo de multiplicação, com migração para o intestino anterior e diferenciação para as formas promastigotas metacíclicas, infectantes, que invadem a faringe do inseto. As fêmeas se tornam infectantes três a quatro dias após o repasto sanguíneo. Em nova alimentação, as formas promastigotas metacíclicas infectantes são depositadas na derme do próximo hospedeiro, junto à saliva do inseto. As formas promastigotas são internalizadas por macrófagos e se transformam em formas imóveis, as amastigotas, que se multiplicam até que ocorra o rompimento da célula parasitada, com posterior infecção de novas células do sistema fagocítico mononuclear (Lainson e Rangel, 2005).

2.2 Leishmaniose visceral canina

Segundo Alvar et al. (2004) e Grima (2005), o período de incubação e a apresentação clínica da leishmaniose visceral canina (LVC) variam intensamente nos animais

acometidos, partindo de total ausência de sinais até graves sintomas clínicos. Na LVC, assim como em outras doenças parasitárias, fatores específicos dependentes do hospedeiro e do parasito determinam o desenvolvimento dos mecanismos patogênicos da doença, das lesões e, em última análise, dos sinais dos animais acometidos. Tais processos patogênicos têm como fator comum a presença do parasito e como fator de distinção as reações orgânicas, sejam elas de resposta imune ou não, de efetividade e intensidade distintas (Ezquerro, 2001). Desta forma, após a inoculação de formas promastigotas na pele pelo inseto vetor, a resposta imune que ocorre no hospedeiro modula a apresentação clínica da afecção (Gama et al., 2004).

Pesquisas afirmam que a maior parte dos cães infectados pela *L. chagasi* são susceptíveis e acabam por desenvolver a doença patente, enquanto uma pequena porcentagem se mostra resistente compreendendo um grupo em que não há manifestação dos sinais ou, caso ocorra, há espontânea remissão destes. A apresentação mais evidente da doença nos cães é a leishmaniose viscerocutânea, onde se observam alterações do tegumento, renais, hepáticas e oculares (Nieto et al., 1992; García-Alonso et al., 1996).

Avaliando o quadro clínico-patológico de cães natural e experimentalmente infectados por *L. infantum*, Martínez-Moreno et al. (1995) observaram que os sinais clínicos encontrados no grupo experimentalmente infectado consistiam em perda de peso, apatia, discreta linfadenopatia, alopecia na face e extremidades; ao passo que, no grupo naturalmente infectado além dos achados anteriores foram observados outros como astenia, lesões ulcerativas, onicogrifose, conjuntivite e rinite. Nos dois grupos, a *Leishmania* foi isolada e identificada através de exames microscópicos de fragmentos retirados do baço, linfonodos, fígado, rins, pele e sistema reprodutivo.

Tendo como objetivo também o acompanhamento da evolução clínico-patológica da LVC, Nieto et al. (1999) avaliaram quatro cães infectados experimentalmente em um período de 343 dias. Os dados revelaram que aos 75 dias após a infecção formas amastigotas podiam ser observadas nos linfonodos poplíteos de todos os animais infectados, sendo que, o primeiro sintoma observado em todos foi linfadenomegalia destes. Em um cão a infecção se manifestou de forma latente com presença de dermatite e onicogrifose. Dois animais desenvolveram a forma patente ou sintomática da LVC, ou seja, perda de peso, adenopatia, onicogrifose e dermatite esfoliativa e ulcerativa na cauda, orelhas e extremidades. Inversamente, em um cão houve remissão dos sintomas aos 200 dias, com subsequente citologia negativa de aspirado de linfonodo.

O período inicial da infecção, geralmente cursa como uma síndrome geral inespecífica, que pode passar despercebida, sendo caracterizada por discreta perda de peso, apatia e ocasionalmente episódios de febre (Grima, 2005). Os sinais posteriores mais evidentes são lesões de pele, com alopecia e intensa descamação seca, não pruriginosa e usualmente aparecendo na cabeça e se estendendo por todo o corpo; onicogrifose; perda de peso progressiva muitas vezes acompanhada de anorexia; linfadenopatia local ou generalizada; lesões oculares, como blefarite e ceratoconjuntivite bilaterais; epistaxe; anemia; falência renal, em consequência à deposição de imunocomplexos e diarreia, onde exames endoscópicos e espécimes para biópsia evidenciaram colite ulcerativa e inflamação granulomatosa da mucosa intestinal (Genaro, 1993; Ferrer, 1999; Grima, 2005).

2.3 Resposta imune

A resposta imune contra antígenos de natureza protéica, como as formas de

Leishmania, é regulada, em grande parte, por células T CD4⁺ ou linfócitos T auxiliares (Th) que têm a capacidade de produzir uma grande variedade de citocinas em resposta a estes antígenos (London et al., 1998).

Pesquisas anteriores demonstraram que clones de células T CD4⁺, em modelo murino, poderiam ser divididos em dois subtipos, fundamentados no perfil de citocinas secretadas em resposta a um antígeno. O subtipo de células T, denominado de Th-1, secretava principalmente interleucina (IL)-2, interferon (IFN)- γ , fator de necrose tumoral (FNT)- α e linfotóxina (LT); enquanto o subtipo Th-2 secretava IL-4, IL-5, IL-6 e IL-13 (Mosmann et al., 1986; Fiorentino et al., 1989).

Segundo Abbas et al. (2002), o IFN- γ constitui a principal citocina do subtipo Th-1 que atua na ativação e incremento da atividade microbicida de macrófagos e estimula a produção de IgG fixadora de complemento. Além disso, as citocinas produzidas por esta população celular promovem a diferenciação de linfócitos T CD8⁺ em células citotóxicas e a ativação de neutrófilos e células “natural killer”. As citocinas produzidas pela população Th-1 estimulam ainda, a fagocitose de microorganismos e eliminação de patógenos intracelulares (London et al., 1998).

Em estudo realizado por Jaffe (1999), para se verificar o perfil da resposta imunológica na LV em modelo murino, observou-se que os animais apresentavam cura quando desenvolviam resposta predominantemente celular do tipo Th-1. Os fatores que determinam o desenvolvimento patente das manifestações clínicas da LV não estão completamente identificados. A deficiente produção de IFN- γ após a exposição ao antígeno *Leishmania* está associado com incremento de células T CD4⁺ expressando um perfil de citocinas Th-2, com a produção

de IL-4 e IL-10, mas não de IL-2 ou IL-12 (Gama, 2004).

Segundo Pinelli et al. (1994), a infecção sintomática, em cães, está associada com a crescente produção de anticorpos, imunorregulação negativa da resposta imune celular periférica com decrescente produção de IL-2, IFN- γ e FNT- α , conduzindo a ineficiente eliminação do parasito. Desta forma, cães sensíveis a LV tendem a desenvolver resposta imune predominantemente humoral caracterizada por hipergamaglobulinemia policlonal, enquanto que, os resistentes apresentam expressiva resposta celular (Ferrer et al., 1995).

Entretanto, até o momento, o exato papel das citocinas do subtipo Th-2, em cães portadores de LV, não está completamente definido. Enquanto há uma correlação positiva entre patologia e incremento da produção de IL-10 em humanos, o envolvimento desta citocina em cães portadores de LV ainda é controverso. Com o intuito de verificar o perfil tecidual de citocinas em cães naturalmente infectados com LV, Quinnell et al. (2001) mensuraram os níveis de RNA-m para IFN- γ , IL-4, IL-10, IL-13 e IL-18 em aspirados de medula óssea. Os níveis de IFN- γ mostraram-se mais elevados nos cães com LV em comparação aos cães saudáveis. Observou-se correlação positiva significativa entre a presença de RNA-m para IFN- γ e os níveis de IgG1 anti-*Leishmania*, enquanto esta correlação não foi estatisticamente significativa para IgG2, IgG3 e IgG4. Quanto ao nível tecidual de RNA-m para IL-10 observou-se que tanto para os cães com sinais clínicos quanto para os não infectados, do grupo controle, o acúmulo desta citocina foi similar. Desta forma, contrariamente aos dados encontrados na LV humana a IL-10 não apresentou papel imunossupressivo em cães.

A resposta celular e humoral, em cães experimentalmente infectados, foi descrita por Martinez-Moreno et al. (1995) durante um período de 110 dias. A avaliação humoral foi realizada através dos testes de imunofluorescência indireta (RIFI) e ensaio imunoenzimático (ELISA) e a responsividade das células T foi avaliada através da reação intradérmica (IDR) e do ensaio linfoproliferativo *in vitro*. A resposta das células T ao antígeno de *Leishmania* foi negativa tanto na IDR quanto no ensaio *in vitro*. Houve produção específica de anticorpos IgG anti-*Leishmania*. A ausência de resposta celular foi considerada específica uma vez que, no ensaio *in vitro*, quando submetida ao mitógeno concavalina-A houve linfoproliferação. As observações dos parâmetros imunológicos, nas primeiras semanas pós-infecção, sugerem que fatores responsáveis por esta resposta anérgica se manifestam muito rapidamente e que o desenvolvimento da doença nos cães está relacionado com a perda da imunidade celular específica e com uma considerável, mas ineficaz resposta humoral. Martinez-Moreno et al. (1993) já revelavam ineficiente resposta imune mediada por células em cães portadores da forma sintomática de LV com presença precoce de anticorpos específicos anti-*Leishmania*.

De forma semelhante, Cabral et al. (1998) avaliaram a resposta humoral e celular de 49 cães acometidos por LV, residentes na região do Alto Douro em Portugal. Como era esperado, observou-se diversidade em relação à resposta imunológica. Tendo como parâmetro os resultados dos cães submetidos à ELISA e resposta linfoproliferativa: 24,5% foram positivos somente na ELISA; 16,3% positivos somente no ensaio linfoproliferativo e 24,5% e 34,7% positivos e negativos em ambos, respectivamente. Considerando os resultados obtidos na RIFI (diluição 1:80) e resposta linfoproliferativa: 16,3% e 24,5% foram positivos somente no RIFI e somente

na linfoproliferação, respectivamente; ao passo que, 16,3% e 42,9% foram positivos e negativos em ambos, respectivamente. Estes dados revelam a diversidade da resposta imunológica de animais portadores de LVC e evidencia a existência de um grupo de cães potencialmente capaz de combater a infecção.

A LVC está associada tanto com a ativação policlonal das células B, por componentes antigênicos do parasito, quanto a efetiva resposta clonal específica com produção de imunoglobulinas (Ig) anti-*Leishmania* (Quinnell et al., 2003). A resposta humoral específica da LVC caracteriza-se pela produção de elevados níveis de IgG anti-*Leishmania*, permitindo ampla utilização do diagnóstico sorológico (Canãvate et al., 2005). Assim sendo, técnicas sorológicas constituem importantes ferramentas no diagnóstico e estudo da doença, estando fundamentadas na detecção de anticorpos específicos anti-*Leishmania* (Gradoni, 2002).

A produção de anticorpos específicos anti-*Leishmania* foi observada em torno de 45 dias a 3 meses por Abranches et al. (1991) e a partir do terceiro mês por Santos-Gomes et al. (2002) em cães experimentalmente infectados por *L. infantum*. Quatro subclasses de IgG (IgG1-IgG4) têm sido descritas em cães (Mazza et al., 1993).

Avaliando o perfil das subclasses de IgG, Deplazes et al. (1995) observaram que cães naturalmente infectados com LV produziam tanto IgG1 quanto IgG2, sendo que elevados níveis de IgG1 estariam associados a cães sintomáticos, enquanto que a presença de IgG2 estaria relacionada com infecção assintomática.

Nieto et al. (1999), em estudo com cães experimentalmente infectados com LV, observaram que o perfil humoral das subclasses de IgG1 e IgG2 se comportavam distintamente em relação ao quadro clínico

apresentado pelo animal: cães que desenvolveram a forma patente evolutiva da doença apresentaram cinética similar de indução para os níveis das subclasses IgG1 e IgG2, permanecendo elevados durante toda a avaliação, sendo que os níveis de IgG2 foram superiores. Os cães assintomáticos também apresentavam elevados níveis de IgG2, ao passo que os níveis de IgG1 permaneceram reduzidos, próximos aos valores de referência do controle negativo. Portanto, considerando a resposta dicotômica das subclasses foi sugerida uma associação entre a presença de IgG1 e a cronicidade da LVC.

Objetivando mensurar os níveis de IgG1-IgG4, em cães naturalmente infectados por *L. chagasi*, Quinnell et al. (2003) avaliaram animais residentes em área endêmica de LVC durante um período de 16 meses. Foi observado que a manifestação dos sinais clínicos nos cães estava associada com o incremento de todas as subclasses, sendo que a proporção de cães que produziram níveis detectáveis de anticorpos da subclasse IgG anti-*Leishmania* foi de 98, 58, 70 e 82% para IgG1-IgG4, respectivamente. Os níveis de IgG2 foram reduzidos em relação aos níveis de IgG1 nos cães doentes e cães parasitologicamente positivos. Assim, pode-se concluir que em cães com LV havia uma elevação de todas as subclasses, particularmente IgG1, IgG3 e IgG4.

Iniesta et al. (2005) avaliaram o perfil da IgG; subclasses IgG1, IgG2 e IgE em 109 amostras de soros de cães. Quatro grupos foram formados, sendo 19 animais de área não endêmica para LVC, 38 animais não infectados de área endêmica, 29 animais infectados assintomáticos e 23 animais sintomáticos. A pesquisa demonstrou que a IgG e a subclasse IgG2, em cães com LV, eram expressas em todos os animais infectados, tanto assintomáticos quanto sintomáticos; ao passo que, a subclasse IgG1 e IgE somente expressavam-se em

animais que desenvolviam os sintomas, evidenciando potencial papel destas imunoglobulinas como marcadores da gravidade da doença.

Inversamente aos dados anteriores, Reis (2001) observou que na LVC assintomática ocorria o desenvolvimento de uma resposta imune humoral caracterizada pela produção de anticorpos IgG1 anti-*Leishmania*, enquanto na LVC sintomática havia uma hipergamaglobulinemia com elevada produção de IgG2 e IgE. Coincidentemente a estes dados, Costa Val (2004) avaliando 42 animais naturalmente infectados por LVC observou que todos apresentavam resultado positivo a ELISA para as subclasses IgG1 e IgG2, havendo diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0001$) entre as subclasses, sendo os índices mais elevados pertencentes à segunda categoria. Os cães que apresentaram maior número de sintomas mostraram também maior teor de anticorpos pela ELISA, bem como maior teor de IgG2.

2.4 Diagnóstico laboratorial da leishmaniose visceral canina

O diagnóstico da LVC deve se basear em informações relativas ao estado clínico do animal, epidemiologia da área, achados bioquímicos e parasitológicos, sendo que todos os dados devem ser considerados em conjunto (Alvar et al., 2004).

Em relação ao diagnóstico laboratorial três categorias de testes podem ser citadas: os parasitológicos para demonstração do parasito; os sorológicos para detecção de anticorpos específicos anti-*Leishmania* e os moleculares, que se fundamentam na amplificação do DNA do parasito (Ferrer, 1999).

2.4.1 Exames parasitológicos

O diagnóstico parasitológico fundamenta-se na demonstração do parasito a partir de material biológico de punções hepática, esplênica, de linfonodos e de medula óssea e ainda biópsia de pele (Alvar, 2004). Sua especificidade é de 100%, ao passo que sua sensibilidade não se apresenta muito elevada devido fatores como número de amostras coletadas, fase da enfermidade e carga parasitária (Grima, 2005). Apesar da sensibilidade ser, de uma forma geral, reduzida a demonstração do parasito tanto por microscopia quanto por culturas obtidas a partir de materiais relevantes representam técnicas diagnósticas de referência (Strauss-Ayali et al., 2004).

Gradoni (2002) relata que em relação à cultura, o número de amostras obtidas por animal, a razão entre a quantidade de material semeado e o número de frascos de cultura e o tipo de meio utilizado podem alterar de maneira significativa sua sensibilidade diagnóstica.

Os aspirados de medula óssea e linfonodos são os mais usados pelos clínicos veterinários para demonstração do parasito por microscopia. A principal desvantagem deste método é a sensibilidade de apenas 50% nos aspirados de medula óssea e menos de 30% naqueles de linfonodos (Alvar et al., 2004). Segundo Genaro (1993), a grande variabilidade do parasitismo medular, que altera entre positivo e negativo indiscriminadamente, seria responsável pela pequena sensibilidade do método.

Foram estudados 64 cães sorologicamente positivos para LV, residentes em área endêmica da doença na Bahia, com o objetivo de comparar a sensibilidade de culturas de punção de baço e linfonodo poplíteo. Os resultados revelaram que a sensibilidade das culturas de aspirado de baço e de linfonodo, para diagnóstico da *L.*

chagasi, foram 73,4% e 18,8%, respectivamente; e que as culturas positivas de aspirado de baço foram mais frequentes nos animais sintomáticos em relação aos assintomáticos (Barrouin-Melo et al., 2004). Também utilizando culturas de punção de baço e linfonodo, em animais portadores de LVC, a sensibilidade encontrada foi de 61 e 37%, respectivamente, em estudo realizado na cidade de Nataf em Israel (Strauss-Ayali et al., 2004).

Natami et al. (2000) utilizando esfregaços de aspirado de linfonodo e de baço, corados pelo Giemsa, encontraram em 54 cães, com sorologia positiva para LV, apenas seis animais parasitologicamente positivos. Costa Val (2004) empregou o exame parasitológico direto de aspirado de linfonodo pré-escapular, medula óssea e cultura em meio NNN/ α -MEM (“Minimal Essential Media”) em 42 cães. O número de animais positivos no exame direto foi: seis para aspirados de linfonodo, nove para medula óssea e sete para ambos. A cultura de material aspirado de medula óssea foi positiva em todos os animais.

Segundo Tafuri et al. (2001), biopsias de pele podem ser obtidas de uma forma simples e a detecção do parasito caracteriza o diagnóstico definitivo. Entretanto, particularmente na pele, os exames rotineiros que utilizam a coloração de hematoxilina-eosina (HE) são muitas vezes inconclusivos. Em estudos posteriores Tafuri et al. (2004) empregaram o método de imunoistoquímica (IQ). Observou-se um incremento na capacidade diagnóstica, sendo que as formas amastigotas foram detectadas em vários órgãos como fígado, baço, medula óssea e pele. Neste último, particularmente, houve um aumento de 50% na positividade para detecção da *Leishmania*, quando comparado com o método de coloração histológico de retina.

2.4.2 Xenodiagnóstico

O xenodiagnóstico é uma técnica aplicada para detecção e isolamento do patógeno utilizando-se o vetor artrópode natural (Guarga et al., 2000). Embora não possa ser considerada como uma técnica de rotina no diagnóstico da *Leishmania* ela representa grande papel na resolução de questões epidemiológicas relacionadas ao quadro clínico e evolução no tratamento de cães acometidos por LV (Gradoni, 2002; Alvar et al., 2004).

Deane e Deane (1954), em pesquisa realizada no Ceará, relatam infecção experimental de fêmeas de flebótomos da espécie *L. longipalpis* quando alimentadas em cães sabidamente portadores de LV.

Considerando a importância de se avaliar a capacidade infectante de cães com LV em relação ao seu quadro clínico, Guarga et al. (2000), na Província de Zaragoza na Espanha, estudaram 12 cães que foram divididos em três grupos clínicos: assintomáticos, oligossintomáticos e polissintomáticos. Os autores concluíram que não houve diferença estatística significativa entre os três grupos, ressaltando a importância epidemiológica dos animais assintomáticos e oligossintomáticos na transmissão da doença.

Em estudo semelhante Travi et al. (2001) associaram o quadro clínico de LVC com a capacidade de infecção do vetor *L. longipalpis*. Vinte cães soropositivos para LV foram divididos em grupos de acordo com os sinais clínicos presentes. Os animais foram submetidos a múltiplos xenodiagnósticos. Os resultados revelaram que os animais assintomáticos não apresentaram capacidade infectante ao passo que o teste foi positivo em dois dos sete animais oligossintomáticos e em quatro dos oito animais polissintomáticos. Os flebotomíneos que se alimentaram nos

animais polissintomáticos apresentaram maior número de promastigotas no seu tubo digestivo. Os autores também concluíram que a pele de orelha é mais infectante em comparação a pele do abdome. Resultados semelhantes, em relação à capacidade infectante dos cães com LV, foram obtidos por Costa Val (2004).

2.4.3 Testes sorológicos

Considerando a significativa expressão de anticorpos específicos anti-*Leishmania* circulantes no cão portador de LV, para estudos de soroprevalência e determinação de possíveis focos enzoóticos, os exames mais empregados são o RIFI e o ELISA (Grima, 2005). No Brasil, estes testes são os mais utilizados no diagnóstico de LV humana e canina sendo considerados, sobretudo o último, o teste de escolha para inquéritos populacionais (Gontijo e Melo, 2004).

A RIFI é uma técnica amplamente utilizada no diagnóstico da LVC (Ferrer et al., 1995) apresentando elevada taxa de sensibilidade mesmo quando se utiliza como antígeno outras espécies de *Leishmania*, tais como *L. mexicana* e *L. braziliensis* (Costa et al., 1991). Alves e Bevilacqua (2004) citam que a RIFI demonstra sensibilidade que varia de 90 a 100% e especificidade aproximada de 80%. A especificidade desse teste decresce onde possivelmente há reações cruzadas por infecção por outros Tripanossomatídeos, como na Doença de Chagas e na LC e LMC.

A RIFI é considerada “padrão ouro” entre os pesquisadores europeus, sendo também recomendado pelo manual do “Office International des Epizooties” de 2000. Principalmente porque, a princípio, nos países do Mediterrâneo não há preocupação com reações cruzadas, contrariamente aos países do Novo Mundo (Gradoni, 2002).

Segundo Gontijo e Melo (2004), o teste ELISA caracteriza-se por apresentar algumas vantagens como a sensibilidade mais elevada, por permitir a detecção de baixos títulos de anticorpos; rapidez; fácil execução e leitura. Os antígenos utilizados são tradicionalmente derivados de culturas *in vitro* de promastigotas e consistem em um repertório de pelo menos 30 antígenos somáticos e inúmeros componentes de superfície (Tavares et al., 2003).

De forma semelhante ao que ocorre na RIFI, reações cruzadas com espécimes pertencentes à mesma família ou com microorganismos filogeneticamente distantes podem ocorrer (Tavares et al., 2003; Rosário et al., 2005).

Estudo realizado nos Estados da Bahia e Pernambuco, em áreas endêmicas de LVC, avaliou a sorologia de cães naturalmente infectados por *L. chagasi* utilizando-se RIFI e ELISA. Considerando os sinais clínicos de LV, os cães foram agrupados em sintomáticos, oligossintomáticos e assintomáticos, além de um grupo controle negativo. Ao final do estudo os resultados indicaram reduzida sensibilidade e elevada especificidade da RIFI (83 e 100%) quando comparadas aos da ELISA (94 e 90%). Os autores concluíram que os anticorpos IgG anti-*Leishmania* foram detectados em todos os animais pertencentes aos grupos sintomáticos e oligossintomáticos utilizando os dois testes simultaneamente, indicando a necessidade de se utilizar dois diferentes testes sorológicos no diagnóstico da LVC (Almeida et al., 2005).

O fato de que as técnicas sorológicas convencionais utilizam antígenos brutos, formas completas de promastigotas ou amastigotas ou extratos solúveis destes, limita consideravelmente sua especificidade (Alvar et al., 2004). Desta forma, ênfase tem sido dada na caracterização de componentes antigênicos da *Leishmania*, antígenos purificados e recombinantes,

como ferramenta para obtenção de um diagnóstico mais específico (Tavares et al., 2003).

Considerando isto, uma questão relevante na execução da ELISA consiste na especificidade do antígeno utilizado no ensaio. É conhecido que alguns podem estar estreitamente relacionados a outros parasitos. A proteína de superfície gp63 está presente em todas as espécies do gênero *Leishmania* e outros parasitos da Família Tripanossomatidae. Da mesma forma, a crescente distribuição geográfica da LV, LC, LMC e Doença de Chagas incrementam os problemas relativos à especificidade dos ensaios imunodiagnósticos (Palatnik-de-Souza et al., 1995).

Considerando a necessidade da caracterização de antígenos espécie-específicos para acurado diagnóstico e prognóstico da LV, Palatnik-de-Souza et al. (1995) avaliaram o complexo glicoprotéico de superfície (FML) de formas promastigotas de *L. donovani* na realização da ELISA. Os resultados obtidos mostraram sensibilidade de 100% e especificidade de 96% no diagnóstico do calazar em pacientes infectados por *L. chagasi*. Não foi observada reação cruzada com pacientes que apresentavam LC, LMC ou Doença de Chagas e em 20% dos pacientes aparentemente saudáveis, com valores positivos para a ELISA-FML, ocorreu o desenvolvimento da LV durante os subsequentes meses.

Em estudo posterior, do mesmo grupo, Cabrera et al. (1999) avaliaram o potencial diagnóstico e prognóstico da ELISA-FML em cães com LV. Avaliou-se a sorologia de animais naturalmente e experimentalmente infectados com *L. chagasi*, vacinados com a vacina-FML e portadores de outras infecções. Outras técnicas diagnósticas foram empregadas como a RIFI com promastigotas de *L. chagasi* e *L. mexicana* e a ELISA utilizando o antígeno solúvel de *L.*

mexicana (ASL). Os resultados revelaram que não houve reatividade com o soro de cães portadores de outras patologias, indicando que a ELISA-FML pode ser usada no diagnóstico da LVC. Outros resultados revelaram elevada sensibilidade da ELISA-FML comparada com a RIFI na detecção de anticorpos em soros de cães assintomáticos. Averiguou-se o valor preditivo dos testes através da análise sorológica dos cães controle negativo e cães vacinados desafiados experimentalmente, através de inoculação intravenosa de 10⁸ amastigotas de *L. donovani*, e cães assintomáticos. O valor preditivo encontrado foi de 100% na ELISA-FML, 43% na ELISA-ASL e 24% na RIFI.

Scalone et al. (2002), em estudo realizado com cães, compararam os resultados da ELISA utilizando o antígeno recombinante rK-39 da *Leishmania*, tendo com padrão os resultados da RIFI. Os resultados da ELISA e RIFI demonstraram elevada concordância. Os valores relativos à sensibilidade e especificidade da ELISA foram 97,1% e 98,7%, respectivamente.

Em Janaúba, Minas Gerais, Rosário et al. (2005) compararam os resultados do teste ELISA utilizando diferentes antígenos: ASL de formas promastigota de *L. chagasi* e *L. amazonensis* e antígenos recombinantes rK-26 e rK-39; utilizando soro e eluato de sangue dessecado coletado em papel filtro. A sensibilidade dos testes foi similar variando de 97 a 100%. A especificidade foi superior a 96% para o soro e eluato com os diferentes antígenos, com exceção para *L. chagasi* com eluato que alcançou 88%. Neste mesmo estudo avaliou-se a reação cruzada em cães acometidos por *Trypanosoma cruzi*, *Babesia canis* e *Dirofilaria immitis*. O ensaio utilizando o antígeno *L. amazonensis* demonstrou reação cruzada com *T. cruzi*, em 25 dos 40 animais e *D. immitis*, em seis dos 10; com o antígeno de *L. chagasi* observou-se reação cruzada com *T. cruzi*, em 34 dos 40; *D.*

immitis, em quatro dos 10 e *B. canis*, em um dos 24 animais. Os antígenos recombinantes não apresentaram reação cruzada.

2.4.4 Testes moleculares

A reação em cadeia da polimerase (PCR) consiste em uma técnica que explora certas características do processo de replicação do DNA. A enzima DNA polimerase utiliza o DNA de fita única, após separação da fita dupla pelo aquecimento, como molde para a síntese de uma nova fita complementar, sendo o ponto inicial para esta síntese determinado pelo fornecimento de oligonucleotídeos ou iniciadores. Desta forma, a síntese de uma região alvo de DNA pode ser direcionada (Watson et al., 1997).

Nos últimos anos, um grande número de pesquisas tem investigado a utilização da PCR para detecção da *Leishmania* em cães. Vários tipos de amostras, iniciadores e diferentes protocolos têm sido desenvolvidos e empregados (Gradoni, 2002; Manna et al., 2004). Alvar et al. (2004) citam a possibilidade de se identificar o DNA do parasito proveniente do minicírculo do cinetoplasto ou do genoma em diferentes amostras como: sangue periférico, pele, linfonodo, conjuntiva ocular e medula óssea.

A PCR representa uma técnica altamente sensível e específica (Cortes et al., 2004), entretanto, sua limitação para uso em inquéritos epidemiológicos se baseia no custo, disponibilidade de reagentes, equipamentos e pouca adaptabilidade do método ao campo (Alves e Bevilacqua, 2004).

Com a finalidade de investigar a prevalência da infecção pela *L. infantum* na ilha de Mallorca, área endêmica de LVC, empregou-se a sorologia e a PCR como técnicas diagnósticas. Cem cães foram examinados clinicamente, determinou-se o

título de anticorpos anti-*Leishmania* e investigou-se a presença do parasito através da PCR em três diferentes tecidos: medula óssea, pele e conjuntiva ocular. A prevalência de cães sintomáticos e a soroprevalência foram 13 e 26%, respectivamente. Em 63% dos cães, o DNA da *Leishmania* pode ser detectado pela PCR em pelo menos um dos três tecidos investigados. Os resultados positivos da PCR na medula óssea, conjuntiva ocular e pele foram: 17,8; 32 e 51%, respectivamente. O DNA da *Leishmania* foi detectado em todos os animais que apresentavam sinais clínicos. Os resultados apontaram que parte significativa dos cães que vivem nesta área estava infectada, incrementando a prevalência até então suposta e demonstrando que o principal tecido de reserva do parasito em cães é a pele (Solano-Gallego et al., 2001). Dados semelhantes, quanto à elevação da suposta taxa de prevalência de LVC, foram obtidos por Leontides et al. (2002) em área endêmica da doença na Grécia.

Em estudo semelhante, Manna et al. (2004) compararam os resultados da RIFI e a sensibilidade e aplicabilidade da PCR como método diagnóstico primário em diferentes tipos de tecidos: biópsia de pele, aspirado de linfonodo e sangue total. O DNA extraído das amostras foi amplificado na PCR utilizando como alvo a região constante do cinetoplasto. Os resultados demonstraram que a avaliação pela PCR foi mais sensível do que a RIFI; sendo que, 100% dos cães foram positivos pela PCR e 85% pela RIFI. Em relação aos espécimes coletados observou-se que: 99% dos aspirados de linfonodo, 95% das biópsias de pele e 94% das amostras de sangue periférico apresentaram resultado positivo. Considerando que a carga parasitária no sangue periférico tende a decrescer com o curso da infecção e que o aspirado de linfonodo é um método invasivo os autores consideraram a biópsia de pele

como substrato ideal para realização do diagnóstico pela PCR.

Cortes et al. (2004), também utilizando na PCR um iniciador específico da região do minicírculo do cinetoplasto, observaram 100% de sensibilidade no diagnóstico de cães acometidos por LV em aspirado de medula óssea e biópsia de pele, ao passo que, a sensibilidade encontrada nas amostras submetidas à cultura foi de 81,8%.

Wortmann et al. (2005) citam a PCR quantitativa em tempo real como uma modificação, relativamente recente, da PCR convencional. Este teste emprega marcadores fluorescentes capazes de monitorar a formação dos produtos de amplificação ao longo da reação. Como vantagens são citados: rapidez; facilidade, não sendo necessária a análise em gel dos produtos de amplificação; reduzido risco de contaminação e elevada especificidade. Considerando o diagnóstico da LVC, Francino et al. (2006) citam que alternativas que quantifiquem a presença do parasito são necessárias não somente para elucidar o estado clínico de cão positivo em áreas endêmicas, mas também para monitorar a parasitemia após o tratamento e na triagem de cães submetidos a novas vacinas e medicamentos.

2.5 Vacinas contra leishmaniose visceral

Estudos precedentes destacam que o principal requisito para que uma vacina seja eficaz contra a LV é a indução estável e permanente de resposta imune celular do tipo Th1. A estimulação inicial da produção de IL-12 tem demonstrado ser um ponto chave na subsequente indução, magnitude e memória da resposta do tipo I (Gradoni, 2001). O IFN- γ , principal citocina produzida em uma resposta deste tipo, induz a síntese de óxido nítrico sintetase (iNOS) que ativa a função microbicida dos macrófagos parasitados (Alvar, 2004).

Sendo assim, a questão crítica para escolha e desenvolvimento de vacinas anti-*Leishmania* em cães é definir antígenos da *Leishmania* e adjuvantes capazes de fornecer uma favorável e sustentável produção de citocinas *in vivo*.

2.5.1 Critérios para desenvolvimento de vacinas

A OMS estabelece quatro fases de experimentação para se desenvolver uma nova vacina. A Fase I é caracterizada por estudos de segurança e imunogenicidade da formulação da vacina. Nesta não há desafio infectante nos indivíduos vacinados, o que ocorre na Fase IIa, na qual os indivíduos vacinados recebem um desafio experimental. As Fases IIb e III são compostas de estudos que analisam a eficácia da vacina a campo, com indivíduos expostos ao desafio natural. Estes testes são de média escala (centenas) e aplicados a um grupo vacinado e a um grupo controle. Finalmente, a Fase IV na qual estudos, em larga escala, são realizados após o registro da vacina com indivíduos vacinados e expostos ao desafio natural (WHO, 2006^a).

2.5.2 Vacina morta ou inativada de *Leishmania*

Segundo Tizard (1998), para se utilizar microorganismos inativados ou mortos em vacinas deve-se preservar ao máximo sua antigenicidade original. Desta maneira, métodos que promovam desnaturação protéica ou oxidação lipídica extensas são geralmente insatisfatórios. Portanto, as proteínas podem ser suavemente desnaturadas por meio de tratamento com acetona ou com álcool.

Poucos estudos, com o emprego desta técnica, têm sido elaborados para cães no combate da LV. O uso deste tipo de vacina, em humanos, tem-se fundamentado nas

formas promastigotas inativadas com ou sem Bacillus Calmette-Guérin (BCG) como adjuvante (Gradoni, 2001).

Uma vacina composta por formas promastigotas de *Leishmania (Viannia) brasiliensis*; sonicadas, tratadas com mertiolate e acrescidas de BCG, foi avaliada nas fases I e II (Mayrink et al., 1996). Durante a fase II, dez cães receberam três doses de vacina, a cada vinte e um dias por via intradérmica. Dois meses após a última administração os cães foram desafiados com formas promastigotas de *L. chagasi*, inoculadas por via intravenosa. Nove dos dez cães vacinados, após a terceira doses de vacina, apresentaram resposta linfoproliferativa significativa aos antígenos de *L. chagasi* e as necropsias destes animais indicaram que não desenvolveram infecção após o desafio. Em estudos subsequentes a vacina foi testada a campo, fase III; entretanto, esta não se mostrou capaz de proteger os cães contra a LV (Genaro et al., 1996).

Lasri et al. (1999) investigaram as respostas humoral e celular em cães vacinados com promastigotas de *L. major*, autoclavadas, acrescidas de BCG ou saponina. Os autores observaram que aqueles cães que receberam vacina com BCG, como adjuvante, exibiram resposta linfoproliferativa específica e prolongada e inexpressivos títulos de anticorpos contra o antígeno *L. infantum*.

Mohebbi et al. (1998) testaram, em quatro grupos de cães negativos para LV, o seguinte protocolo: vacina autoclavada de *L. infantum* (1mg de proteína/dose) com BCG (400mg/dose); vacina autoclavada de *L. major* (1mg de proteína/dose) com BCG (400mg/dose); somente BCG (400mg/dose) e salina, respectivamente. Os cães que foram vacinados receberam três doses, por via intradérmica, com intervalo de trinta dias. Os cães foram desafiados, 90 dias após a terceira dose, com formas promastigotas de *L. infantum*. Todos os cães dos grupos

controle foram negativos na IDR com lisado de *Leishmania* e apresentaram sinais clínicos da doença seis meses após o desafio, com esfregaço e cultura positivos das amostras de baço, fígado e linfonodo poplíteo coletados na necropsia. Todos os cães vacinados apresentaram IDR positiva e somente um dos oito cães desenvolveu a doença com posterior resultado parasitológico positivo. Desta forma, em condições experimentais, as vacinas autoclavadas de *L. infantum* e *L. major* acrescidas de BCG foram protetoras. Extensão deste estudo foi realizada a campo, onde se avaliou a proteção destas vacinas contra infecção natural, sendo o grupo controle composto de 75 cães não vacinados e o grupo vacinado composto por 45 cães. Durante o período de um ano constatou-se que a taxa de soroconversão, ou seja, a produção de anticorpos dos animais vacinados foi significativamente inferior em relação ao grupo não vacinado. Os pesquisadores concluíram que as vacinas de *Leishmania* autoclavada acrescidas de BCG foram efetivas em proteger os cães contra LV em área endêmica (Fallah et al., 2000).

2.5.3 Vacina de subunidade ou frações purificadas da *Leishmania*

Antígenos purificados ou frações purificadas da *Leishmania* têm sido largamente utilizados em modelos experimentais, com o objetivo de verificar seus potenciais imunogênicos (Gradoni, 2001).

Dunan et al. (1989) investigaram, a campo, a imunogenicidade de frações purificadas liofilizadas de promastigotas de *L. infantum*, de 67 e 94 KDa, denominadas LiF2. Foram utilizados 400 cães soronegativos, escolhidos aleatoriamente para receber LiF2 com adjuvante ou somente o adjuvante. Os cães foram expostos por dois anos à infecção, em uma região endêmica no sul da

França. Contrariamente ao que já havia sido verificado em modelo murino, a taxa de infecção e sinais clínicos foram significativamente superiores nos cães vacinados em relação ao grupo controle.

Palatinik et al. (1989) destacam a importância da interação dos ligantes de superfície, presentes na forma promastigota da *Leishmania*, com os receptores de reconhecimento e internalização, presentes em macrófagos do hospedeiro vertebrado infectado. O ligante glicoprotéico fucose-manose (FML) foi purificado e analisado quimicamente. Os açúcares identificados foram testados quanto a sua capacidade de inibir a internalização de formas promastigotas em macrófagos peritoneais de BALB/c *in vitro*. As células foram pré-incubadas com carboidratos para saturação de receptores livres e co-incubadas com promastigotas e carboidratos. Os resultados demonstraram um decréscimo de 75% na taxa de internalização. Esta fração está presente na superfície de formas promastigotas e amastigotas da *Leishmania donovani* durante todo o seu ciclo de vida.

O potencial protetor da FML como vacina foi testado tendo o hamster como modelo experimental. O efeito de três injeções (via intraperitoneal) de 100mg FML e 100mg saponina, com intervalos semanais, seguido de desafio (via intracárdica) de 10⁷ amastigotas, na quarta semana, foi estudado. Evidenciou-se efeito protetor significativo tanto no aumento dos títulos de anticorpos anti-FML e da resposta proliferativa de esplenócitos *in vitro*, quanto na manutenção da IDR positiva ao antígeno, redução da carga parasitária no baço e da esplenomegalia. As comparações com os grupos controle, tratados apenas com saponina ou salina, mostraram diferenças estatísticas significativas (Palatinik-de-Souza et al., 1994).

Pesquisas posteriores, realizadas em São Gonçalo do Amaranto (RN), avaliaram a

eficácia da vacina FML (1,5mg) em ensaio a campo. Neste estudo, foi verificado que 97% dos cães vacinados apresentavam anticorpos anti-FML e 100% deles mostraram IDR positiva ao lisado de *L. donovani*, sete meses após a vacinação. Dois anos após, alcançou-se 92% de proteção, pois apenas 8% dos vacinados desenvolveram sintomas discretos de calazar, sem óbitos; enquanto que 33% dos controles desenvolveram sinais clínicos ou calazar fatal (Da Silva et al., 2001).

Em um segundo ensaio, também a campo, foram vacinados com FML (1,5mg) acrescido do adjuvante saponina QuilA (1mg) cães de uma área endêmica. Os pesquisadores observaram que 100% dos animais vacinados foram positivos para anticorpos anti-FML e mostraram IDR positivo ao lisado de *L. donovani*, dois meses após a vacinação completa. Os títulos de anticorpos e o tamanho da IDR foram significativamente maiores quando comparados aos do grupo controle, durante todo o período de três anos e seis meses de acompanhamento. A infecção por *Leishmania* foi também confirmada nos animais controle através de PCR positiva para DNA de *Leishmania* e sorologia para anticorpos anti-FML, associados a IDR negativos (Borja-Cabrera et al., 2002).

Mendes et al. (2003) avaliaram o perfil humoral através da ELISA, utilizando como antígeno a subunidade de *Leishmania* FML, de cães vacinados com FML-QuilA e cães naturalmente infectados com LV. A comparação das subclasses de anticorpos IgG anti-FML no soro de cães vacinados e cães naturalmente infectados demonstrou a presença de uma dicotomia, estando a IgG1 associada com infecção natural e IgG2 associada com a vacinação. Concluíram que o incremento da IgG2, nos cães vacinados, poderia ser uma forma indireta de verificar uma resposta celular efetiva.

Após avaliações a campo, esta vacina FML foi inserida na rotina de algumas clínicas veterinárias por meio de um projeto piloto, sendo neste momento registrada com o nome de Leishmune®. Um grupo de 600 cães assintomáticos, de raças distintas e idades variando entre quatro meses e 15 anos, foi envolvido neste projeto realizado em 30 clínicas situadas em áreas endêmicas (Andradina, Araçatuba, Guararapes e Valparaíso, no Estado de São Paulo; Nova Lima, Belo Horizonte e Sete Lagoas, no Estado de Minas Gerais) e periendêmicas (Marília, Bauru, São José do Rio Preto e Viçosa). Os cães receberam três doses da vacina por via subcutânea, com intervalos de 21 dias entre as aplicações. Estes animais foram testados quanto à resposta humoral, antes do início da vacinação, 30 dias após a terceira dose e sete meses após a primeira dose. O teste de IDR foi realizado sete meses após a primeira dose com o intuito de avaliar a resposta celular. Entre os cães vacinados 7,7% em área endêmica e 2,5% em área periendêmica eram positivos no dia da vacinação. Trinta dias após o término do programa vacinal 98% dos cães soronegativos apresentaram soroconversão, demonstrando que a vacina induziu resposta humoral. Sete meses após a primeira dose da vacina 93% dos cães continuaram a apresentar sorologia positiva e 59% apresentavam IDR positiva ao lisado de *Leishmania*, indicando resposta celular protetora ativa. Após dez meses do término do programa vacinal apenas 1% dos cães de áreas endêmicas e 0,85% dos cães das áreas periendêmicas apresentaram sinais clínicos sugestivos de LV, apresentando resultado positivo ao exame parasitológico. Concluindo-se, portanto, que a vacina FML induziu proteção em cães sadios e soronegativos de áreas endêmicas e periendêmicas (Fort Dodge, 2003).

2.5.4 Vacina de DNA de *Leishmania*

Vacina de DNA consiste na inserção de um gene de interesse em um plasmídeo bacteriano (Gurunathan et al., 2000), ou seja, resulta na expressão do antígeno parasitário em sua forma nativa (Gradoni, 2001).

A utilização de vacina de DNA tem sido implementada nos últimos anos para promover respostas duráveis e protetoras contra patógenos intracelulares como: *Plasmodium*, *Trypanosoma* ou *Leishmania*. Considerando que, a resposta imune humoral não é suficiente para combater este tipo de infecção, a habilidade da vacina de DNA em recrutar células relacionadas com as classes do Complexo de Histocompatibilidade Maior (MHC) do tipo I e II é desejável (Gurunathan et al., 2000).

Um plasmídeo para ser utilizado em protocolos de imunização deve apresentar o gene de interesse clonado, um promotor para expressão em células de mamíferos, uma origem de replicação e seqüências de nucleotídeos específicas que atuem como imunomoduladores. Estas seqüências, denominadas oligonucleotídeos de citosina-fosfato-guanosina não-metiladas (CpG), estimulam macrófagos, células dendríticas e linfócitos T a produzirem IFN- γ , FNT- α e IL-12, além de estimularem a maior expressão de moléculas co-estimuladoras na superfície das células apresentadoras de antígenos (Gurunathan et al., 2000).

Segundo Gradoni (2001), este tipo de vacina apresenta inúmeras vantagens: estabilidade; fácil manipulação; baixo custo; possibilidade de expressão do antígeno em sua forma nativa; indução de resposta imune humoral e celular, que parecem ser de longa duração.

Ramshaw e Ramsay (2000) relatam que novas estratégias de vacinação, como a do tipo “prime-boost”, que envolvem uma

primeira administração da vacina de DNA (Plasmídeo-DNA) com subsequente administração de um reforço Vetor Viral recombinante atenuado (rVV), onde ambos expressam o antígeno de interesse, têm resultado na produção de uma imunidade celular específica.

Ramiro et al. (2003) realizaram em cães experimento do tipo “prime-boost”, com uma primeira imunização com plasmídeo carreando o gene que codifica a proteína LACK, de *L. infantum*, seguido por um reforço com rVV expressando a mesma proteína LACK. Após este esquema de vacinação foram realizados desafios com 10^8 promastigotas de *L. infantum*. Os autores observaram 60% de proteção no grupo de animais que receberam este esquema vacinal em relação aos grupos controle, quando os critérios analisados foram carga parasitária tecidual, presença de anticorpos específicos, nível de citocinas e desenvolvimento de sinais clínicos da doença.

3 HIPÓTESE

Os cães residentes em Belo Horizonte, Nova Lima e Sete Lagoas, áreas endêmicas de LV, que participaram efetivamente do esquema vacinal, projeto piloto de vacinação da Leishmune[®] não apresentaram infecção pela *Leishmania* e desenvolveram resposta humoral compatível com a vacinação e distinta quando comparada com cães naturalmente infectados.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Avaliar cães residentes em Belo Horizonte, Nova Lima e Sete Lagoas que receberam a vacinação do projeto piloto com a

Leishmune® em outubro de 2003 e que foram revacinados em outubro de 2004 e 2005, quanto ao perfil humoral e presença de infecção por *Leishmania*.

4.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a condição clínica dos animais que foram submetidos ao esquema vacinal com a vacina Leishmune® entre 2003 e 2005;
- Avaliar o perfil da imunidade humoral nos animais vacinados através de pesquisa de imunoglobulinas da classe IgG, subclasses IgG1 e IgG2 utilizando o teste de ELISA com antígeno solúvel de *Leishmania chagasi* (ASL) convencional e antígeno de subunidade Fucose-Manose Ligante (FML);
- Comparar o perfil imune humoral dos cães vacinados com aquele dos cães naturalmente infectados, tendo em vista as imunoglobulinas da classe IgG e subclasses IgG1 e IgG2, com os antígenos ASL e FML;
- Realizar imunoistoquímica em biópsia de pele de orelha dos cães vacinados, visando identificação de parasitos do gênero *Leishmania*;
- Realizar PCR, com iniciadores específicos para o complexo *Leishmania donovani*, para pesquisa de parasitos no sangue periférico.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Animais

O estudo foi conduzido nas cidades de Belo Horizonte, Nova Lima e Sete Lagoas. Em Belo Horizonte, as clínicas veterinárias credenciadas para utilização da vacina Leishmune® e colaboradoras do projeto foram: Família Vet, Gutierrez, Melhor

Amigo, Santo Agostinho, São Francisco de Assis, São Geraldo e Vital Vet. Em Sete Lagoas as clínicas participantes foram: InterVet e São Francisco de Assis. Nova Lima foi representada por cinco cães residentes nesta cidade.

Realizou-se exame clínico dos 30 cães vacinados com Leishmune® e os achados foram anotados em fichas individuais (ANEXO A). Foram coletadas amostras de sangue para realização dos testes sorológicos. Para a realização da PCR as amostras de sangue foram depositadas em papel filtro próprio. Amostra de pele, da face interna da orelha, foram coletas de 19 cães vacinados para a realização da técnica de imunoistoquímica. Estas intervenções ocorreram cinco meses após o segundo reforço anual da Leishmune®, sendo que foram realizadas nas clínicas veterinárias já citadas. Do total de cães vacinados (CV) havia 14 machos e 16 fêmeas, pertencentes a diferentes raças como: Bernese (2), Bichon Frisé (3), Buldogue Inglês (4), Husky Siberiano (1), Labrador (1), Pastor Alemão (1), Pit Bull Terrier (4), Poodle (1), Schnauzer (1), Shar Pei (1), SRD (5), Terrier Escocês (3), Teckel Padrão (1), Weimaraner (1) e Yorkshire Terrier (1).

Os critérios de inclusão dos cães portadores de LV, no experimento, foram sua soropositividade avaliadas pelo RIFI e ELISA convencional e exame parasitológico positivo realizados no Laboratório de Sorologia e Biologia de *Leishmania* do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG, respectivamente. Posteriormente, fez-se avaliação clínica destes animais e os achados anotados em fichas individuais (ANEXO A). Amostras de sangue foram coletadas e os procedimentos foram os mesmos descritos anteriormente. Todas as intervenções foram realizadas nas dependências do canil do Departamento de Parasitologia do ICB.

Os animais foram alocados, após a avaliação clínica, em dois grupos descritos a seguir. Um terceiro grupo constituiu o material sorológico controle negativo para todos os testes.

Grupo 1: trinta cães vacinados (CV) com Leishmune[®], previamente soronegativos para LV, que foram submetidos a protocolo de três doses, com intervalo de vinte e um dias entre elas, que se iniciou em outubro de 2003, cujas revacinações ocorreram em outubro de 2004 e 2005. Estes animais pertenciam a proprietários. O exame clínico e subseqüentes intervenções ocorreram nas clínicas veterinárias citadas, após autorização dos proprietários.

Grupo 2: trinta cães naturalmente infectados por LV provenientes do Canil de Controle de Zoonoses do município de Santa Luzia. Estes cães foram mantidos no canil do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, onde recebiam água e alimentação industrializada *ad libitum*. Estes eram sorologicamente e parasitologicamente positivos para *Leishmania chagasi*.

Grupo 3: dez soros de cães negativos para LV provenientes de área não endêmica para leishmaniose no Estado de Rio Grande do Sul; sendo este, o grupo controle negativo das reações sorológicas.

Todos os procedimentos foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (Protocolo nº 134/2006) em ANEXO B.

5.2 Exames laboratoriais

5.2.1 Colheita de material

De cada animal, foi colhida uma amostra de sangue, por punção da veia jugular, em seringa sem anticoagulante (Becton

Dickinson plastipack[®], BD Lab., EUA) de cinco mililitros de capacidade. Parte desta amostra foi depositada, imediatamente após a coleta, em papel filtro próprio para extração de DNA (FTA[®] CLASSIC CARD, Dialab) o restante foi submetido à centrifugação a 200g (Centrífuga Excelsa Baby II[®], FANEM, Brasil) por 10 minutos para separação do soro. O soro obtido foi dividido em alíquotas de dois mililitros, devidamente identificadas e congeladas à -20°C até o momento da realização dos testes.

Após a coleta de sangue, os animais foram contidos manualmente e quando necessário sedados com acepromazina a 1% (Acepran[®], UNIVET, Brasil) na dose de 0,05mg/Kg, por via intramuscular, para a coleta de material de pele de orelha para realização de biópsia. A coleta foi realizada após previa aplicação de um volume correspondente à dose de 4mg/Kg, por via subcutânea, de cloridrato de lidocaína (Cloridrato de Lidocaína 2%, Hipolabor, Brasil), como anestésico local, na face interna da orelha direita. Procedeu-se então a retirada de um fragmento da pele com o auxílio de um “punch” de cinco milímetros de diâmetro (Punch para Biópsia[®], Kolplast ci LTDA, Brasil). O fragmento foi seco em papel filtro e imediatamente fixado em solução de formalina tamponada a 10%.

5.2.2 Reação de Imunofluorescência Indireta

Os soros obtidos dos cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi* foram submetidos à Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para a detecção de anticorpos IgG segundo a técnica descrita por Camargo (1964), com as seguintes modificações:

Para a obtenção do título desejado, os soros a serem testados foram diluídos na razão dois, a partir de 1:40, em solução tampão

fosfato (PBS). Foram colocados 25µL da solução obtida sobre cada região demarcada de uma lâmina, na qual foi previamente fixado o antígeno, constituído por formas íntegras de promastigotas de *L. chagasi*, cepa MHOM/BR/1967/BH46, rotineiramente utilizada pelo Laboratório de Sorologia do Departamento de Parasitologia do ICB. Após a incubação das lâminas em câmara úmida, por 30 minutos em estufa a 37°C, estas foram lavadas com PBS, cobertas com o mesmo por cinco minutos, lavadas em água destilada e secas sob ventilação artificial (Ventilador Britânia B20, Brasil). Posteriormente, em cada região demarcada da lâmina foram acrescentados 25µL do conjugado, diluído a seu título, em azul de Evans (EVANS BLUE®, Sigma Aldrich, EUA) a 1/5000, sendo esse previamente preparado em PBS Tween (Tween® 80, Merck, Alemanha) a 2%. O conjugado utilizado (Bethyl Lab. Inc., EUA), marcado com Isotiocianato de Fluoresceína, foi específico anti-IgG de cão. Seguiram-se nova incubação, lavagem e secagem. A lâmina foi, então, coberta com glicerina tamponada e laminada, e a leitura procedida em microscópio de luz ultravioleta (Olympus BX 41®, Japão). Soros conhecidamente positivos e negativos foram usados na mesma lâmina como controle da reação.

As soluções para a execução da técnica foram preparadas como descrito no ANEXO C.

5.2.3 Pesquisa de anticorpos da classe IgG e das subclasses IgG1 e IgG2 através do ELISA com antígeno solúvel de *Leishmania* (ASL)

A detecção de anticorpos IgG e subclasses IgG1 e IgG2 específicos anti-*Leishmania*, nos soros obtidos, foram realizados pelo método de ELISA de acordo com a técnica

descrita por Voller et al. (1979), com modificações:

Os antígenos utilizados foram produzidos a partir de formas promastigotas de *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* cepa MHOM/BR/1967/BH46. Estas foram centrifugadas a 250g (Hermle Z 323K, Alemanha), por dez minutos a 4°C, ressuspendidas em PBS e submetidas a ruptura por ultra-sonografia a 25w por 45 segundos, cinco vezes (BRANSON 1510®, Branson Ultrasonics Co., EUA). A quantidade de proteína obtida foi dosada através do método de Lowry (Lowry et al., 1951) e ajustada para 20µg/mL em PBS, sendo armazenado à -20°C em alíquotas até o momento do uso.

Antes da implementação do ensaio imunoenzimático, nas amostras a serem testadas, realizou-se padronização do conjugado, uma vez que a concentração ideal de antígeno e diluição dos soros já estava padronizada.

A diluição ótima dos conjugados (QUADRO 1) foi obtida por titulação em bloco, a partir de um “pool” de soros de cães parasitologicamente positivos para LV e um “pool” de soros de cães negativos, provenientes de área não endêmica para LV. Os soros foram diluídos 1/400, dispostos em triplicatas, e o conjugado submetido a sucessivas diluições, iniciando-se 1/200 e terminando 1/204800. A partir dos resultados absolutos das absorbâncias, a 495nm, das triplicatas de cada diluição do conjugado obteve-se a média. Para cada diluição, foi calculada uma razão entre os valores de absorbância dos soros positivos e dos soros negativos. Assim, o título ideal foi escolhido como sendo o valor mais elevado, ou seja, quando houvesse distinção mais fidedigna entre soro positivo e soro negativo.

QUADRO 1

Caracterização dos conjugados utilizados na ELISA

Anti-imunoglobulina de cão	Conjugado	Afinidade molecular
IgGT*	HRPO	Molécula total
IgG1**	HRPO	Específico para cadeia pesada
IgG2***	HRPO	Específico para cadeia pesada

O conjugado *anti-IgGT-cão foi obtido a partir de soro imune de coelho (Sigma/USA - A6792); **anti-IgG1-cão a partir de soro imune de cabra (Bethyl/USA - A40-120P-11) e ***anti-IgG2-cão a partir de soro imune de ovelha (Bethyl/USA - A40-121P-10), sendo todas marcadas com Peroxidase VI

Foram utilizadas microplacas de polietileno (Falcon®, BD Lab., USA) de 96 orifícios e fundo plano. Cada orifício das microplacas foi sensibilizado com 2µg do antígeno diluídos em 100µL de tampão carbonato, seguindo-se um período de 24 horas para permitir que o antígeno se adsorvesse as paredes de cada orifício. Após a sensibilização, o excesso de antígeno foi retirado através de lavagem da placa, por uma vez, com solução de lavagem. A solução para bloqueio de sítios inespecíficos foi adicionada, na ordem de 150µL por orifício, seguindo-se incubação por 30 minutos a 37°C. O excesso de solução tampão de bloqueio foi retirado por duas lavagens sucessivas. Os soros foram diluídos em tampão de incubação. Foi aplicado 100µL da solução diluída em cada orifício, sendo utilizada a diluição 1:400. Seguiu-se incubação por 45 minutos a 37°C e retirada do excesso do soro diluído por uma série de cinco lavagens. O conjugado foi diluído a seu título e 100µL desta diluição foi acrescentada em cada orifício. Após nova incubação por 45 minutos a 37°C, o excesso de conjugado foi retirado por nova série de cinco lavagens. A solução

do substrato foi então preparada e 100µL acrescentados em cada orifício. A reação ocorreu por 10 minutos a 37°C, quando foi interrompida pela adição de 25µL de H₂SO₄ 4N (Merck, Alemanha) em cada orifício. Em qualquer etapa, após cada lavagem, as placas foram secas por inversão sobre papel absorvente.

As leituras das reações foram realizadas em leitor de ELISA (BioRad. Modelo 550, Brasil) a 495nm. Os resultados expressos em valores de absorbância.

Para cada placa o ponto de corte (cut-off) foi estabelecido a partir da média dos valores de absorbância dos soros dos cães de área não endêmica, adicionada de três vezes o desvio padrão. As soluções para a execução da técnica foram preparadas como descrito no ANEXO C.

5.2.4 Pesquisa de anticorpos da classe IgG e das subclasses IgG1 e IgG2 através do ELISA com a subunidade fucose-manose ligante (FML)

A detecção de anticorpos IgG e subclasses IgG1 e IgG2 específicos anti-*Leishmania* foram realizados pelo método ELISA-FML, nos soros obtidos, de acordo com a técnica descrita por Palatnik-de-Souza et al. (1995).

O isolamento, caracterização química e dosagem protéica do antígeno FML foram fornecidos pelo laboratório Fort Dodge®.

Os conjugados utilizados anti-IgGT, anti-IgG1 e anti-IgG2 de cão, foram os mesmos já descritos em 5.2.3.

A diluição ótima dos conjugados foi obtida como descrito anteriormente, sendo que neste caso os soros foram diluídos 1/100.

Foram utilizadas microplacas de polietileno (Falcon®, BD Laboratory., USA) de 96 orifícios e fundo plano. Cada microplaca foi sensibilizada com 50µL de antígeno FML a 40µg/mL (2µg/poço) diluídos em tampão carbonato bicarbonato, por uma hora a 37°C, seguindo um período de 12 a 27 horas a 4°C.

Após o período de sensibilização, o excesso de antígeno foi retirado por meio de cinco lavagens com PBS-Tween contendo 1% de leite em pó desnatado (PBS*), utilizando piceta, sendo a microplaca, ao final das sucessivas lavagens, seca sobre papel absorvente e mantida em geladeira até o término da diluição dos soros.

Os soros foram adicionados em duplicatas, 50 µL por poço, diluídos 1/100 em PBS*; quando utilizado soro armazenado com glicerol a diluição foi de 1/50. Seguiu-se incubação por uma hora a 37°C, com posterior série de cinco lavagens, com PBS*, como já descrito.

O conjugado foi adicionado, 50µL por poço, previamente diluído a seu título em PBS*. A placa foi incubada por uma hora a 37°C, com posterior série de cinco lavagens com PBS*. Finalizou-se com adição de

solução do substrato. A reação ocorreu em ambiente escuro, durante 30 minutos. Findo este tempo, a reação foi interrompida por adição de 10µL de ácido sulfúrico 1N. A leitura foi feita no leitor de ELISA (BioRad®, Modelo 550, Brasil) com filtro 495nm.

As soluções para a execução da técnica foram preparadas como descrito no ANEXO C.

5.2.5 PCR específica para *Leishmania chagasi*

5.2.5.1 Extração de DNA

Para o procedimento de extração de DNA foi utilizada a técnica descrita por Da Silva et al. (2002). Amostras de sangue, aproximadamente um mililitro, foram obtidas de cães, estocadas em papel filtro (FTA® CLASSIC CARD, Dialab) e secas naturalmente. O papel filtro foi processado para remoção de contaminantes enzimáticos e citotóxicos antes da análise.

Uma pequena porção da amostra do papel de filtro foi coletada, aproximadamente dois milímetros sendo colocada em tubo de microcentrifuga contendo 200µL de Tampão de Lise (Reagentes de processamento FTA; Gibco BRL). A amostra foi agitada e incubada por cinco minutos à temperatura ambiente. Em seguida foi centrifugada (13000g, 20s) e o sobrenadante removido. Este procedimento foi repetido duas a três vezes. Após a última lavagem, 200µL de Tampão TE (10 mM Tris-HCL, 1mM EDTA, pH 7.5) foi adicionado no tubo de microcentrifuga seguindo agitação e incubação por cinco minutos à temperatura ambiente. Foi realizada então centrifugação (13000g, 20s) e o sobrenadante obtido foi descartado. Este procedimento foi repetido duas vezes. O fragmento de papel de filtro remanescente,

contendo DNA, foi utilizado para realização da técnica de PCR.

5.2.5.2 Técnica da PCR

Os produtos amplificados pela PCR foram analisados pela eletroforese em gel de poliacrilamida 5%, corados pela prata (Sambroock et al., 1982). Um marcador de peso molecular de 100pb (Invitrogen, EUA) foi utilizado.

Evitou-se a contaminação da reação pelo uso de diferentes ambientes para o processamento das amostras, amplificação e análise dos produtos amplificados, além dos processos rotineiros de descontaminação das áreas de trabalho.

A reação foi feita em um volume final de 10µL contendo um fragmento de papel de filtro com DNA; 50mM KCl; 0,2mM de cada deoxinucleotídeo trifosfato (dNTPs) (Promega USA); 1,5mM de MgCl₂; 10mM de Tris-HCl pH8,3; 1U de *Taq* DNA polimerase (Centro de Biotecnologia – CENBIOT – RS - Brasil) e 10pmol de cada iniciador

LV1 (5' **ACGAGGTCAGCTCCACTCC** 3') e **LV2** (5' **CTGCAACGCCTGTGTCTACG** 3').

Estes iniciadores são específicos para o complexo *L. donovani* e amplificam um fragmento de 100pb (Piarroux et al., 1993). As condições ótimas para amplificação do DNA foram as seguintes: desnaturação inicial a 96°C por cinco minutos e 35 ciclos consistindo na desnaturação a 94°C por 30s, anelamento a 59°C por 30s, extensão a 72°C por 30s e extensão final a 72°C por dois minutos (Piarroux et al., 1993). A reação foi realizada em um termociclador (MJ Research PTC-100). Em todas as reações um controle negativo, sem a presença de DNA, e dois controles positivos foram utilizados: um contendo 1ng de DNA extraído de cultura de uma cepa de *L. chagasi*, MHOM/BR/1967/BH46; e outro contendo sangue de cão sabidamente positivo, depositado em papel filtro.

5.2.5.3 Eletrofore em gel de poliacrilamida

Os produtos de amplificação obtidos por meio da técnica de PCR-Específica foram analisados em géis de poliacrilamida não desnaturante na concentração de 5% e coloração por nitrato de prata a 0,1% para visualização dos fragmentos amplificados. Uma alíquota de três microlitros do produto amplificado, diluído com igual volume do tampão da amostra 2x (0,5% de azul de bromofenol; 0,5% de xileno-cianol; 60% de glicerol) foi aplicado em cada canaleta. A corrida eletroforética foi realizada a 80-100 volts cerca de três horas, ou seja, com migração de aproximadamente dois centímetros do corante xileno cianol. O tamanho das bandas amplificadas foi monitorado com a utilização de marcadores de peso molecular de 100pb (Promega, Madison, WI, USA). Após a eletroforese, os géis foram transferidos para a solução fixadora (etanol absoluto 10%, ácido acético 0,5%) durante 10 minutos e revelados pela coloração com 0,1% de nitrato de prata (AgNO₃) diluído em solução fixadora por 10 minutos sob agitação lenta. Posteriormente, foram lavados em água milli-Q rapidamente e seguido da redução dos sais de prata com 3% (p/v) de hidróxido de sódio (NaOH) e 0,3% de formaldeído a 37% até a visualização das bandas, segundo Santos et al. (1993) com modificações. Quando completa, a revelação foi interrompida com a solução fixadora e os géis fotografados para documentação.

5.2.6 Imunoistoquímica

O fragmento obtido a partir da biópsia foi encaminhado ao laboratório de Neuroimunopatologia Experimental (NIPE) do Departamento de Patologia do ICB-UFMG para realização da técnica de imunoistoquímica de acordo com Tafuri et al. (2004), objetivando a pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania*.

As lâminas, contendo cortes parafinados de tecidos, foram desparafinadas em xilol (Merck, Alemanha) por 20 minutos, hidratadas em solução de álcoois decrescentes (álcool absoluto, 90^o, 80^o e 70^o respectivamente) e submetidas a um banho em PBS ("Phosphate Buffer Saline"- pH 7,2, 0,01M) a 10%. Em seguida, realizou-se o bloqueio da peroxidase endógena adicionando-se ao banho de PBS o peróxido de hidrogênio (Synth, Brasil), 30 volumes diluída a 4% em PBS, por 30 minutos à temperatura ambiente. As lâminas foram cobertas com solução de bloqueio (12g de leite em pó desnatado diluído em 200mL PBS) e incubadas em câmara úmida por 30 minutos à temperatura ambiente. Logo após, o anticorpo primário (soro de cão infectado com *L. chagasi*, na diluição de 1/100 em BSA-soro albumina) foi adicionado em quantidade suficiente para recobrir os fragmentos, sendo as lâminas incubadas por 18 a 24 horas em câmara úmida a 4^oC. Adicionou-se então o anticorpo secundário biotilado (anti-soro de coelho biotilado anti-camundongo, IgG1, na diluição de 1/100-DAKO- LSAB 2 System, Peroxidase-K0675) e as lâminas foram novamente incubadas em câmara úmida por 30 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se o complexo estreptoavidina peroxidase (Dakocytomation Inc., EUA), e incubou-se por 30 minutos em câmara úmida à temperatura ambiente. A reação foi revelada utilizando-se solução de Diaminobenzina (DAB) a 0,024% em PBS acrescida de solução de peróxido de hidrogênio 40 volumes a 0,16% em PBS, por cinco minutos à temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água corrente e foi realizada uma contra-coloração com Hematoxilina de Harris (Merck, Alemanha). As lâminas foram então desidratadas em álcoois crescentes, diafanizadas em xilol e montadas com bálsamo do Canadá (Entellan[®], Merck, Alemanha). Foi utilizado um controle negativo e um controle positivo. Como controle negativo, utilizou-se soro de cão

normal na diluição de 1/100 e/ou PBS, em substituição aos anticorpos primários. Como controle positivo foi utilizada uma lâmina com corte histológico de baço de um cão naturalmente infectado. A leitura foi realizada em microscópio ótico utilizando objetiva de imersão.

5.3 Análise Estatística

Os resultados obtidos foram submetidos à análise pelo programa InStat (Graphpad Estados Unidos). Considerando a natureza não paramétrica dos dados, que não obtiveram normalidade após transformação, foram submetidos aos testes de Mann & Whitney e Kruskal-Wallis (Sampaio, 2002).

6 RESULTADOS e DISCUSSÃO

6.1 Aspectos clínicos dos cães vacinados e cães naturalmente infectados

Durante a anamnese dos cães vacinados (CV) não foi relatada, pelos proprietários, a ocorrência de reação local ou sistêmica e ou alterações comportamentais dos animais, após as três doses iniciais e dois reforços anuais da vacina a que foram submetidos.

Ao exame clínico dos 30 CV, 25 (83,3%) não apresentaram alterações aparentes, sugestivas de infecção natural por *L. chagasi*. Em dois (6,7%) observou-se aumento discreto dos linfonodos cervicais superficiais; três (10%) apresentaram alterações dermatológicas, sendo que um dos animais apresentava área de alopecia, descamação e crostas no seio nasal, base da orelha direita e dedos das patas anteriores; o segundo, área de alopecia no dorso; e o terceiro, lesão na região inferior direita da mandíbula com presença de alopecia, crostas e exudação sanguinolenta.

Dos 30 cães naturalmente infectados, 15 não apresentavam sinais compatíveis com a doença e foram classificados como assintomáticos (CA) os outros 15 foram classificados como sintomáticos (CS) por apresentarem pelo menos um sinal sugestivo de LV.

O exame clínico, dos cães do experimento, confirma dados anteriores de Da Silva et al. (2001), que avaliaram por dois anos cães vacinados residentes em uma região com elevada incidência de LV. Os autores observaram que dos 58 cães vacinados apenas cinco (8,0%) apresentaram sintomas discretos LV. De forma semelhante, Borja-Cabreira et al. (2002) avaliaram a eficácia dessa vacina acrescida de QuilA (1mg) durante 41 meses, em área também endêmica. Ao final do experimento, dos 44 cães vacinados, apenas um animal

desenvolveu a doença fatal no quarto ano da avaliação e outro apresentou sinais discretos de LV.

Parra et al. (2007) avaliando a segurança desta vacina, já licenciada pelo Ministério da Agricultura e denominada de Leishmune®, acompanharam um grupo de 600 cães. Verificou-se a manifestação de dor local (40,87%), anorexia (20,48%), apatia (24,14%), edema local (15,90%), vômito (2,4%) e diarreia (1,5%) de forma discreta e transiente durante as três primeiras administrações da vacina. Considerando os dados obtidos durante a anamnese dos cães, neste trabalho, não foram relatadas estas alterações pelos proprietários, no que tange as primeiras três administrações e os dois reforços anuais da vacina.

Tendo em vista a avaliação clínica do cão suspeito de ser acometido por LV está é, muitas vezes, inconclusiva para se caracterizar o diagnóstico da doença (Ferrer, 1999; Gradoni, 2002). Estes autores ressaltam o grande pleomorfismo inerente à doença e a possibilidade de outras afecções manifestarem sintomatologia similar. Extrapolando estas considerações para o exame clínico dos CV torna-se importante a realização de outros exames laboratoriais e considerar a presença de outras possíveis afecções, uma vez que, somente os sinais clínicos podem não ser conclusivos para diagnóstico de LV.

6.2 Avaliação da resposta imune humoral dos cães vacinados e cães naturalmente infectados

A presença de anticorpos específicos anti-*Leishmania*, IgG total (IgGT) e as subclasses

IgG1 e IgG2, foram verificadas e analisadas através do ELISA utilizando dois antígenos. Este procedimento foi precedido da titulação dos conjugados anti-IgGT, IgG1 e IgG2 de cão (TAB 1).

TABELA 1

Título obtido para a utilização dos conjugados anti-IgG total, anti as frações IgG1 e IgG2 para o teste ELISA-ASL e ELISA-FML

Anti-imunoglobulina G de cão	Título do Conjugado	
	*ELISA-ASL	**ELISA-FML
IgGT	1/10000	1/2000
IgG1	1/5000	1/12800
IgG2	1/25000	1/2000

ASL= antígeno solúvel de *Leishmania*; FML= fucose manose ligante. *Diluição do soro 1/400.

**Diluição do soro 1/100

Os anticorpos IgGT e suas subclasses IgG1 e IgG2 foram pesquisados pelos testes do ELISA empregando o antígeno solúvel de *Leishmania* (ASL) e a subunidade fucose manose ligante (FML), individualmente no soro de cada um dos animais, gráficos em ANEXO D.

Os resultados aqui apresentados são expressos pela média dos valores de absorbância encontrados no soro, para cada grupo: 1 cães vacinados (CV) e 2 animais naturalmente infectados: cães assintomáticos (CA) e cães sintomáticos (CS) e para cada um dos antígenos.

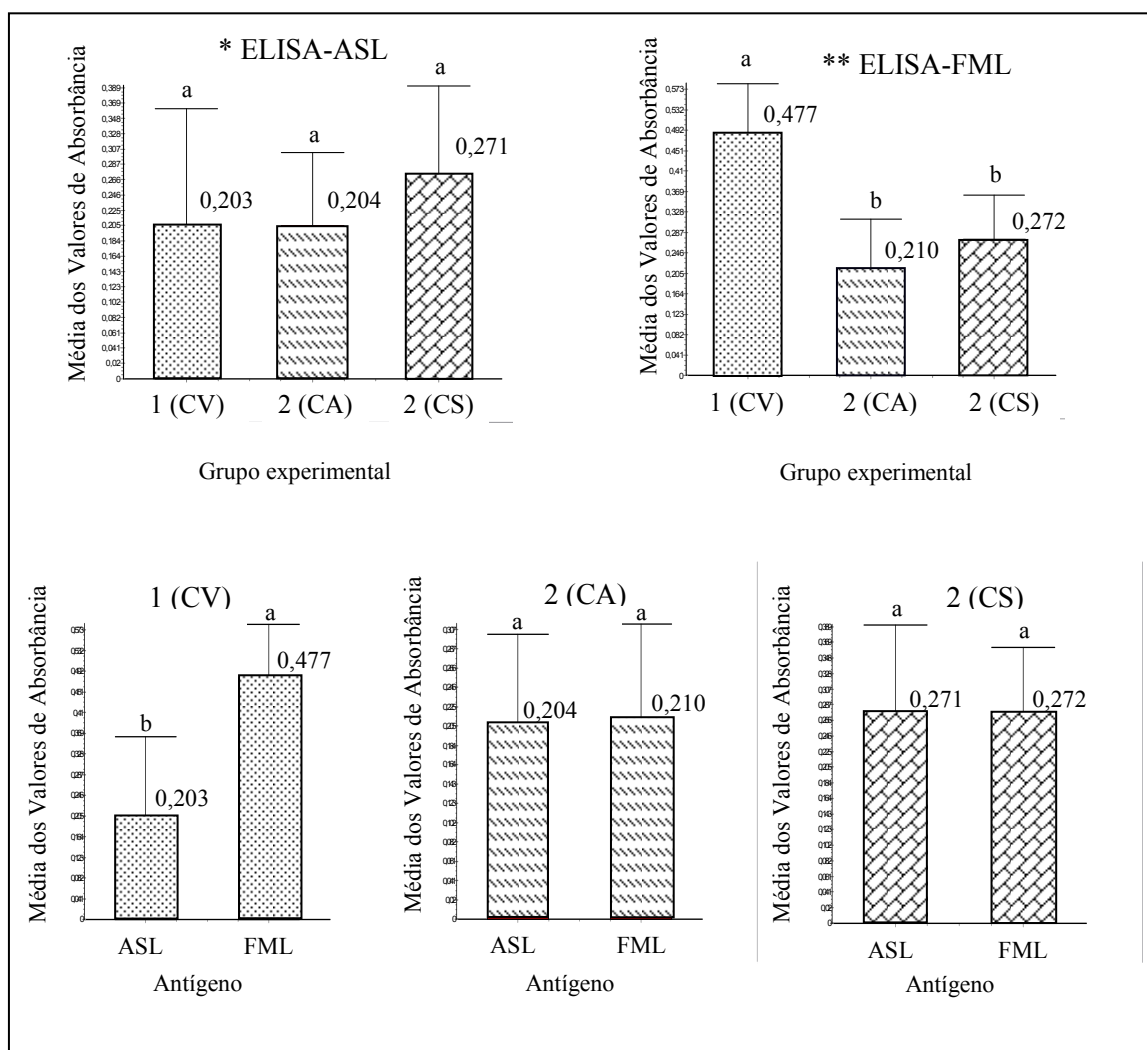


FIGURA 1: Média dos valores de absorbância para a determinação da presença de IgG total em soros de cães vacinados e cães portadores de leishmaniose visceral pela ELISA-ASL e ELISA-FML. Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem ao nível de 5% de probabilidade pela análise de variância. CV= cão vacinado; CA= cão assintomático; CS= cão sintomáticos. ASL= antígeno solúvel de *Leishmania*; FML= fucose manose ligante. *Diluição do soro 1/400; **Diluição do soro 1/100

Quando as médias das densidades óticas foram avaliadas, considerando os grupos experimentais 1 (CV) e 2 (CA e CS), para o teste do ELISA-ASL não foi observada diferença estatística entre elas. Entretanto, quando tais médias foram comparadas na ELISA-FML, a média apresentada pelos animais vacinados foi significativamente superior ($p < 0,001$) em comparação aos valores verificados para o grupo 2. Não houve diferença significativa entre os

animais assintomáticos e sintomáticos, dentro do grupo 2.

Para o grupo dos CV a média de reatividade de IgGT no ELISA-FML foi significativamente superior ($p < 0,0001$) em relação aos valores fornecidos pela ELISA-ASL. Não houve diferença estatística entre os animais naturalmente infectados (CA e CS) para os dois testes.

A média dos valores de absorvância da subclasse IgG1, específica anti-

Leishmania, estão apresentados na FIG 2.

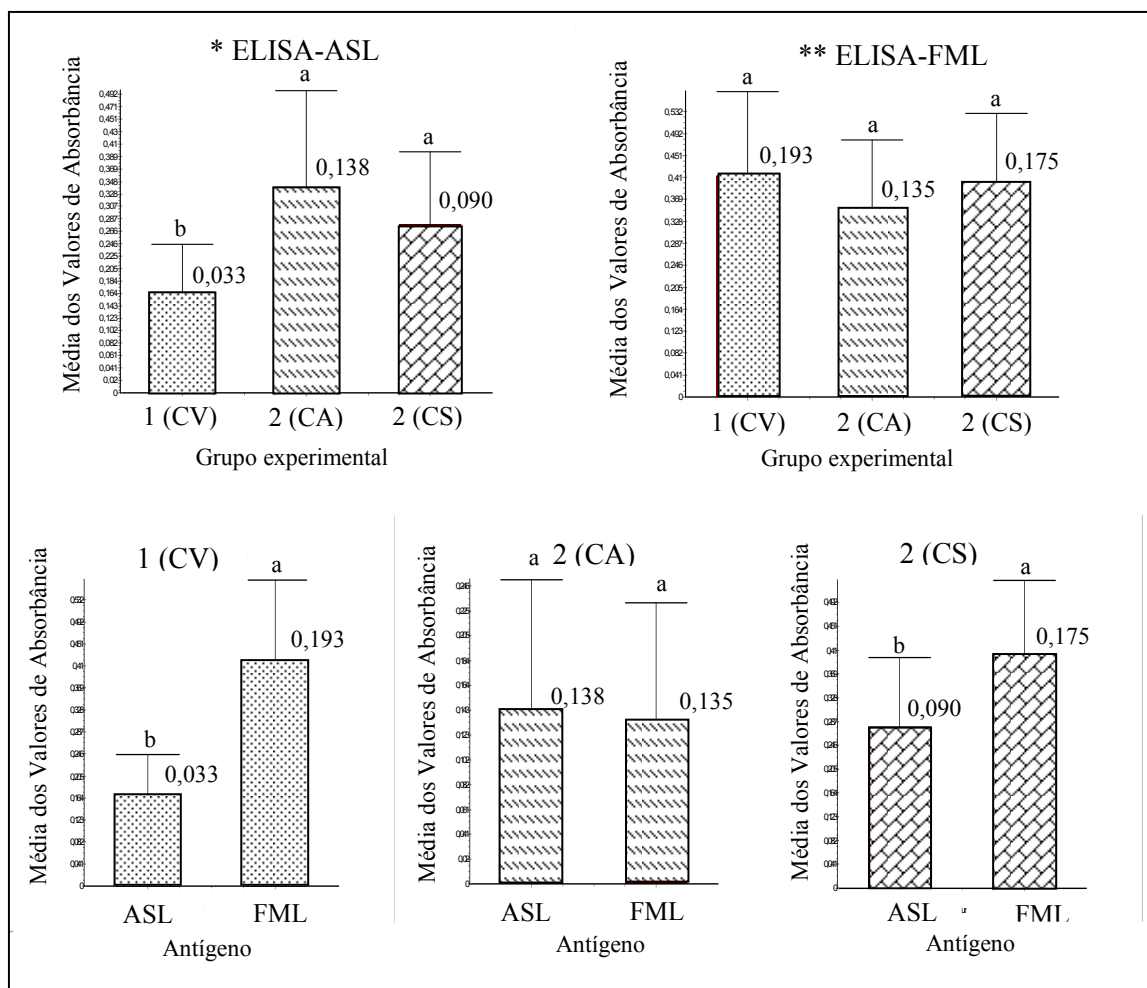


FIGURA 2: Média dos valores de absorvância para a determinação da presença de IgG1 em soros de cães vacinados e cães portadores de leishmaniose visceral pela ELISA-ASL e ELISA-FML. Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem ao nível de 5% de probabilidade pela análise de variância. CV= cão vacinado; CA= cão assintomático; CS= cão sintomáticos. ASL= antígeno solúvel de *Leishmania*; FML= fucose manose ligante. *Diluição do soro 1/400; **Diluição do soro 1/100

A comparação das médias das densidades de leitura ótica, dentro dos grupos experimentais considerando a ELISA-ASL, mostra diferença estatística significativamente inferior entre a média da absorvância apresentada pelos soros dos CV em relação à dos CA ($p < 0,001$) e CS ($p < 0,005$). As médias dos valores de

absorvância dos CA e CS não apresentaram diferença estatística. Quando o teste empregado foi o ELISA-FML, não se observou diferença significativa na medida da produção de IgG1.

Quando comparadas as médias obtidas na avaliação dos dois grupos, entre os dois

ensaios, houve diferença estatisticamente significativa entre as médias dos CV e dos CS ($p < 0,0001$), sendo que, o ELISA utilizando o antígeno FML foi capaz de fornecer médias de densidade ótica mais elevadas, para ambos.

A FIG 3 mostra os resultados das médias dos valores de absorvância dos grupos de cães avaliados em relação à reatividade da subclasse de IgG2.

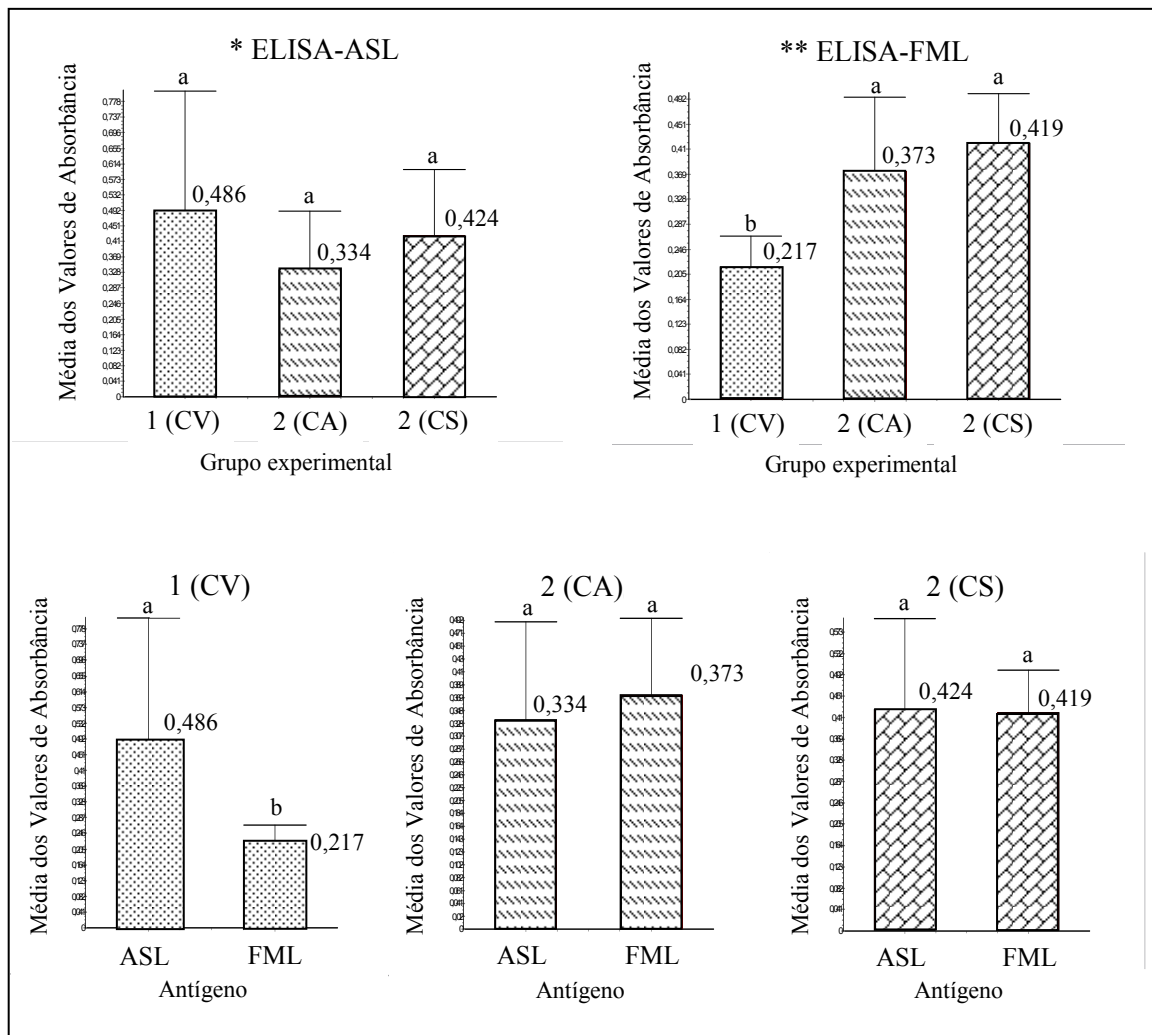


FIGURA 3: Média dos valores de absorvância para a determinação da presença de IgG2 em soros de cães vacinados e cães portadores de leishmaniose visceral pela ELISA-ASL e ELISA-FML. Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem ao nível de 5% de probabilidade pela análise de variância. CV= cão vacinado; CA= cão assintomático; CS= cão sintomáticos. ASL= antígeno solúvel de *Leishmania*; FML= fucose manose ligante. *Diluição do soro 1/400; **Diluição do soro 1/100

A comparação das médias dos valores de absorvância dos grupos 1 e 2, sob a ótica da ELISA-ASL, não apresentou diferença

estatística. Na ELISA empregando a subunidade FML, a análise estatística dos resultados demonstrou que o grupo 2

apresentou reatividade de IgG2 significativamente superior ($p < 0,001$) em comparação à média do grupo CV. Não houve diferença estatística, quando da avaliação das médias dos valores de absorbância, entre o grupo CA e dos CS.

Os valores obtidos das médias da densidade ótica dos testes dos CV, considerando os dois antígenos empregados, apresentaram diferença estatística significativamente ($p < 0,0001$) superior na ELISA empregando o antígeno ASL. A comparação das médias de densidade ótica do grupo 2 não apresentou diferença estatística.

A produção das subclasses de IgG, IgG1 e IgG2, tem sido apresentada como de perfil diferente entre os animais vacinados e aqueles doentes e ainda, com modulação entre os animais assintomáticos e aqueles com sinais clínicos da doença.

As médias de densidade ótica das subclasses IgG1 e IgG2 dentro de cada grupo de cães avaliados e sua relação (IgG1/IgG2) foram analisadas e os resultados encontram na TAB 2.

TABELA 2

Relação das médias de densidade ótica de IgG1 e IgG2 e relação IgG1/IgG2 na ELISA-ASL e na ELISA-FML, dentro de cada grupo experimental.

Grupos	*ELISA-ASL					**ELISA-FML				
	Subclasses de IgGT					Subclasses de IgGT				
	IgG1		IgG2		IgG1/ IgG2	IgG1		IgG2		IgG1/ IgG2
	X	SD	X	SD		X	SD	X	SD	
CV (30)	0,033 ^b	0,028	0,486 ^a	0,319	0,0685	0,193 ^a	0,119	0,217 ^a	0,050	0,8926
CA (15)	0,138 ^b	0,112	0,334 ^a	0,155	0,4146	0,135 ^b	0,096	0,373 ^a	0,122	0,3631
CS (15)	0,090 ^b	0,073	0,424 ^a	0,175	0,2122	0,175 ^b	0,098	0,419 ^a	0,081	0,4192

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na horizontal não diferem ao nível de 5% de probabilidade pela análise de variância. CV= cão vacinado; CA= cão assintomático; CS= cão sintomáticos. ASL= antígeno solúvel de *Leishmania*; FML= fucose manose ligante. *Diluição do soro 1/400; **Diluição do soro 1/100

Avaliados sob a ótica da ELISA-ASL as médias das densidades óticas para identificar IgG1 e IgG2 mostraram diferença significativa. A presença de IgG2 foi superior a IgG1 para os CV ($P < 0,0001$) e para os CA e CS ($p < 0,001$).

Na ELISA-FML, as médias dos valores de absorbância das duas subclasses foram diferentes entre os animais vacinados e os naturalmente infectados. Entre os animais vacinados os valores de IgG1 e IgG2 foram

equivalentes. Nos animais portadores (CA e CS) as medidas de IgG2 foram superiores aquelas de IgG1 com significância ($p < 0,0001$).

A relação IgG1/IgG2 foi sempre inferior a um, independente do antígeno empregado para o teste e da categoria clínica do animal. O fato das técnicas sorológicas convencionais utilizarem antígenos brutos, formas íntegras de promastigotas ou amastigotas, ou extratos solúveis do parasito

limita consideravelmente a especificidade do teste. Assim, têm sido estudados antígenos da *Leishmania* que proporcionem testes mais específicos (Alvar, 2004). Segundo Rosati et al. (2003) a tecnologia recombinante, juntamente com a caracterização genética de antígenos imunodominantes, permitiu o desenvolvimento de uma segunda geração de ensaios imunoenzimáticos. Desta forma, a performance de um imunoensaio, como o ELISA, pode ser afetada pela qualidade do antígeno usado.

A avaliação do potencial diagnóstico da ELISA-FML foi realizada anteriormente em humanos acometidos pelo calazar e posteriormente em cães com LV (Gontijo e Melo, 2004). Cabrera et al. (1999) avaliaram este método no diagnóstico de animais parasitologicamente positivos para LVC. Foi comparado, dentre outros, o poder diagnóstico da ELISA-FML com o da ELISA utilizando antígeno solúvel de formas promastigotas de *L. mexicana*. Observou-se que na ELISA-FML a sensibilidade e o valor preditivo foi de 100%, para ambos, e na ELISA com ASL de *L. mexicana* foi de 55,6% e 43%, respectivamente.

De acordo com a literatura a resposta imune humoral, presente nos cães acometidos pela LV, é muito intensa com a presença de elevados níveis de anticorpos IgGT específicos anti-*Leishmania* (Gradoni, 2002; Cañavate et al., 2005), de forma que, cães vacinados apresentam soropositividade de IgGT anti-*Leishmania*, obtida após o completo esquema vacinal, qualitativamente indistinta daquela presente em cães naturalmente (Da Silva et al., 2001; Borja-Cabreira et al., 2002; Mendes et al., 2003) ou experimentalmente infectados (Cabreira et al., 1999).

Neste trabalho, os valores médios de densidade ótica de IgGT específica, apresentada pelo grupo dos CV, foi significativamente superior aos valores

encontrados para o grupo 2 (CA e CS) na ELISA-FML. Estes dados concordam com os de Da Silva et al. (2001) e Borja-Cabrera et al. (2002). Os autores observaram que a resposta imune humoral induzida pela vacina-FML pode ser analisada não somente pela proporção de soroconversão, mas também pelo incremento dos valores de absorbância.

Estudos relativos à diversidade da resposta imunológica, em cães acometidos por LV, e conseqüente capacidade de combater a doença foi verificada por alguns autores. Segundo Fisa et al. (1999), cães machos mais velhos eram mais freqüentemente infectados; Acedo-Sanchez et al. (1996) verificaram que a prevalência da leishmaniose visceral, por grupos de idade, revelou índices mais elevados em cães entre três e quatro anos, seguido de cães com quatro a cinco anos; Solano-Gallego et al. (2000) avaliando a resposta humoral de cães da raça Ibiza Hound observaram que estes se apresentavam mais resistentes à infecção pela *Leishmania* por serem capazes de estabelecer uma expressiva resposta celular efetiva contra a infecção.

No atual estudo a avaliação dos níveis de densidade ótica de IgGT nos CV foi melhor caracterizada na ELISA-FML e este teste foi capaz de diferenciar o grupo vacinado daquele naturalmente infectado. Considerando isto e tendo em vista a heterogeneidade da população canina sob os aspectos de raça, sexo e idade é importante a ampliação do grupo experimental com realização de pesquisas em população canina vacinada e doente, em área endêmica, para o possível estabelecimento de um ponto de corte entre o resultado apresentado por cães vacinados e pelos cães naturalmente infectados.

As campanhas epidemiológicas de controle da LV fundamentam-se na detecção de IgGT anti-*Leishmania*. As circunstâncias de similaridade da soroconversão de cães

vacinados e cães infectados conduziram a uma tentativa de avaliar os níveis das subclasses de IgG1 e IgG2 específicos anti-*Leishmania*. Neste trabalho, a avaliação da presença das subclasses IgG1 e IgG2, na ELISA, revelou diferença estatística significativa com o antígeno convencional (ASL) para IgG1 e a subunidade FML para IgG2, entre os cães do grupo vacinado e naturalmente infectado.

O ELISA convencional emprega o antígeno solúvel de *Leishmania*, que é tradicionalmente derivado de culturas *in vitro* de promastigotas e consistem em um repertório de pelo menos 30 antígenos somáticos e inúmeros componentes de superfície (Tavares et al., 2003). O antígeno FML é um complexo glicoprotéico da superfície de formas promastigotas e amastigotas de *L. donovani* (Palatnik-de-Souza et al., 1994). O principal componente imunoprotetor deste ligante consiste em uma fração glicoprotéica de 36-kDa denominada GP-36 (De Souza et al., 2001) e a nucleosídeo hidrolase representa um componente antigênico desta fração (Santana et al., 2002). Estes últimos autores relatam que o teste ELISA empregando a subunidade FML demonstrou um comportamento similar na avaliação imune humoral de cães assintomáticos e cães sintomáticos. Os resultados observados no atual trabalho são concordantes com a observação destes autores. Foi ainda verificado por estes autores que a fração nucleosídeo hidrolase, utilizada no teste ELISA, reagiu preferencialmente com a imunoglobulina do subtipo IgG1, que no estudo estava presente principalmente em cães sintomáticos.

É importante ressaltar que, a subunidade glicoprotéica fucose-manose (FML) além de ser utilizada como potencial antígeno no diagnóstico e prognóstico de cães com LV (Cabrera et al., 1999) representa um dos componentes da vacina, sendo importante imunógeno de membrana capaz de induzir

uma resposta imune humoral e celular efetiva em cães de áreas endêmicas (Da Silva et al., 2001). Assim, o cão vacinado com esta subunidade desenvolve uma resposta imune humoral específica anti-FML.

No grupo de cães avaliados neste trabalho, o teste ELISA-ASL foi capaz de diferenciar os cães vacinados dos cães portadores, pelas médias de absorbância da subclasse IgG1. Considerando que a produção do antígeno solúvel de *Leishmania* é fundamentada em um extrato bruto, portanto com a presença de vários antígenos somáticos e de superfície, talvez não ocorra a exposição de epítomos que reajam de forma “mais específica” com a fração IgG1 anti-FML, produzida pelos cães vacinados. Considerando que o grupo de cães infectados avaliados neste trabalho apresentaram IgG1 significativamente superior aos valores encontrados pelos cães vacinados talvez se possa, através de uma ampliação populacional, estabelecer um ponto de corte entre os cães vacinados e cães portadores de LV, empregando o teste ELISA-ASL e considerando a subclasse IgG1.

Na avaliação da subclasse IgG2 verificou-se que o teste ELISA empregando a subunidade FML foi capaz de diferenciar o grupo dos animais vacinados do grupo dos portadores. Os cães naturalmente infectados apresentaram média de densidade ótica de IgG2 superior em relação à média encontrada nos cães vacinados. Enquanto o teste empregando o antígeno solúvel de *Leishmania* não foi capaz de diferenciá-los. No entanto, quando os dois testes foram comparados entre si, o que empregou o antígeno solúvel de *Leishmania* forneceu valores mais elevados de absorbância. Considerando a presença de frações antigênicas com maior afinidade a uma determinada subclasse de imunoglobulina, como descrito por Santana et al. (2002), talvez o reconhecimento desta subclasse

IgG2 anti-FML seja mais efetivo quando se considera o ASL embora não tenha sido capaz de diferenciar os grupos. Desta forma, estudos posteriores com ampliação do grupo populacional devem ser feitos.

O cão apresenta relevante papel na epidemiologia da LV urbana. Os estudos que visam melhor conhecimento da resposta imunológica destes animais são importantes, tanto no sentido de poder extrapolar considerações acerca do quadro clínico apresentado, quanto para acompanhamento de animais tratados e atualmente no acompanhamento de cães vacinados. A discussão entre autores, sobre a presença de uma determinada subclasse e a conseqüentemente predisposição da manifestação ou não da sintomatologia em cães infectados, é ainda controversa (Barbiéri, 2006).

Os resultados apresentados aqui concordaram em parte com os resultados obtidos por Leandro et al. (2001) e Reis et al. (2006). Estes observaram que a presença dos sinais clássicos da doença, ou seja, a morbidade da doença estava associada a uma marcada resposta imune humoral com elevados níveis da subclasse IgG2. Realmente, a média dos valores de densidade ótica da subclasse IgG2 dos CS foram significativamente superiores às médias encontradas para IgG1, nos dois ensaios imunodiagnósticos. Entretanto, este mesmo resultado foi encontrado para o grupo de CA.

Os resultados do trabalho, média dos valores de absorvância de IgG2 superiores aos de IgG1 para o grupo de CA e CS, concordam com os de Bourdoiseau et al. (1997). Estes observaram que, na avaliação inicial de seis cães assintomáticos naturalmente infectados e oito cães sintomáticos naturalmente infectados todos apresentavam elevados níveis tanto de IgG1 quanto de IgG2, sendo que os níveis de

IgG2 apresentavam-se significativamente mais elevados.

A comparação sorológica das médias de densidade ótica das subclasses de IgG1 e IgG2 nos CV, considerando a ELISA-ASL, revelou que a média do valor de absorvância da subclasse IgG2 foi significativamente superior ao valor encontrado para IgG1. Na ELISA-FML, entretanto, não houve diferença entre as médias das subclasses de IgG. Esta equivalência das subclasses de IgG1 e IgG2 concordam com a avaliação de Borja-Cabrera et al. (2002), em que quatro cães vacinados apresentaram elevados níveis tanto de IgG1 quanto de IgG2.

No entanto, em estudos posteriores do mesmo grupo, Mendes et al. (2003) avaliando 68 cães vacinados com a vacina-FML QuilA observaram que o subtipo de IgG2 foi predominante. Estes autores mencionam que o incremento desta subclasse, na resposta imune humoral de cães vacinados, pode ser uma maneira indireta de evidenciar a presença de uma resposta celular, servindo desta forma como um marcador de proteção. Entretanto, no atual trabalho observou-se que na ELISA-FML esta diferença entre os isotipos não foi observada. Mendes et al. (2003) mencionam ainda que a razão de $IgG1/IgG2 \leq 1$ poderia ser indicativo de uma resposta protetora encontrada em cães vacinados e que a razão $IgG1/IgG2 \geq 1$ poderia indicar a presença da doença. Neste trabalho esta razão, tanto para os cães vacinados quanto para o grupo de cães naturalmente infectados, apresentou valor inferior a um.

6.3 Avaliação parasitológica dos cães vacinados e cães naturalmente infectados

As amostras de sangue periférico obtidas dos cães vacinados (FIG 4-6), depositadas em papel filtro próprio, foram negativas no

exame por PCR específica. Este mesmo procedimento foi realizado com 14 cães

doentes sendo que, 28,6% (4) apresentaram resultado positivo (FIG 7).

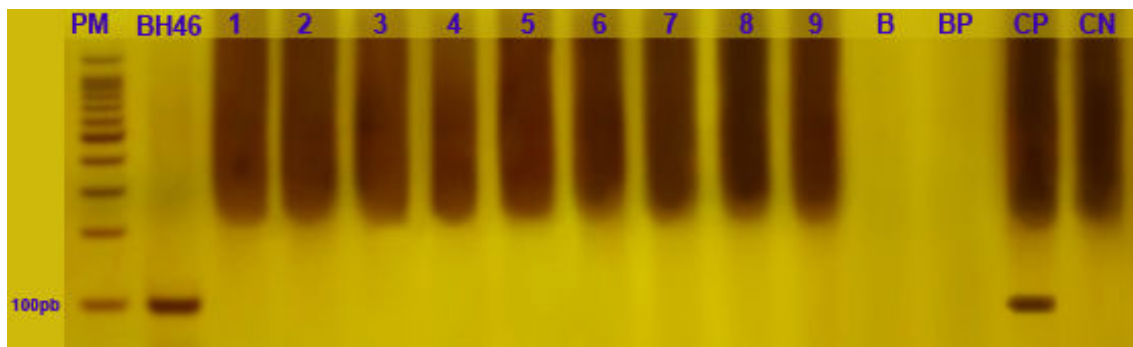


FIGURA 4 - gel de poliacrilamida 5%, corado pela prata, mostrando produtos amplificados (PCR) em nove cães vacinados. PM= marcador de peso molecular de 100pb. BH46= 1 ng de DNA extraído de cultura de uma cepa de *L. chagasi*, MHOM/BR/1967/BH46. Números 1-9= cães vacinados. B= branco. BP= branco papel. CP= controle positivo contendo sangue de cão sabidamente positivo, depositado em papel filtro. CN= controle negativo contendo sangue de cão sabidamente negativo, depositado em papel filtro

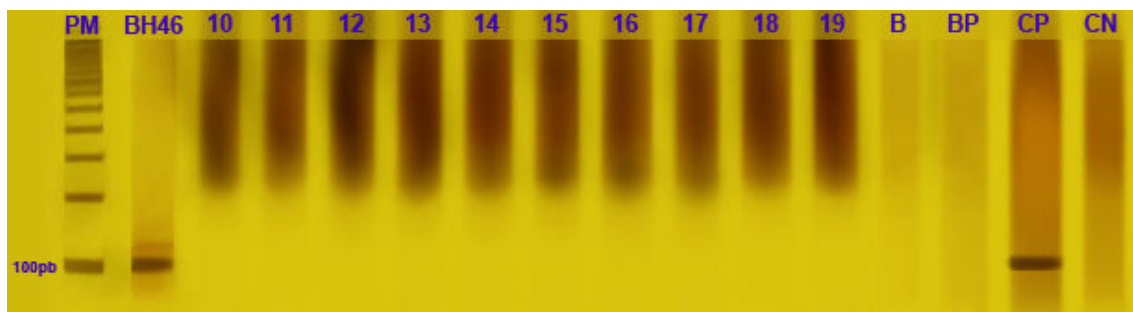


FIGURA 5 - gel de poliacrilamida 5%, corado pela prata, mostrando produtos amplificados (PCR) em dez cães vacinados. PM= marcador de peso molecular de 100pb. BH46= 1 ng de DNA extraído de cultura de uma cepa de *L. chagasi*, MHOM/BR/1967/BH46. Números 10-19= cães vacinados. B= branco. BP= branco papel. CP= controle positivo contendo sangue de cão sabidamente positivo, depositado em papel filtro. CN= controle negativo contendo sangue de cão sabidamente negativo, depositado em papel filtro

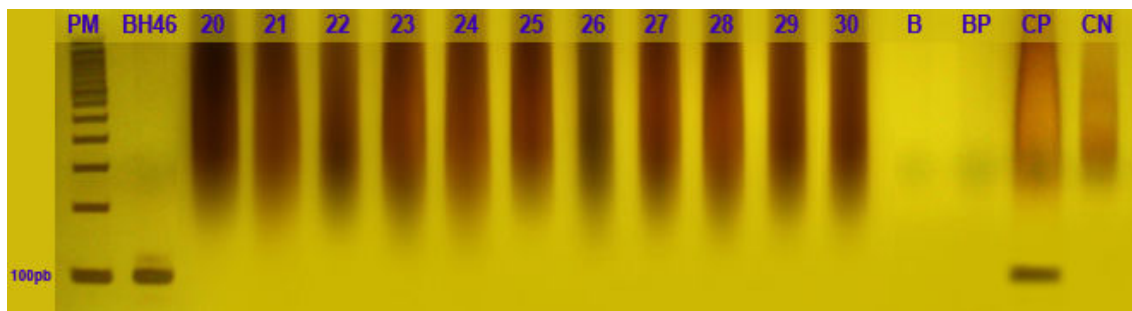


FIGURA 6 - gel de poliacrilamida 5%, corado pela prata, mostrando produtos amplificados (PCR) em 11 cães vacinados. PM= marcador de peso molecular de 100pb. BH46= 1 ng de DNA extraído de cultura de uma cepa de *L. chagasi*, MHOM/BR/1967/BH46. Números 20-30= cães vacinados. B= branco. BP= branco papel. CP= controle positivo contendo sangue de cão sabidamente positivo, depositado em papel filtro. CN= controle negativo contendo sangue de cão sabidamente negativo, depositado em papel filtro.

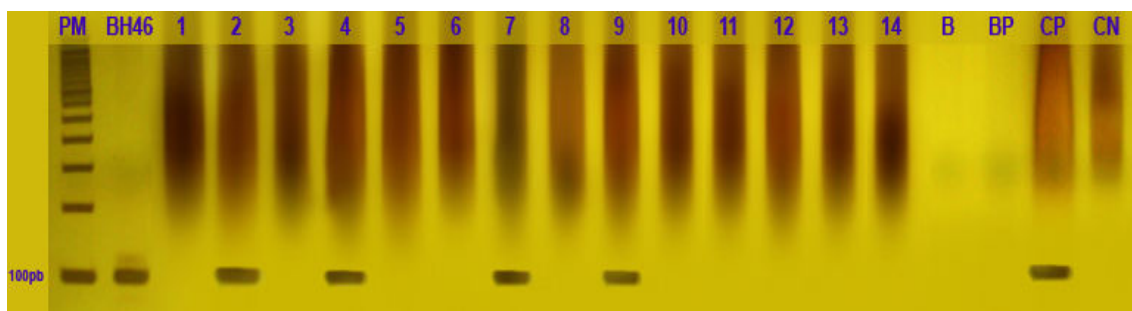


FIGURA 7 - gel de poliacrilamida 5%, corado pela prata, mostrando produtos amplificados (PCR) em 14 cães naturalmente infectados. PM= marcador de peso molecular de 100pb. BH46= 1 ng de DNA extraído de cultura de uma cepa de *L. chagasi*, MHOM/BR/1967/BH46. Números 1-14= cães portadores de LV. B= branco. BP= branco papel. CP= controle positivo contendo sangue de cão sabidamente positivo, depositado em papel filtro. CN= controle negativo contendo sangue de cão sabidamente negativo, depositado em papel filtro

Da Silva et al. (2004) avaliaram o diagnóstico de LV humana utilizando sangue periférico estocado em papel-filtro. Os resultados indicaram que dos 85 pacientes com sintomatologia, a PCR foi positiva em 71,7%, ao passo que a sorologia foi positiva em 49,4%. Como vantagens desta técnica foram citadas, a facilidade da coleta do material para análise, simplificação, rapidez e não utilização de solventes orgânicos no protocolo de extração do DNA, além da facilidade de estocar o material que não necessita de

baixas temperaturas. Em trabalho posterior Da Silva et al. (2006) avaliou esta técnica no diagnóstico da leishmaniose visceral em cães. Foi verificado que dos 36 cães que apresentaram microscopia e cultura positivas para *Leishmania* 28 (77,7%) também o foram na avaliação pela PCR de sangue depositado em papel filtro. Os achados verificados por estes autores não concordam com a sensibilidade encontrada neste trabalho, cujo resultado foi positivo em quatro cães (28,6%) dos 14 naturalmente infectados avaliados.

Genaro (1993) avaliando a pesquisa de parasitos no sangue circulante, através de leucocultura seriada, durante cinco semanas, em cinco cães experimentalmente infectados, observou positividade em 60% destes. Sendo que um animal foi persistentemente positivo, enquanto que em outros dois, o parasito foi encontrado em uma única vez. Considerando, a carga parasitária nos tecidos, Solano-Galego et al. (2001) relatam que a infecção pela *Leishmania* pode apresentar um caráter tecido-dependente em cães, com a presença de tropismo tecidual e conseqüente variação de freqüência da detecção do DNA do parasito. Assim, fatores como o desconhecimento do momento da infecção dos cães conjuntamente a possibilidade de oscilação da parasitemia, em um mesmo animal, podem influenciar o resultado diagnóstico de técnicas cujo material de escolha for o sangue periférico.

A avaliação da presença do parasito na pele de orelha, pela técnica de imunoistoquímica, foi negativa em todos os 19 cães vacinados avaliados e positiva em seis (42,9%) dos 14 cães naturalmente infectados.

O encontro da *Leishmania* na pele de cães naturalmente infectados por LV e sua conseqüente importância epidemiológica é relatada por Deane e Deane (1954). Trabalho de Travi et al. (2001) sugere uma distribuição desigual deste parasito na pele dos cães e relata uma maior incidência na pele da orelha. Confirmando estes dados, Xavier (2002) demonstra a presença de maior parasitismo cutâneo na pele da orelha em comparação a pele do abdômen e do focinho.

Considerando a avaliação clínica dos 30 cães vacinados observou-se, como já descrito, alterações em cinco cães envolvendo linfonodos ou tegumento. Estes animais pertencem aos 19 cães avaliados. Sendo assim, mesmo sendo cães residentes de área endêmica de LV e representando um grupo que foi avaliado cinco meses após a

última revacinação anual, realizada em outubro de 2005, que corresponde ao segundo reforço anual, estes apresentaram negatividade na avaliação pela imunoistoquímica da pele de orelha. Os resultados encontrados neste estudo concordam com os dados de Nogueira et al. (2005), referentes a 32 cães vacinados com a Leishmune[®]. Os autores verificaram que todos os cães vacinados foram negativos na avaliação pela imunoistoquímica, 11 meses após o esquema vacinal completo, ao passo que, 25% dos 40 cães portadores da afecção foram positivos.

A leishmaniose visceral é uma zoonose, sendo o cão doméstico o principal reservatório urbano e periurbano. O desenvolvimento de vacinas ou imunoprolifáticos representa uma alternativa importante na busca pelo controle desta doença. A Leishmune[®], vacina de segunda geração, está presente na rotina das clínicas veterinárias no Brasil desde o ano de 2003, quando foi licenciada pelo Ministério da Agricultura. Considerando que se trata de uma vacina recente no mercado e representa eminente papel no possível controle da LV, o atual estudo caracteriza a importância da avaliação de cães que foram submetidos ao esquema vacinal e estão expostos à infecção natural e aponta a necessidade de ampliação dos estudos para melhor caracterização deste grupo de cães.

7 CONCLUSÕES

O exame clínico de cães vacinados em 2003 e revacinados anualmente até 2005 revelou que 83,3% apresentam-se clinicamente normais, sem sinais compatíveis com leishmaniose visceral.

A técnica da ELISA, utilizando a subunidade fucose-manose ligante (FML), foi capaz de diferenciar cães vacinados de cães naturalmente infectados em relação a IgGT e a subclasse IgG2.

A técnica ELISA, utilizando o antígeno solúvel de *Leishmania* (ASL) de formas promastigotas *Leishmania chagasi*, foi capaz de diferenciar cães vacinados de cães naturalmente infectados, em relação à subclasse IgG1.

A relação IgG1/IgG2 inferior a um foi verificada para todos os grupos avaliados neste estudo, indicando que esta não foi capaz de diferenciar os cães vacinados dos cães naturalmente infectados.

Os cães vacinados e expostos à infecção, em área endêmica de leishmaniose visceral, apresentaram resultado negativo na avaliação pela PCR de sangue depositado em papel filtro e imunoistoquímica da pele de orelha, 2 anos e três meses após o início do esquema vacinal pela Leishmune®.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. In: __ *Imunologia Celular e Molecular*. 4. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2002. Cap. 11, p.235-269.
- ABRANCHES, P.; SANTOS-GOMES; RACHAMIN, G. M. et al. An experimental model for canine visceral leishmaniasis. *Parasite Immunology*, v.13, n.5, p.537-550, 1991.
- ACEDO-SÁNCHEZ, A.; MARTÍN-SANCHEZ, J.; BERNAL, I. D. V. et al. Leishmaniasis Eco-epidemiology in the Alpujarra Region (Granada province, southern Spain). *International Journal for Parasitology*, v.25, n.3, p.303-310, 1996.
- ALMEIDA, M. A. O.; JESUS, E. E. V.; SOUSA-ATTA, M. L. B. et al. Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Veterinary Parasitology*, v.127, n.3-4, p.227-232, 2005.
- ALVAR, J.; CAÑAVATE, C.; MOLINA, R. et al. Canine Leishmaniasis. *Advances in Parasitology*, v.57, p.1-88, 2004.
- ALVES, W. A.; BEVILACQUA, P. D. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. *Cadernos de Saúde Pública do Rio de Janeiro*, v.20, n.1, p.259-265, 2004.
- BARBIÉRI, C. L. Immunology of canine leishmaniasis. *Parasite Immunology*, v.28, n.7, p.329-337, 2006.
- BARROUIN-MELO, S. M.; LARANJEIRA, D. F.; TRIGO, J. et al. Comparison between splenic and lymph node aspirations as sampling methods for the parasitological detection of *Leishmania chagasi* infection in dogs. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.99, n.2, p.195-197, 2004.
- BORJA-CABRERA, G. P.; PONTES, N.N.C.; OLIVEIRA DA SILVA, V. et al. Long lasting protection against canine Kala-azar using the FML-QuilA saponin vaccine in an endemic area of Brazil (São Gonçalo do Amaranto, RN). *Vaccine*, v.20, n.27-28, p.3277-3284, 2002.
- BOURDOISEAU, G.; BONNEFONT, C.; HOAREAU, E. et al. Specific IgG1 and IgG2 antibody and lymphocyte subset levels in naturally *Leishmania infantum*-infected treated and untreated dogs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.59, n.1-2, p.21-30, 1997.
- CABRAL, M.; O'GRADY, J. E.; GOMES, S. et al. The immunology of canine leishmaniosis: strong evidence for a developing disease spectrum from asymptomatic dogs. *Veterinary Parasitology*, v.76, n.3, p.173-180, 1998.
- CABRERA, G. P. B.; DA SILVA, V. O.; DA COSTA, R. T. et al. The fucose-manose ligand-ELISA in the diagnosis and prognosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v.61, n.2, p.296-301, 1999.

CAMARGO, E. P. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I-origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Revista de Medicina Tropical de São Paulo*, v.6, p.93-100, 1964.

CANÃVATE, C.; CRUZ, I.; FLORES, M. Leishmanioses canina: diagnóstico. *Información Veterinaria: La leishmaniosis canina 1ª parte*, p.28-32, 2005.

CORTES, S.; ROLÃO, N.; RAMADA, J., et al. PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* s.l.-specific kinetoplastid primers. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v.98, n.1, p.12-17, 2004.

COSTA, C. H.; PEREIRA, H. F.; ARAÚJO, M. V. Leishmaniose visceral canina: avaliação da metodologia sorológica utilizada em inquéritos epidemiológicos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.24, n.1, p.21-25, 1991.

COSTA VAL, A. P. *Tratamento da Leishmaniose Visceral canina com antimonial pentavalente encapsulado em lipossomas*. 2004. 125f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

DA SILVA, V. O.; BORJA-CABRERA, G. P.; PONTES, N. N. C. et al. A phase III trial of efficacy of the FML-vaccine against canine Kala-azar in an endemic area of Brazil (São Gonçalo do Amaranto, RN). *Vaccine*, v.19, n.9-10, p.1082-1092, 2001.

DA SILVA, E. S.; PACHECO, R. S.; GONTIJO, C. M. F. et al. Visceral leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in a patient infected with human immunodeficiency virus. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.44, n.3, p.145-149, 2002.

DA SILVA, E. S.; GONTIJO, C. M. F.; PACHECO, R. S. et al. Diagnosis of human visceral leishmaniasis by PCR using blood samples spotted on filter paper. *Genetics and Molecular Research*, v.3, n.2, p.251-257, 2004.

DA SILVA, E. S.; VAN Der MEIDE, W. F.; SCHOONE, G. J. et al. Diagnosis of canine leishmaniasis in the endemic area of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil by parasite, antibody and DNA detection assays. *Veterinary Research Communication*, v.30, n.6, p.637-643, 2006.

DE SOUZA, E. P.; BERNARDO, R. R.; PALATNIK, M. et al. Vaccination of Balb/c mice against experimental visceral leishmaniasis with the GP36 glycoprotein antigen of *Leishmania donovani*. *Vaccine*, v.19, n.23-24, p.3104-3115, 2001.

DEANE, L. M.; DEANE, M. P. Encontro de cães naturalmente infectados por *Leishmania donovani*, no Ceará. *O Hospital*, v.45, n.6, p.43-47, 1954.

DEANE, L. M.; DEANE, M. P. Visceral leishmaniasis in Brazil: geographical distribution and transmission. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.4, n.maio-jun, p.149-212, 1962.

DEPLAZES, P.; SMITH, N. C.; ARNOLD, P. et al. Specific IgG1 and IgG2 antibody responses of dogs to *Leishmania infantum* and other parasites. *Parasite immunology*, v.17, n.9, p.451-458, 1995.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: public health aspects and control. *Clinics in Dermatology*, v.14, n.5, p.417-123, 1996.

DESJEUX, P. Urbanization of the leishmaniasis. In: CANINE LEISHMANIASIS: MOVING TOWARDS A SOLUTION, 2, 2002, Sevilha. *Proceedings of the Second International Canine Leishmaniasis Forum*. Sumène: Hoeschst Roussel Vet, maio, 2002. p.49-55.

DIAS, F. O. P.; LOROSA, E. S.; REBÊLO, J. M. M. Fonte alimentar sanguínea e a peridomiciliação de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Psychodidae, Phlebotominae). *Cadernos de Saúde Pública do Rio de Janeiro*, v.19, n.5, p.1373-1380, 2003.

DUNAN, S.; FROMMEL, D.; MONJOUR, L. et al. Vaccination trial against canine visceral leishmaniasis. *Parasite Immunology*, v.11, n.4, p.397-402, 1989.

ESQUERRA, J. P. A. *Leishmaniasis: de la biología y su control*. 2 ed. Madrid: Instituto de Salud Carlos. III, 2001. p.157-159.

FALLAH, E.; MOHEBALI, M.; ZAREH, N.M. Preparation and evaluation of *Leishmania* vaccines in Iran for the control of Kala-azar. *Acta Parasitologica*, v.45, n.3, p.202-203, 2000.

FERRER, L.; AISA, M. J.; ROURA, X. et al. Serological diagnosis and treatment of canine leishmaniasis. *The Veterinary Record*, v.136, n.20, p.514-516, 1995.

FERRER, L. M. Clinical aspects of canine leishmaniasis. In: CANINE LEISHMANIASIS: AN UPDATE, 1, 1999, Barcelona. *Proceedings of the International Canine Leishmaniasis Forum*. Sumène: Hoeschst Roussel Vet, agosto, 1999. p.6-10.

FISA, R.; GÁLLEGO, M.; CASTILLEJO, S. et al. Epidemiology of canine leishmaniosis in Catalonia (Spain): the example of the Priorat focus. *Veterinary Parasitology*, v.83, n.2, p.87-97, 1999.

FRANCINO, O; ALTET, L.; SÁNCHEZ-ROBERT, E. et al. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*, v.137, n.3-4, p.214-221, 2006.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ (FIOCRUZ) Disponível em <<http://www.dbbm.fiocruz.br/tropical/leishman/leishext/index.htm>> Acesso em dezembro de 2006.

FIORENTINO, D. F.; BOND, M. W.; MOSMANN, T. R. The types of mouse T helper cell. Two types of mouse T helper cell. *The Journal of Experimental Medicine*, v.170, n.6, p.2081-2095, 1989.

FORT DODGE. *Leishmune: manual técnico*. São Paulo: Fort Dodge, 2003. 52p.

GARCIA-ALONSO, M.; BLANCO, A.; REINA, D. et al. Immunopathology of the uveitis in canine leishmaniasis. *Parasite Immunology*, v.18; n.12; p.617-623, 1996.

GAMA, M. E. A.; COSTA, I. M. L.; PEREIRA, J. C. R. et al. Serum cytokine profile in the subclinical form of visceral leishmaniasis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v.37, n.1, p.129-136, 2004.

GENARO, O. *Leishmaniose Visceral Canina Experimental*. 1993. 146f. Tese (Doutorado em Parasitologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

GENARO, O.; PINTO, J. A.; DA COSTA, C. A.; et al. Phase III randomized double blind clinical trial of the efficacy of a vaccine against canine visceral leishmaniasis in urban area of Montes Claros, MG, Brasil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.91, p.166, 1996.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, v.7, n.3, p.1-12, 2004.

GRADONI, L. An update on antileishmanial vaccine candidates and prospects for a canine *Leishmania* vaccine. *Veterinary Parasitology*, v.100, n.1-2, p.87-103, 2001.

GRADONI, L. The diagnosis of canine leishmaniasis. In: CANINE LEISHMANIASIS: MOVING TOWARDS A SOLUTION, 2, 2002, Sevilha. *Proceedings of the Second International*

Canine Leishmaniasis Forum. Sumène: Hoeschst Roussel Vet, maio, 2002. p.7-15.

GRIMA, M. Z. Leishmanioses canina: panorâmica geral de la enfermedad. *Información Veterinaria: La leishmaniosis canina 1ª parte*, p.14-18, 2005.

GUARGA, J. L.; LUCIENTES, J.; PERIBÁÑEZ, M. A. et al. Experimental infection of *Phlebotomus perniciosus* and determination of the natural infection rates of *Leishmania infantum* in dogs. *Acta Tropica*, v.77, n.2, p.203-207, 2000.

GUERIN, P. J.; OLLIARO, P.; SUNDAR, S. et al. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. *Infectious Diseases*, v.2, n.8, p.494-501, 2002.

GURUNATHAN, S.; KLINMAN, D. M.; SEDER, R. A. DNA vaccine: immunology, application and optimization. *Annual Review of Immunology*, v.18, p.927-974, 2000.

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

JAFFE, C. L. Prospective for a vaccine against canine leishmaniasis. In: CANINE LEISHMANIASIS: AN UPDATE, 1, 1999, Barcelona. *Proceedings of the International Canine Leishmaniasis Forum*. Sumène: Hoeschst Roussel Vet, agosto, 1999. p.66-71.

LAINSON, R.; RANGEL, E. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil- A Review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.100, n.8, p.811-827, 2005.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: PETERS, W. KILLICK-KENDRICK, R. The Leishmaniasis in biology and medicine. New York: Academic, Press, 1987. p1-120.

LASRI, S.; SAHIBI, H.; SADAK, A. et al. Immune responses in vaccinated dogs with autoclaved *Leishmania major* promastigotes. *Veterinary Research*, v.30, n.5, p.441-449, 1999.

LEANDRO, C.; SANTOS-GOMES, G. M.; CAMPINO, L. et al. Cell mediated immunity and specific IgG1 and IgG2 antibody response in natural and experimental canine leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.79, n.3-4, p.273-284, 2001.

LEONTIDES, L. S.; SARIDOMICHELAKIS, M. N.; BILLINIS, C. et al. A cross-sectional study of *Leishmania* spp. infection in clinically healthy dogs with polymerase chain reaction and serology in Greece. *Veterinary Parasitology*, v.109, n.1-2, p.19-27, 2002.

LONDON, C. A.; ABBAS, A. K.; KELSO, A. Helper T cell subsets: heterogeneity, functions and development. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.63, n.1-2, p.37-44, 1998.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, v.193, n.1, p.265-275, 1951.

MANNA, L.; VITALE, F.; REALE, S. et al. Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*, v.125, n.3-4, p.251-262, 2004.

MARTÍNEZ-MORENO, A.; MARTÍNEZ-CRUZ, M. S.; BLANCO, S. et al. Immunological and histological study of T – and B – lymphocyte activity in canine visceral leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*, v.51, n.1-2, p.49-59, 1993.

MARTÍNEZ-MORENO, A.; MORENO, T.; MARTÍNEZ-MORENO, F. J. et al. Humoral and cell-mediated immunity in natural and experimental canine leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.48, n.3-4, p.209-220, 1995.

MAURICIO, I. L.; HOWARD, M. K.; STOTHARD, J. R. Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. *Parasitology*, v.119, n.3, p.237-246, 1999.

MAYRINK, W.; GENARO, O.; SILVA, J. C. F. Phase I and II open clinical trials of a vaccine against *Leishmania chagasi* infections in dogs. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.91, n.6, p.695-697, 1996.

MAZZA, G.; DUFFUS, W. P. H.; ELSON, C. J. et al. The separation and identification by monoclonal antibodies of dog IgG fractions. *Journal Immunology and Methods*, v.161, n.2, p.193-203, 1993.

- MENDES, C. O.; DE SOUZA, E. P.; BORJA-CABRERA, G. P. et al. IgG1/IgG2 antibody dichotomy in sera of vaccinated or naturally infected dogs with visceral leishmaniasis. *Vaccine*, v.21, n.19-20, p.2589-2597, 2003.
- MICHALICK, M. S. M. Spreading of visceral leishmaniasis in urban area of Belo Horizonte, MG, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.88, suppl. I, p.53, 1993.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Disponível em <[http://portal/aplicacoes/buscar/buscar.cfm](http://portal.aplicacoes/buscar/buscar.cfm)> Acesso em 25 de janeiro de 2006
- MOHEBALI, M.; FALLAH, E.; JAMSHIDI, S. et al. Vaccine trial against canine visceral leishmaniasis in the Islamic Republic of Iran. *Eastern Mediterranean Health Journal*, v.4, n.2, p.234-238, 1998.
- MOSMANN, T. R.; CHERWINSKI, H.; BOND, M. W. Two types of murine helper T cell clone. *The Journal of Immunology*, v.136, n.7, p.3248-2357, 1986.
- NATAMI, A.; SAHIBI, H.; LASRI, S. et al. Serological, clinical and histopathological changes in naturally infected dogs with *Leishmania infantum* in the Khemisset province, Morocco. *Veterinary Research*, v.31, n.3, p.355-363, 2000.
- NIETO, C. G.; NAVARRETE, I.; HABELA, M. A. et al. Pathological changes in kidneys of dogs with natural *Leishmania* infection. *Veterinary Parasitology*, v.45, n.1-2, p.33-47, 1992.
- NIETO, C. G.; GARCÍA-ALONSO, J. M.; REQUENA, J. M. et al. Analysis of the humoral immune response against total and recombinant antigens of *Leishmania infantum*: correlation with disease progression in canine experimental leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.67, n.2, p.117-130, 1999.
- NOGUEIRA, F. S.; MOREIRA, M. A. B.; BORJA-CABRERA, G. P. et al. Leishmune[®] vaccine blocks the transmission of canine visceral leishmaniasis absence of *Leishmania* parasites in blood, skin and lymph nodes of vaccinated exposed dogs. *Vaccine*, v.23, n.40, p.4805-4810, 2005.
- PALATNIK, C. B.; BOROJEVIC, R.; PREVIATO, J. O. et al. Inhibition of *Leishmania donovani* promastigote internalization into murine macrophages by chemically defined parasite glycoconjugate ligands. *Infection and Immunity*, v.57, n.3, p.754-763, 1989.
- PALATNIK-DE-SOUZA, C.B.; MORENO, M.M.B.; PARAGUAI-DE-SOUZA, E. et al. The FML vaccine (fucose-mannose-ligand) protects hamsters from experimental Kala-azar. *Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science*, v.46, n.4, p.290-296, 1994.
- PALATNIK-DE-SOUZA, C. B.; GOMES, E. M.; PARAGUAI-DE-SOUZA, E. *Leishmania donovani*: titration of antibodies to the fucose-mannose ligand as an aid in diagnosis of visceral leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v.89, n.4, p.390-392, 1995.

- PARRA, L. E.; BORJA-CABRERA, G. P.; SANTOS, F.N et al. Safety trial using the Leishmune® vaccine against canine visceral leishmaniasis in Brazil. *Vaccine*, v.25, n.12, p. 2180-2186, 2007.
- PIARROUX, R.; AZAIEUX, R.; LOSSI, A. M. et al. Isolation and characterization of a repetitive DNA sequence from *Leishmania infantum*: development of a visceral leishmaniasis polymerase chain reaction. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.49, n.3, p.364-369, 1993.
- PINELLI, E.; KILLICK-KENDRICK, R.; WAGENAAR, J. et al. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infection and Immunity*, v.62, n.1, p.229-235, 1994.
- QUINNELL, R. J.; COURTENAY, O.; SHAW, M. A. et al. Tissue Cytokine response in canine visceral leishmaniasis. *The Journal of Infectious Diseases*, v.183, n.9, p.1421-1424, 2001.
- QUINNELL, R. J.; COURTENAY, O.; GARCEZ, L. M. et al. IgG subclass responses in a longitudinal study of canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Immunology and immunopathology*, v.91, n.3-4, p.161-168, 2003.
- RAMSHAW, I. A.; RAMSAY, A. J. The prime-boost strategy: exciting prospects for improved vaccination. *Immunology Today*, v.21, n.4, p.163-165, 2000.
- RAMIRO, M. J.; ZÁRATE, J. J.; HANKE, T. et al. Protection in dogs against visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* is achieved by immunization with heterologous prime-boost regime using DNA and vaccinia recombinant vector expressing LACK. *Vaccine*, v.21, n.19-20, p.2474-2484, 2003.
- REIS, A. B. I. *Avaliação de parâmetros laboratoriais e imunológicos de cães naturalmente infectados com Leishmania (Leishmania) chagasi, portadores de diferentes formas clínicas da infecção*. 2001. 176f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- REIS, A. B.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; VALE, A. M. et al. Isotype patterns of immunoglobulins: Hallmarks for clinical status and tissue parasite densite in brazilian dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.112, n.3-4, p.102-116, 2006.
- ROSÁRIO, E. Y.; GENARO, O.; FRANÇA-SILVA, J. C. et al. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay using crude *Leishmania* and recombinant antigens as a diagnostic marker for canine visceral leishmaniasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.100, n.2, p.197-203, 2005.
- ROSATI, S.; ORTOFFI, M.; PROFITI, M. et al. Prokaryotic expression and antigenic characterizatio of three recombinant *Leishmania* antigens for serological diagnosis of canine leishmaniasis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, v.10, n.6, p.1153-1156, 2003.
- SAMBROOK, J.; FRITSH, E. F.; MANIATIS, T. Gel Electrophoresis: Polyacrylamide Gel Eletrophoresis. In _____ *Molecular cloning: a laboratory manual*.

New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982. Cap.5, p.173-180.

SAMPAIO, I. B. M. *Estatística Aplicada à Experimentação Animal*. 2. ed. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2002. 265p.

SANTANA, D. M.; BORJA-CABRERA, G. P.; DE SOUZA, E. P. et al. Nucleoside hydrolase from *Leishmania (L.) donovani* is na antigen diagnostic for visceral leishmaniasis. *Molecular & Biochemical Parasitology*, v.120, n.2, p.315-319, 2002.

SANTOS, F. R.; PENA, S. D. J.; EPPLEN, J. T. Genetic and population study of a Y-linked tetranucleotide repeat DNA polymorphism with a simple non-isotopic technique. *Human genetics*, v.90, n.6, p.655-656, 1993.

SANTOS-GOMES, G. M.; ROSA, R.; LEANDRO, C. et al. Cytokine expression during the outcome of canine experimental infection by *Leishmania infantum*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.88, n.1-2, p.21-30, 2002.

SCALONE, A.; LUNA, R.; OLIVA, 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. *Veterinary Parasitology*, v.104, n.4, p.275-285, 2002.

SOLANO-GALLEGO, L.; LLULL, J.; RAMOS, G. et al. The Ibizaian hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania*

infection. *Veterinary Parasitology*, v.90, n.1-2, p.37-45, 2000.

SOLANO-GALLEGO, L.; MORELL, P.; ARBIX, M. et al. Prevalence of *Leishmania infantum* in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. *Journal of Clinical Microbiology*, v.39, n.2, p.560-563, 2001.

STRAUSS-AYALI, D.; JAFFE, C. L.; BURSHTAIN, O. et al. Polymerase chain reaction using noninvasively obtained samples, for the detection of *Leishmania infantum* DNA in dogs. *The Journal of Infectious Diseases*, v.189, n.9, p.1729-1733, 2004.

TAFURI, W. L.; DE OLIVEIRA, M. R.; MELO, M. N. et al. Canine visceral leishmaniasis: a remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil. *Veterinary Parasitology*, v.96, n.3, p.203-212, 2001.

TAFURI, W. L.; SANTOS, R. L.; ARANTES, R. M. et al. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. *Journal of immunological methods*, v.292, n.1-2, p.17-23, 2004.

TAVARES, C. A. P.; FERNANDES, A. P.; MELO, M. N. Molecular diagnosis of leishmaniasis. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, v.3, n.5, p.657-667, 2003

TIZARD, I. R. Vacinação e Vacinas. In:____. *Imunologia Veterinária: uma introdução*. 5. ed. São Paulo: Rocca, 1998. Cap. 21, p.271-287.

TRAVI, B. L.; TABARES, C. J.; CADENA, H. et al. Canine Visceral Leishmaniasis in Colombia: relationship between clinical and parasitologic status and infectivity for sand flies. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.64, n.3-4, p.119-124, 2001.

VOLLER, A., BIDWELL, D. E.; BARTLETT, A. *The enzyme linked immunosorbent assay (ELISA): a guide with abstracts of microplate applications*. Guernsey: Dynatech Europe, 1979. 124p.

WATSON, J. D.; GILMAN, M.; WITKOWSKI, J. et al. Reação da Polimerase em Cadeia. In: _____. *O Dna Recombinante*. 2.ed. Ouro Preto: UFOP, 1997. Cap.6, p.75-93.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Control of the leishmaniasis. *World Health Organization Technical Report Series*, v.793, p.106, 1990.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) a . TDR diseases/Diseases current portfolio. Disponível em <http://www.who.int/tdr/publications/publications/pdf/malaria_vaccine.pdf> Acesso em: 06 dezembro 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) b. TDR diseases/Diseases current portfolio. Disponível em <http://www.who.int/tdr/publications/pdf/pr13/leis.pdf/pr13/leish.pdf>> Acesso em 06 dezembro 2006.

WORTMANN, G.; HOCHBERG, L.; HUO-HSU, H. et al. Rapid identification of *Leishmania* complexes by a real-time PCR assay. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.73, n.6, p.999-1004, 2005.

XAVIER, S. C. *Aspectos clínicos, histopatológicos e parasitológicos da pele de cães naturalmente infectados com Leishmania (Leishmania) chagasi*. 2002. 46f. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

FICHA CLÍNICA

Proprietário:_____

Rua/Av: _____

Bairro: _____ Cidade/Estado: _____

CEP: . - Telefones:

Animal: _____ Espèce: _____

Raça: _____ Cor: _____ Idade: _____

Sexo: _____ Peso: _____

Vacinação com Leishmune®:

1^a dose: ____/____/____ 2^a dose: ____/____/____ 3^a dose: ____/____/____

Reforço anual: / / / /

Anamnese e exame clínico

[illegible]

ANEXO B



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 134/2006**, relativo ao projeto intitulado "**Avaliação do perfil humoral de cães vacinados com Leishmune® residentes em áreas endêmicas de Leishmaniose visceral canina.**", que tem como responsável **Adriane Pimenta da Costa Val Bicalho**, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **22/ 11/2006**.

Este certificado expira-se em **22/ 11 / 2011**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 134/2006**, related to the project entitled "**Evaluation of the humoral immune response of vaccinated dogs with Leishmune® living in endemic area of canine visceral leishmaniasis**", under the supervision of **Adriane Pimenta da Costa Val Bicalho**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **November 22, 2006**.

This certificate expires in **November 22, 2011**.

Belo Horizonte, 27 de Novembro de 2006.

Prof. Humberto Pereira Oliveira
Presidente do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4516
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@proq.ufmg.br

(Mod.Cert. v1.0)

ANEXO C

1.1 SOLUÇÃO PARA REALIZAÇÃO DA RIFI

▪ Solução de Tampão Fosfato (PBS) pH 7,4

Na ₂ HPO ₄ (Merck, Alemanha)	1,20g
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O (Merck, Alemanha)	0,22g
NaCl (Merck, Alemanha)	8,5g
H ₂ O destilada q.s.p.	1000mL

▪ Solução de Azul de Evans 1:100

Azul de Evans (Sigma)	0,1g	0,05g	0,025g
H ₂ O destilada q.s.p.	10,0mL	5,0mL	2,5mL
Azul de Evans	50μL		
PBS – Tween 80 a 2%	2950μL		

▪ Glicerina Tamponada

Glicerina P.A. (Merck)	75 mL
Salina Tamponada (especial)	25 mL

Salina Tamponada (especial)

Solução 1

0,1M-- Na₂HPO₄ · 7 H₂O ----0,268g / ou · 2 H₂O -----0,178g

Solução 2

0,1M--- NaH₂PO₄ x H₂O----0,138g

Em 10 mL de água destilada

Tomar 9,45mL da solução 1, adicionar 0,55mL da solução 2 dando um pH8,0.

1.2. SOLUÇÕES PARA REALIZAÇÃO DA ELISA CONVENCIONAL

▪ Solução de Tampão Fosfato (PBS) pH 7,6

Na ₂ HPO ₄ (Merck)	3,30g ou 4,136g x 2 H ₂ O
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O (Merck)	0,39g ou 0,3215g x 2 H ₂ O
NaCl (Merck)	21,25g (17g/2litros)
H ₂ O destilada	q.s.p. 2,5 litros

▪ Tampão Carbonato (Coating Buffer)

Na ₂ CO ₃ (Merck)	1,59g
NaHCO ₃ (Merck)	2,93g
H ₂ O destilada	q.s.p. 1 litro

Viável por 15 dias a 4°C.

▪ Solução de Lavagem

NaCl (Merck)	9g
Tween 20(Merck)	0,5mL
H ₂ O destilada	q.s.p. 1 litro

Manter a 4°C

▪ Tampão de Bloqueio

PBS pH 7,6	1000mL
Caseína (Sigma, Alemanha)	20g

Aquecer o PBS a aproximadamente 90°C, adicionar a caseína lentamente, agitando com bastão. Filtrar. Conservar a -20°C.

▪ **Tampão de Incubação**

PBS pH 7,6	1000mL
Tween 20	0,5mL
Caseína (Sigma, Alemanha)	2,5g

Aquecer o PBS a aproximadamente 90°C, dissolver a caseína e colocar o Tween. Conservar a -20°C.

▪ **Tampão do Substrato ou Tampão do Ácido Cítrico**

Na ₂ HPO ₄	7,19g ou 9,012g x 2 H ₂ O
C ₆ H ₈ O ₇ . H ₂ O (Ácido Cítrico) (Merck)	5,19g ou 5,7g x 2 H ₂ O
H ₂ O destilada	1 litro

▪ **Solução do Substrato**

Orto-phenyldamidina (Sigma [®] Aldrich, EUA)	10mg
H ₂ O ₂ (30V)	4μL
Tampão do Acido Cítrico	10mL

Preparar na hora do uso

▪ **H₂SO₄ 4N**

H ₂ SO ₄ concentrado (Merck)	480mL
H ₂ O	qsp 1000mL

1.3. SOLUÇÕES PARA REALIZAÇÃO DA ELISA-FML

▪ Tampão Carbonato Bicarbonato pH 9,6

Solução A

NaHCO ₃ 0,06M	5,0406g/L
Água milliqual q.s.p.	1 litro.

Solução B

Na ₂ CO ₃ 0,06M	6,3594g/L
Água milliqual q.s.p	1 litro.

usar uma parte da solução B + até quatro partes da solução A. Ajustar o pH para 9,6 da seguinte forma: se estiver maior que 9,6 adicionar Solução A, se estiver menor que 9,6 adicionar Solução B.

▪ Tampão Fosfato Salina (PBS - 0,018M)

NaCL	8,18g
Na ₂ PO ₄	1,05g
ou Na ₂ HPO ₄ 7H ₂ O	2,16g
ou Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O	2,651g
ou Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O	1,318g
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	0,357g
ou NaH ₂ PO ₄	0,310g
Água milliqual q.s.p	1000mL

▪ **Tampão Fosfato Salina - Tween-leite em pó (PBS*)**

Tween 20 a 0,05% (v/v), 1% (p/v) de leite em pó desnatado em 100mL de PBS

▪ **Tampão OPD pH 4.9-5.2**

Solução A Na_2HPO_4	11,9g
H_2O milliqui q.s.p.	1.000mL
Solução B $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Ácido Cítrico)	7g
H_2O milliqui q.s.p.	1.000mL

▪ **Solução do Substrato**

Orto-phenyldamidina (Sigma [®] Aldrich, EUA)	2,4mg
H_2O_2 (30V)	2,4 μL
Tampão OPD	6mL

Preparar na hora do uso

▪ **Ácido Sulfúrico 1N**

Usar 2,52mL do ácido (H_2SO_4), 96% para 50mL de água milliqui. Colocar primeiramente a água e depois o ácido.

ANEXO D

Valores individuais de absorbância dos cães vacinados e cães naturalmente infectados com LV nos testes ELISA-FML e ELISA-ASL, para a IgGT e suclasse IgG1 e IgG2.

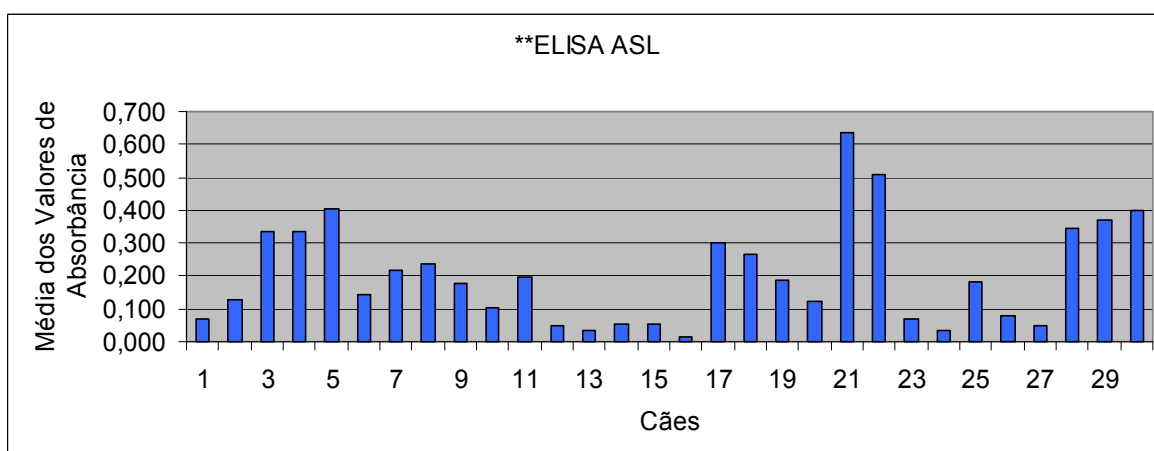
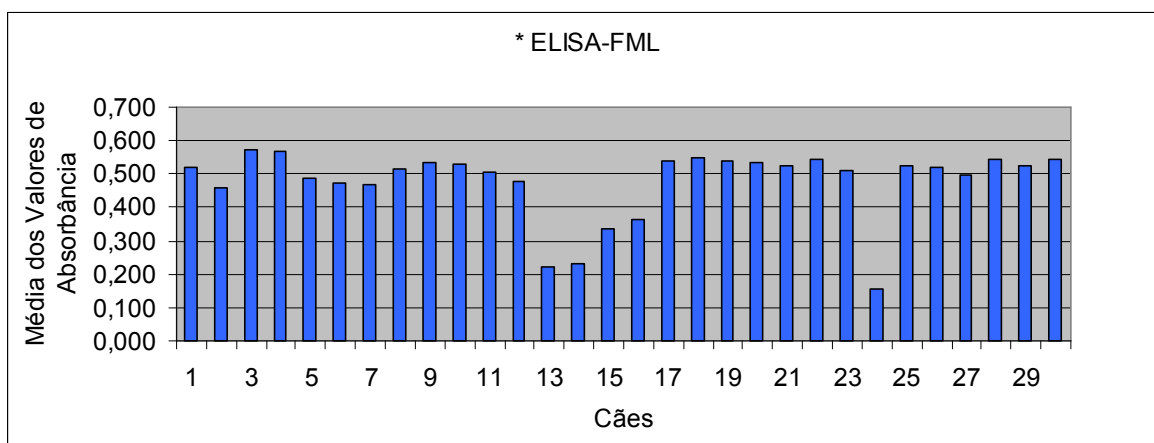


GRÁFICO 1 Valores individuais de absorbância de IgGT dos cães vacinados (n=30) na *ELISA-FML e **ELISA-ASL. Cada amostra de soro foi testada em duplicata. O eixo y representa os valores de absorbância a 495nm de amostras de soros diluídos a *1/100 e **1/400. FML= fucose manose ligante. ASL= antígeno solúvel de *Leishmania*. Ponto de Corte: ELISA-FML= 0,091; ELISA-ASL= 0,061.

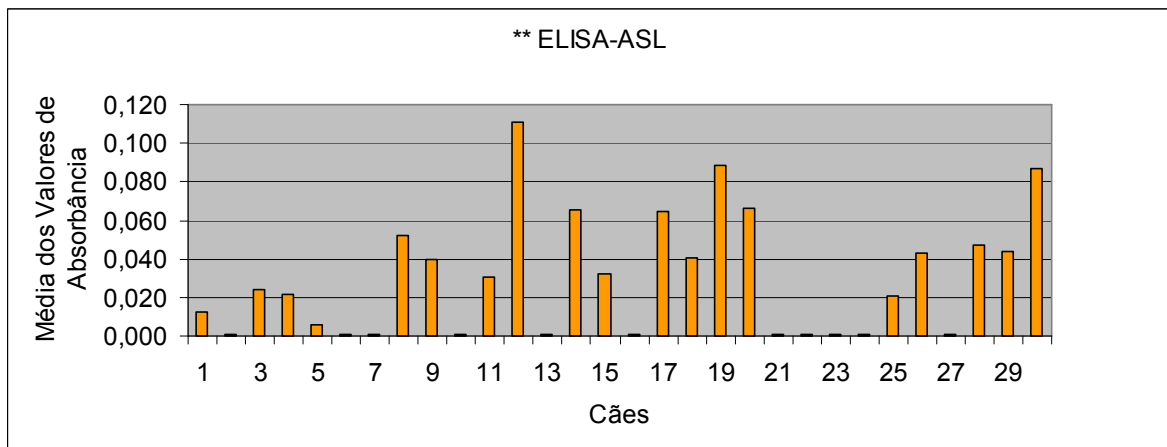
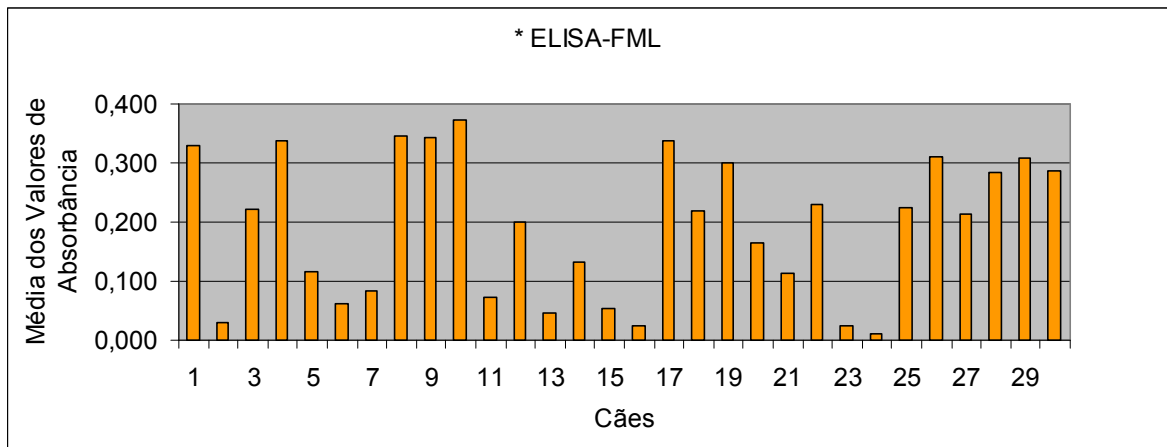


GRÁFICO 2 Valores individuais de absorbância de IgG1 dos cães vacinados (n=30) na *ELISA-FML e **ELISA-ASL. Cada amostra de soro foi testada em duplicata. O eixo y representa os valores de absorbância a 495nm de amostras de soros diluídos a *1/100 e **1/400. FML= fucose manose ligante. ASL= antígeno solúvel de *Leishmania*. Ponto de Corte: ELISA-FML= 0,078; ELISA-ASL= 0,138.

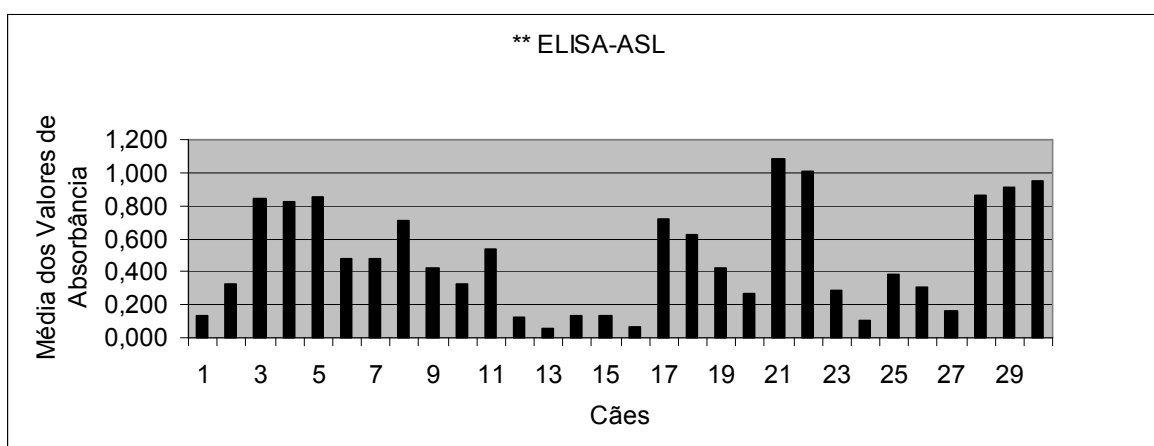
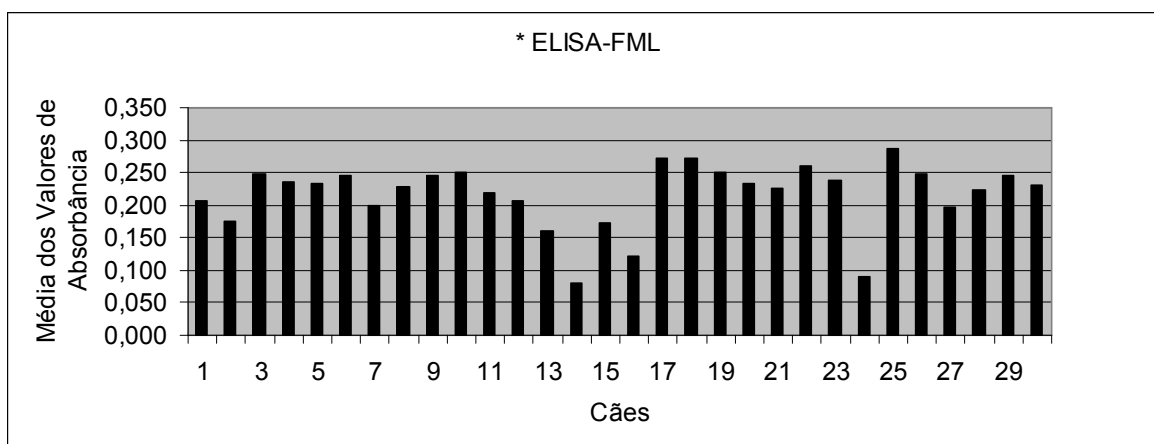


GRÁFICO 3 Valores individuais de absorbância de IgG2 dos cães vacinados (n=30) na *ELISA-FML e **ELISA-ASL. Cada amostra de soro foi testada em duplicata. O eixo y representa os valores de absorbância a 495nm de amostras de soros diluídos a *1/100 e **1/400. FML= fucose manose ligante. ASL= antígeno solúvel de *Leishmania*. Ponto de Corte: ELISA-FML= 0,064; ELISA-ASL= 0,200.

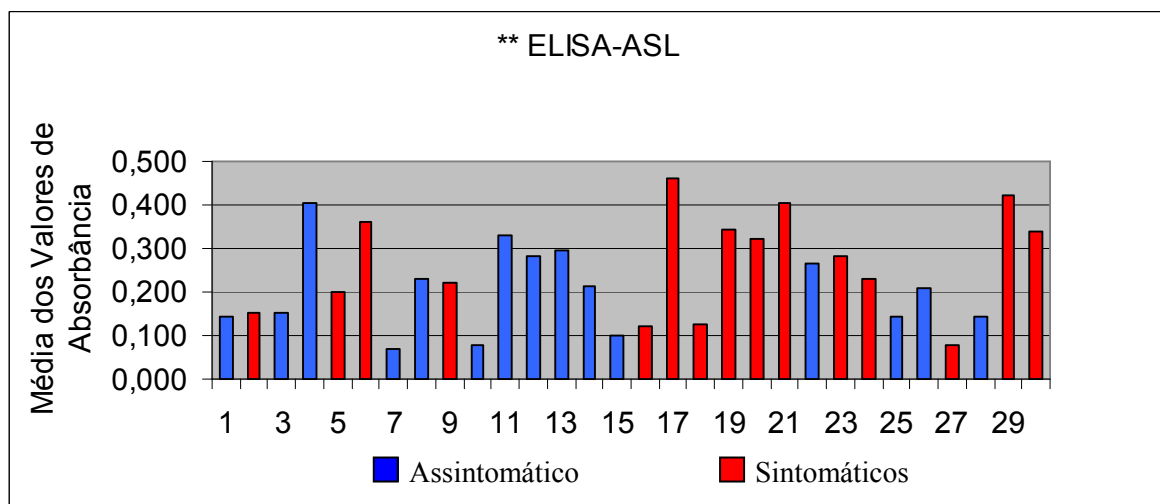
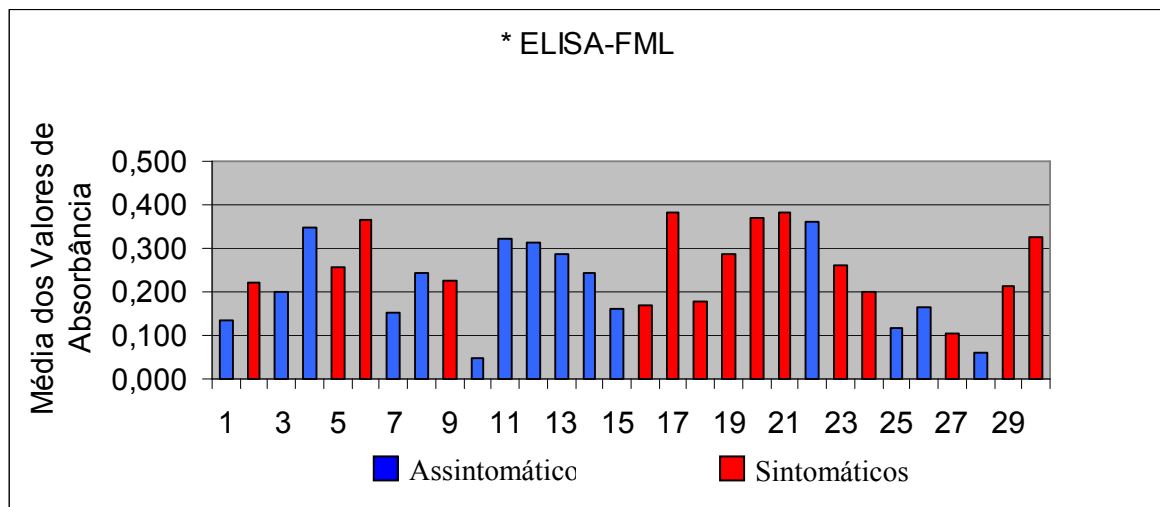


GRÁFICO 4 Valores individuais de absorbância de IgGT dos cães naturalmente infectados (n=30) na *ELISA-FML e **ELISA-ASL. Cada amostra de soro foi testada em duplicata. O eixo y representa os valores de absorbância a 495nm de amostras de soros diluídos a *1/100 e **1/400. FML= fucose manose ligante. ASL= antígeno solúvel de *Leishmania*. Ponto de Corte: ELISA-FML= 0,033; ELISA-ASL= 0,045.

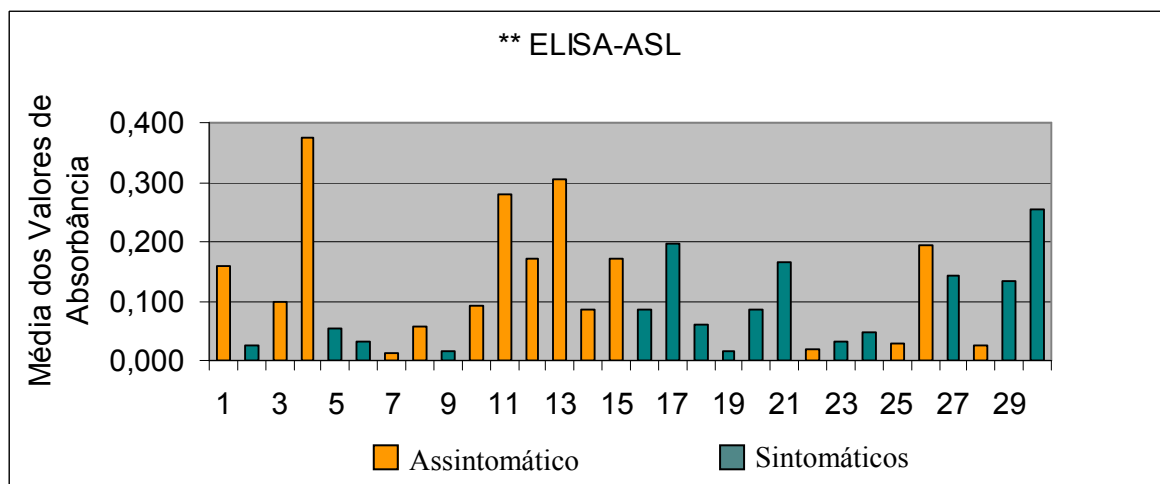
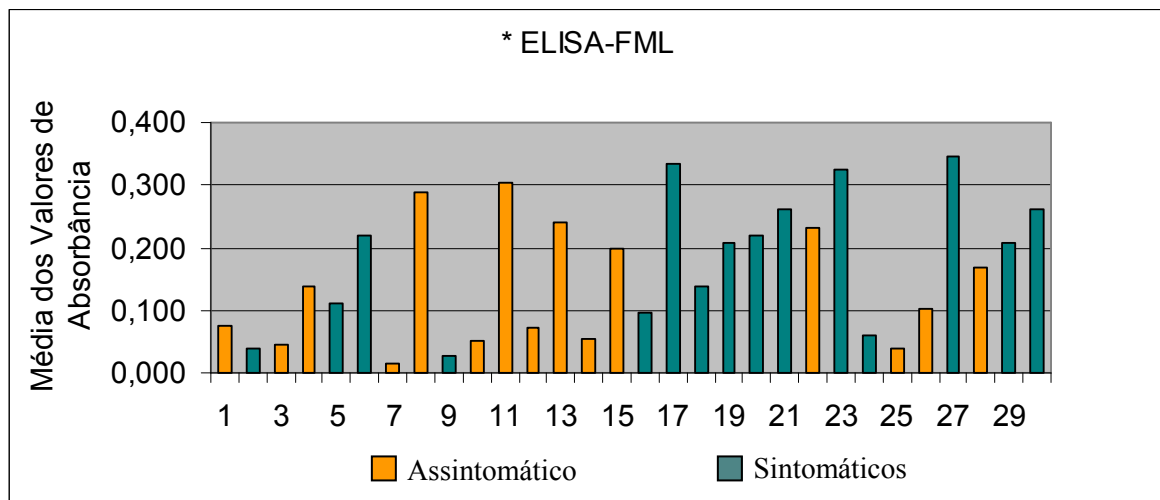


GRÁFICO 5 Valores individuais de absorbância de IgG1 dos cães naturalmente infectados (n=30) na *ELISA-FML e **ELISA-ASL. Cada amostra de soro foi testada em duplicata. O eixo y representa os valores de absorbância a 495nm de amostras de soros diluídos a *1/100 e **1/400. FML= fucose manose ligante. ASL= antígeno solúvel de *Leishmania*. Ponto de Corte: ELISA-FML= 0,154; ELISA-ASL = 0,175.

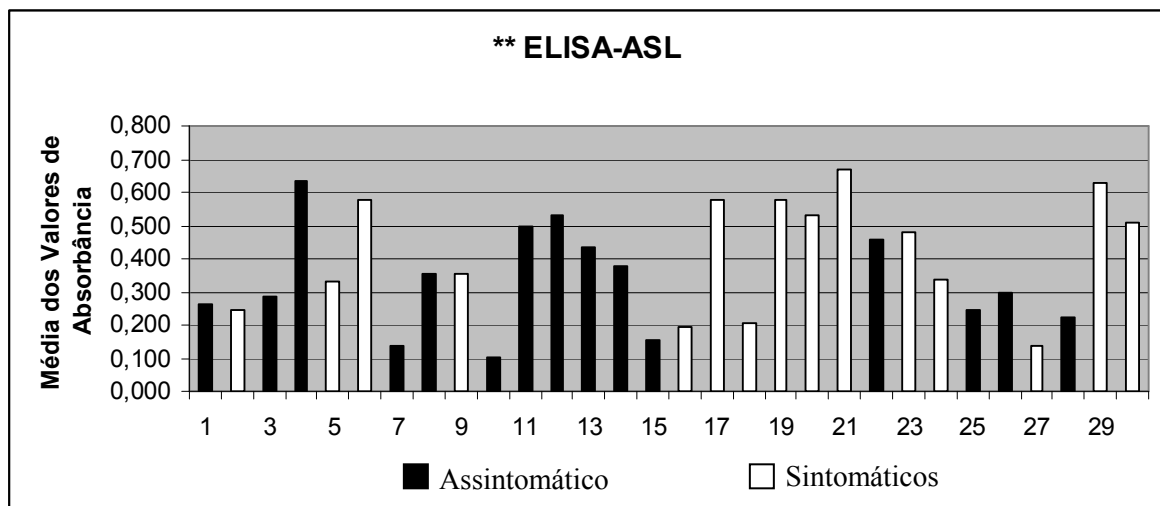
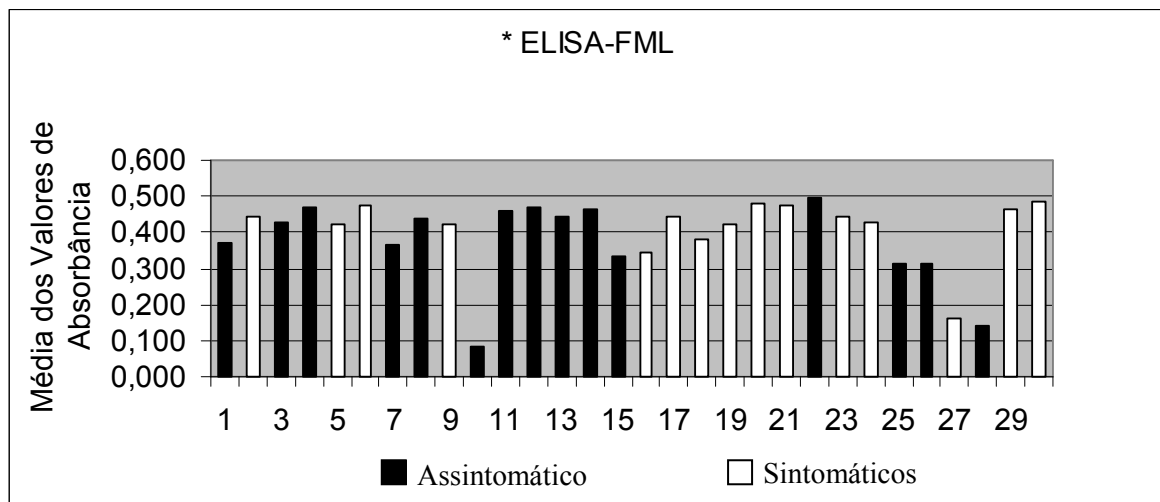


GRÁFICO 6 Valores individuais de absorbância de IgG2 dos cães naturalmente infectados (n=30) na *ELISA-FML e **ELISA-ASL. Cada amostra de soro foi testada em duplicata. O eixo y representa os valores de absorbância a 495nm de amostras de soros diluídos a *1/100 e **1/400. FML= fucose manose ligante. ASL= antígeno solúvel de *Leishmania*. Ponto de Corte: ELISA-FML= 0,054; ELISA-ASL= 0,062.