

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Parasitologia

**EXPRESSÃO HETERÓLOGA DA rKDDR DE *Leishmania infantum*:
UM NOVO ANTÍGENO RECOMBINANTE PARA O
DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL**

LUCAS DE CARVALHO DHOM LEMOS

Belo Horizonte
Outubro/2014

LUCAS DE CARVALHO DHOM LEMOS

**EXPRESSÃO HETERÓLOGA DA rKDDR DE *Leishmania infantum*:
UM NOVO ANTÍGENO RECOMBINANTE PARA O
DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito à obtenção do título de Mestre em Parasitologia.

Área de Concentração: Imunoparasitologia

Orientação: Dr. Ricardo Toshio Fujiwara

Coorientação: Dra. Daniella C. Bartholomeu

Belo Horizonte

Outubro/2014

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos – LIGP, do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, sob orientação do Prof. Dr. Ricardo Toshio Fujiwara e coorientação da Prof^a. Dr^a. Daniella Castanheira Bartholomeu.

COLABORADORES

Departamento de Parasitologia – ICB/UFMG

Dra. Lilian Lacerda Bueno

Me. Tiago Antonio Mendes

Me. João Luis Reis Cunha

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde – UNIMONTES/MG

Dr. Silvio Fernando Guimarães de Carvalho

ÓRGÃOS FINANCIADORES:

CNPq, FAPEMIG, UFMG

**Dedico este trabalho ao meu pai Francisco Túlio Dhom Lemos
(*in memoriam*)**

à minha mãe Maria Cristina Guimarães de Carvalho

às minhas irmãs Renata e Eduarda

À minha amada esposa

Aléxia Brescia Dhom Lemos

“O sentimento segue aquilo que amamos. Se amamos o que é verdadeiro, bom e belo, ele nos conduzirá para lá. O problema, portanto, não é sentir, mas amar as coisas certas. Do mesmo modo, o pensamento não é guia de si próprio, mas se deixa levar pelos amores que temos. Sentir ou conhecer, nenhum dos dois é um guia confiável. Antes de poder seguir qualquer um dos dois, é preciso aprender a escolher os objetos de amor – e o critério dessa escolha é: Quais são as coisas que, se dependessem de mim, deveriam durar para sempre? Há coisas que são boas por alguns instantes, outras por algum tempo. Só algumas são para sempre.”

Olavo de Carvalho

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me conceder o privilégio da vida, por me inspirar pela verdade que há em seu amor, por me amar incondicionalmente, guiando-me em seu caminho e em seu tempo. Obrigado Deus, por me permitir que, à luz da razão, eu pudesse compreender sua existência. Obrigado Deus, por resgatar em minha alma o sentido eterno do seu amor.

Ao meu pai, Francisco Túlio Dhom Lemos (*in memoriam*), por ter sido o melhor pai do mundo, por sempre ter acreditado em mim, pelos conselhos, ensinamentos, longas conversas filosóficas, por ter estado ao meu lado sempre, me instruindo e apoiando nos meus sonhos.

À minha mãe, Maria Cristina Guimarães de Carvalho, pelo total apoio e confiança tão essenciais para que eu pudesse vencer essa etapa da minha vida, pelo amor, zelo e investimento no meu futuro.

Aos meus avós, em especial minha estimada avó Ligia Dhom Lemos, por verdadeiramente admirar o que eu faço, por apostar e torcer pelo meu sucesso nesta caminhada acadêmica, por ser meu porto seguro.

Ao meu tio Ulisses Magno Dhom Lemos, pelo incondicional apoio, pelos conselhos, por acreditar em mim, por ter sido como um pai em momentos difíceis neste período da minha vida. Obrigado tio!

Às minhas irmãs e todos os meus familiares, que sempre fizeram e fazem parte da minha vida, por torcerem por mim e me amarem.

À família Brescia, que me acolheram desde o início por todos esses anos. Obrigado pelo carinho, apoio e alegria de estar com vocês!

Aos meus amigos de infância e amigos da faculdade, pela amizade sincera e verdadeira; obrigado por rirem das minhas palhaçadas, mesmo sendo elas nada engraçadas.

Ao meu orientador, Ricardo Toshio Fujiwara. Obrigado por ter me escolhido e recebido como seu aluno. Agradeço pela sua paciência, amizade e cuidado. Por sempre estar disposto a ajudar, ensinar, dar conselhos, ouvir. Serei eternamente grato pelo seu imenso empenho em proporcionar todas as condições possíveis para que eu possa seguir no caminho da ciência. Obrigado por ser um verdadeiro mestre, uma referência a qual eu admiro.

Aos amigos do Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos (LIGP), pela amizade, agradável convívio e carinho.

A todos os amigos e colegas do Departamento de Parasitologia, pelo ótimo convívio e bons momentos vividos.

À secretaria da Pós-Graduação do Dep. de Parasitologia, pela presteza, cuidado e grande esforço de ajudar prontamente todos os alunos nas dificuldades inerentes à pós-graduação.

A todos os colaboradores deste trabalho, que contribuíram imensamente para o desenvolvimento e execução deste projeto.

Às agências financiadoras, CNPq e FAPEMIG por tornarem este projeto viável.

Aos pacientes e animais estudados neste trabalho pela oportunidade de aprendizado.

Agradecimento Especial

Agradeço a minha amada esposa Aléxia Brescia Dhom Lemos, por ser minha fonte de inspiração, de esperança, força e vontade de viver. Obrigado por estar ao meu lado todos esses anos, mesmo nos momentos mais difíceis, me encorajando a seguir frente e não desistir dos meus sonhos. Estar ao seu lado todos esses anos me fez entender o verdadeiro sentido de viver! Eu te amo!!!

SUMÁRIO

<i>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</i>	<i>iv</i>
<i>LISTA DE FIGURAS</i>	<i>vi</i>
<i>LISTA DE TABELAS</i>	<i>x</i>
<i>RESUMO</i>	<i>xi</i>
<i>ABSTRACT</i>	<i>xii</i>
1. <i>INTRODUÇÃO</i>	01
1.1 Leishmaniose Visceral.....	02
1.1.1 Os agentes etiológicos da leishmaniose visceral.....	02
1.1.2 Ciclo biológico e transmissão.....	03
1.1.3 Aspectos gerais da epidemiologia e distribuição da leishmaniose visceral.....	04
1.1.4 O controle da leishmaniose visceral.....	06
1.2 Diagnóstico da leishmaniose visceral.....	07
1.2.1 Diagnóstico clínico.....	07
1.2.2 Diagnóstico parasitológico.....	08
1.2.3. Diagnóstico sorológico.....	08
1.2.4. Kinesinas de <i>Leishmania</i>	12
2. <i>JUSTIFICATIVA</i>	14
3. <i>OBJETIVOS</i>	16
3.1. Objetivo Geral.....	17
3.2. Objetivos Específicos.....	17
4. <i>METODOLOGIA</i>	18
4.1 Parasitos.....	19
4.1.1 Cultivo de <i>L. infantum</i> – cepa BH46.....	19

4.2 Predição de epitopos lineares de células B e de desordem estrutural.....	19
4.3 Expressão heteróloga da porção repetitiva da kinesina de <i>L. infantum</i>	20
4.3.1 Obtenção de DNA genômico de <i>L. infantum</i> purificado.....	20
4.3.2 Desenho de primers que flanqueiam a região repetitiva da kinesina de <i>L. infantum</i> (TritypDB ID: Linj.14.1180) para a obtenção de amplicons utilizados na expressão heteróloga.....	20
4.3.3 Amplificações por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase).....	23
4.3.4 Análise do padrão de amplificação em gel de agarose.....	23
4.3.5 Purificação das bandas de tamanho esperado do gel de agarose.....	23
4.3.6 Ligação dos amplicons purificados ao vetor de clonagem pGEM [®] -T.....	23
4.3.7 Transformação de bactérias por eletroporação.....	24
4.3.8 Extração e purificação dos plasmídeos recombinantes.....	24
4.3.9 Digestão dos vetores com enzimas de restrição.....	24
4.3.10 Ligação ao vetor de expressão pET28a-TEV.....	25
4.3.11 Sequenciamento da montagem pET28a-TEV/KDDR.....	25
4.3.12 Indução da expressão das proteínas recombinantes.....	26
4.3.13 Teste de solubilidade.....	26
4.3.14 Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE).....	27
4.3.15 Purificação de proteínas recombinantes por cromatografia de afinidade.....	27
4.4 Ensaio de reconhecimento sorológico.....	28
4.4.1 Soros de cães.....	28
4.4.2 Soros humanos.....	28
4.4.3 Aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa e Experimentação Animal.....	29
4.5. Teste de ELISA.....	29

4.6. Análise estatística.....	30
5. RESULTADOS.....	31
5.1 Predição de epitopos lineares de células B e predição de desordem estrutural da kinesina <i>L. infantum</i>	32
5.2 Expressão heteróloga da rKDDR.....	33
5.2.1 PCR e obtenção de amplicons para clonagem em pGEM [®] -T.....	34
5.2.2 Digestão com enzimas de restrição (NheI e XhoI) da montagem pGEM [®] -T/KDDR para subclonagem em vetor de expressão.....	35
5.2.3 Análise do sequenciamento da montagem pET28a-TEV/KDDR.....	37
5.2.4 Análises moleculares da rKDDR.....	39
5.2.5 Indução da expressão e teste de solubilidade da rKDDR.....	41
5.2.6 Purificação por cromatografia de afinidade da rKDDR.....	42
5.3 Sorodiagnóstico da Leishmaniose Visceral por ELISA.....	44
5.3.1 Reconhecimento sorológico canino com o antígeno rKDDR.....	44
5.3.2 Leishmaniose visceral humana: reconhecimento sorológico humano.....	50
6. DISCUSSÃO.....	53
7. CONCLUSÃO.....	60
8. ANEXOS.....	62
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AUC – “Area Under the Curve” (Área Sob a Curva)
- BLAST – “Basic Local Alignment Search Tool”
- BOD – “Biochemical Oxygen Demand” (Demanda Bioquímica de Oxigênio)
- CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais
- COEP – Comitê de Ética em Pesquisa
- CN – Controle Negativo
- DAT – “Direct Agglutination Test” (Teste de Aglutinação Direta)
- DNA – “Deoxyribonucleic acid” (Ácido Desoxirribonucléico)
- dNTP – Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
- DO – Densidade Óptica
- ELISA – Ensaio Imunoadsorvente Ligado à Enzima
- HAI – Hemaglutinação Indireta
- His-Tag – Cauda de Histidina
- HPLC – “High Performance/Pressure Liquide Chromatography”
- Ig – Imunoglobulina
- IgG – *gama* Imunoglobulina
- IPTG – Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
- kb – Kilo Base
- kDa – Kilodalton
- KDDR – “Kinesin Degenerated Derived Repeat” (Repetição Degenerada Derivada de Kinesina)
- LDPK – Leishmaniose Dérmica Pós-Kalazar
- LV – Leishmaniose Visceral
- LVC – Leishmaniose Visceral Canina
- LVH – Leishmaniose Visceral Humana
- ORF – “Open Reading Frame” (Janela da Abertura de Leitura)
- OPD – “o-phenylenediamine dihydrochloride”
- pb – Pares de Base
- PBS – “Phosphate Buffered Saline” (Solução Salina de Tampão Fosfato)
- PCR – “Polymerase Chain Reaction” (Reação em Cadeia da Polimerase)

pI – Ponto Isoelétrico

qPCR – Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa

RIFI – Reação de Imunofluorescência Indireta

ROC – “Receiver Operating Characteristic” (Característica de Operação do Receptor)

ROS – Espécies Reativas de Oxigênio

SDS – “Sodium Dodecyl Sulfate”

SDS-PAGE – Gel de Poliacrilamida-SDS

SMF – Sistema Mononuclear Fagocitário

TIC – Teste imunocromatográfico

VPN – Valor Preditivo Negativo

VPP – Valor Preditivo Positivo

WHO – “World Health Organization” (Organização Mundial de Saúde)

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Ciclo de vida esquemático do gênero *Leishmania*.** Fonte: Chappuis *et al.*, 2007 – adaptado de Handman, 2001.....04
- Figura 2: Estado de endemicidade, a nível mundial, da leishmaniose visceral no ano de 2012.** Fonte: WHO, 2013.....06
- Figura 3: Desenho esquemático do cromossomo 14 de *L. infantum* e alinhamento múltiplo.** **A:** O cromossomo 14 de *L. infantum* contém o gene que codifica a proteína kinesina que possui uma extensa região de repetição. **B:** alinhamento múltiplo dos 9 primeiros motivos repetitivos (117 pb) do gene da kinesina (TritypDB ID: Linj.14.1180). **T**, timina degenerada; destacados em azul, nucleotídeos que foram utilizados como molde para o desenho do primer reverso (sequência complementar-reversa de: 5' **TCAGCTGGAGGCC** 3').....21
- Figura 4: Esquema das predições de epitopos e de desordem estrutural da kinesina de *L. infantum*.** Pelo fato do tamanho da proteína kinesina (TritypDB ID: Linj.14.1180) de *L. infantum* ser extremamente extensa (~ 3300 aa), apenas o seu primeiro terço está representado pela régua no topo da figura. A seta negra segmentada (numerada de 1 a 15) representa a região de repetição da kinesina e cada segmento da seta representa um bloco de repetição de 39 aminoácidos. Os retângulos cinza claro e cinza escuro significam, respectivamente, as localizações das proteínas rK39 e rKDDR na kinesina. A linha negra tracejada, perpendicular aos retângulos, seta e régua, indica o início das repetições na proteína kinesina. Os retângulos de cor verde e vermelha de diferentes intensidades indicam, respectivamente, a posições preditas dos epitopos lineares de células B e as regiões de maior entropia preditas (quanto maior a intensidade da cor maior o score de predição).....32
- Figura 5: Gel de agarose a 1% do produto da PCR do DNA genômico de *L. infantum*.** Bandas mais fortes contendo amplicons de tamanho esperado (~1100pd) são excisados para clonagem em vetor de clonagem pGEM®-T.....34

Figura 6: Separação eletroforética em gel de agarose a 1% do produto de digestão com *NheI*. Após o processo de digestão os plasmídeos linearizam-se, gerando uma única banda com o tamanho do plasmídeo (3000pb) mais o tamanho do inserto (~1100pb); pb = pares de base; *NheI* = canaleta correspondente a digestão do vetor pGEM®-T/KDDR por *NheI*.....35

Figura 7: Separação eletroforética em gel de agarose a 1% do produto de digestão com *XhoI*. Com a segunda digestão, os insertos são separados dos plasmídeos linearizados gerando duas bandas: uma maior do tamanho do plasmídeo (3000pb) e outra com o tamanho esperado do inserto (~1100pb); pb= pares de base; *XhoI* = canaleta correspondente a digestão do vetor pGEM®-T/KDDR por *XhoI*.....35

Figura 8: Alinhamento global *Clustal O* (1.2.1) Multiple Sequence Alignment. A linha contendo o identificador da proteína recombinante corresponde a sequência clonada no vetor pET-28a-TEV, enquanto a linha contendo o identificador do gene da kinesina corresponde a sua sequência proteica depositada no Trityp DB na região 365-707. O “*” abaixo dos aminoácidos significa que eles são idênticos. O símbolo “-” no lugar de um aminoácido corresponde a um “Gap” nesta sequência. As sequências em vermelho correspondem a parte do vetor pET-28a-TEV que é incorporada à proteína recombinante.....37

Figura 9: Sequência de DNA e proteica deduzida da KDDR. **A:** sequência de nucleotídeos da KDDR está em letra minúscula e em letra maiúscula a sequência proteica deduzida; sublinhado em preto estão os motivos repetitivos de 39 aminoácidos e sublinhado em amarelo a His-Tag; a sequência de letras maiúsculas vermelhas corresponde ao motivo repetitivo polimórfico e as letras maiúsculas em cor azul correspondem aos aminoácidos degenerados exclusivas deste motivo; **B:** letras em preto correspondem à sequência consenso dos motivos repetitivos da KDDR; as setas apontam as posições de degeneração; abaixo, se encontra o motivo repetitivo polimórfico.....39

Figura 10: Indução da expressão e teste de solubilidade. **A:** Separação em gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) a 12% das amostras de bactérias utilizadas no teste de expressão. canaleta I: corresponde à amostra de bactérias transformadas não induzidas; canaleta II: amostra de bactérias transformadas com três horas de indução com IPTG (1mM); canaleta III: amostra de bactérias não transformadas (*E. coli*); **B:** Separação em gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) a 12% das amostras de bactérias utilizadas no teste de solubilidade: canaleta IV: fração solúvel e canaleta V: fração insolúvel.....40

Figura 11: Curva de eluição após purificação por cromatografia de afinidade da proteína rKDDR. O pico de absorvância ocorreu entre as frações 9 e 16, indicando a presença da proteína rKDDR nas nestas frações.....42

Figura 12: Gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) para a confirmação da purificação por cromatografia de afinidade da proteína rKDDR. As bandas fortes na altura dos 40 kDa correspondem à rKDDR.....42

Figura 13: Comparação da reatividade dos soros de cães nos testes de ELISA da EIE-LVC kit, rK39 e rKDDR. Os diferentes testes de ELISA foram realizados com seguintes grupos de soros de cães: CN, controle negativo, n = 81; Babesia, cães com babesiose para avaliação de reatividade cruzada, n = 15; Tc, cães com doença de Chagas para avaliação de reatividade cruzada, n = 15; LVC, cães com leishmaniose visceral canina, n = 96. No eixo das ordenadas estão representadas as absorvâncias de comprimento de 490nm. No eixo das abscissas estão ordenados os diferentes grupos de soros de cães testados. A linha vermelha é o limite inferior de positividade (*cut-off*). Os índices acima de cada coluna de plotagem indicam o percentual de pontos que estão acima do *cut-off*. A curva ROC foi utilizada para determinar o *cut-off* de cada teste. #*Cut-off* obtido de acordo com as instruções do manual do fabricante.....45

Figura 14: Comparação das curvas ROC obtidas de cada teste: EIE-LVC kit, rK39 e rKDDR. As curvas ROC foram geradas pelo software Prism 5.0 e com elas foram determinados *cut-off*, sensibilidade, especificidade e AUC (área sob a curva). O eixo das ordenadas está representando as sensibilidades de cada teste. O eixo da abscissa está significando a especificidade de cada teste.....46

Figura 15: Comparação da reatividade e das curvas ROC dos testes de ELISA da rK39 e rKDDR com soros humanos. Os dois testes de ELISA foram realizados com seguintes grupos de soros humanos: CN, controle negativo, n = 31; Tc, pacientes com doença de Chagas para avaliação de reatividade cruzada, n = 17; LVH, pacientes com leishmaniose visceral, n = 84. **A e B:** reatividade dos soros humanos no teste de ELISA da rK39 e sua curva ROC, respectivamente; **C e D:** reatividade dos soros humanos no teste de ELISA da rKDDR e sua curva ROC, respectivamente. Nos gráficos de reatividade, os eixos das ordenadas estão representando as absorvâncias de comprimento de 490nm e nos gráficos de curva ROC as sensibilidades de cada teste. Nos gráficos de reatividade, os eixos das abscissas estão ordenados os diferentes grupos de soros humanos testados e nos gráficos de curva ROC as especificidades de cada teste. A linha vermelha é o limite inferior de positividade (*cut-off*). Nos gráficos de reatividade, os índices acima de cada coluna de plotagem indicam o percentual de pontos que estão acima do *cut-off*. As curvas ROC foram geradas pelo software Prism 5.0 e com elas foram determinados *cut-off*, sensibilidade, especificidade e AUC (área sob a curva) de cada teste.....50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Detecções sorológicas e antigênicas comumente utilizadas para o diagnóstico da LV.....	11
Tabela 2: Concentrações das frações de purificação.....	41
Tabela 3: Percentuais de sensibilidade, especificidade, VPP, VPN e acurácia dos ensaios imunoenzimáticos rKDDR, rK39 e Kit EIE-LVC em soros caninos para diagnóstico da LV canina.....	47
Tabela 4: Concordância dos testes de ELISA rKDDR, rK39 e do Kit EIE-LVC com o diagnóstico parasitológico para LV canina.....	48
Tabela 5: Percentuais de sensibilidade, especificidade, VPP, VPN e acurácia dos ensaios imunoenzimáticos rKDDR e rK39 em soros humanos para diagnóstico da LV humana.....	51
Tabela 6: Concordância dos testes de ELISA rKDDR e ELISA rK39 com o diagnóstico parasitológico para LV humana.....	51

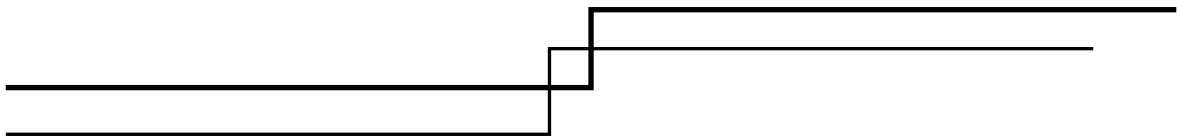
RESUMO

A leishmaniose visceral (LV) ou calazar é a forma mais grave dentre os diferentes tipos de leishmaniose, podendo levar à morte se não for diagnosticada e tratada. No Brasil, a LV é uma doença zoonótica, causada pela espécie Leishmania infantum, sendo o cão seu principal reservatório. A LV é um grave problema de saúde pública, devido ao crescente número de novos casos e de mortes a cada ano, colocando o Brasil na posição de terceiro lugar em incidência no mundo. Assumindo que o cão possui um papel central na epidemiologia da LV, as atuais estratégias de controle se resumem na eliminação de cães soropositivos, no combate às formas adultas do vetor, no diagnóstico e tratamento de humanos. Entretanto, os usuais métodos de diagnóstico apresentam limitações críticas que refletem diretamente na eficiência dos programas de controle da doença que, ainda, vigoram no país. Neste contexto, se fazem urgentes estudos que visem o desenvolvimento de novas técnicas de diagnóstico que sejam simples, rápidas, não invasivas, de relativo baixo custo e que possam ser utilizadas em campo. Diante do exposto, o presente trabalho teve como principal objetivo a produção de um novo antígeno recombinante, baseado na porção repetitiva de kinesina de L. infantum. Análises *in silico* de predição indicaram que a kinesina apresenta em sua porção repetitiva inúmeros epitopos de células B e um alto grau de desordem estrutural, sugerindo que antígenos constituídos de motivos repetitivos desta proteína exibem um alto potencial antigênico. Para a expressão heteróloga da proteína recombinante foram desenhados iniciadores específicos contendo em suas extremidades sítios de restrição para facilitação da transferência de amplicons em vetores de clonagem e de expressão, possibilitando a produção de um antígeno recombinante solúvel, com 8.5 motivos repetitivos de 39 aminoácidos, chamado rKDDR. Ensaio comparativos de reconhecimento sorológico canino e humano comprovaram que a rKDDR possui maior sensibilidade (cão 88,54% e 78,13; humano 92,86% e 90,48%, respectivamente) e especificidade (cão 97,30% e 90,09%; humano 100% e 97,92%, respectivamente) em relação a rK39. Além disso, a ELISA rKDDR apresentou melhor desempenho quando comparada com o Kit EIE-LVC, teste sorológico recomendado pelo Ministério da Saúde para o diagnóstico da LV canina. Esses resultados indicam que a rKDDR pode ser utilizada para o teste diagnóstico da leishmaniose visceral e contribuir para o controle da infecção em cães e humanos.

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis (VL) or kala-azar is the most severe form among the different types of leishmaniasis, which can lead to death if not properly diagnosed and treated. In Brazil, the VL is a zoonotic disease caused by Leishmania infantum and dogs are the major reservoir. VL is a serious public health problem due to the increasing number of new cases and deaths each year, which places Brazil in the third position of incidence worldwide. Assuming that dogs have a central role in the epidemiology of VL, current strategies of control are focused in the elimination of seropositive dogs, vector control and the diagnosis and treatment of infected humans. However, the usual diagnostic methods have critical limitations that limit the efficiency of programs for control that still prevail in the country. In this context, development of simple, quick, non-invasive, relatively low cost diagnostic techniques that could be used in the field are still urgent and necessary. The present work aimed to produce a new recombinant antigen based on the repetitive portion of the L. infantum kinesin. In silico prediction showed that the kinesin repetitive portion presents numerous B cell epitopes and a high degree of structural disorder, suggesting a high potential of antigenicity. For the heterologous expression of recombinant protein, specific primers containing an overhang at restriction sites to facilitate the transfer of amplicons into cloning and expression vectors were designed, enabling the production of a soluble recombinant antigen, with 8.5 motifs of 39 amino acid repeating, namely rKDDR. Comparatively, canine and human serologic recognition tests of rKDDR has shown greatest sensitivity (dog: 88.54% and 78.13%; human: 92.86% and 90.48%, respectively) and specificity (dog: 97.30% and 90.09%; human: 100% and 97.92%, respectively) when compared to rK39. In addition, rKDDR-ELISA shown better performance when compared with the kit EIE-LVC, the serologic test recommended by the Brazilian Ministry of Health for the diagnosis of canine VL. Taking together, these results indicate that rKDDR might be used for serodiagnosis test of visceral leishmaniasis and contribute to the control of the infection in dogs and humans.

1. INTRODUÇÃO



1.1 Leishmaniose visceral

A leishmaniose visceral (LV), também denominada calazar (kala-azar), é considerada uma doença sistêmica e de alta letalidade, pois se não houver tratamento, pode levar à morte em mais de 90% dos casos. A doença é causada por espécies de protozoários digenéticos pertencentes ao Filo Sarcomastigophora, Ordem Kinetoplastida e Família Trypanosomatidae (Ross 1903) e apresenta um período médio de incubação de 2 a 6 meses no homem e 3 a 7 meses no cão (Ministério da Saúde 2006). A LV exibe um amplo espectro de manifestações clínicas, que podem variar desde casos assintomáticos a ocorrências graves, estas, com acentuado comprometimento de órgãos como baço, fígado, medula óssea, linfonodos, epiderme e intestino.

1.1.1 Os agentes etiológicos da leishmaniose visceral

Até pouco tempo, admitia-se a existência de três espécies - *Leishmania donovani*, *L. infantum* e *L. chagasi* - causadoras da LV, reunindo-as em um complexo chamado *Leishmania donovani* (Lainson & Shaw 1987). Entretanto, após uma revisão realizada por Lainson e Shaw em 2005, passou-se a admitir duas subespécies viscerotrópicas geograficamente separadas responsáveis pela LV: a *Leishmania (L.) infantum chagasi*, incriminada como o agente etiológico da LV americana e *Leishmania (L.) infantum infantum* sendo o agente no Velho Mundo (Lainson & Shaw 2005).

Já a proposta feita por Lukes e col. em 2007, presume que a leishmaniose visceral é causada por protozoários pertencentes ao complexo *Leishmania donovani*, reunindo duas espécies de *Leishmania*: *Leishmania (Leishmania) donovani* e *Leishmania (Leishmania) infantum*, sendo a espécie *L. (L.) infantum* o agente etiológico da LV de transmissão zoonótica nas Américas, Europa, África, China e no oriente médio. Já em regiões como Índia, ocidente africano, Bangladesh e Nepal a espécie *L. (L.) donovani* é a responsável por provocar tanto a forma clássica da LV, com também a leishmaniose dérmica pós-calazar (LDPK). Além disso, sua transmissão possui caráter antroponótico, ou seja, a doença é transmitida de um ser humano para outro através do vetor (Herwaldt 1999, Lukes et al. 2007).

Atualmente, por falta de evidências sólidas que comprovem diferenças relevantes entre as espécies *L. infantum* e *L. chagasi*, ambas são consideradas sinonímias (Maurício et al. 2000).

1.1.2 Ciclo biológico e transmissão

Os parasitos do gênero *Leishmania* são transmitidos através da picada de dípteros pertencentes à Família Psychodidae e subfamília Phlebotominae (Lainson & Shaw 1978), conhecidos popularmente como mosquito-palha, birigui, cangalha, tatuquíra, entre outros.

O flebotomíneo da espécie *Lutzomyia longipalpis* é considerado o vetor da *L. infantum* no Brasil, afetando tanto o homem quanto os animais domésticos em ambientes urbanos e periurbanos (Sacks & Kamhawi 2001, Lainson & Rangel 2005). Esses parasitos exibem um ciclo de vida heteróxico, que significa ocorrência de alternância em hospedeiros vertebrados e invertebrados.

No seu ciclo de vida (**Figura 1**), os parasitos podem apresentar formas flageladas (promastigotas e paramastigotas), as quais se desenvolvem no tubo digestivo do flebotomíneo, enquanto que as formas não-flageladas, denominadas amastigotas, desenvolvem-se no interior das células do sistema fagocitário mononuclear (SFM) dos hospedeiros vertebrados (Grimaldi & Schottelius 2001). O ciclo se inicia quando fêmeas de flebotomíneo hematófagas ingerem, durante o repasto sanguíneo em um hospedeiro, as formas amastigotas. No interior do tubo digestivo do inseto, as amastigotas começam a dividir e se diferenciar em promastigotas procíclicas (células alongadas e com flagelo livre). Posteriormente, após o rompimento da membrana peritrófica, os parasitos migram para a região anterior do tubo digestivo do inseto e invadem o esôfago e faringe. Ali os parasitos se diferenciam em formas infectantes chamadas promastigotas metacíclicas (Killick Kendrick & Rioux 1991, Schlein 1993). Durante um novo repasto sanguíneo, a fêmea de flebotomíneo regurgita as formas promastigotas metacíclicas infectantes no local da picada, onde são imediatamente internalizadas por macrófagos residentes ou por células do SFM do hospedeiro vertebrado. No interior dos fagolisossomos, as formas flageladas se diferenciam em amastigotas, que passam a se multiplicar por divisão binária, até que a célula hospedeira se rompa liberando as amastigotas, que serão fagocitadas por macrófagos adjacentes

dando continuidade ao ciclo no hospedeiro vertebrado (Mosser & Brittingham 1997, Kane & Mosser 2000).

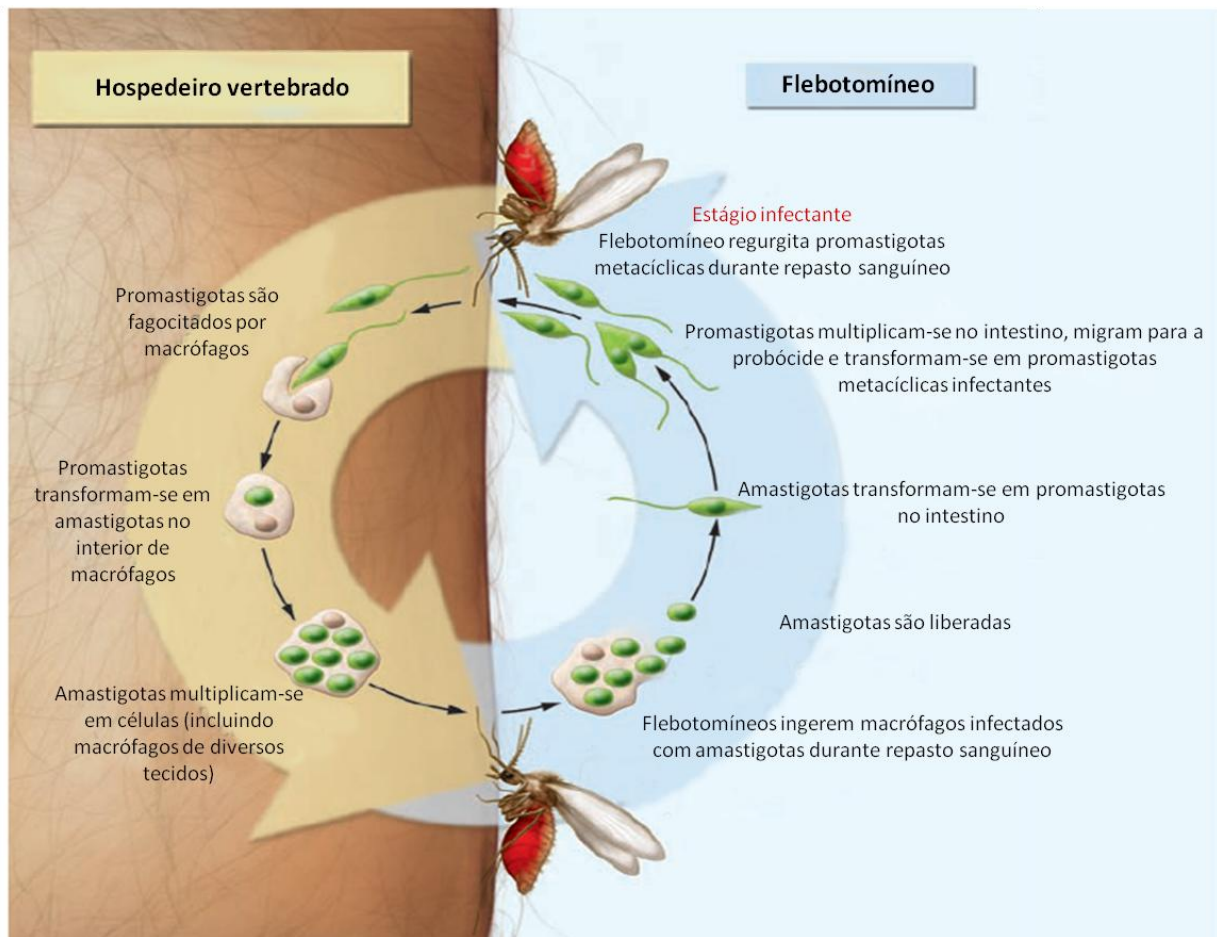


Figura 1. Esquema do ciclo de vida do gênero *Leishmania* nos seus hospedeiros vertebrados e invertebrados. FONTE: adaptado de (Stuart et al. 2008).

1.1.3 Aspectos gerais da epidemiologia e distribuição da leishmaniose visceral

Apesar do crescente esforço no combate da transmissão da LV no mundo, seja no âmbito da pesquisa ou pelos inúmeros programas de controles espalhados nos diferentes continentes, o calazar ainda é classificada como uma doença negligenciada, de acordo com recentes estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS) (WHO 2014).

A LV exibe uma ampla distribuição geográfica (**Figura 2**), sendo que até o presente momento ocorre em 65 países, onde 90% dos casos concentram-se em cinco Estados de baixo índice sócio-econômico, os quais são: Brasil, Bangladesh, Índia, Nepal e Sudão. As regiões rurais e suburbanas desses países representam os locais com maiores taxas de transmissão, afetando principalmente crianças e idosos (Alvar et al. 2012).

Estima-se que, anualmente, são registrados de 0,2 a 0,4 milhões de novos casos de LV, além de ocorrerem entre 20 mil e 40 mil mortes causadas pelas espécies de *Leishmania* viscerotrópicas em todo o mundo (WHO 2014). Em termos globais, o Brasil é o terceiro mais importante foco de LV, sendo também o detentor do maior número de novos casos relatados de calazar nas Américas, (Desjeux 2004a, b, Maia-Elkhoury et al. 2008, Alvar et al. 2012). No período de 1998 a 2010 o número médio anual de casos de LV no país foi de 3246, com uma taxa de incidência de aproximadamente 1,85 casos por 100.000 habitantes, e com uma tendência a aumentar, devido ao crescimento constante da população de cães infectados (Maia-Elkhoury et al. 2008, Alvar et al. 2012). Além disso, nos últimos anos, o número de mortes, bem como a taxa de letalidade relacionada à VL têm aumentado gradualmente: foram registradas 117 (3,4%) mortes no ano de 1994, subindo para 262 (7,2%) em 2006, representando um aumento na taxa de mortalidade de quase 124% (Ministério da Saúde 2010).

Casos de co-infecção de *Leishmania* (complexo *L. donovani*) e o vírus do HIV (Human Immunodeficiency Virus – Vírus da Imunodeficiência Humana) têm aumentado ao longo dos anos no Brasil. Em 2006, 2,5% dos casos de LV foram concomitantes com infecção por HIV (Maia-Elkhoury et al. 2007). Já em 2008, o percentual de casos de LV concomitante com HIV subiu para 4,2% (Sousa-Gomes et al. 2011).

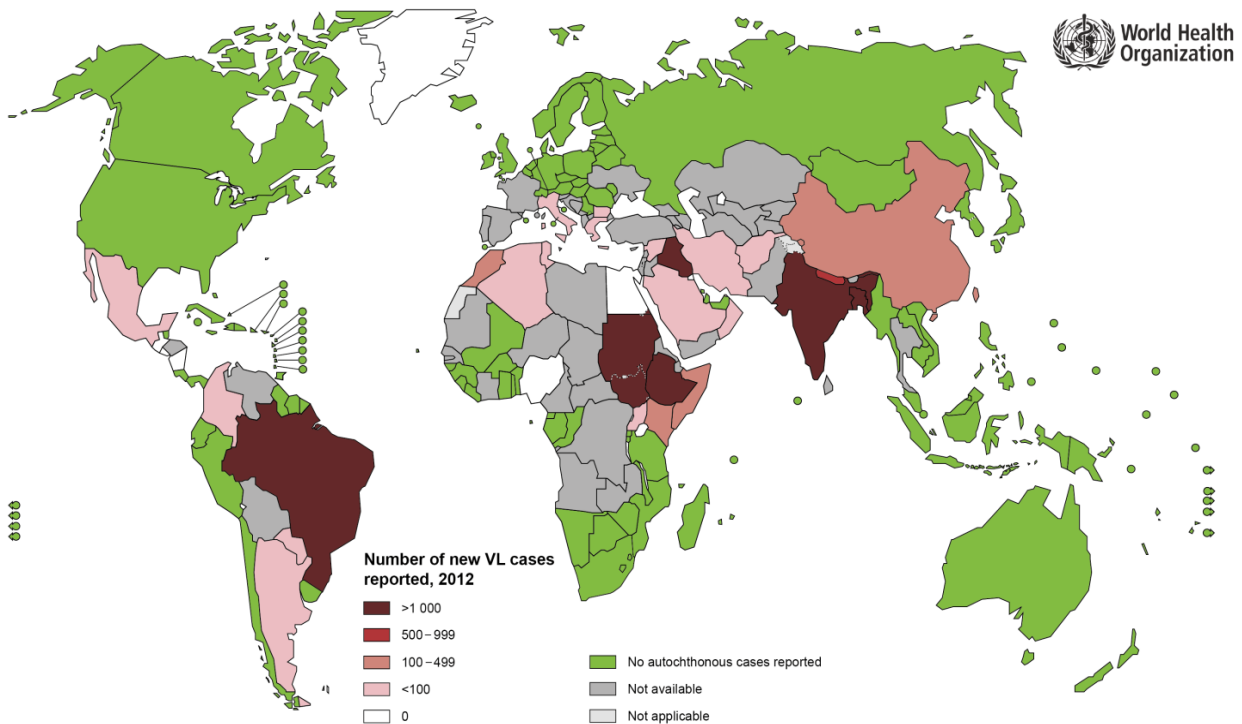


Figura 2. Estado de endemicidade da leishmaniose visceral no ano de 2012.

FONTE: WHO, 2013

(http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Leishmaniasis_VL_2013.png)

1.1.4 O controle da leishmaniose visceral

Diante do atual panorama epidemiológico da LV no mundo, da diversidade e da complexidade das relações biológicas entre os parasitos e os seus hospedeiros, nos diferentes ambientes, não resta dúvidas de que estabelecer um programa de controle em locais endêmicos se torna um verdadeiro desafio para as agências de saúde pública. A sugestão da WHO para a prevenção e combate da LV em áreas endêmicas é de que haja uma combinação de estratégias de intervenções direcionadas aos reservatórios e vetores (preferencialmente estágios adultos do flebotomíneo), em paralelo com um monitoramento ativo de infecção através de métodos sensíveis de diagnóstico clínico, parasitológico e sorológico (WHO 2010).

Atualmente, no Brasil, pelo fato da transmissão da LV ser de caráter zoonótico e dos reservatórios (cães) desempenharem um papel central da epidemiologia da doença no país, foram estabelecidas três frentes de combate fundamentais: eliminação de cães positivos, o combate às formas adultas do vetor e diagnóstico seguido de tratamento. Estudos anteriores já demonstraram que tais medidas podem reduzir drasticamente a transmissão, se mantidas por um longo período de tempo (Magalhaes et al. 1980, Desjeux 1996, Jeronimo et al. 2000, Palatnik-de-Sousa et al. 2001, França-Silva et al. 2003). Entretanto, recentemente, essa estratégia tem sido questionada. Apesar de esforços agressivos no controle da LVC centrados na eliminação de cães reativos aos testes de diagnóstico – que também têm sido questionados – e na aplicação de inseticidas, a incidência da LV humana continua em níveis altos e crescentes (Dantas-Torres & Brandão-Filho 2006). A esse dilema do controle da LVC, atribui-se o fato de que cerca de 80% dos cães infectados de áreas endêmicas exibem a forma assintomática da doença, os quais acabam atuando ativamente como fonte infecção e passando despercebidos pelos testes sorológicos vigentes (Reis et al. 2006, Dantas-Torres et al. 2006).

A falta de um teste diagnóstico sorológico confiável, sensível, rápido e simples representa um dos problemas centrais para o controle da LV (Ritmeijer et al. 2006, Akhoundi et al. 2010).

1.2 Diagnóstico da leishmaniose visceral

1.2.1 Diagnóstico clínico

Na LV humana os sintomas podem variar de paciente para paciente, dependendo de fatores relacionados à virulência do parasito e do estado imunológico do indivíduo. O diagnóstico clínico deve ser feito levando em consideração sinais como: febre e esplenomegalia, associado ou não à hepatomegalia e pancitopenia (Boelaert et al. 2004, Ministério da Saúde 2006). Em cães sintomáticos é possível observar alterações cutâneas, linfadenomegalia local ou generalizada, perda de peso, aumento do tamanho do baço e do fígado, onicogrifose e apatia (Maia & Campino 2008).

A diversidade de sinais clínicos da doença torna o diagnóstico clínico da LV bastante complexo. Além da ausência de sintomatologias patognomônicas, os sinais

clássicos da doença podem ser facilmente confundidos com outras parasitoses (Silva, F. S. 2007), dificultando o diagnóstico clínico.

1.2.2 Diagnóstico Parasitológico

Os métodos de diagnóstico parasitológicos de visualização dos parasitos por meio de microscopia apresentam os maiores índices de especificidade, alguns chegam a atingir bons níveis de sensibilidade e são considerados o padrão ouro para o diagnóstico da LV (Herwaldt 1999). Entretanto, os métodos convencionais baseiam-se em técnicas de investigações por microscopia de esfregaço de fragmentos ou punção de líquidos dos tecidos de tropismo típicos do parasito, como punção medular e esplênica (Ho et al. 1948, Siddig et al. 1988, Zijlstra et al. 1992, Babiker et al. 2007). Tais métodos são altamente invasivos e dolorosos, que exigem profundo conhecimento técnico para serem realizados (Kager & Rees 1983). Além disso, os resultados dos testes parasitológicos são demorados e a sensibilidade é dependente da carga parasitária, a qual depende da evolução da doença (Vilaplana et al. 2004, Reis et al. 2006).

1.2.3 Diagnóstico sorológico

Diferentes métodos empregados na detecção de anticorpos anti-*Leishmania* têm sido desenvolvidos (**Tabela I**), entretanto limitações como redução dos níveis de anticorpos após o tratamento (Kumar et al. 2001, Braz et al. 2002) e significativa proporção de indivíduos assintomáticos torna esta estratégia de controle um verdadeiro desafio (Schaefer et al. 1995).

O primeiro teste sorológico específico realizado para diagnosticar a LV foi a reação de fixação do complemento (RFC) e se tornou, a partir do final da década de 50, uma boa alternativa para os exames parasitológicos diretos, entretanto sua baixa sensibilidade e devido a reação cruzada com outras formas da leishmaniose o teste foi rapidamente substituído por ensaios de fluorescência que surgiram na década de 60 (Flemmings et al. 1984, Hockmeyer et al. 1984, Smith et al. 1984, Pappas et al. 1985).

A reação de imunofluorescência indireta (RIFI) começou a ser utilizada a partir da década de 60 e até recentemente era considerada como o método sorológico padrão ouro no diagnóstico da LV devido a sua alta sensibilidade (87-100%) e especificidade

(77-100%) (el Amin et al. 1986, Iqbal et al. 2002, Boelaert et al. 2004). Entretanto, aspectos como, demanda de equipamentos sofisticados e de elevada experiência técnica para a realização deste teste o tornam laborioso e caro, inviabilizando sua aplicabilidade em campo, bem como sua utilização em estudos de triagem em larga escala (Iqbal et al. 2002, Chappuis et al. 2007).

O ensaio imunoadsorvente ligado à enzima (ELISA) foi introduzido da década de 70 e atualmente é o teste sorológico mais utilizado para o diagnóstico da LV (Alves & Bevilacqua 2004). Este ensaio possui a vantagem de ser utilizado em testes de triagem em estudos epidemiológicos, devido à capacidade de processar várias amostras ao mesmo tempo, porém sua performance é muito influenciada pelo tipo de antígeno utilizado no teste (Maia & Campino 2008). A ELISA com antígenos brutos ou solúveis é a mais comumente realizada e apresenta sensibilidade variando entre 80% e 100%, enquanto que a especificidade pode variar de 84% a 95% (Rajasekariah et al. 2001a, Ryan et al. 2002). A especificidade da ELISA de antígenos brutos ou solúveis pode ser comprometida, pois estes testes podem apresentar reatividade cruzada com outros protozoários parasitos que possuem moléculas antigênicas semelhantes às de *L. infantum* (Choudhry et al. 1990, Oliveira et al. 2008, Romero et al. 2009, Zanette et al. 2014). O rK39 é predominantemente apontado pela literatura científica como o antígeno recombinante mais promissor para o diagnóstico sorológico da LV (Burns et al. 1993), apresentando excelente sensibilidade (93-100%) e especificidade (97-98%) em testes de ELISA realizados em vários países endêmicos para a LV (Qu et al. 1994, Singh et al. 1995, Badaró et al. 1996, Braz et al. 2002, Kurkjian et al. 2005, Costa et al. 2012). Entretanto, esse antígeno tem sido menos eficiente em algumas regiões, como por exemplo, no leste da África. De algum modo, pacientes residentes em áreas endêmicas do Sudão apresentam baixos títulos de anticorpos contra a rK39 quando comparados com pacientes indianos (Ritmeijer et al. 2006).

Testes sorológicos baseados em ensaios imunoenzimáticos (ELISA), imunofluorescência indireta (RIFI) ou western blot (ver **Tabela 1**) têm mostrado alta precisão para o diagnóstico da LV, entretanto estes testes revelam uma séria limitação por não serem adaptados ao campo (Ho et al. 1983, Iqbal et al. 2002). Como alternativa às limitações inerentes aos testes imunoenzimáticos apontadas anteriormente, o teste de aglutinação direta (DAT) é de fácil execução, baixo custo e pode ser utilizado em

campo (Harith et al. 1986, 1987). Vários estudos com o DAT em diferentes áreas endêmicas mostraram sensibilidade variando de 85% a 100% e especificidade de 91% a 100% (Oskam et al. 1999, Chappuis et al. 2006, Akhoundi et al. 2010). Este método apresenta limitações relacionadas ao tempo elevado de espera para se obter o resultado, além da dificuldade de padronização da concentração do antígeno a ser utilizado (Chappuis et al. 2006, 2007).

Outro método de sorodiagnóstico da LV de boa aplicação em campo é o teste imunocromatográfico da rK39 (TIC-rK39). Pela sua simplicidade, rápido resultado, alta reprodutibilidade e baixo custo, este teste é considerado a melhor ferramenta para diagnóstico da LV em estudos de triagem em campo (Chappuis et al. 2007), exibindo boa sensibilidade e especificidade (90-100% e 93-100%, respectivamente) (Sundar et al. 1998, 2002, Jelinek et al. 1999, Carvalho et al. 2003, Welch et al. 2008). Contudo, mais estudos para a validação do TIC da rK39 ainda são necessários.

Muitos estudos já demonstraram a presença de vários antígenos de *Leishmania* na urina de pacientes com LV (Abeijon et al. 2012, Abeijon & Campos-Neto 2013). O teste de aglutinação do látex (KAtex) é relativamente simples e recomenda-se seu uso para pacientes imunocomprometidos, entretanto casos de pacientes com baixa concentração de antígeno na urina impede a sua distinção com pacientes negativos, comprometendo a sensibilidade do teste (Attar et al. 2001, Sarkari et al. 2002, Rijal et al. 2004).

Apesar do contínuo desenvolvimento de variados testes de imunodiagnóstico da LV ao longo das últimas décadas, limitações intrínsecas de cada técnica resulta em um diagnóstico impreciso, tornando também imprecisos os dados epidemiológicos resultantes de estudos feitos com estas mesmas técnicas. Este tipo de problema reforça ainda mais importância do esforço científico para o desenvolvimento de tecnologias e testes mais confiáveis para o diagnóstico da LV.

Tabela I: Detecções sorológicas e antigênicas comumente utilizadas para o diagnóstico da LV

Ensaio ou Método	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	Vantagens	Desvantagens	Referências	
Detecção de anticorpo	RIFI	87-100	77-100	Detectável nos estágios iniciais da infecção e não detectável de 6-9 meses após cura clínica	Requer laboratórios sofisticados. Nenhuma aplicação no campo	(Badaró et al. 1983, Iqbal et al. 2002, Boelaert et al. 2004)
	ELISA	52-98	50-100	Pode ser usado em triagens em larga escala de estudos epidemiológicos	A sensibilidade e especificidade são muito influenciadas pelo antígeno utilizado. Requer pessoal qualificado, equipamentos sofisticados e eletricidade	(Rajasekariah et al. 2001b, Ryan et al. 2002, Menezes-Souza et al. 2014b)
	CSA como Ag.	80-100	84-95	Alta sensibilidade	Reatividade cruzada relativamente alta, reduzindo a especificidade do teste	(Rajasekariah et al. 2001b, Ryan et al. 2002)
	rK39 como Ag.	75-98	79-89			(Burns et al. 1993, Badaró et al. 1996, Abass et al. 2013)
	Western Blot	90-98	98-100	Fornecer respostas de anticorpos detalhadas para vários antígenos de <i>Leishmania</i>	Demorado, tecnicamente complicado e dispendioso	(Mary et al. 1992, Santos-Gomes et al. 2000, Brito et al. 2000, Ravindran et al. 2004, Cota et al. 2012)
	DAT	85-100	91-100	Teste rápido, aplicável em campo	Limitações para uso em regiões de endemicidade. Tempo de incubação longo. Indisponibilidade de fonte comercial do antígeno e fragilidade	(Oskam et al. 1999, Chappuis et al. 2006, Akhoundi et al. 2010)
	TIC com rK39	90-100	93-100	Baixo custo, rápido, simples e pode ser realizada por uma pessoa não treinada	Não detecta assintomáticos com baixa titulação	(Sundar et al. 1998, 2002, Jelinek et al. 1999, Carvalho et al. 2003, Welch et al. 2008)
Detecção de antígeno	KAtex	79-100	60-100	Simples, fácil realização e útil para diagnóstico de pacientes imunocomprometidos	Difícil distinguir resultado fracamente positivo de resultados negativos; a urina deve ser fervida para eliminar fatores aglutinantes evitando reações falso-positivo	(Attar et al. 2001, Sarkari et al. 2002, Rijal et al. 2004)

Abreviaturas: (RIFI) reação de imunofluorescência; (CSA) “crude soluble antigen” - antígeno bruto solúvel; (DAT) “direct agglutination test” – teste de aglutinação direta; (TIC) teste de imunocromatografia.

FONTE: adaptado de (Elmahallawy et al. 2014).

1.2.4 Kinesinas de *Leishmania*

As kinesinas pertencem a uma superfamília de proteínas motoras que estão presentes em todos os eucariontes e desempenham um papel importante na regulação dos processos de mitose e controle de comprimento do flagelo das espécies de *Leishmania* (Dubessay et al. 2006, Blaineau et al. 2007). Em 1993, Burns e colaboradores caracterizaram um antígeno relacionado à molécula de kinesina (locus tag: Linj.14.1180) de *L. infantum* (LiKin). De modo geral, a LiKin compõe a maquinaria de proteínas responsáveis pela movimentação do flagelo, movimentação dos cromossomos durante a fase de divisão celular e locomoção de vesículas citoplasmáticas (Burns et al. 1993). Em sua estrutura molecular primária, a LiKin possui uma série de repetições de 39 aminoácidos denominado K39 (Burns et al. 1993).

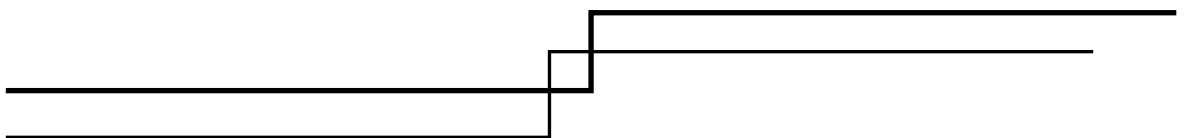
A importante relação das kinesinas de *Leishmania* com o diagnóstico sorológico deve-se à presença de longas regiões repetitivas na sua sequência proteica. Esta região de repetição que se estende por grande parte da extensão da proteína apresenta blocos ou motivos de repetição de 39 aminoácidos. Os motivos repetitivos, aparentemente, estão associados com a elevada antigenicidade de proteínas recombinantes derivadas de kinesinas (Burns et al. 1993, Bhatia et al. 1999, Sivakumar et al. 2006, Abass et al. 2013). Neste sentido, propomos a seguinte hipótese:

“O aumento da proporção de motivos repetitivos na proteína recombinante derivada de kinesina, resultará no aumento da performance dos testes de reconhecimento sorológico”

Vários antígenos recombinantes derivados de kinesina de *Leishmanias* do complexo *Leishmania donovani* já foram descritos. Dentre eles destacam-se as proteínas derivadas de kinesina de *L. infantum*: rK39, rK9 e rK26 que apresentaram um bom desempenho em diferentes estudos, revelando seu alto potencial para o diagnóstico da LV (Burns et al. 1993, Bhatia et al. 1999, Kurkjian et al. 2005, Farajnia et al. 2008, Mohapatra et al. 2010). Antígenos recombinantes baseados na kinesina de *L. donovani* também foram desenvolvidos e caracterizados, tais como: rKRP42, rKE16 e rKLO8 (Sivakumar et al. 2006, Takagi et al. 2007, Abass et al. 2013). A rKE16 alcançou sensibilidade e especificidade de 100% no diagnóstico da LV no Velho Mundo, além disso esse antígeno revelou excelente performance para o diagnóstico da leishmaniose dérmica Pós-Kalazar (Sivakumar et al. 2006). Contudo, mesmo antígenos com boa

performance como rK39 e rKE16 ainda apresentam baixo desempenho no Brasil e Leste Africano (Cunningham et al. 2012), elevando ainda mais a necessidade de desenvolvimento de novos antígenos recombinantes e mais eficientes baseados em kinesina.

2. JUSTIFICATIVA

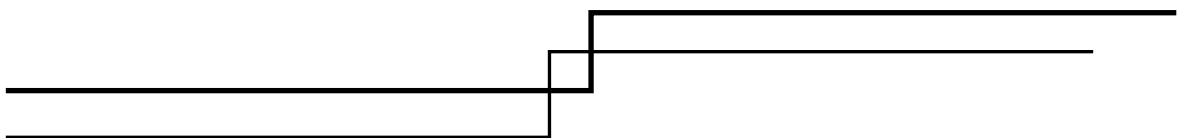


Afetando anualmente aproximadamente 300.000 de pessoas no mundo, a leishmaniose visceral é reconhecida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como uma das principais e mais graves doenças parasitárias (WHO 2014). O número de pessoas expostas ao risco de infecção em seis países, que notificaram mais de 90% dos casos de LV em todo o mundo, incluindo o Brasil, chegaria a 310 milhões (WHO, 2014).

Dados epidemiológicos recentes identificaram lacunas no conhecimento sobre o impacto e incidência da LV na maioria dos países endêmicos, chamando a atenção para a necessidade de desenvolvimento de um robusto sistema de vigilância nesses locais (Alvar et al. 2012, WHO 2013). Para que o sistema de vigilância tenha impacto significativo no controle da LV é necessário que haja métodos de diagnóstico rápidos, com boa reprodutibilidade e com ótima acurácia. Por esse motivo, o desenvolvimento de novos testes sorológicos mais confiáveis, utilizando novos antígenos que aumentem a performance dos testes, é crucial para o controle da transmissão da leishmaniose visceral (LV) (Boelaert et al. 2000, van Griensven & Diro 2012).

Diante disso, neste trabalho, propomos a expressão heteróloga de um novo antígeno recombinante baseado na porção repetitiva da kinesina de *L.infantum*, visando, sobretudo a construção de um antígeno recombinante constituído exclusivamente de motivos repetitivos de kinesina denominado rKDDR (Kinesin Degenerated Derived Repeat) para uso em testes de sorodiagnóstico para a leishmaniose visceral.

3. OBJETIVOS



3.1. Objetivo Geral

Avaliar o potencial antigênico da proteína recombinante rKDDR e sua aplicação em testes de reconhecimento sorológico para o diagnóstico da leishmaniose visceral.

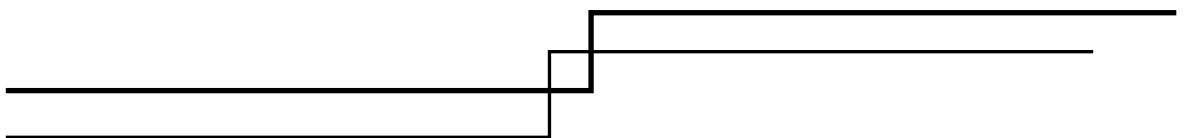
3.2. Objetivos Específicos

3.2.1. Predizer por ferramentas de bioinformática o potencial antigênico da KDDR;

3.2.2. Realizar a expressão heteróloga da proteína rKDDR;

3.2.3. Realizar testes de ELISA comparativos para determinar a performance diagnóstica da rKDDR em relação à antígenos já caracterizados para o diagnóstico da leishmaniose visceral.

4. METODOLOGIA



4.1. Parasitos

4.1.1 Cultivo de *L. infantum*

Os parasitos da espécie *L. infantum* (MHOM/BR/1972/BH46) foram inicialmente isolados a partir de um fragmento do baço de hamsters da espécie *Mesocricetus auratus*, experimentalmente infectados com 10^7 promastigotas deste parasito. As amostras dos baços foram inoculadas em meio de cultura Schneider's Insect Medium (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab, Brasil). Com a finalidade de evitar contaminação com fungos e bactérias, foram adicionados aos meios de cultura 100U/mL penicilina e 100µg/mL de estreptomicina (Gibco® Life technologies, EUA). As culturas foram mantidas em estufa biológica BOD (Tecnal TE-371, Brasil) à temperatura de $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Para o crescimento adequado dos parasitos, as garrafas de culturas foram homogeneizadas constantemente por um agitador (Elmeco, EUA) presente no interior da BOD. Após dez dias de expansão populacional das promastigotas, os parasitos foram distribuídos em alíquotas para criopreservação em nitrogênio líquido em uma solução PBS - Phosphate Buffered Saline [NaCl 153 mM (Synth, Brasil); Na_2HPO_4 7,6 mM (Nuclear, Brasil); NaHPO_4 2,7 mM (Nuclear, Brasil); pH = 7,4] contendo 1% de Glicose (Vetec, Brasil) e 16% de Glicerol (Synth, Brasil) para serem utilizadas em futuros experimentos deste estudo.

4.2. Predição de epítomos lineares de células B e de desordem estrutural

Para avaliar o potencial antigênico da rKDDR, a sequência completa do gene da kinesina (TritypDB ID: Linj.14.1180) de *L. infantum* foi submetida à predição de epítomos lineares de células B, utilizando o programa BepiPred 1.0 com um *cut-off* de 1,3 (Larsen et al. 2006). Para a determinação do grau de desordem da região da KDDR foi utilizado o programa IUPred, *cut-off* de 0,5 (Dosztányi et al. 2005).

4.3. Expressão heteróloga da porção repetitiva da kinesina de *L. infantum*

4.3.1. Obtenção de DNA genômico de *L. infantum* purificado

Para extração de DNA genômico foi utilizado o kit GFX™ Genomic Blood DNA Purification (GE Healthcare, EUA) seguindo o protocolo do fabricante. Foi utilizado em cada extração 10^8 promastigotas de *L. infantum*. As formas promastigotas foram submetidas à centrifugação a 2.000g (Eppendorf centrifuge 5804 R, Alemanha) a 4°C por 10 minutos. Após essa centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado duas vezes com 10 mL de solução salina PBS com centrifugações de 2.000g a 4°C por 10 minutos. A 300 µL de cada amostra, foi adicionado 20 µL de proteinase K (Bioline, Reino Unido) e 400 µL do tampão de lise do kit GFX™ Genomic Blood DNA Purification, seguido de agitação em vórtex por 15 segundos e incubação por 10 minutos em temperatura ambiente. O DNA genômico foi separado da mistura inicial por sua afinidade a uma coluna de sílica. A coluna com o DNA ligado foi lavada 3 vezes com tampão de lavagem. O DNA extraído foi eluído da coluna de sílica com 50 µL água milliQ autoclavada previamente aquecida a 37°C e quantificado no espectrofotômetro NanoDrop® Spectrophotometer ND-1000 (Thermo Scientific, EUA).

4.3.2. Desenho de iniciadores que flanqueiam a região repetitiva da kinesina de *L. infantum* (TritypDB ID: Linj.14.1180) para a obtenção de amplicons utilizados na expressão heteróloga

Iniciadores (primers) específicos para a região repetitiva da kinesina foram desenhados e validados por meio da amplificação *in silico* e por PCR convencional. Para permitir que o primer reverso se anele especificamente dentro da porção repetitiva, sem que ocorra sucessivos anelamentos inespecíficos foi necessário encontrar um nucleotídeo degenerado entre as sequências repetitivas (**Figura 3-A**). Com o auxílio da ferramenta *Clustal O* (1.2.1) Multiple Sequence Alignment (Sievers & Higgins 2014), foi feito o alinhamento múltiplo dos 9 primeiros blocos das sequências de nucleotídeos que codificam os motivos repetitivos de 39 aminoácidos no gene da kinesina, possibilitando a identificação de um nucleotídeo (Timina) degenerado (**Figura 3-B**).

Com isso, o primer reverso pode ser desenhado de modo a anelar em função do nucleotídeo T degenerado (**Figura 3-B**). Os primers utilizados foram:

Forward, 5' **GCTAGC**CGTGAAAGCGCCTGC 3' e

Reverse, 5' **CTCGAG****TC**AGGCCTCCAGCTGA 3'.

À extremidade 5' de cada primer foram adicionados sítios de restrição (em negrito e sublinhados: *NheI* and *XhoI*, respectivamente) para facilitar a transferência dos amplicons entre os vetores de clonagem pGEM[®]-T (Promega, EUA) e de expressão pET28a-TEV (CeBiME, Campinas/SP). Imediatamente após o sítio de restrição do iniciador reverso (destacado em vermelho), foi também adicionado o códon de terminação gênica (stop codon). O tamanho esperado do amplicon gerado por esses primers em PCR seria de 1086 pb.

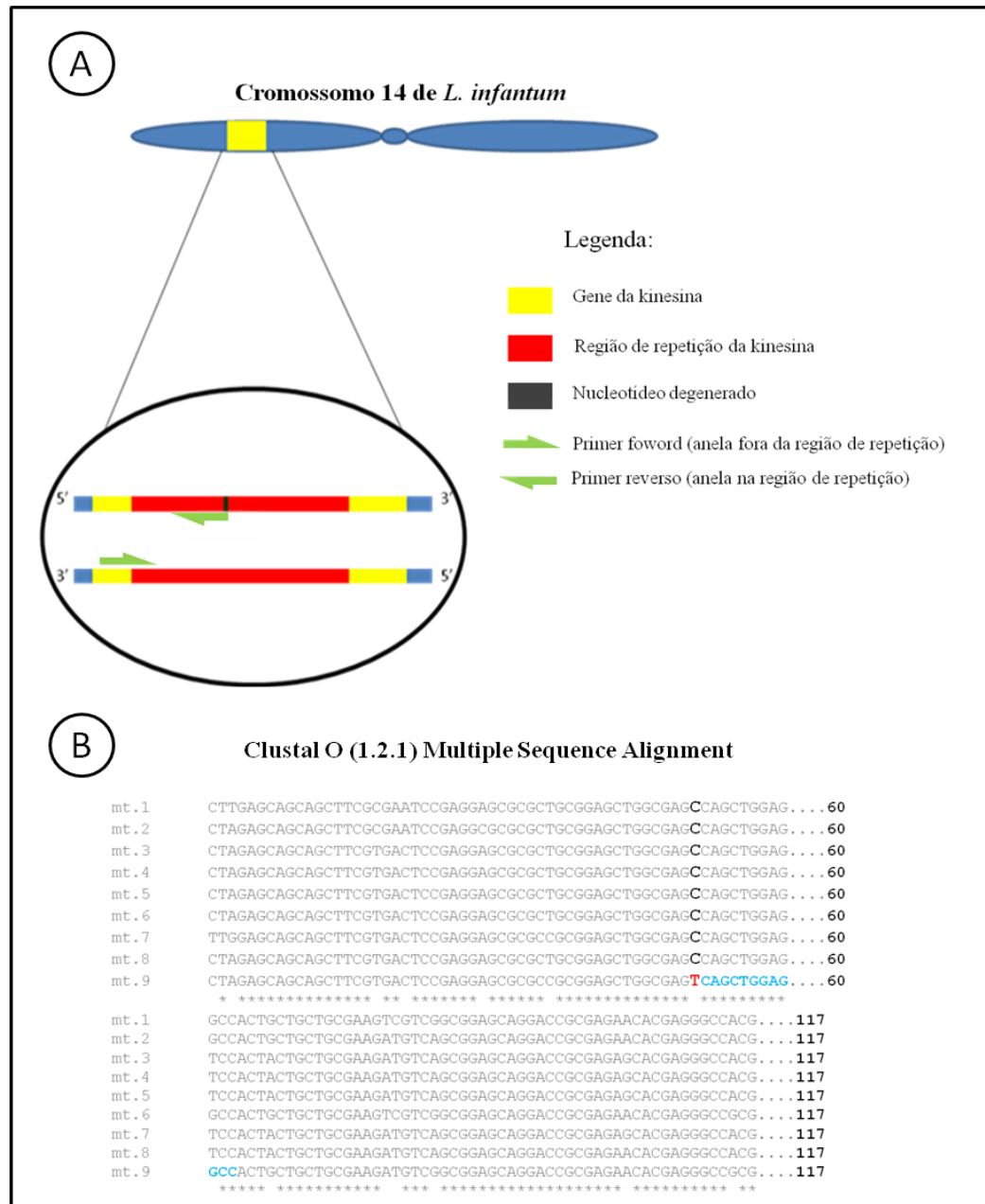


Figura 3. Desenho esquemático do cromossomo 14 de *L. infantum* e alinhamento múltiplo. A: O cromossomo 14 de *L. infantum* contém o gene que codifica a proteína kinesina que possui uma extensa região de repetição. **B:** alinhamento múltiplo dos 9 primeiros motivos repetitivos (117 pb) do gene da kinesina (TritypDB ID: Linj.14.1180). **T**, timina degenerada; destacados em azul, nucleotídeos que foram utilizados como molde para o desenho do primer reverso (sequência complementar-reversa de: 5' **TCAGCTGGAGGCC** 3').

4.3.3. Amplificações por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)

As amplificações por PCR foram realizadas utilizando como molde 100ng de DNA genômico de formas promastigotas de *L. infantum* (MHOM/BR/1972/BH46), com o tampão Green GoTaq®Reaction Buffer (Promega, Barsil) 1x; 200µM de dNTP (Promega, Brasil); 10ng de cada um dos iniciadores *forward* e *reverse*; e 1,25U de Tap DNA Polimerase (Phoneutria Biotecnologia e Serviços Ltda, Brasil), em um volume final de 50 µL de reação.

4.3.4. Análise do padrão de amplificação em gel de agarose

Os amplicons (~1100 pb) obtidos nas PCRs foram submetidos à separação em gel de agarose (Agargen, Brasil) 1% a 120v em tampão TAE 1X (4,8 g/L Tris-base pH = 8,0; 1,14 mL ácido acético glacial; 2 mL EDTA 0,5M), contendo 0,3 µg/µL de brometo de etídio (Bio-Rad, Brasil). Foi utilizado padrão de peso molecular de 1kb (Promega, EUA).

4.3.5. Purificação das bandas de tamanho esperado do gel de agarose

Após a separação em gel de agarose, as bandas de tamanho esperado foram excisadas utilizando lâmina de bisturi. O DNA obtido foi submetido ao protocolo do QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen, EUA) para obtenção do DNA purificado.

4.3.6 Ligação dos amplicons purificados ao vetor de clonagem pGEM®-T

Os amplicons purificados foram clonados no vetor pGEM®-T (Promega, EUA), após incubação por 16 horas a 4°C com a enzima T4-ligase, seguindo as instruções do fabricante (Promega, EUA). Devido à presença do gene de resistência a ampicilina no vetor, esse antibiótico foi utilizado para seleção de transformantes positivos.

4.3.7 Transformação de bactérias por eletroporação

Cerca de 20 µL dos sistemas de ligação foram incubados por 5 minutos no gelo com 50 µL de bactérias *Escherichia coli* das cepas eletrocompetentes XL1-Blue (Phoneutria, Brasil), ou BL-21Star. Após este período, as amostras foram transferidas para Micro Pulser Cuvettes (Bio-Rad, EUA) de 0,1 cm e submetidas a um pulso (2,50kV) em um eletroporador MicroPulser (Bio-Rad, EUA). Após a eletroporação, foram adicionados 300 µL do meio de cultura 2xYT líquido (Tryptona 16 g/L; Extrato de Levedura 10 g/L; NaCl 5 g/L), seguido por incubação durante uma hora a 37°C em agitação (Maxq 400, Thermo Scientific, EUA) a 180 rpm (rotações por minuto). Após este período, as amostras foram plaqueadas em meio sólido 2xYT-ágar a 1,5% com ampicilina (SEM, Brasil) a 100 µg/mL caso o vetor utilizado tenha sido o pGEM[®]-T ou kanamicina (Sigma-Aldrich, EUA) a 50µg/mL no caso do vetor pET28a-TEV. As placas foram colocadas em estufa (Nova Ética, Brasil) à 37°C durante 12-16 horas, para obtenção de colônias isoladas.

4.3.8. Extração e purificação dos plasmídeos recombinantes

Os clones positivos obtidos foram inoculados em 3-4 mL de meio 2xYT, contendo o antibiótico específico para cada vetor, e cultivados durante 12-16 horas à 37°C sob agitação (Maxq 400, Thermo Scientific, EUA) de 180 rpm. A extração dos plasmídeos foi realizada utilizando o kit QIAprep[®]Spin Miniprep Kit (Qiagen).

4.3.9. Digestão dos vetores com enzimas de restrição

Para aumentar a eficiência das enzimas de restrição as digestões foram divididas em duas etapas. Primeiramente, os plasmídeos pGEM[®]-T contendo os insertos, assim como o vetor de expressão pET28a-TEV, foram digeridos com NheI (Promega, EUA) durante 16 horas à 37°C. Após a digestão, as amostras foram submetidas à separação eletroforética em gel agarose e purificação, como previamente descrito no item 4.3.4. O produto da purificação foi então submetido à digestão por XhoI (Promega, EUA), repetindo os mesmos procedimentos da digestão anterior.

4.3.10. Ligação ao vetor de expressão pET28a-TEV

O vetor de expressão pET28a-TEV, produzido no centro de Biologia Molecular e Estrutural (CeBiME, Campinas/SP), possui o gene de resistência à kanamicina para seleção positiva dos transformantes. A ligação entre os insertos obtidos do pGEM[®]-T por digestão enzimática e o vetor pET28a-TEV, também previamente digerido com as mesmas enzimas de restrição, foi realizada nas suas extremidades coesivas, por incubação a 4°C durante 16 horas com a enzima T4 Ligase (Promega) em tampão específico (Tris-HCl 30mM, MgCl₂ 10mM, DTT 10mM, ATP 10mM, pH = 7.8). Após a incubação, o produto de ligação foi utilizado na transformação de bactérias *E. coli* BL-21Star por eletroporação.

4.3.11. Sequenciamento da montagem pET28a-TEV/KDDR

O sequenciamento dos clones positivos foi realizado pela empresa Macrogen (Seul, Coréia do Sul) em sequenciador automático ABI Prism[®]3730xl DNA Analyser (AppliedBiosystems), utilizando os primers T7 *forward* e *reverse* para o vetor pET28a-TEV. As sequências obtidas foram processadas pelo pacote PhredPhrapConsed (Ewing et al. 1998, Ewing & Green 1998), para retirada de sequências de baixa qualidade, sequências do vetor e formação de contigs. Após o processamento, as sequências foram submetidas à pesquisa de homologia usando o programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul et al. 1990) contra o banco de dados “Nucleotide collection (nr/nt)” do NCBI (National Center for Biotechnology Information) e contra todos os bancos de genoma do Tritypdb DB, para confirmação da identidade dos genes clonados. Para avaliar o grau de identidade entre a proteína recombinante predita e a sequência protéica da kinesina (Tritypdb ID: Linj.14.1180), foi feito o alinhamento global utilizando o programa *Clustal O* (1.2.1) Multiple Sequence Alignment (Sievers & Higgins 2014).

4.3.12. Indução da expressão das proteínas recombinantes

Colônias isoladas de *E. coli* BL-21Star contendo o plasmídeo pET28a-TEV/KDDR, foram inoculadas em 3 mL de meio 2xYT líquido contendo kanamicina (50 µg/mL) e incubadas a 37°C por 14 horas sob agitação de 180 rpm. Após este período, os inóculos foram diluídos na proporção de 1:20 em 10 mL de meio 2xYT contendo kanamicina (50µg/mL) e incubados a 37°C a 180 rpm até atingirem DO600 (Densidade óptica) entre 0,6 e 0,8. A expressão das proteínas recombinantes foi induzida pela adição de isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a 1mM (Invitrogen, Brasil), sendo a cultura, então, incubada por 3 horas a 37°C a 180rpm. Após as 3 horas de indução, a cultura foi centrifugada a 2.000 g, por 25 minutos a 4°C em centrífuga Eppendorf 5804R, congelada em nitrogênio líquido e armazenada a -80°C. Alíquotas da cultura que foram separadas imediatamente antes da adição de IPTG e após 3 horas de expressão foram também congeladas.

4.3.13. Teste de solubilidade

Os sedimentos celulares mantidos a -80°C serão descongelados e ressuspensos em 5 mL de PBS para cada 50 mL de cultura, na presença de Lisozima (Sigma, EUA) a 100 µg/mL, sendo, então, homogeneizados e deixados em repouso por 15 minutos. Após o repouso, as alíquotas foram submetidas a 5 ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho-maria à 37°C e passadas exaustivamente em seringas de insulina (1mL/U100, 26G ½”, 0,45x13mm – TKL, China) para fragmentação do DNA genômico. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 11.000 g a 4°C, para separação das frações solúvel (sobrenadante) e insolúvel (sedimento). Amostras destas duas frações foram analisadas em gel de poliacrilamida-SDS (vide item 4.3.14) para avaliar em qual fração se encontra a proteína recombinante.

4.3.14. Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE)

As amostras obtidas nos testes de expressão, solubilidade e frações das purificações foram submetidas à separação por eletroforese em gel de poliacrilamida, utilizando Bis-acrilamida (Gibco BRL Ultra Pure, EUA) 40%. O gel de separação a 12% foi preparado utilizando Tris-HCl 1,5M pH8,8 e SDS 0,01%; persulfato de amônio 0,5 v/v e TEMED (Promega, EUA) 0,05 v/v. O gel de concentração foi preparado de modo semelhante ao de separação, mas utilizando o tampão Tris-HCl 1,5M pH6,8.

Às amostras obtidas da indução e teste de solubilidade foi adicionado o tampão de amostra (SDS 10%; Tris-HCl 0,5 mM pH 6,8; azul de Bromofenol 1%; 2- β -mercaptoetanol 5%; glicerol 10%). As amostras foram fervidas durante 5 minutos para desnaturação das proteínas e aplicadas no gel para separação eletroforética. A eletroforese foi realizada em tampão de corrida (Tris-HCl 25mM; glicina 192 mM; SDS 0,1%, pH = 8,3) à voltagem constante de 200 V. Após a corrida, os géis foram corados por incubação por 2-16 horas com a solução de Coomassie Blue (Coomassie Brilliant Blue G-250 0,25%; metanol 50%; ácido acético 10%), e então, descorados em solução etanol 30% e ácido acético 10%.

4.3.15. Purificação de proteínas recombinantes por cromatografia de afinidade

Após a realização do procedimento da seção **4.3.13** (Teste de solubilidade) e uma vez definido em qual fração (solúvel ou insolúvel) se encontra a proteína, o extrato proteico foi aplicado em uma coluna HisTrap HP de 1 mL (GE Healthcare Life Sciences, EUA) conectada a um HPLC (High Performance/Pressure Liquid Chromatography – AktaPrime Plus, GE). A coluna foi primeiramente lavada utilizando 5 volumes de coluna com o tampão A (fosfato de sódio 20mM; NaCl 500mM; imidazol 30mM). A eluição foi realizada através da adição do tampão B (fosfato de sódio 20mM; NaCl 500mM; imidazol 500mM). Todas as frações obtidas que compreenderem toda a extensão do pico de absorbância observado durante a eluição foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS.

4.4. Ensaios de reconhecimento sorológico

4.4.1 Soros de cães

O painel de soros caninos consistiu de 206 amostras, das quais 96 provenientes de cães naturalmente infectados com *L. infantum* (grupo LVC). As amostras de soros caninos infectados com *Leishmania* (n = 96) foram obtidas de áreas endêmicas para LVC no Estado de Minas Gerais, no sudeste do Brasil. O principal critério de inclusão para amostras de soro LVC utilizados neste estudo foi a positividade parasitológica para a espécie *L. infantum*, confirmada por análise microscópica de aspirados de medula óssea. Cães machos e fêmeas residentes em área não endêmica para leishmaniose visceral e com resultados negativos para *Leishmania* em esfregaços de tecido (medula óssea) foram considerados não-infectados e, portanto, foram utilizados como controle negativo CN (n = 81). As amostras de cães experimentalmente infectados com *Trypanosoma cruzi* (Tc, n = 15) e naturalmente infectados com *Babesia* sp. (n = 15) foram incluídas para avaliar possível reatividade cruzada.

4.4.2 Soros humanos

Todas as amostras foram obtidas a partir do banco de soros do Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasito, ICB/UFMG e do Hospital Universitário de Montes Cloros (Minas Gerais, Brasil). O painel de soros humanos consistiu de um total de 132 amostras que foram divididas em 3 grupos: 84 amostras de pacientes com LV (LVH), 17 amostras de pacientes em infecção crônica com *T. cruzi* (Tc) para avaliação de reatividade cruzada e 31 amostras de humanos negativos que foram utilizados com controle negativo (CN) neste estudo.

A infecção natural por *L. infantum* do grupo LVH (n = 84) foi confirmada através da análise de microscopia óptica de aspirado da medula óssea desses pacientes, seguido por detecção de *Leishmania* através da amplificação por PCR em tempo real de kDNA específico (de Bruijn & Barker 1992). Todos os indivíduos não apresentaram infecção concomitante com *T. cruzi*. As informações das avaliações clínicas, bem como os resultados de pPCR foram obtidos a partir do prontuário médico dos pacientes. A

infecção natural por *T. cruzi* do grupo Tc (n = 17) foi confirmada por hemocultura ou por associação com os testes do Kit ELISA recombinante v.3.0 Chagatest[®] (Wiener Lab, Argentina) e Teste de Hemaglutinação Indireta (HAI) Chagatest[®] (Wiener Lab).

4.4.3 Aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa e Experimentação Animal

O presente estudo foi inicialmente submetido e aprovado pelos Comitês de Ética em Experimentação Animal - CETEA (CEUA/UFMG, Protocolo 44/2012) e de Ética em Pesquisa – COEP (CAAE –00842112.2.0000.5149) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para pesquisas envolvendo humanos também foi submetido e aprovado pelo COEP/UFMG.

4.5 Teste de ELISA

Os ensaios de ELISA foram realizados utilizando como antígenos a proteína rKDDR e a proteína rK39. O teste de ELISA do kit EIE-LVC (FIOCRUZ-Bio-Manguinhos[®], Brasil) também foi utilizado neste estudo segundo as instruções do próprio manual do kit (**Anexo II**). Placas de ELISA de 96 wells (Costar[®], EUA) foram sensibilizadas por 16 horas (overnight) a 4°C com 50ng de antígeno recombinante diluído em 100 µL de tampão carbonato [Na₂CO₃ 15 mM (Synth, Brasil); NaHCO₃ 34 mM (Merck, Brasil); pH ajustado em 9,6]. Após a sensibilização, as placas foram bloqueadas com 150 µL de PBS-Caseína (Merck, Alemanha) a 2%, pH = 7,4, durante 2 horas à temperatura ambiente. Após o bloqueio das placas, 100 µL dos soros humanos ou de cães diluídos na proporção de 1:100 em PBS-Tween20 a 0,05% (pH = 7,4) foram adicionados aos poços e incubados por 12-16 horas (overnight) a 4°C. Em sequência, as placas foram lavadas 5 vezes com a solução de lavagem (PBS- Tween20 a 0,05%). 100 µL do anticorpo anti-IgG canino ou humano conjugados com a enzima peroxidase (Sigma-Aldrich, USA), em diluição na proporção de 1:5000 (em PBS-Tween20 a 0,05%), foram adicionados em todos os poços e as placas foram então incubadas a 37°C por 1 hora e 30 minutos. As placas foram novamente lavadas 5 vezes com a solução de lavagem (PBS-Tween20 a 0,05%), e em seguida foram adicionados 100 µL

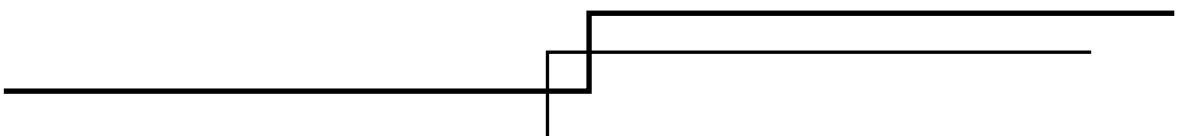
da solução reveladora (ácido cítrico 0,1 M; Na₂PO₄ 0,2 M; OPD 0,05% e H₂O₂ 0,1%) aos poços. As placas foram então incubadas a 37°C, ao abrigo de luz, por 10 minutos, quando a reação foi interrompida pela adição de 50 µL de 4N H₂SO₄ diluído em água MilliQ. A absorbância resultante da reação foi mensurada em leitor de microplacas de ELISA a 492 nm.

4.6 Análise estatística

Para a análise estatística dos dados gerados neste trabalho foi utilizado o *software* GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Inc, EUA) e o programa Microsoft Excel 2010 para o processamento e organização dos dados de absorbância gerados pelas ELISAs. Todas as amostras de soros deste trabalho foram testadas em duplicata nas placas de ELISA.

A curva ROC (Receiver Operating Characteristic) foi utilizada para estabelecer o limite inferior de positividade (*cut-off*) para a rKDDR, rK39 e kit EIE-LVC (FIOCRUZ-Bio-Manguinhos[®], Brasil) e para determinar o maior valor combinado de sensibilidade, especificidade e área sob a curva. Conforme descrito previamente (Linnet et al. 2012), o desempenho de cada teste foi avaliado de acordo com a sensibilidade (Se), especificidade (Es), o valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN), a área sob a curva (AUC) e acurácia (AC). O grau de concordância entres os testes de ELISA e exame parasitológico (biópsia, aspirado ou PCR) foi determinado pelo índice Kappa (k) interpretados de acordo com a seguinte escala de Fleiss : 0,00-0,20, pobres; 0,21-0,40, justo; 0,41-0,60, moderada; 0,61-0,80, bom; 0,81-0,99, muito bom e 1,00, perfeito (Fleiss et al. 1972).

5. RESULTADOS



5.1. Predição de epitopos lineares de células B e predição de desordem estrutural da kinesina de *L. infantum*

Neste estudo, utilizando a ferramenta BepiPred 1.0, realizamos a predição dos epitopos lineares de linfócitos B presentes na kinesina com o intuito de avaliar o potencial antigênico da rKDDR. Além disso, determinamos o grau de desordem estrutural ao longo da molécula da kinesina através da ferramenta IUPred, afim de verificar a provável linearidade dos epitopos preditos, uma vez que o aumento da desordem estrutural significa aumento de linearidade da proteína.

Os resultados das predições foram representados na **Figura 4** e indicam uma grande quantidade de epitopos lineares de células B localizados na região repetitiva da kinesina. Por outro lado, não foram identificados epitopos lineares de célula B na região não repetitiva da kinesina.

Com relação à entropia da kinesina, foi possível observar um alto valor de desordem (IUPred) na região repetitiva, sugerindo um maior grau de linearização estrutural da kinesina nessa região. Interessantemente, é também nessa mesma região que foram encontrados os maiores valores de score de predição de antigenicidade, com picos coincidindo com a localização dos epitopos preditos (ver gráfico de antigenicidade da **Figura 4**). Observando a localização dos blocos de repetição (seta negra segmentada, **Figura 4**), foi possível identificar uma sobreposição desses motivos repetitivos com as regiões dos epitopos e os picos de antigenicidade.

A localização da proteína rK39, representada pelo retângulo cinza claro (**Figura 4**), indica que uma parte significativa de sua sequência está fora da região repetitiva, ao contrário do que ocorre com a localização da rKDDR, que se encontra quase que inteiramente na região repetitiva (retângulo cinza escuro, **Figura 4**). Por essa razão, a rKDDR apresentou um maior número de epitopos lineares de células B (9) em sua sequência, quando comparada com a rK39 (7).

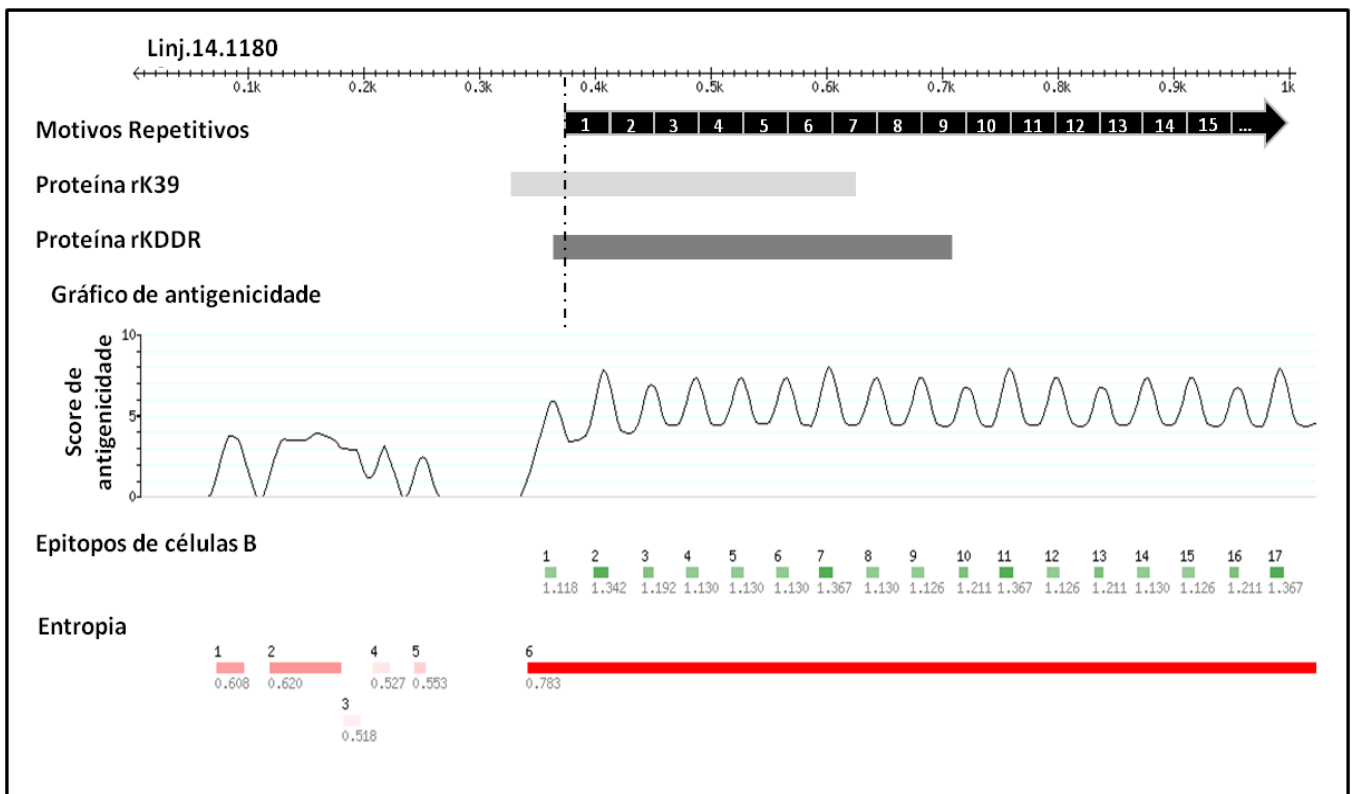


Figura 4: Esquema das predições de epitopos e de desordem estrutural da kinesina de *L. infantum*. Pelo fato do tamanho da proteína kinesina (TritypDB ID: Linj.14.1180) de *L. infantum* ser extremamente extensa (~ 3300 aa), apenas o seu primeiro terço está representado pela régua no topo da figura. A seta negra segmentada (numerada de 1 a 15) representa a região de repetição da kinesina e cada segmento da seta representa um bloco de repetição de 39 aminoácidos. Os retângulos cinza claro e cinza escuro significam, respectivamente, as localizações das proteínas rK39 e rKDDR na kinesina. A linha negra tracejada, perpendicular aos retângulos, seta e régua, indica o início das repetições na proteína kinesina. Os retângulos de cor verde e vermelha de diferentes intensidades indicam, respectivamente, a posições preditas dos epitopos lineares de células B e as regiões de maior entropia preditas (quanto maior a intensidade da cor maior o score de predição).

5.2. Expressão Heteróloga da rKDDR

5.2.1. PCR e obtenção de amplicons para clonagem em pGEM[®]-T

A partir da análise da sequência da kinesina de *L. infantum* (Linj.14.1180), anotada no banco dados genômicos do Tritryp DB, foi possível desenhar primers específicos capazes de flanquear a região que corresponde à KDDR no gene, com produção de amplicons de tamanho estimado de aproximadamente 1100pb. Este primers foram então submetidos à PCR utilizando como molde o DNA genômico de *L. infantum* (MHOM/BR/1972/BH46).

Após separação eletroforética em gel de agarose do produto de PCR, foi possível observar (**Figura 5**) a presença de duas bandas: uma banda mais forte (destacada pela seta) situada sutilmente acima da banda 1000pb do padrão e uma segunda banda de tamanho de 1500pb. A presença da banda mais forte com tamanho concordante com o esperado indicou boa especificidade dos primers quanto ao anelamento nas regiões esperadas (1093-2121) do gene da kinesina (TritrypDB ID: Linj.14.1180). O aparecimento de uma segunda banda mais fraca na altura dos 1500pb sugere que o primer reverso anela-se ainda mais adentro da porção repetitiva da kinesina. Em sequência, a banda de tamanho esperado foi excisada (**Figura 5**) e o material genético purificado. Os amplicons purificados foram utilizados para a reação de ligação com o vetor de clonagem, gerando a construção circular pGEM[®]-T/KDDR.

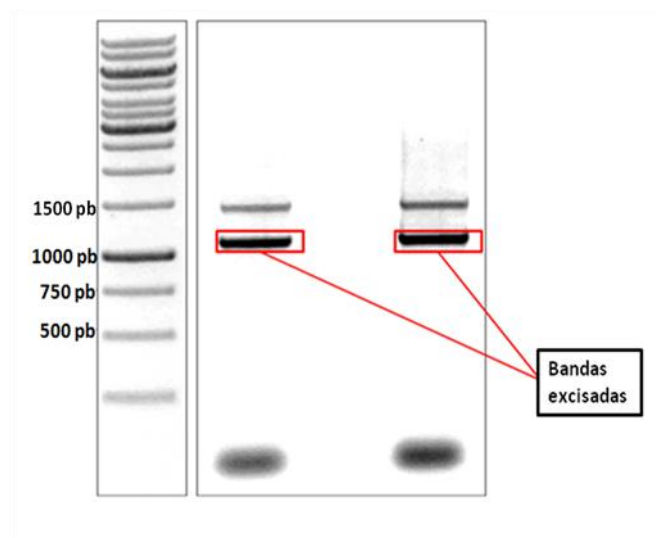


Figura 5: Gel de agarose a 1% do produto da PCR do DNA genômico de *L. infantum*. Bandas mais fortes contendo amplicons de tamanho esperado (~1100pd) são excisados para clonagem em vetor de clonagem pGEM[®]-T.

5.2.2. Digestão com enzimas de restrição (NheI e XhoI) da montagem pGEM[®]-T/KDDR para subclonagem em vetor de expressão

Os plasmídeos pGEM[®]-T contendo o inserto foram submetidos a reações enzimáticas de restrição. Para aumentar o máximo possível a eficiência das enzimas, as digestões correram separadamente. A primeira digestão foi realizada com a enzima NheI, seguida por etapas de separação eletroforética em gel de agarose, corte da banda de interesse (**Figura 6**) e purificação. A segunda digestão (com XhoI) resultou na definitiva liberação dos insertos contendo extremidades coesivas de ambas as enzimas, NheI e XhoI (**Figura 7**). A banda dos insertos foi cortada, purificada para realização da sub-clonagem no vetor pET28a-TEV, previamente digerido com as mesmas enzimas. A sub-clonagem foi confirmada pela PCR de colônias isoladas de bactérias *E. coli* (BL-21 Star) transformadas e a identidade da KDDR clonada foi confirmada por meio de sequenciamento.

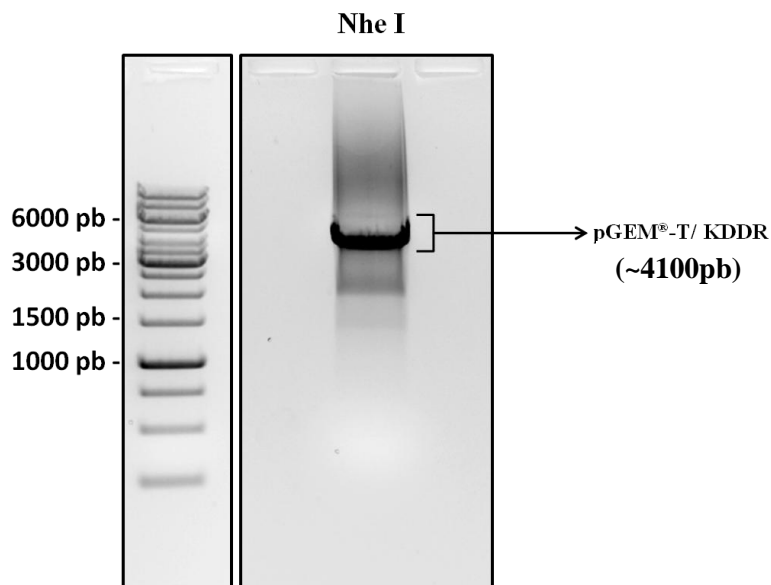


Figura 6: Separação eletroforética em gel de agarose a 1% do produto de digestão com NheI. Após o processo de digestão os plasmídeos linearizam-se, gerando uma única banda com o tamanho do plasmídeo (3000pb) mais o tamanho do inserto (~1100pb); pb = pares de base; NheI = canaleta correspondente a digestão do vetor pGEM®-T/KDDR por NheI.

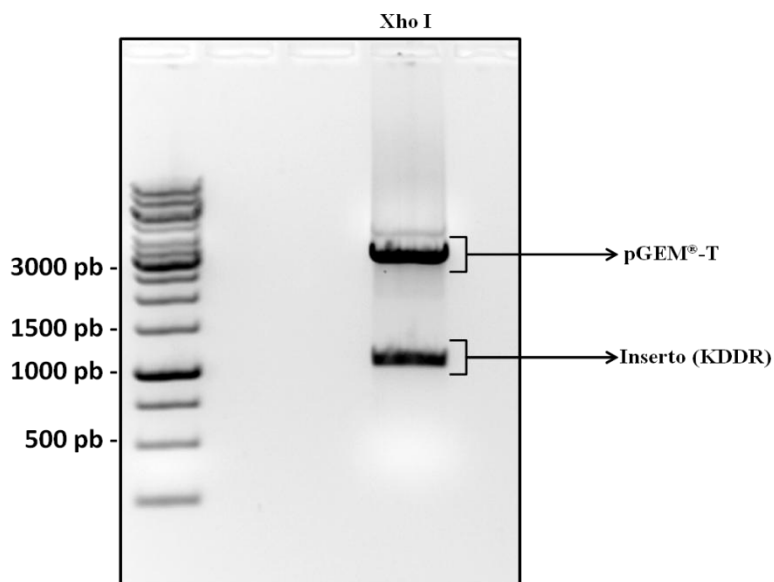


Figura 7: Separação eletroforética em gel de agarose a 1% do produto de digestão com XhoI. Com a segunda digestão, os insertos são separados dos plasmídeos linearizados gerando duas bandas: uma maior do tamanho do plasmídeo (3000pb) e outra com o tamanho esperado do inserto (~1100pb); pb= pares de base; XhoI = canaleta correspondente a digestão do vetor pGEM®-T/KDDR por XhoI.

5.2.3. Análise do sequenciamento da montagem pET28a-TEV/KDDR

Para a confirmação da identidade da KDDR clonada, os vetores contendo os insertos KDDR (pET28a-TEV/KDDR) foram enviados para sequenciamento pela empresa Macrogen (Seul, Coréia do Sul) em sequenciador automático ABI Prism®3730xl DNA Analyser (Applied Biosystems), utilizando os primers T7 *forward* e *reverse* específicos para o vetor em questão. Após o processamento dos dados do sequenciamento por ferramentas de bioinformática, a sequência proteica predita a partir do contig gerado pelo sequenciamento foi confrontada com a sequência proteica completa da kinesina (TritypDB ID: Linj.14.1180). A região de match (acerto) entre elas (365-707) está representada na **Figura 8**.

Analisando o alinhamento global entre as proteínas (**Figura 8**), nota-se que a sequência proteica recombinante apresenta 100% de identidade com a região da KDDR na kinesina, além da absoluta nulidade de “mismatches”, ou seja, de falso alinhamento entre dois aminoácidos diferentes. Os “saltos” situados abaixo das sequências em vermelho são esperados, uma vez que se trata de um trecho peptídico proveniente do vetor que foi propositalmente incorporado à proteína recombinante.


```

pET28a-TEV/KDDR      MGHHHHHHENLYFQGHMASRESACERLTSLEQQLRESEERAAELASQLEATAAAKSSAEQ  60
Linj.14.1180(365-707) -----RESACERLTSLEQQLRESEERAAELASQLEATAAAKSSAEQ  41
                        *****

pET28a-TEV/KDDR      DRENRATLEQQLRESEARAAELASQLEATAAAKMSAEQDRENRATLEQQLRDSEERAA  120
Linj.14.1180(365-707) DRENRATLEQQLRESEARAAELASQLEATAAAKMSAEQDRENRATLEQQLRDSEERAA  101
                        *****

pET28a-TEV/KDDR      ELASQLESTTAAKMSAEQDRESTRATLEQQLRDSEERAAELASQLESTTAAKMSAEQDRE  180
Linj.14.1180(365-707) ELASQLESTTAAKMSAEQDRESTRATLEQQLRDSEERAAELASQLESTTAAKMSAEQDRE  161
                        *****

pET28a-TEV/KDDR      STRATLEQQLRESEERAAELASQLESTTAAKMSAEQDRESTRATLEQQLRDSEERAAELA  240
Linj.14.1180(365-707) STRATLEQQLRESEERAAELASQLESTTAAKMSAEQDRESTRATLEQQLRDSEERAAELA  221
                        *****

pET28a-TEV/KDDR      SQLEATAAAKSSAEQDRENTRAALEQQLRDSEERAAELASQLESTTAAKMSAEQDRESTR  300
Linj.14.1180(365-707) SQLEATAAAKSSAEQDRENTRAALEQQLRDSEERAAELASQLESTTAAKMSAEQDRESTR  281
                        *****

pET28a-TEV/KDDR      ATLEQQLRDSEERAAELASQLESTTAAKMSAEQDRENRATLEQQLRDSEERAAELASQL  360
Linj.14.1180(365-707) ATLEQQLRDSEERAAELASQLESTTAAKMSAEQDRENRATLEQQLRDSEERAAELASQL  341
                        *****

pET28a-TEV/KDDR      EA  362
Linj.14.1180(365-707) EA  343
                        **

```

Figura 8: Alinhamento global *Clustal O* (1.2.1) Multiple Sequence Alignment. A linha contendo o identificador da proteína recombinante corresponde a sequência clonada no vetor pET-28a-TEV, enquanto a linha contendo o identificador do gene da kinesina corresponde a sua sequência proteica depositada no Trityp DB na região 365-707. O “*” abaixo dos aminoácidos significa que eles são idênticos. O símbolo “-” no lugar de um aminoácido corresponde a um “salto” nesta sequência. As sequências em vermelho correspondem a parte do vetor pET-28a-TEV que é incorporada à proteína recombinante .

5.2.4 Análises moleculares da rKDDR

A proteína rKDDR apresenta uma ORF (Open Reading Frame) única com 1086 pares de base que codificam 362 aminoácidos (**Figura 9-A**), correspondendo a uma massa molecular de 40,21 kDa e um pI (ponto isoelétrico) de 4,63. Esta proteína recombinante possui aproximadamente 8,5 blocos repetitivos de 39 aminoácidos, sendo que 92% de sua sequência proteica é constituída de motivos repetitivos, enquanto que os 8% restantes provém de resquícios do plasmídeo e alguns resíduos da parte não repetitiva da kinesina. Esses blocos ou motivos de repetição exibem um padrão de degeneração que se conserva entre as sequências repetitivas (**Figura 9-B**). Isso ocorre devido ao fato de todos os motivos repetitivos apresentarem substituições sempre nas mesmas posições indicadas pelas setas da **Figura 9-B**.

Um aspecto particular da rKDDR é a presença de um motivo repetitivo altamente polimórfico (**Figura 9**), com pelo menos 6 resíduos degenerados, em um padrão de substituição de aminoácidos diferente dos demais motivos (**Figura 9-B**).

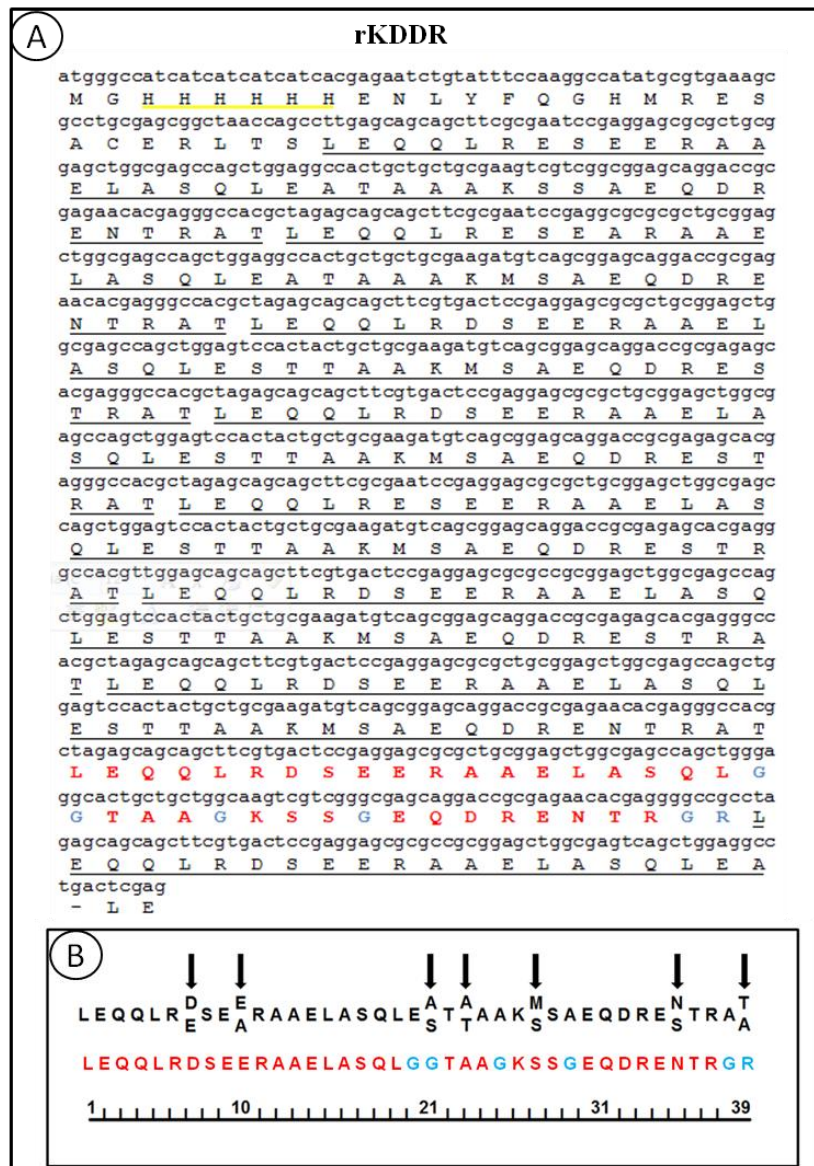


Figura 9. Sequência de DNA e proteica deduzida da KDDR. A: sequência de nucleotídeos da KDDR está em letra minúscula e em letra maiúscula a sequência proteica deduzida; sublinhado em preto estão os motivos repetitivos de 39 aminoácidos e sublinhado em amarelo a His-Tag; a sequência de letras maiúsculas vermelhas corresponde ao motivo repetitivo polimórfico e as letras maiúsculas em cor azul correspondem aos aminoácidos degenerados exclusivos deste motivo; **B:** letras em preto correspondem à sequência consenso dos motivos repetitivos da KDDR; as setas apontam as posições de degeneração; abaixo, se encontra o motivo repetitivo polimórfico.

5.2.5. Indução da expressão e teste de solubilidade da rKDDR

As bactérias *E. coli* (BL-21 Star) transformadas com os plasmídeos pET28a-TEV/KDDR foram submetidas à indução de expressão com IPTG para realização do teste de expressão. Analisando a **Figura 10-A**, é demonstrado que as bactérias não estimuladas com IPTG (canaleta **I**) já apresentaram uma produção basal significativa da proteína rKDDR. Após 3 horas de estímulo essas bactérias apresentaram um aumento notável na expressão da rKDDR (canaleta **II**).

O teste de solubilidade (**Figura 10-B**) revelou que a rKDDR é uma proteína solúvel, visto que é encontrada praticamente apenas na fração solúvel (canaleta **V**). Tal característica é uma excelente vantagem para a posterior purificação, uma vez que não será necessário o tratamento prévio com ureia, medida que reduziria drasticamente o rendimento da produção em larga escala de proteínas recombinantes purificadas.

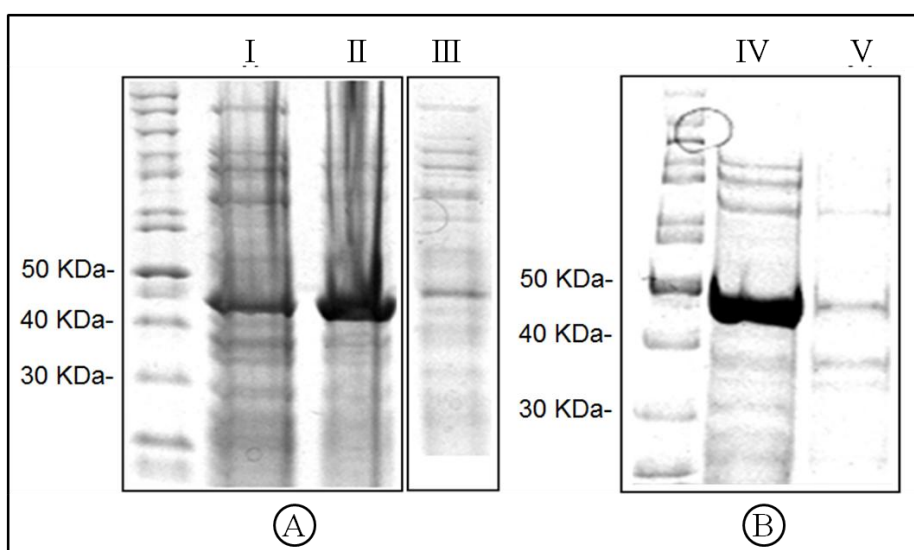


Figura 10: Indução da expressão e teste de solubilidade. **A:** Separação em gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) a 12% das amostras de bactérias utilizadas no teste de expressão. canaleta I: corresponde à amostra de bactérias transformadas não induzidas; canaleta II: amostra de bactérias transformadas com três horas de indução com IPTG (1 mM); canaleta III: amostra de bactérias não transformadas (*E. coli*); **B:** Separação em gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) a 12% das amostras de bactérias utilizadas no teste de solubilidade: canaleta IV: fração solúvel e canaleta V: fração insolúvel.

5.2.6. Purificação por cromatografia de afinidade da rKDDR

Para permitir a purificação por cromatografia de afinidade através do sistema Histidina/Níquel, uma cauda de histidina (His-Tag) foi adicionada na região amino-terminal da rKDDR. A partir da identificação da fração em que a proteína se encontra, o extrato proteico da fração sobrenadante (fração solúvel) foi então submetido a uma coluna de níquel. Ao passarem pela coluna, as proteínas com His-Tag interagem com o níquel fixando-as à parede da coluna. No processo de eluição, a adição de tampões específicos reduz a interação entre o níquel e a histidina liberando as proteínas recombinantes da coluna e permitindo sua obtenção na fração eluída.

Todas as frações obtidas que compreendem toda extensão do pico de absorbância observado durante a eluição foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS a 12,5%. Na **Figura 11** nota-se que o aumento da absorbância durante a eluição da proteína ligada à coluna His-trap começa a acentuar-se na fração 9 até atingir o seu auge na fração 11 e posteriormente na fração 13, mantendo-se constante até o final da eluição. A presença de bandas fortes na altura dos 40 kDa (**Figura 12**) após a corrida de alíquotas dessas frações, corroborou com os resultados achados na curva de eluição.

Após o processo de purificação, as concentrações proteicas das frações de maior pico de absorbância durante a eluição (de 10 a 15) foram submetidas à técnica de dosagem de proteínas do Kit BCA (Thermo Scientific, USA) segundo o protocolo do fabricante. A **Tabela II** mostra as concentrações obtidas na diferentes frações. Nota-se que as frações 10, 11 e 12 apresentam as maiores concentrações da proteína rKDDR.

Tabela II: Concentrações das frações de purificação.

Fração	[] µg/mL
10	169,8
11	110,5
12	80,4
13	65,4
14	38
15	18,9

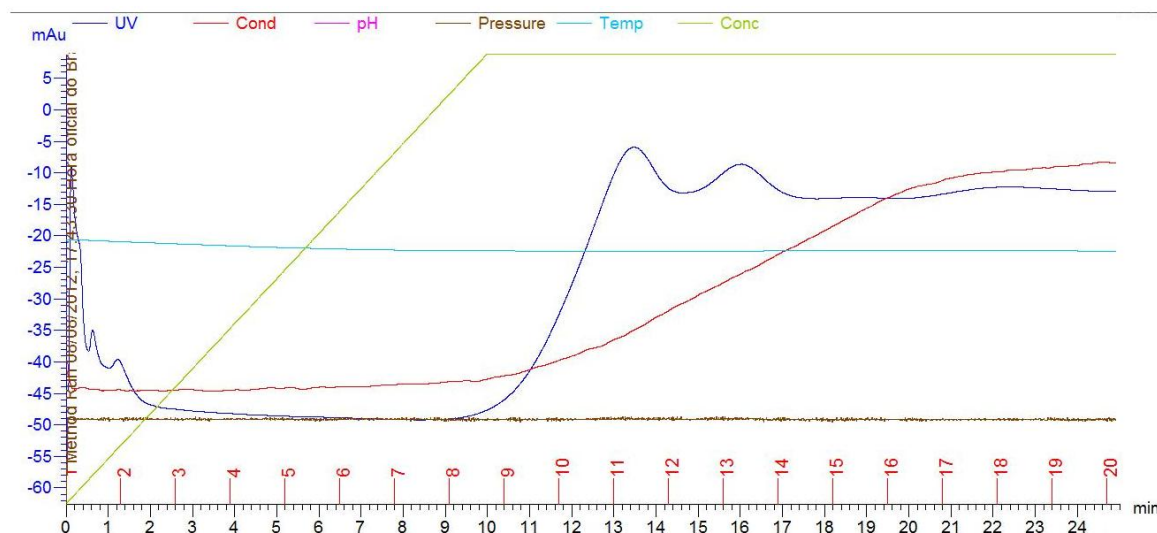


Figura 11: Curva de eluição após purificação por cromatografia de afinidade da proteína rKDDR. O pico de absorvância ocorreu entre as frações 9 e 16, indicando a presença da proteína rKDDR nas nestas frações.

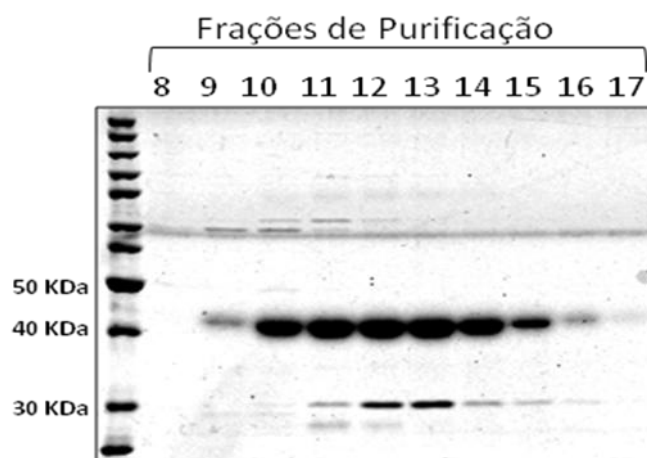


Figura 12: Gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) para a confirmação da purificação por cromatografia de afinidade da proteína rKDDR. As bandas de 40KDa correspondem à rKDDR.

5.3. Sorodiagnóstico da Leishmaniose Visceral por ELISA

5.3.1. Reconhecimento sorológico canino com o antígeno rKDDR

A validação da rKDDR no diagnóstico sorológico da LVC foi realizada por ensaios de ELISA. Diante da necessidade de se estabelecer pontos de referência a partir de testes confiáveis que, além de apresentarem os melhores desempenhos no sorodiagnóstico da LVC na atualidade, são amplamente utilizados e recomendados para esse fim, testes de ELISA com o antígeno rK39 e o teste EIE-LVC kit (FIOCRUZ-Bio-Manguinhos[®], Brasil) foram realizados neste estudo a fim de defini-los com ponto de comparação para a performance da rKDDR.

Os dados referentes à reatividade e performance da rKDDR estão representados nas **Figura 13** e **Figura 14**. As **Tabelas III** e **IV** apresentam sumariamente os dados de performance e concordância. O perfil de reatividade de anticorpos (IgG) contra a rKDDR mostrou-se interessante, uma vez que nenhuma reatividade cruzada foi identificada (**Figura 13**). Por outro lado, tanto a rK39 quanto o kit EIE-LVC (em ambos *cut-offs*) apresentaram alta taxa de reatividade cruzada. O kit EIE-LVC, em ambos os *cut-offs*, foi o que apresentou as melhores taxas de sensibilidade, enquanto que suas taxas de especificidade e de reação cruzada foram as piores (**Figura 13**), dentre os métodos testados.

A ELISA de rKDDR apresentou uma maior sensibilidade (88,54%; IC de 95%: 80,42-94,14%) e especificidade (97,30%; IC de 95%: 92,30-99,44%) quando comparada com o teste de ELISA da rK39, que apresentou sensibilidade de 78,13% (IC de 95%: 68,53-85,92%) e especificidade de 90,09% (IC de 95%: 82,96-94,95%). Quando comparada com os outros dois testes, a rKDDR apresentou a maior área da curva ROC (AUC=0,954; IC de 95%: 0,922-0,985), contrastando-se com a rK39 que exibiu AUC = 0,901 com IC de 95%: 0,869-0,949 (**Figura 14 e Tabela IV**). A rKDDR também alcançou o maior VPP (96,70%), seguido pela rK39 (87,20%) e por último o kit EIE-LVC (84,90% para *cut-off* obtido por curva ROC; 64,18% para *cut-off* obtido seguindo instrução do fabricante, ver **Anexo II**).

Em relação à acurácia dos testes (**Tabela III**), a rKDDR exibiu o maior índice de acurácia (AC = 93,24%), enquanto que a rK39 apresentou um índice menor (AC =

84,54%). Os índices de acurácia do kit EIE-LVC ficaram relativamente altos (AC = 89,37%) quando o seu *cut-off* foi definido com base na curva ROC. Por outro lado, quando seu *cut-off* foi estabelecido de acordo com instruções do kit, seus índices de AC foram os menores entre os testes (AC = 73,91%)

As análises de concordância (**Tabela IV**) com os métodos de diagnóstico parasitológico indicaram que a rKDDR apresenta o melhor índice de concordância (0,863, muito bom). Nota-se também que o índice de concordância da rK39 é o terceiro pior dentre os testes (0,687, bom). O pior índice ficou com o kit EIE-LVC (0,494, moderado), quando seu *cut-off* é calculado de acordo com o seu manual. Por outro lado, quando seu *cut-off* é definido conforme a curva ROC, seu índice de concordância com os métodos de diagnóstico parasitológico aumenta consideravelmente (0,788, bom).

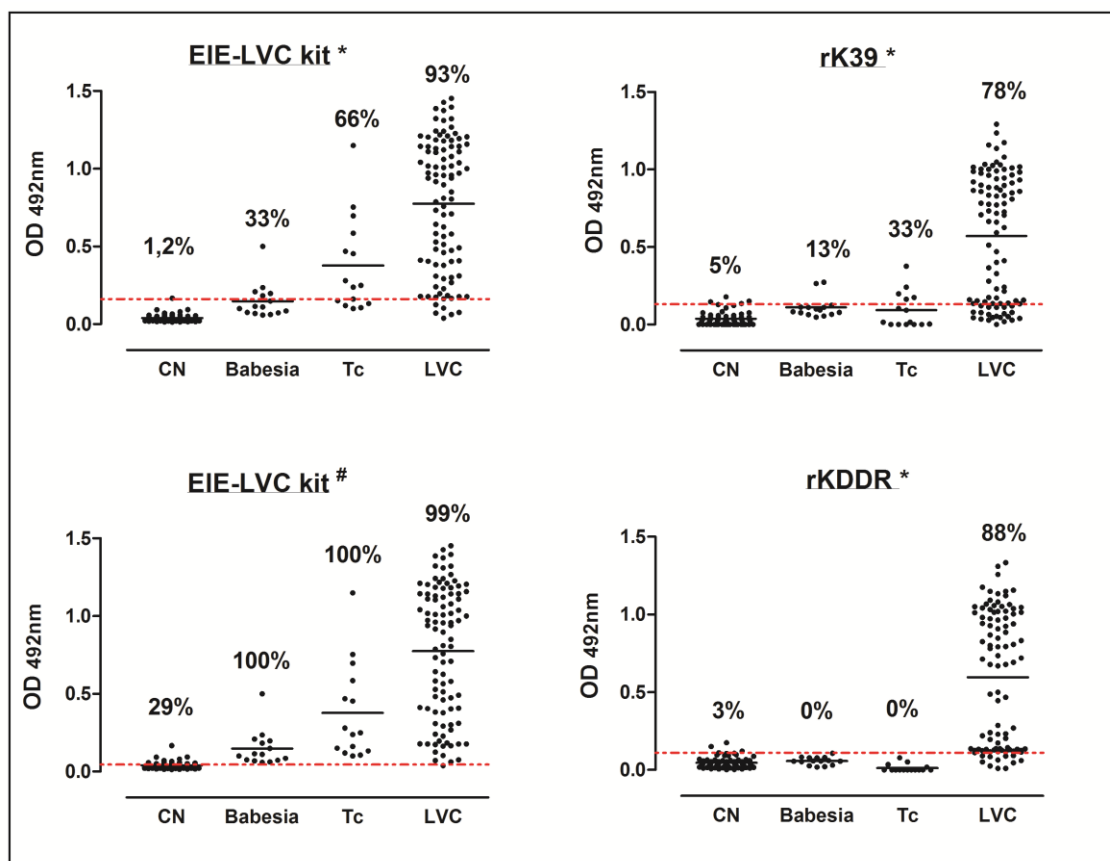


Figura 13: Comparação da reatividade dos soros de cães nos testes de ELISA da EIE-LVC kit, rK39 e rKDDR. Os diferentes testes de ELISA foram realizados com seguintes grupos de soros de cães: CN, controle negativo, $n = 81$; Babesia, cães com babesiose para avaliação de reatividade cruzada, $n = 15$; Tc, cães com doença de Chagas para avaliação de reatividade cruzada, $n = 15$; LVC, cães com leishmaniose visceral canina, $n = 96$. No eixo das ordenadas estão representadas as absorbâncias de comprimento de 492nm. No eixo das abscissas estão ordenados os diferentes grupos de soros de cães testados. A linha vermelha é o limite inferior de positividade (*cut-off*). Os índices acima de cada coluna de plotagem indicam o percentual de pontos que estão acima do *cut-off*. A curva ROC foi utilizada para determinar o *cut-off* de cada teste.

* *Cut-off* obtido com base na curva ROC; # *Cut-off* obtido de acordo com as instruções do manual do fabricante (**Anexo II**).

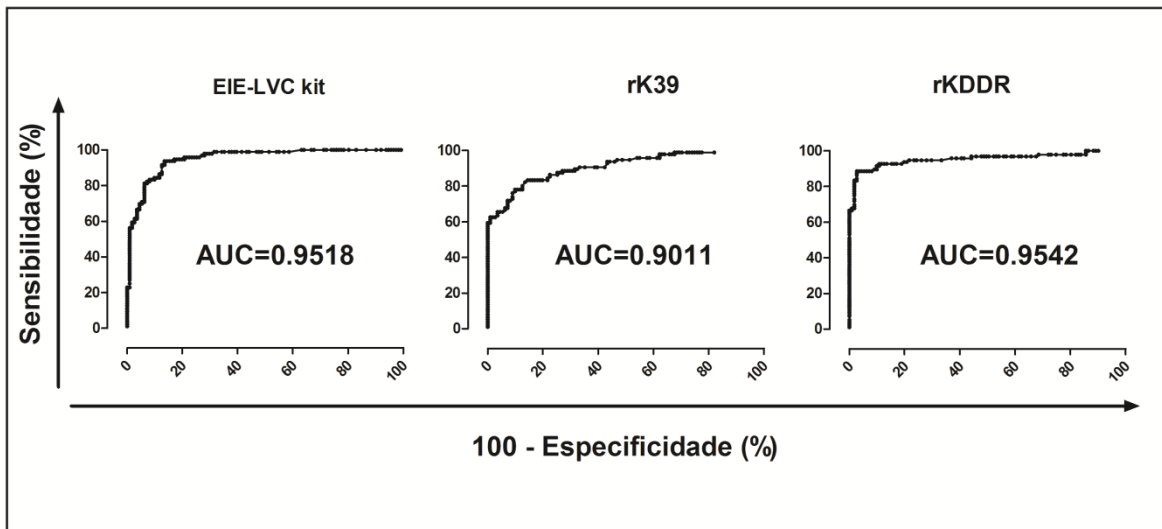


Figura 14: Comparação das curvas ROC obtidas de cada teste: EIE-LVC kit, rK39 e rKDDR. As curvas ROC foram geradas pelo software Prisma 5.0 e com elas foram determinados os *cut-offs*, sensibilidade, especificidade e AUC (área sob a curva). O eixo das ordenadas está representando as sensibilidades de cada teste. O eixo da abscissa está significando a especificidade de cada teste.

Tabela III: Percentuais de sensibilidade, especificidade, VPP, VPN e acurácia dos ensaios imunoenzimáticos rKDDR, rK39 e Kit EIE-LVC em soros caninos para diagnóstico da LV canina

Teste de ELISA	Cut-off	Parâmetros ^α						
		Sensibilidade (%)	IC 95%	Especificidade (%)	IC 95%	VPP (%)	VPN (%)	AC (%)
rKDDR*	0,111	88,54	80,42-94,14	97,30	92,30-99,44	96,70	90,76	93,24
rK39*	0,131	78,13	68,53-85,92	90,09	82,96-94,95	87,20	82,64	84,54
EIE-LVC Kit*	0,162	93,75	86,89-97,67	86,49	78,69-92,23	84,90	94,05	89,37
EIE-LVC Kit[#]	0,045	98,96	94,33-99,97	52,25	42,56-61,82	64,18	98,30	73,91

Abreviações: (IC) intervalo de confiança; (VPP) valor preditivo positivo; (VPN) valor preditivo negativo; (AC) acurácia;

^α Os parâmetros foram calculados a partir de todas as amostras de soro canino utilizadas neste trabalho (CN, n = 81; Babesia, n = 15; Tc, n = 15; LVC, n = 96);

* *Cut-off* calculado com base na curva ROC;

Cut-off calculado de acordo com manual do fabricante (**Anexo II**).

Tabela IV: Concordância dos testes de ELISA rKDDR, rK39 e do Kit EIE-LVC com o diagnóstico parasitológico para LV canina

Teste de ELISA	AUC	IC 95%	tP	tN	FP	FN	κ^{α}	IC 95%	Concordância ^{β}
rKDDR*	0,954	0,922-0,985	85	108	3	11	0,863	0,794-0,932	Muito Bom
rK39*	0,901	0,869-0,949	75	100	11	21	0,687	0,588-0,786	Bom
EIE-LVC Kit*	0,951	0,924-0,978	90	95	16	6	0,788	0,704-0,871	Bom
EIE-LVC Kit[#]	NA	NA	95	58	53	1	0,494	0,393-0,595	Moderado

Abreviações: (AUC) área sob a curva ; (IC) intervalo de confiança; (tP) teste positivo; (tN) teste negativo; (FP) falso positivo; (FN) falso negativo;

α Para calcular o fator Kappa todas as amostras de soros caninos foram utilizadas (CN, n = 81; Babesia, n = 15; Tc, n = 15; LVC, n = 96);

β Os testes de diagnóstico parasitológico foram padrão ouro para o cálculo da concordância;

* *Cut-off* calculado com base na curva ROC;

Cut-off calculado de acordo com manual do fabricante (**Anexo II**).

5.3.2. Leishmaniose visceral humana: reconhecimento sorológico humano

O validação da rKDDR no diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral humana foi realizada por meio de ensaios de ELISA comparativos entre a rKDDR e rK39.

Os dados referentes à reatividade e curva ROC da rKDDR e rK39 estão representados na **Figura 15**. Nas **Tabelas V e VI** estão representados de maneira sumária os resultados de performance e de concordância dos testes. O perfil de reconhecimento sorológico de humanos com LV da rKDDR foi superior ao da rK39. Não foi identificada nenhuma reatividade cruzada com os soros de pacientes chagásicos em ambas as proteínas recombinantes.

A ELISA de rKDDR apresentou maior sensibilidade (92,4%; IC de 95%: 85,10-97,33%) e especificidade (100,00%; IC de 95%: 92,60-100,00%) quando comparada com o teste de ELISA da rK39, que apresentou sensibilidade de 90,48% (IC de 95%: 82,09-95,80%) e especificidade de 97,92% (IC de 95%: 88,93-99,95%). Comparada com a rK39, a rKDDR apresentou a maior área sob a curva ROC (AUC=0,975; IC de 95%: 0,950-0,999), enquanto que a rK39 que exibiu AUC = 0,951 com IC de 95%: 0,913-0,988 (**Figura 15 e Tabela VI**). A rKDDR também obteve maior VPP (100%), VPN (88,88%) e AC (95,65%) em comparação com a rK39, que apresentou VPP de 98,70%, VPN de 85,45% e AC de 93,61%.

Vale resaltar que, em função dos resultados obtidos pela rKDDR aqui apresentados, foi feito pela Coordenadoria de Transferência e Inovação Tecnológica (CTIT) da UFMG, depósito da patente referente ao “Processo de Produção e Uso da Proteína rKDDR e Kit para Diagnóstico de Leishmaniose”, junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI). A documentação referente ao depósito da patente está descrita no **Anexo I**.

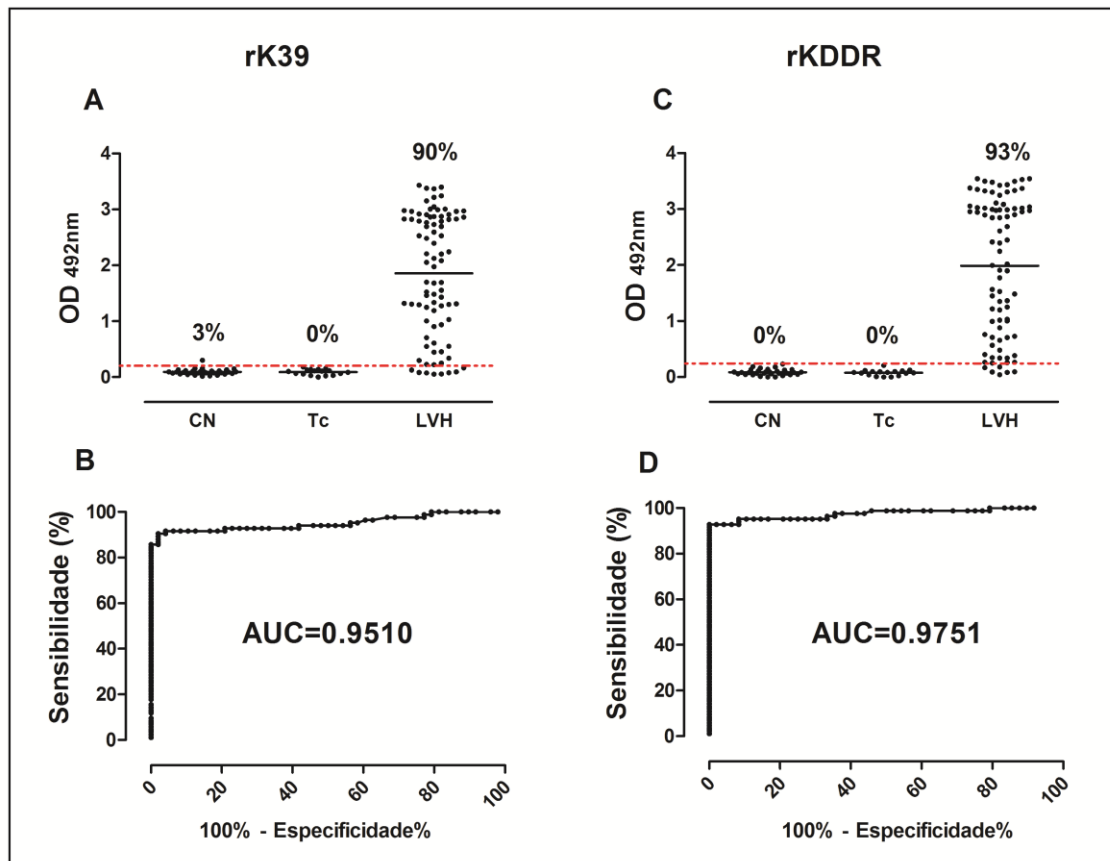


Figura 15: Comparação da reatividade e das curvas ROC dos testes de ELISA da rK39 e rKDDR com soros humanos. Os dois testes de ELISA foram realizados com seguintes grupos de soros humanos: CN, controle negativo, n = 31; Tc, pacientes com doença de Chagas para avaliação de reatividade cruzada, n = 17; LVH, pacientes com leishmaniose visceral, n = 84. **A e B:** reatividade dos soros humanos no teste de ELISA da rK39 e sua curva ROC, respectivamente; **C e D:** reatividade dos soros humanos no teste de ELISA da rKDDR e sua curva ROC, respectivamente. Nos gráficos de reatividade, os eixos das ordenadas estão representando as absorvâncias de comprimento de 492nm e nos gráficos de curva ROC as sensibilidades de cada teste. Nos gráficos de reatividade, os eixos das abscissas estão ordenados os diferentes grupos de soros humanos testados e nos gráficos de curva ROC as especificidades de cada teste. A linha vermelha é o limite inferior de positividade (*cut-off*). Nos gráficos de reatividade, os índices acima de cada coluna de plotagem indicam o percentual de pontos que estão acima do *cut-off*. As curvas ROC foram geradas pelo software Prisma 5.0 e com elas foram determinados os *cut-offs*, sensibilidade, especificidade e AUC (área da curva) de cada teste.

Tabela V: Percentuais de sensibilidade, especificidade, VPP, VPN e acurácia dos ensaios imunoenzimáticos rKDDR e rK39 em soros humanos para diagnóstico da LV humana

Teste de ELISA	Cut-off	Parâmetros ^α						
		Sensibilidade (%)	IC 95%	Especificidade (%)	IC 95%	VPP (%)	VPN (%)	AC (%)
rKDDR*	0,242	92,86	85,10-97,33	100,00	92,60-100,00	100	88,88	95,65
rK39*	0,204	90,48	82,09-95,80	97,92	88,93-99,95	98,70	85,45	93,61

Abreviações: (IC) intervalo de confiança; (VPP) valor preditivo positivo; (VPN) valor preditivo negativo; (AC) acurácia;

^α Os parâmetros foram calculados a partir de todas as amostras de soro canino utilizadas neste trabalho (CN, n = 31; Tc, n = 17; LVH, n = 84);

* Cut-off calculado com base na curva ROC;

Tabela VI: Concordância dos testes de ELISA rKDDR e ELISA rK39 com o diagnóstico parasitológico para LV humana

Teste de ELISA	AUC	IC 95%	tP	tN	FP	FN	κ^{α}	IC 95%	Concordância ^β
rKDDR*	0,975	0,950-0,999	78	48	0	6	0,904	0,830-0,979	Muito Bom
rK39*	0,951	0,913-0,988	76	47	1	8	0,857	0,768-0,947	Muito Bom

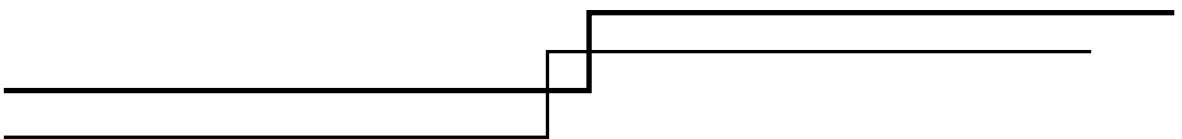
Abreviações: (AUC) área sob a curva; (IC) intervalo de confiança; (tP) teste positivo; (tN) teste negativo; (FP) falso positivo; (FN) falso negativo;

^α Para calcular o fator Kappa todas as amostras de soros caninos foram utilizadas (CN, n = 31; Tc, n = 17; LVH, n = 84);

^β Os testes de diagnóstico parasitológico foram padrão ouro para o cálculo da concordância;

* Cut-off calculado com base na curva ROC;

6. DISCUSSÃO



Neste presente estudo, identificamos, por análises de bioinformática de predição, uma grande quantidade de epitopos lineares de células B presentes na kinesina de *L. infantum*, além de um alto grau de desordem estrutural na porção repetitiva dessa proteína. Na análise em questão, verificamos, ainda, uma nítida sobreposição das posições dos blocos repetitivos com as posições dos epitopos preditos e dos picos de antigenicidade. Além disso, esses motivos repetitivos, bem como os epitopos estão presentes em menor número na sequência da rK39 (Burns et al. 1993) e em maior número na da rKDDR.

Estudos recentes têm revelado um aumento significativo do fator de ativação de células B (BAFF) no soro de pacientes com LV, esses valores chegaram a ser 4 vezes maior do que o observado em indivíduos saudáveis, sugerindo que os parasitos do complexo *Leishmania donovani* produzem ativamente moléculas de natureza antigênica, que atuam como fortes potencializadores da resposta imune humoral no hospedeiro vertebrado (Goto et al. 2014).

Diversos trabalhos com proteínas repetitivas já demonstraram grande produção de anticorpos específicos contra as porções repetitivas de diferentes proteínas em indivíduos com leishmaniose e em outras parasitoses, como a tripanosomíase e malária (Coppel et al. 1984, Koenen et al. 1984, Cowman et al. 1985, Kemp et al. 1987, Ibañez et al. 1988, Burns et al. 1992, 1993, Bhatia et al. 1999, Goto et al. 2006, 2007, 2010, Thuy et al. 2012, Nguyen et al. 2014). Algumas proteínas secretadas por células cancerígenas, conhecidas por induzirem uma forte resposta imune humoral, possuem em sua sequência proteica regiões de repetição (Kotera et al. 1994, Mollick et al. 2003), sugerindo que esses motivos repetitivos tendem a ser antigênicos independente da origem.

Várias são as razões atribuíveis ao caráter antigênico de proteínas repetitivas como a kinesina de *L. infantum*. Uma delas seria de que as múltiplas cópias dos motivos repetitivos ocasionam uma maior exposição das porções antigênicas ao sistema imune do hospedeiro. Outra característica demonstrada em estudos proteômicos de amastigotas de *Leishmania*, é que, comparadas com as proteínas expressas de todo o proteoma do parasito, proteínas repetitivas apresentam-se altamente expressas, indicando que os parasitos do gênero *Leishmania* utilizam ativamente a família de proteínas repetitivas para parasitismo intracelular em hospedeiros mamíferos (Goto et al. 2010, Mendes et al.

2013). Além disso, esses estudos pressupõe a hipótese de que o tamanho das repetições e seu grau de degeneração interferem na capacidade de alguns parasitos intracelulares de invadir células do hospedeiro (Mendes et al. 2013).

O estudo de 64 genes de *L. infantum* que codificam proteínas repetitivas, incluindo a kinesina, revelou uma forte tendência de elas possuírem carga elétrica (Goto et al. 2007). Tal característica explicaria, pelo menos em parte, sua propensão a serem solúveis em meio aquoso (hidrofilia). Por questões de termodinâmica e cinética molecular, proteínas hidrofílicas são reconhecidas por serem melhores antígenos de células B do que hidrofóbicas. De fato, no presente trabalho, a rKDDR provou ser uma proteína solúvel por meio dos testes de solubilidade. Além disso, outro aspecto importante é que 92% de sua sequência proteica é constituída de motivos repetitivos de kinesina, já a rK39 apresenta apenas 60% desses motivos repetitivos em sua constituição (Burns et al. 1993).

Em consonância com esses aspectos inerentes às proteínas repetitivas, nossos dados de predição de epitopos de células B, bem como da sequência proteica predita da rKDDR avigoram as evidências de que proteínas repetitivas derivadas de kinesina, ou de qualquer outra proteína repetitiva de *L. infantum*, são excelentes candidatas a antígeno para o diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral. Ressalta-se, ainda, que o uso de ferramentas de bioinformática de predição de epitopos de célula B revela ser de suma importância para a identificação e caracterização de novas proteínas com alto potencial antigênico e, portanto, prováveis candidatas ao sorodiagnóstico da LV.

Recentemente, com o intuito de verificar se o número de motivos repetitivos de um antígeno recombinante de *T. cruzi* influencia o desempenho de ensaios de detecção de anticorpos em pacientes chagásicos, testes com diferentes quantidades dos motivos repetitivos nesses antígenos foram conduzidos (Valiente-Gabioud et al. 2011). Os resultados levaram a conclusão de que o aumento no número de repetições não resulta no aumento da resposta humoral contra o antígeno. Por outro lado, verificou-se que a avidéz das interações anticorpo/antígeno foram maiores com o aumento das repetições, o que determinaria uma maior especificidade nos testes sorológicos (Valiente-Gabioud et al. 2011). É importante ressaltar que, a rKDDR além de ter provado ser mais sensível que a rK39 em relação aos testes sorológicos da LV humana e canina, apresentou melhor especificidade (com nenhuma ocorrência de reatividade cruzada) no diagnóstico da LVC e no da LV humana, corroborando em parte com os resultados do trabalho de

Valiente-Gabioud e colaboradores (2011). A maior sensibilidade da rKDDR possivelmente está relacionada ao fato da rKDDR possuir 32% mais epitopos lineares que a rK39, somado, ainda, ao fato de que rKDDR é constituída quase que exclusivamente de motivos repetitivos, o que não ocorre na rK39.

Grande é a discussão a respeito das características essenciais que um teste de diagnóstico para a LV precisa possuir (Chappuis et al. 2007, Maia & Campino 2008, Elmahallawy et al. 2014). O motivo disso está relacionado ao fato de que o diagnóstico de qualquer parasitose é o ponto de partida imperativo para qualquer ação que se deseja tomar em relação ao seu tratamento e controle (Chappuis et al. 2007). Partindo desse princípio, o teste de diagnóstico da LV precisa ser sensível o suficiente para detectar indivíduos infectados independente do estágio da doença em que se encontram, a fim de que possam ser tratados e que não se tornem uma fonte de infecção para o vetor (Alves & Bevilacqua 2004). Por outro lado, o teste precisa também ser específico o suficiente para evitar tratamento desnecessário, uma vez que o mesmo possui sérios efeitos colaterais, ou, ainda, de evitar a eliminação de um animal falso positivo de maneira obviamente equivocada (Alves & Bevilacqua 2004, Chappuis et al. 2007, Maia-Elkhoury et al. 2008). Além disso, um bom método de diagnóstico fornecerá informações fundamentais e precisas a respeito da situação de prevalência e incidência em um determinado local, propiciando o desenvolvimento de medidas de controle mais incisivas e eficazes, que por sua vez, poderão certamente modificar o cenário epidemiológico da doença (Ministério da Saúde 2010).

O controle da LV humana no Brasil se depara com as seguintes limitações: ineficientes estratégias de intervenção da transmissão da doença; baixo investimento político, financeiro e de recursos humanos nos programas de intervenção; falta de políticas de conscientização das populações afetadas e, o mais importante, falta de um eficiente método de diagnóstico (Dantas-Torres & Brandão-Filho 2006, Dantas-Torres et al. 2006).

Os cães, por serem os reservatórios da espécie *L. infantum* no Brasil, são os principais alvos das medidas de controle no país, que consisti em sua eliminação, caso fiquem positivos nos testes de diagnóstico utilizados pelas agências de controle (Ministério da Saúde 2006). Contudo, esta prática agressiva de eliminação canina tem mostrado ser ineficaz, visto que o crescimento do número de novos casos e a taxa de mortalidade da LV no Brasil continua aumentando, talvez por falha de identificação

correta de animais positivos (Maia-Elkhoury et al. 2008, Ministério da Saúde 2010, Alvar et al. 2012).

O diagnóstico da LVC é obtido a partir de uma combinação de evidências clínicas e da confirmação por testes sorológicos (Ministério da Saúde 2006). Anteriormente, esses testes sorológicos eram realizados da seguinte forma: a triagem dos cães com suspeita de leishmaniose era feita com o teste de ELISA indireta do kit EIE-LVC da Bio-Manguinhos[®] (desenvolvido no Brasil pela FIOCRUZ); os cães positivos para este teste eram então submetidos a um segundo teste sorológico confirmatório, o RIFI (reação de imunofluorescência indireta). Atualmente, o formato triagem seguido de teste confirmatório ainda se mantém. Entretanto, com o surgimento do teste rápido imunocromatográfico da rK39 (DPP[®] Leishmaniose Visceral Canina - Bio-Manguinhos, Brasil), este passou a ser utilizado para triagem dos cães no lugar do kit EIE-LVC, por sua alta sensibilidade, especificidade, praticidade e compatibilidade para uso em campo (Sundar et al. 1998, 2002, Jelinek et al. 1999, Brandonisio et al. 2002, Carvalho et al. 2003). Já o kit EIE-LVC, por sua vez, ocupou o lugar do RIFI e passou a ser o teste de ELISA confirmatório da LVC.

O teste de ELISA do kit EIE-LVC da Bio-Manguinhos[®] é considerado como o teste sorológico padrão-ouro para o diagnóstico da LVC e recomendado pelo Ministério da Saúde do Brasil (Alves & Bevilacqua 2004). Entretanto, estudos sorológicos comparativos recentes já expuseram suas reais limitações (Menezes-Souza et al. 2014b, a). O primeiro e principal objeto de percalço do kit EIE-LVC debruça-se sobre o fato de o ensaio imunoenzimático desse teste consistir na reação de anticorpos presentes nos soros ou plasmas de cães com antígenos solúveis de *L. major like*. Apesar do antígeno derivar de espécie diferente, ao contrário do que se esperaria, o antígeno solúvel utilizado parece não ser um fator interferente no desempenho dos testes de ELISA indireta, principalmente pelo fato de que espécies de *Leishmania* exibem um alto grau de conservação a nível proteômico entre elas e com outros tripanosomatídeos (El-Sayed et al. 2005). No entanto, o uso do antígeno bruto solúvel na ELISA indireta é pouco recomendável, visto que, por razão dessa alta conservação proteômica entre os tripanosomatídeos, o grau de reatividade cruzada nos ensaios sorológicos são altos, reduzindo drasticamente a especificidade dos testes (Oliveira et al. 2008, Romero et al. 2009, Zanette et al. 2014).

A segunda limitação do kit EIE-LVC está associada com a sensibilidade do teste, resultando em sacrifício grosseiro da sua especificidade. Seguindo as recomendações do manual (**Anexo II**) do próprio teste (FIOCRUZ-Bio-Manguinhos[®], Brasil), valores de *cut-off* obtidos são extremamente baixos. Nossos resultados demonstraram que o valor de *cut-off* obtido pela curva ROC (0,162) é quase 4 vezes maior que o *cut-off* obtido a partir de instruções no manual (0,045). Apesar da sensibilidade obtida, o kit EIE-LVC apresentou os piores valores de especificidade, VPP, acurácia e de concordância. É importante ressaltar, que o kit sugere valores esperados de sensibilidade e especificidade (94,54% e 91,76%, respectivamente; ver **Anexo II**), no entanto, os valores obtidos em nossos testes divergiram, principalmente em relação à especificidade. Essa diferença pode ser explicada pelo fato de que os estudos preliminares de padronização do kit EIE-LVC foram realizados a partir de amostras de soros de cães com suspeita clínica de LV. Além disso, para os cálculos de sensibilidade e especificidade, o teste padrão ouro foi a RIFI. De outro lado, nossos testes foram realizados de forma controlada, onde as amostras de soros de cães foram muito bem caracterizadas, uma vez que os grupos de cães infectados com as diferentes parasitoses (LVC, Babesia e doença de Chagas) foram confirmados por diferentes testes. Diante disto, considerando a ocorrência de sobreposição geográfica entre LV e outras parasitoses caninas comuns no Brasil (Barbosa-de-Deus et al. 2002), acreditamos que o padrão ouro utilizado pelo kit (RIFI) superestimou as amostras de cães com suspeita clínica.

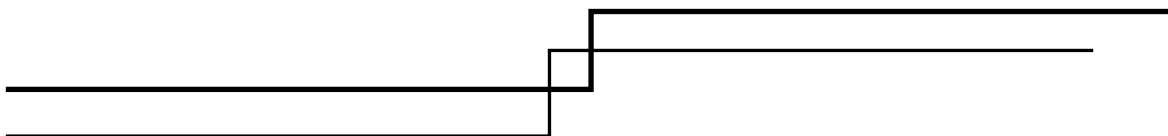
As proteínas recombinantes são, por outro lado, as melhores opções para o diagnóstico da LV, devido à sua alta especificidade e sensibilidade (Sivakumar et al. 2006, Abass et al. 2013). Com o advento da biologia molecular e da explosão de dados genômicos produzidos a partir das diferentes espécies de parasitos nas últimas décadas, foi possível a seleção de genes, clonagem e produção em larga escala das proteínas recombinantes de interesse (de Azevedo & Soares 2009). A vantagem da produção de antígenos recombinantes é que permite a obtenção de um antígeno com alto grau de pureza, produção a relativo baixo custo e permite a seleção de genes que não se conservam entre as espécies, conferindo alta especificidade ao teste o qual o utilize (Fernández-Robledo & Vasta 2010). O estudo aprofundado do genoma dos parasitos possibilitou, ainda, o desenvolvimento de ferramentas de bioinformática que permitissem a identificação e seleção de genes que codificam proteínas hipoteticamente

antigênicas, aumentando ainda mais a eficiência das proteínas recombinantes para o diagnóstico de diversas parasitoses (Larsen et al. 2006).

Este presente estudo levou a produção de uma nova proteína recombinante que, demonstrou ser um excelente candidato para o diagnóstico da LVC e LV humana, abrindo perspectivas para o desenvolvimento de novas tecnologias voltadas para o aperfeiçoamento e implementação de novos testes rápidos, práticos e baratos de diagnóstico. Nos dias correntes, o governo brasileiro tem implementado importantes iniciativas de apoio a atividades de pesquisa científica de alto impacto, a partir de diversas frentes de estratégias de políticas públicas tais como: Estratégia Nacional de Ciência, Tecnologia e Inovação (ENCTI) (MCTI 2012), o Plano Brasil Maior (PBM) (PIB 2014) e o Plano Nacional da Saúde (PNS) (Ministério da Saúde 2011), que estão direcionadas e comprometidas em contribuir com desenvolvimento de tecnologias na área da saúde e saneamento.

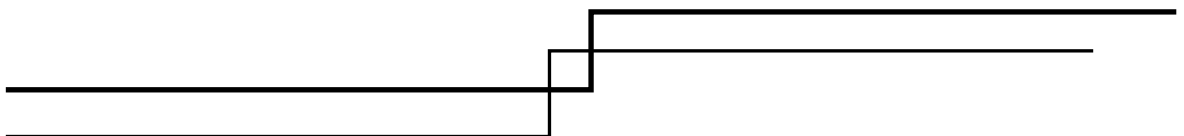
Diante da urgência de desenvolvimento de testes de diagnóstico confiáveis para o diagnóstico da LV no país, em função do anacronismo dos testes vigentes, nosso grupo de pesquisa do Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos têm focado na busca proteínas e peptídeos com excelente performance no diagnóstico das leishmanioses e da doença de Chagas, visando o desenvolvimento e melhoria dos testes diagnósticos para doenças parasitárias. Como perspectiva futura, visamos a produção de um antígeno multimérico, composto por diferentes proteínas e/ou epitopos de *Leishmania*, objetivando o desenvolvimento de um teste sorológico de melhor sensibilidade e especificidade, de maior importância, de modo que o teste seja capaz de chegar à população com facilidade, em todos os focos de leishmaniose, permitindo o devido controle dessa doença em expansão.

7. CONCLUSÃO





Nossos resultados permitiram concluir que a utilização de proteína constituída exclusivamente de motivos repetitivos de kinesina apresentou melhor performance diagnóstica quando comparada com a rK39 e o kit EIE-LVC, demonstrando seu potencial uso para o diagnóstico da LV humana e canina.

8. ANEXO



Anexo I. Patente gerada pelo projeto de mestrado

496

 INSTITUTO NACIONAL DE PROPRIEDADE INDUSTRIAL PROTOCOLO GEN. 19/12/2012 014120002971 16:17 DEMG  BR 10 2012 032499 7	< Uso exclusivo do INPI >
Espaço reservado ao protocolo	Espaço para etiqueta

DEPÓSITO DE PEDIDO DE PATENTE OU DE CERTIFICADO DE ADIÇÃO**Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:**

O requerente solicita a concessão de um privilégio na natureza e nas condições abaixo indicadas

1. Depositante (71):

- 1.1 Nome: Universidade Federal de Minas Gerais
 1.2 Qualificação: Instit. de Ensino e Pesquisa
 1.3 CNPJ/CPF: 17217985000104
 1.4 Endereço Completo: Av. Antonio Carlos, 6627 - Pampulha, Belo Horizonte - MG, Brasil
 1.5 CEP: 31270-901 1.6 Telefone: (31) 3409-4774 1.7 Fax: (31) 3409-6430
 1.8 E-mail: patentes@ctit.ufmg.br

 continua em folha anexa

- 2. Natureza:** Invenção Modelo de Utilidade Certificado de Adição

Escreva, obrigatoriamente, e por extenso, a Natureza desejada: Patente de Invenção

3. Título da Invenção ou Modelo de Utilidade ou Certificado de Adição(54):

PROCESSO DE PRODUÇÃO E USO DA PROTEÍNA rK39-KDDR E KIT PARA DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE

 continua em folha anexa

- 4. Pedido de Divisão:** do pedido Nº _____ Data de Depósito: _____

- 5. Prioridade:** interna unionista

O depositante reivindica a(s) seguinte(s):

Pais ou organização de origem	Número de depósito	Data do depósito

6. Inventor (72): Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seu(s) nome(s)

- 6.1 Nome: RICARDO TOSHIO FUJIWARA
 6.2 Qualificação: PROFESSOR 6.3 CPF: 171.267.248-70
 6.4 Endereço completo: RUA DESEMBARGADOR PAULA MOTA, 263, APTO. 1404, BAIRRO OURO PRETO, BELO HORIZONTE, MG
 6.5 CEP: 31.310-340 6.6 Telefone: 31 - 3409-4774 6.7 Fax: 31 - 3409-6430
 6.8 E-Mail: patentes@ctit.ufmg.br

 continua em folha anexa


Anexo II. Manual de Instrução do Kit EIE Leishmaniose Visceral Canina



EIE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA Bio-Manguinhos (USO VETERINÁRIO)

ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (EIE) PARA DIAGNÓSTICO DA
LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA
(material fornecido para 384 reações)

INDICAÇÃO DE USO

O Kit EIE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA Bio-Manguinhos é utilizado na detecção de anticorpos contra *Leishmania major like*, em soros ou plasmas de cães.

PRINCÍPIO DO TESTE

O ensaio imunoenzimático consiste na reação de anticorpos presentes nos soros ou plasmas de cães com antígenos solúveis e purificados de *Leishmania major like* obtidos a partir de cultura *in vitro*. Os antígenos obtidos são previamente adsorvidos nas cavidades de microplacas/ "strips" (fase sólida). A seguir, adicionam-se os soros controle positivo, negativo e as amostras, devidamente diluídos. Caso as amostras possuam anticorpos específicos, estes irão se ligar aos antígenos da fase sólida.

Na etapa seguinte, deve-se adicionar um conjugado específico, anti imunoglobulina, marcado com a enzima peroxidase. Na presença de anticorpos específicos, ocorrerá a ligação conjugado-anticorpo, que poderá ser evidenciada com a adição de uma substância cromógena (tetrametilbenzidina-TMB).

A peroxidase juntamente com o peróxido de hidrogênio formará um composto de coloração azul turquesa que ao adicionar-se o ácido sulfúrico, interrompe a reação e passa a apresentar uma coloração amarela, positivo (reagente). Nas cavidades que não houver anticorpos específicos, não haverá desenvolvimento de cor o que caracteriza uma reação negativa (não reagente). Os resultados podem ser avaliados por meio de um espectrofotômetro para microplaca em comprimento de onda de 450 nm.

2

ESQUEMA DO TESTE

Reagente



Não Reagente



MATERIAL FORNECIDO

Componentes	Apresentação
Diluyente Amostras/ Conjugado [5X]	02 frascos com 45 mL
Lecitina de leite	01 saco - 10 g
Tampão de lavagem [20X]	02 frascos com 60 mL
Diluyente do Substrato	01 frasco com 60 mL
Cromógeno (TMB)	01 frasco com 0,7 mL
Substrato H ₂ O ₂	01 frasco com 0,2 mL
Ácido Sulfúrico 2M	01 frasco com 30 mL
Controle Positivo	01 frasco com 0,25 mL
Controle Negativo	01 frasco com 0,25 mL
Conjugado	01 frasco com 0,4 mL
Molduras com 6 "strips dupla sensibilizadas"	04 unidades
Folhas adesivas	08 unidades
Manual de Instrução de Uso	01 unidade

MATERIAL COMPLEMENTAR NÃO FORNECIDO

- Água destilada;
- Vidraria básica em geral (tubos, pipetas, provetas, etc);
- Micropipetadores multicanal e monocanal ajustáveis e ponteiros descartáveis;
- Luvas descartáveis;
- Barquetes ou reservatórios;
- Estufa a 37 °C;
- Sistema de vácuo com pente de lavagem, pipeta Pasteur adaptada ou

3

lavador automático de microplacas;

- Hipoclorito de sódio a 2,5% ou água sanitária;
- Espectrofotômetro para leitura de microplacas, equipado com filtro de 450 nm.
- Balança semi-analítica;
- Caso utilize amostras em papel de filtro: picotador de 6 mm.

CONSERVAÇÃO E ESTOCAGEM DOS COMPONENTES

Manter entre 2° e 8°C: Diluyente de amostra/conjugado [5X], Lecitina de leite, Tampão de lavagem [20X], Diluyente do Substrato, Cromógeno (TMB), Substrato H₂O₂ e Ácido Sulfúrico 2M.

Manter a -20°C: Controle Positivo, Controle Negativo, Conjugado e "Strip" Sensibilizada.

Todos os componentes do kit devem ser conservados nas respectivas temperaturas indicadas em seus rótulos, desde o ato do recebimento até a validade definida na caixa principal do kit.

Obs.: De acordo com estudos realizados em Bio-Manguinhos, a temperatura de transporte, com bobinas de gelo reciclável, permite que o conjunto se mantenha em condições estáveis durante 24 a 36 horas.

CUIDADOS E PRECAUÇÕES

Somente para uso diagnóstico "in vitro".

Este conjunto diagnóstico contém produtos biológicos e químicos, podendo representar uma fonte de infecção. Portanto, ao manusear qualquer um dos reagentes desse conjunto, observar as precauções de biossegurança necessárias.

A qualidade dos resultados obtidos com este conjunto diagnóstico depende do cumprimento às boas práticas de laboratório, tais como:

- As amostras e os soros controles devem ser manipulados com cuidado;
- Homogeneizar as amostras e controles antes de usar;
- Utilizar equipamento de proteção individual (EPI), tais como luvas descartáveis, jaleco e protetor facial, em todas as etapas do teste.
- Desprezar ponteiros, luvas, pipetas de vidro, frascos, placas utilizadas, etc., em solução de hipoclorito de sódio a 2,5% ou água sanitária;
- Nunca misturar componentes de lotes diferentes;
- Aconselha-se só utilizar componentes do mesmo conjunto.

4

- Para evitar interferências, nunca tocar com os dedos na parte interna das strips;

- Cada strip só pode ser utilizada uma única vez;
- Soluções contendo TMB e/ou peroxidase são irritantes para pele e mucosas e não devem entrar em contato com metais;
- Não usar os componentes após sua data de vencimento;
- Utilizar frascos e vidrarias rigorosamente limpos, pois resíduos de detergentes e/ou substâncias oxidantes poderão interferir na reação.

PROCEDIMENTO DO TESTE

Os componentes do kit armazenados na temperatura de 2 a 8 °C, assim como os componentes armazenados na temperatura de -20 °C, soros controles e as strips sensibilizadas, devem ser retirados de sua temperatura de conservação antes do início do teste e utilizados, retornando-os à temperatura logo após o uso.

Importante: Retirar apenas a quantidade de "Strips" a serem utilizadas no teste.

O conjugado deve ser retirado de sua temperatura de conservação apenas no momento da sua utilização, sem a necessidade de descongelamento retornando para conservação imediatamente, após seu uso.

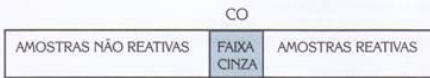
Importante: Este insumo não tolera variações de temperatura, evitar prolongar sua permanência fora da temperatura de -20 °C.

1- Preparo do diluyente de amostras/conjugado:

nº STRIPS duplas	nº REAÇÕES	Diluyente de Amostras/ Conjugado [5X]	Lecitina de leite (pesar)	H ₂ O destilada
01	Até 16	3 mL	0,3 g	12 mL
02	Até 32	6 mL	0,6 g	24 mL
03	Até 48	8 mL	0,8 g	32 mL
04	Até 64	10 mL	1 g	40 mL
05	Até 80	12 mL	1,2 g	48 mL
06	Até 96	14 mL	1,4 g	56 mL

2- Diluir em tubos, 5 µL dos controles e das amostras de soros ou plasmas de cães a serem analisadas, previamente homogeneizadas, em 500 µL do diluyente de amostra/conjugado (1:100)..

5



RESULTADOS

- **Amostras reagentes** = As que apresentarem densidade ótica igual ou superior ao *Cut-Off*.

- **Amostras não reagentes** = As que apresentarem densidade ótica inferior ao *Cut-Off*.

- **Amostras indeterminadas** = As que apresentarem densidade ótica entre o *cut-off* e a faixa cinza.

Obs. 1: recomendamos a repetição das amostras que apresentarem densidade ótica na "faixa cinza", considerada neste teste, entre o valor obtido para o *Cut-Off* e o valor obtido com a multiplicação deste por 1,2.

Obs. 2: mantendo-se as amostras na "faixa cinza" após a repetição, recomendamos a utilização de outras metodologias para confirmação deste resultado, que deverá ser designado como INDETERMINADO.

Obs.3: operador deverá observar os controles do teste, considerando que a DO obtida para o controle do conjugado (SS), não poderá ser superior a 1,5 x DO obtida para o soro controle negativo.

10

PROCEDIMENTO DO TESTE PARA AMOSTRAS COLHIDAS EM PAPEL FILTRO

1- Preparo do diluente de amostras/conjugado:

nº STRIPS duplas	nº REAÇÕES	Diluente de Amostras/Conjugado [5X]	Lecitina de leite (pesar)	H ₂ O destilada
01	Até 16	3 mL	0,3 g	12 mL
02	Até 32	6 mL	0,6 g	24 mL
03	Até 48	9 mL	0,9 g	32 mL
04	Até 64	10 mL	1 g	40 mL
05	Até 80	12 mL	1,2 g	48 mL
06	Até 96	14 mL	1,4 g	56 mL

2 - Em tubos previamente descontaminados, limpos e secos, colocar 2 picotes (6 mm) de cada amostra coletada em papel de filtro Whatman nº1 ou 1 picote (6 mm) para papel filtro Klabin 80 e nos tubos correspondentes.

3 - Adicionar 400 µL de diluente de amostra/conjugado, por tubo, para as amostras coletadas em papel Whatman nº1 ou 500 µL de diluente para amostras coletadas em papel Klabin 80.

4 - Colocar a estante de tubos em agitador rotacional para eluir as amostras coletadas em papel de filtro. Deixar eluir durante a noite na geladeira ou agitar 1 hora no agitador, rotação de 50 Rpm a 125 Rpm.

5 - Diluir em tubos, 5 µL dos soros controle positivo e negativo, previamente homogeneizados, em 500 µL do diluente de amostra/conjugado (1:100).

6 - Distribuir na placa sensibilizada 100 µL dos controles e das amostras eluídas da seguinte forma: na coluna 1 fileira "A", "B", o soro controle positivo, na "C", "D", "E" o controle negativo, na "F" e "G", somente o diluente da amostra/ conjugado (sem soro). Nos outros orifícios, distribuir 100 µL das amostras teste já eluídas, seguindo o protocolo abaixo:

11

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CP	Amostra 2	Amostra 10	Amostra 18	Amostra 26	Amostra 34	Amostra 42	Amostra 50	Amostra 58	Amostra 66	Amostra 74	Amostra 82
B	CP	Amostra 3	Amostra 11	Amostra 19	Amostra 27	Amostra 35	Amostra 43	Amostra 51	Amostra 59	Amostra 67	Amostra 75	Amostra 83
C	CN	Amostra 4	Amostra 12	Amostra 20	Amostra 28	Amostra 36	Amostra 44	Amostra 52	Amostra 60	Amostra 68	Amostra 76	Amostra 84
D	CN	Amostra 5	Amostra 13	Amostra 21	Amostra 29	Amostra 37	Amostra 45	Amostra 53	Amostra 61	Amostra 69	Amostra 77	Amostra 85
E	CN	Amostra 6	Amostra 14	Amostra 22	Amostra 30	Amostra 38	Amostra 46	Amostra 54	Amostra 62	Amostra 70	Amostra 78	Amostra 86
F	SS	Amostra 7	Amostra 15	Amostra 23	Amostra 31	Amostra 39	Amostra 47	Amostra 55	Amostra 63	Amostra 71	Amostra 79	Amostra 87
G	SS	Amostra 8	Amostra 16	Amostra 24	Amostra 32	Amostra 40	Amostra 48	Amostra 56	Amostra 64	Amostra 72	Amostra 80	Amostra 88
H		Amostra 1	Amostra 9	Amostra 17	Amostra 25	Amostra 33	Amostra 41	Amostra 49	Amostra 57	Amostra 65	Amostra 73	Amostra 81

CP = Controle Positivo | CN = Controle Negativo | SS = Sem Soro

7- Selar os "strips" com a folha adesiva e incubar a 37°C ± 1 °C por 30 min.

Obs.: Caso ocorra variação significativa de temperatura durante o período de incubação, o técnico deverá invalidar o ensaio.

8- Preparo do tampão de lavagem:

Obs.: este tampão é sujeito a cristalização, caso isso ocorra, coloque em banheira a 37 °C até a dissolução dos cristais.

a) volumes necessários quando se utiliza sistema de vácuo com pente de lavagem ou pipeta Pasteur:

nº STRIPS duplas	nº REAÇÕES	Tampão de Lavagem [20X]	H ₂ O destilada
01	Até 16	2 mL	38 mL
02	Até 32	3 mL	57 mL
03	Até 48	4 mL	76 mL
04	Até 64	5 mL	95 mL
05	Até 80	7 mL	133 mL
06	Até 96	8 mL	152 mL

12

b) volumes necessários quando se utiliza lavadores automáticos:

nº STRIPS duplas	nº PLACAS	Tampão de Lavagem [20X]	H ₂ O destilada
Até 3	1/2	20 mL	380 mL
Até 6	1	25 mL	475 mL
Até 9	1 1/2	30 mL	570 mL
Até 12	2	35 mL	665 mL
Até 15	2 1/2	40 mL	760 mL
Até 18	3	45 mL	855 mL
Até 21	3 1/2	50 mL	950 mL
Até 24	4	55 mL	1045 mL

9- Descolar cuidadosamente a folha adesiva, aspirar o conteúdo e lavar 6 vezes com tampão de lavagem (200 µL/orifício). Aguardar 30 a 60 segundos entre cada lavagem.

10- Diluir o conjugado no diluente de amostra/conjugado, preparado anteriormente.

Preparo do conjugado:

nº STRIPS duplas	nº REAÇÕES	Diluente de Amostras/Conjugado diluído	Conjugado
01	Até 16	5 mL	5 µL
02	Até 32	5 mL	5 µL
03	Até 48	10 mL	10 µL
04	Até 64	10 mL	10 µL
05	Até 80	15 mL	15 µL
06	Até 96	15 mL	15 µL

11- Homogeneizar e distribuir 100 µL da diluição do conjugado em cada orifício dos strips.

12- Selar "os strips" com folha adesiva e incubar a 37°C ± 1 °C por 30 min. Aspirar e lavar conforme descrito no item 9.

13- Preparar o substrato alguns minutos antes do uso, preferencialmente em frasco escuro (ao abrigo da luz).

13

14- Preparo do substrato:

nº STRIPS duplas	nº REAÇÕES	Diluíente do Substrato	Cromógeno TMB	Substrato H ₂ O ₂
01	Até 16	2,5 mL	25 µL	5 µL
02	Até 32	4 mL	40 µL	8 µL
03	Até 48	6 mL	60 µL	12 µL
04	Até 64	8 mL	80 µL	16 µL
05	Até 80	10 mL	100 µL	20 µL
06	Até 96	12 mL	120 µL	24 µL

15- Distribuir 100 µL do substrato rapidamente em todos os orifícios.

16- Deixar à temperatura ambiente, ao abrigo da luz, durante 30 min.

17- Bloquear a reação adicionando 50 µL de ácido sulfúrico 2M em todos os orifícios. Em seguida, proceder a leitura das microplacas.

LEITURA

Ligar o espectrofotômetro para microplacas, equipado com filtro de 450 nm para leitura e sem a utilização de filtro de referência (620-630nm). Após alguns minutos, para estabilização do feixe de luz, zerar o aparelho no ar (sem a microplaca de teste) e, em seguida, iniciar a leitura.

Obs.: Caso a leitura seja feita com filtro de 450 nm, tendo como referência outro de 620-630 nm, todas as densidades óticas (DO) ficarão abaixo do esperado, prejudicando o cálculo do *cut-off* e causando a ocorrência de resultados falso-positivos no ensaio.

Para o cálculo do *cut-off* deve-se calcular a média das densidades óticas (DO) dos controles positivos baixo e dos controles negativos dentro da faixa de validação do teste. Caso seja encontrada alguma densidade ótica fora da faixa de validação do teste, esta deverá ser descartada e a média deverá ser realizada utilizando-se as demais densidades óticas, conforme demonstrado nos exemplos abaixo.

VALIDAÇÃO DO TESTE

Considerar o teste válido quando os valores da densidade ótica estiverem na faixa descrita a seguir:

14

- Controle Positivo: $\geq 0,500$ de DO
 - Controle Negativo: $\geq 0,050 \leq 0,120$ de DO
 Repetir o ensaio se os valores citados estiverem fora do limite.

Cálculo do *Cut-Off* (CO)

$$CO = XCN \times 3$$

XCN = média da densidade ótica dos orifícios do controle negativo.

DO = densidade ótica

CN = controle negativo

Exemplo 1:

$$\frac{DO\ CN1 + DO\ CN2 + DO\ CN3}{3} = \frac{0,100 + 0,098 + 0,101}{3} = 0,099$$

$$DO\ CN1 = 0,100$$

$$DO\ CN2 = 0,098$$

$$DO\ CN3 = 0,101$$

$$CO = XCN \times 3 = 0,099 \times 3 = 0,297$$

Exemplo 2:

$$\frac{DO\ CN1 + DO\ CN2}{2} = \frac{0,110 + 0,090}{2} = 0,100$$

$$DO\ CN1 = 0,110$$

$$DO\ CN2 = 0,090$$

~~DO CN3 = 0,134~~ Fora da faixa de validação do teste = descartar.

$$CO = XCN \times 3 = 0,100 \times 3 = 0,300$$

Exemplo 3:

$$\frac{DO\ CN1 + DO\ CN2}{2} = \frac{0,110 + 0,080}{2} = 0,095$$

$$DO\ CN1 = 0,110$$

$$DO\ CN2 = 0,080$$

~~DO CN3 = 0,040~~ Fora da faixa de validação do teste = descartar.

$$CO = XCN \times 3 = 0,095 \times 3 = 0,285$$

Cálculo da Faixa Cinza (FC):

$$FC = CO \times 1,2$$

Exemplo: $CO = 0,322$

$$FC = CO \times 1,2$$

$$FC = 0,322 \times 1,2$$

$$FC = 0,386$$

15

CO

AMOSTRAS NÃO REATIVAS	FAIXA CINZA	AMOSTRAS REATIVAS
-----------------------	-------------	-------------------

RESULTADOS

- **Amostras reagentes** = As que apresentarem densidade ótica igual ou superior ao *Cut-Off*.

- **Amostras não reagentes** = As que apresentarem densidade ótica inferior ao *Cut-Off*.

- **Amostras indeterminadas** = As que apresentarem densidade ótica entre o *cut-off* e a faixa cinza.

Obs. 1: recomendamos a repetição das amostras que apresentarem densidade ótica na "faixa cinza", considerada neste teste, entre o valor obtido para o *Cut-Off* e o valor obtido com a multiplicação deste por 1,2.

Obs. 2: mantendo-se as amostras na "faixa cinza" após a repetição, recomendamos a utilização de outras metodologias para confirmação deste resultado, que deverá ser designado como INDETERMINADO.

Obs.3: operador deverá observar os controles do teste, considerando que a DO obtida para o controle do conjugado (SS), não poderá ser superior a 1,5 x DO obtida para o soro controle negativo.

16

ÍNDICE DE SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE

Estudos preliminares de padronização do teste foram realizados por Bio-Manguinhos em conjunto com o Instituto Adolfo Lutz (IAL-SP). Foram identificados 130 cães com suspeita clínica de Leishmania Visceral Americana (LVA) dos quais foram coletadas amostras de soro e amostras coletadas em papel de filtro. Estas amostras foram testadas tanto na IFI quanto no EIE. Para os cálculos de sensibilidade e especificidade a IFI foi considerado o teste padrão ("Gold Standard"), e os seguintes índices foram encontrados: Sensibilidade para amostras de soro dos cães: 94,54% e especificidade de 91,76%. Já para as amostras coletadas em papel de filtro os índices de sensibilidade e especificidade foram de 79,45% e 90,24% respectivamente.

ÍNDICE DE REPRODUTIBILIDADE, REPETITIVIDADE E ESTABILIDADE

Diversos estudos foram realizados em nossos laboratórios utilizando amostras conhecidas e caracterizadas como padrão, sob os aspectos de reprodutibilidade e repetitividade. As conclusões nos permitiram determinar um período mínimo de 6 meses de validade para o produto, quando acondicionado conforme as recomendações do Manual de Instruções de Uso. Durante este período o produto manteve suas características e seus padrões de qualidade.

17

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALVES, W.A. BEVILACQUA, P.D. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da Leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. Cad.S.Pub. RJ; 2004; 20(1)jan-fev: 259-265.
2. ASFORD, D.A. BADARÓ, R. EULALIO, C. Et Al. Studies on the control of visceral leishmaniasis: validation of the falcon assay screening test-enzyme-linked immunosorbant assay (FASTEIE) for field diagnosis of canine visceral leishmaniasis. Amer.J.Trop.Med. Hyg.1993;Jan;48(1):1-8.
3. BADARÓ, R. DUARTE, M.I.S. Leishmaniose Visceral. In: VERONESI, R. FOCACCIA, R. Tratado de Infectologia. 2ed. 2002; 1254-79
4. BRADFORD, M.M. A rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 1976; 72.
5. BRASIL. Fundação Nacional de Saúde. Leishmaniose Visceral. Guia de Vigilância Epidemiológica. 2003; 527-539.
6. CARVALHO, F.A.A. CHAREST, H. TAVARES, C.A.P. Et Al. Diagnosis of American Visceral Leishmaniasis in human and dogs using the recombinant Leishmania donovan A2 antigen. Diag. Microb. And Infect. Disease. 2002; 43: 289-295
7. CUBA, C.A. MARSDEN, PH.D. BARRETO, A. C. ROCHA, R. SAMPAIO, R.R. PATZIAFF, L. Diagnóstico parasitológico e imunológico de Leishmaniose tegumentar americana. Biol. Of sanit. Param.1980; 89: 95-208.
8. MEDRONHO, R.A. Et Al. Epidemiologia.2003. Cap 18;p 259-270.
9. MONTOYA, A. CASTELL, J.V. Long Term Storage of Peroxidase-Labeled Immunoglobulins for use in enzyme immunoassay. J. Immun. Meth.1978; 99: 13-20.
10. MORENO, J. ALVAR, J. Canine Leishmaniasis: Epidemiological risk and the experimental model. Trends in Parasitology. 2002; 18(9): 399-405.

11. NAKANE, PK. KAWAVI, A. Peroxidase Labeled Antibody a new Method of Conjugation. J. Histochem Cytochem.1974; 22(12);1084-1091.
12. PAPPAS, M.G.HAJKOSWSKI, R. HOCKMEYER, W.T. Dot enzyme linked immunosorbant assay (DOT- LISA): a micro technique for the rapid diagnosis of visceral leishmaniasis. J. Immunol.Method. 1983; Nov 11; 64(1-2): 205-14.
13. REITHINGER, R. DAVIES, C.R. Canine Leishmaniasis: novel strategies for control. Trends in Parasitology. 2002; 18(7): 289-290.

Licenciado no Min. da Agricultura sob o nº 8968/ 04, em 22/09/2004.
Resp. Téc. Méd. Vet.: Adenauer Cruz Teixeira | CRMV-RJ nº 1.359

ASSISTÊNCIA AOS USUÁRIOS

Orientações técnicas adicionais a respeito deste produto poderão ser obtidas junto a:
Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos | Bio-Manguinhos FIOCRUZ
Av. Brasil, 4365 - Manguinhos - CEP 21040-900 | Rio de Janeiro-RJ
CNPJ 33.781.055/0015-30
SAC: 08000.210.310 | sac.reativos@bio.fiocruz.br | www.bio.fiocruz.br
Indústria Brasileira

**ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (EIE) PARA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA
MODELO DE PROTOCOLO**

Produto: _____ Partida nº: _____ Venc.: ____/____/____
Seção: _____ EIE nº: _____ Data: ____/____/____
Início: ____ h ____ min Término: ____ h ____ min

Disposição das amostras:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

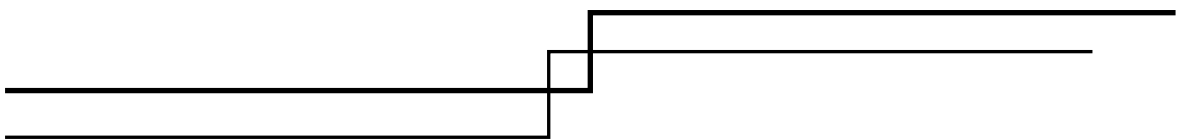
Densidade ótica das amostras:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Cálculo do Cut-Off (CO) $CO = \frac{DO.CN1 + DO.CN2 + DO.CN3}{3} = \frac{XCN}{3} = X$
 $CO = XCN \times 2$
 XCN = média da densidade ótica dos orifícios do controle negativo.
 X = médias das DO
 DO = densidade ótica.
 CN = controle negativo.

Técnico Responsável: _____
 Observações: _____

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



- Abass E, Bollig N, Reinhard K, Camara B, Mansour D, Visekruna A, Lohoff M, Steinhoff U 2013. rKLO8, a Novel *Leishmania donovani* - Derived Recombinant Immunodominant Protein for Sensitive Detection of Visceral Leishmaniasis in Sudan. *PLoS Negl Trop Dis* 7.
- Abeijon C, Campos-Neto A 2013. Potential non-invasive urine-based antigen (protein) detection assay to diagnose active visceral leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis* 7: e2161.
- Abeijon C, Kashino SS, Silva FO, Costa DL, Fujiwara RT, Costa CHN, Campos-Neto A 2012. Identification and diagnostic utility of *Leishmania infantum* proteins found in urine samples from patients with visceral leishmaniasis. *Clin. Vaccine Immunol.* 19: 935–943.
- Akhoundi B, Mohebbali M, Babakhan L, Edrissian G-H, Eslami M-B, Keshavarz H, Malekafzali H 2010. Rapid detection of human *Leishmania infantum* infection: a comparative field study using the fast agglutination screening test and the direct agglutination test. *Travel Med Infect Dis* 8: 305–310.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403–410.
- Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, Boer M den, the WHO Leishmaniasis Control Team 2012. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PLoS ONE* 7: e35671.
- Alves WA, Bevilacqua PD 2004. Quality of diagnosis of canine visceral leishmaniasis in epidemiological surveys: an epidemic in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, 1993-1997. *Cadernos de Saúde Pública* 20: 259–265.
- Amin ER el, Wright EP, Abdel Rahman AM, Kolk A, Laarman JJ, Pondman KW 1986. Serodiagnosis of Sudanese visceral and mucosal leishmaniasis: comparison of ELISA--immunofluorescence and indirect haemagglutination. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 80: 271–274.
- Attar ZJ, Chance ML, el-Safi S, Carney J, Azazy A, El-Hadi M, Dourado C, Hommel M 2001. Latex agglutination test for the detection of urinary antigens in visceral leishmaniasis. *Acta Trop.* 78: 11–16.
- Azevedo WF de, Soares MBP 2009. Selection of targets for drug development against protozoan parasites. *Curr Drug Targets* 10: 193–201.
- Babiker ZOE, Davidson R, Mazinda C, Kipngetich S, Ritmeijer K 2007. Utility of lymph node aspiration in the diagnosis of visceral leishmaniasis in Sudan. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 76: 689–693.
- Badaró R, Benson D, Eulálio MC, Freire M, Cunha S, Netto EM, Pedral-Sampaio D, Madureira C, Burns JM, Houghton RL, David JR, Reed SG 1996. rK39: a cloned antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral leishmaniasis. *J. Infect. Dis.* 173: 758–761.

- Badaró R, Reed SG, Carvalho EM 1983. Immunofluorescent antibody test in American visceral leishmaniasis: sensitivity and specificity of different morphological forms of two *Leishmania* species. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 32: 480–484.
- Barbosa-de-Deus R, Luiz dos Mares-Guia M, Zacarias Nunes A, Morais Costa K, Goncalves Junqueira R, Mayrink W, Genaro O, Pereira Tavares CA 2002. *Leishmania* major-Like Antigen for Specific and Sensitive Serodiagnosis of Human and Canine Visceral Leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol* 9: 1361–1366.
- Bhatia A, Daifalla NS, Jen S, Badaro R, Reed SG, Skeiky YA 1999. Cloning, characterization and serological evaluation of K9 and K26: two related hydrophilic antigens of *Leishmania chagasi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 102: 249–261.
- Blaineau C, Tessier M, Dubessay P, Tasse L, Crobu L, Pagès M, Bastien P 2007. A Novel Microtubule-Depolymerizing Kinesin Involved in Length Control of a Eukaryotic Flagellum. *Current Biology* 17: 778–782.
- Boelaert M, Criel B, Leeuwenburg J, Damme W Van, Ray D Le, Stuyft P Van der 2000. Visceral leishmaniasis control: a public health perspective. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 94: 465–471.
- Boelaert M, Rijal S, Regmi S, Singh R, Karki B, Jacquet D, Chappuis F, Campino L, Desjeux P, Ray D Le, Koirala S, Stuyft P Van der 2004. A comparative study of the effectiveness of diagnostic tests for visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 70: 72–77.
- Brandonisio O, Fumarola L, Maggi P, Cavaliere R, Spinelli R, Pastore G 2002. Evaluation of a rapid immunochromatographic test for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 21: 461–464.
- Braz RFS, Nascimento ET, Martins DRA, Wilson ME, Pearson RD, Reed SG, Jeronimo SMB 2002. The sensitivity and specificity of *Leishmania chagasi* recombinant K39 antigen in the diagnosis of American visceral leishmaniasis and in differentiating active from subclinical infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 67: 344–348.
- Brito ME, Mendonça MG, Gomes YM, Jardim ML, Abath FG 2000. Identification of potentially diagnostic *Leishmania braziliensis* antigens in human cutaneous leishmaniasis by immunoblot analysis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 7: 318–321.
- Bruijn MH de, Barker DC 1992. Diagnosis of New World leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. *Acta Trop.* 52: 45–58.
- Burns JM, Shreffler WG, Benson DR, Ghalib HW, Badaro R, Reed SG 1993. Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. *PNAS* 90: 775–779.

Burns JM, Shreffler WG, Rosman DE, Sleath PR, March CJ, Reed SG 1992. Identification and synthesis of a major conserved antigenic epitope of *Trypanosoma cruzi*. *PNAS* 89: 1239–1243.

Carvalho SFG, Lemos EM, Corey R, Dietze R 2003. Performance of Recombinant K39 Antigen in the Diagnosis of Brazilian Visceral Leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 68: 321–324.

Chappuis F, Rijal S, Soto A, Menten J, Boelaert M 2006. A meta-analysis of the diagnostic performance of the direct agglutination test and rK39 dipstick for visceral leishmaniasis. *BMJ* 333: 723.

Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, Peeling RW, Alvar J, Boelaert M 2007. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control?. *Nat. Rev. Microbiol.* 5: 873–882.

Choudhry A, Guru PY, Saxena RP, Tandon A, Saxena KC 1990. Enzyme-linked immunosorbent assay in the diagnosis of kala-azar in Bhadohi (Varanasi), India. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 84: 363–366.

Coppel RL, Cowman AF, Anders RF, Bianco AE, Saint RB, Lingelbach KR, Kemp DJ, Brown GV 1984. Immune sera recognize on erythrocytes *Plasmodium falciparum* antigen composed of repeated amino acid sequences. *Nature* 310: 789–792.

Costa MM, Penido M, Santos MS dos, Doro D, Freitas E de, Michalick MSM, Grimaldi G, Gazzinelli RT, Fernandes AP 2012. Improved canine and human visceral leishmaniasis immunodiagnosis using combinations of synthetic peptides in enzyme-linked immunosorbent assay. *PLoS Negl Trop Dis* 6: e1622.

Cota GF, Sousa MR de, Demarqui FN, Rabello A 2012. The diagnostic accuracy of serologic and molecular methods for detecting visceral leishmaniasis in HIV infected patients: meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis* 6: e1665.

Cowman AF, Saint RB, Coppel RL, Brown GV, Andere RR, Kemp DJ 1985. Conserved sequences flank variable tandem repeats in two α -antigen genes of *Plasmodium falciparum*. *Cell* 40: 775–783.

Cunningham J, Hasker E, Das P, El Safi S, Goto H, Mondal D, Mbuchi M, Mukhtar M, Rabello A, Rijal S, Sundar S, Wasunna M, Adams E, Menten J, Peeling R, Boelaert M, WHO/TDR Visceral Leishmaniasis Laboratory Network 2012. A global comparative evaluation of commercial immunochromatographic rapid diagnostic tests for visceral leishmaniasis. *Clin. Infect. Dis.* 55: 1312–1319.

Dantas-Torres F, Brandão-Filho SP 2006. Geographical expansion of visceral leishmaniasis in the State of Pernambuco. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 39: 352–356.

- Dantas-Torres F, Brito MEF de, Brandão-Filho SP 2006. Seroepidemiological survey on canine leishmaniasis among dogs from an urban area of Brazil. *Vet. Parasitol.* 140: 54–60.
- Desjeux P 1996. Leishmaniasis: Public health aspects and control. *Clinics in Dermatology* 14: 417–423.
- Desjeux P 2004a. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 27: 305–318.
- Desjeux P 2004b. Leishmaniasis. *Nat. Rev. Microbiol.* 2: 692.
- Dosztányi Z, Csizmok V, Tompa P, Simon I 2005. IUPred: web server for the prediction of intrinsically unstructured regions of proteins based on estimated energy content. *Bioinformatics* 21: 3433–3434.
- Dubessay P, Blaineau C, Bastien P, Tasse L, Dijk J Van, Crobu L, Pagès M 2006. Cell cycle-dependent expression regulation by the proteasome pathway and characterization of the nuclear targeting signal of a *Leishmania major* Kin-13 kinesin. *Molecular Microbiology* 59: 1162–1174.
- Elmahallawy EK, Martinez AS, Rodriguez-Granger J, Hoyos-Mallecot Y, Agil A, Mari JMN, Fernandez JG 2014. Diagnosis of leishmaniasis. *The Journal of Infection in Developing Countries* 8: 961–972.
- El-Sayed NM, Myler PJ, Blandin G, Berriman M, Crabtree J, Aggarwal G, Caler E, Renauld H, Worthey EA, Hertz-Fowler C, Ghedin E, Peacock C, Bartholomeu DC, Haas BJ, Tran A-N, Wortman JR, Alsmark UCM, Angiuoli S, Anupama A, Badger J, Bringaud F, Cadag E, Carlton JM, Cerqueira GC, Creasy T, Delcher AL, Djikeng A, Embley TM, Hauser C, Ivens AC, Kummerfeld SK, Pereira-Leal JB, Nilsson D, Peterson J, Salzberg SL, Shallom J, Silva JC, Sundaram J, Westenberger S, White O, Melville SE, Donelson JE, Andersson B, Stuart KD, Hall N 2005. Comparative Genomics of Trypanosomatid Parasitic Protozoa. *Science* 309: 404–409.
- Ewing B, Green P 1998. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Res.* 8: 186–194.
- Ewing B, Hillier L, Wendl MC, Green P 1998. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res.* 8: 175–185.
- Farajnia S, Darbani B, Babaei H, Alimohammadian MH, Mahboudi F, Gavvani AM 2008. Development and evaluation of *Leishmania infantum* rK26 ELISA for serodiagnosis of visceral leishmaniasis in Iran. *Parasitology* 135: 1035–1041.
- Fernández-Robledo JA, Vasta GR 2010. Production of recombinant proteins from protozoan parasites. *Trends Parasitol.* 26: 244–254.
- Fleiss JL, Spitzer RL, Endicott J, Cohen J 1972. Quantification of agreement in multiple psychiatric diagnosis. *Arch. Gen. Psychiatry* 26: 168–171.

Flemmings BJ, Pappas MG, Keenan CM, Hockmeyer WT 1984. Immune complex decomplexation of canine sera for use in a complement-fixation test for diagnosis of visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 33: 553–559.

França-Silva JC, Costa RT da, Siqueira AM, Machado-Coelho GLL, Costa CA da, Mayrink W, Vieira EP, Costa JS, Genaro O, Nascimento E 2003. Epidemiology of canine visceral leishmaniosis in the endemic area of Montes Claros Municipality, Minas Gerais State, Brazil. *Vet. Parasitol.* 111: 161–173.

Goto Y, Carter D, Guderian J, Inoue N, Kawazu S-I, Reed SG 2010. Upregulated Expression of B-Cell Antigen Family Tandem Repeat Proteins by *Leishmania* Amastigotes. *Infect. Immun.* 78: 2138–2145.

Goto Y, Coler RN, Guderian J, Mohamath R, Reed SG 2006. Cloning, Characterization, and Serodiagnostic Evaluation of *Leishmania infantum* Tandem Repeat Proteins. *Infect. Immun.* 74: 3939–3945.

Goto Y, Coler RN, Reed SG 2007. Bioinformatic Identification of Tandem Repeat Antigens of the *Leishmania donovani* Complex. *Infect. Immun.* 75: 846–851.

Goto Y, Omachi S, Sanjoba C, Matsumoto Y 2014. Elevation of Serum B Cell-Activating Factor Levels During Visceral Leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*

Griensven J van, Diro E 2012. Visceral leishmaniasis. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 26: 309–322.

Grimaldi G, Schottelius J 2001. Leishmaniases--their relationships to monoxenous and dixenous trypanosomatids. *Med. Microbiol. Immunol.* 190: 3–8.

Harith AE, Kolk AH, Kager PA, Leeuwenburg J, Faber FJ, Muigai R, Kiugu S, Laarman JJ 1987. Evaluation of a newly developed direct agglutination test (DAT) for serodiagnosis and sero-epidemiological studies of visceral leishmaniasis: comparison with IFAT and ELISA. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 81: 603–606.

Harith AE, Kolk AH, Kager PA, Leeuwenburg J, Muigai R, Kiugu S, Kiugu S, Laarman JJ 1986. A simple and economical direct agglutination test for serodiagnosis and sero-epidemiological studies of visceral leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 80: 583–536.

Herwaldt BL 1999. Leishmaniasis. *Lancet* 354: 1191–1199.

Hockmeyer WT, Wellde BT, Sabwa CL, Smith DH, Rees PH, Kager PA 1984. A complement fixation test for visceral leishmaniasis using homologous parasite antigen I. *Ann Trop Med Parasitol* 78: 489–493.

Ho M, Leeuwenburg J, Mbugua G, Wamachi A, Voller A 1983. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for field diagnosis of visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 32: 943–946.

- Ho EA, Soong TH, Li Y 1948. Comparative merits of sternum, spleen and liver punctures in the study of human visceral leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 41: 629–636.
- Ibañez CF, Affranchino JL, Macina RA, Reyes MB, Leguizamon S, Camargo ME, Aslund L, Pettersson U, Frasc AC 1988. Multiple Trypanosoma cruzi antigens containing tandemly repeated amino acid sequence motifs. *Mol. Biochem. Parasitol.* 30: 27–33.
- Iqbal J, Hira PR, Saroj G, Philip R, Al-Ali F, Madda PJ, Sher A 2002. Imported visceral leishmaniasis: diagnostic dilemmas and comparative analysis of three assays. *J. Clin. Microbiol.* 40: 475–479.
- Jelinek T, Eichenlaub S, Löscher T 1999. Sensitivity and specificity of a rapid immunochromatographic test for diagnosis of visceral leishmaniasis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 18: 669–670.
- Jeronimo SMB, Teixeira MJ, Sousa A de Q, Thielking P, Pearson RD, Evans TG 2000. Natural History of Leishmania (Leishmania) chagasi infection in Northeastern Brazil: Long-Term Follow-Up. *Clin Infect Dis.* 30: 608–609.
- Kager PA, Rees PH 1983. Splenic aspiration. Review of the literature. *Trop Geogr Med* 35: 111–124.
- Kane MM, Mosser DM 2000. Leishmania parasites and their ploys to disrupt macrophage activation. *Curr. Opin. Hematol.* 7: 26–31.
- Kemp DJ, Coppel RL, Anders RF 1987. Repetitive Proteins and Genes of Malaria. *Annual Review of Microbiology* 41: 181–181.
- Killick Kendrick R, Rioux JA 1991. Intravectorial cycle of Leishmania in sandflies. *Ann Parasitol Hum Comp* 66 Suppl 1: 71–74.
- Koenen M, Scherf A, Mercereau O, Langsley G, Sibilli L, Dubois P, Pereira da Silva L, Müller-Hill B 1984. Human antisera detect a Plasmodium falciparum genomic clone encoding a nonapeptide repeat. *Nature* 311: 382–385.
- Kotera Y, Fontenot JD, Pecher G, Metzgar RS, Finn OJ 1994. Humoral Immunity against a Tandem Repeat Epitope of Human Mucin MUC-1 in Sera from Breast, Pancreatic, and Colon Cancer Patients. *Cancer Res* 54: 2856–2860.
- Kumar R, Pai K, Pathak K, Sundar S 2001. Enzyme-linked immunosorbent assay for recombinant K39 antigen in diagnosis and prognosis of Indian visceral leishmaniasis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 8: 1220–1224.

- Kurkjian KM, Vaz LE, Haque R, Cetre-Sossah C, Akhter S, Roy S, Steurer F, Amann J, Ali M, Chowdhury R, Wagatsuma Y, Williamson J, Crawford S, Breiman RF, Maguire JH, Bern C, Secor WE 2005. Application of an improved method for the recombinant k39 enzyme-linked immunosorbent assay to detect visceral leishmaniasis disease and infection in Bangladesh. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 12: 1410–1415.
- Lainson R, Rangel EF 2005. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 100: 811–827.
- Lainson R, Shaw JJ 1978. Epidemiology and ecology of leishmaniasis in Latin-America. *Nature* 273: 595–600.
- Lainson R, Shaw JJ 1987. Evolution, classification and geographical distribution. : 1–120.
- Lainson R, Shaw JJ 2005. New World Leishmaniasis. In: *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections*, John Wiley & Sons, Ltd, pp. 313–349.
- Larsen JEP, Lund O, Nielsen M 2006. Improved method for predicting linear B-cell epitopes. *Immunome Res* 2: 2.
- Linnet K, Bossuyt PMM, Moons KGM, Reitsma JB 2012. Quantifying the Accuracy of a Diagnostic Test or Marker. *Clinical Chemistry* 58: 1292–1301.
- Lukes J, Mauricio IL, Schönian G, Dujardin J-C, Soteriadou K, Dedet J-P, Kuhls K, Tintaya KWQ, Jirků M, Chocholová E, Haralambous C, Pratlong F, Oborník M, Horák A, Ayala FJ, Miles MA 2007. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104: 9375–9380.
- Magalhaes PA, Mayrink W, Costa CA da, Melo MN, Dias M, Batista SM, Michalick MS, Williams P 1980. [Kala-azar in the Rio Doce, Minas Gerais area. Results of prophylactic measures]. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 22: 197–202.
- Maia C, Campino L 2008. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Vet. Parasitol.* 158: 274–287.
- Maia-Elkhoury ANS, Alves WA, Sousa-Gomes ML de, Sena JM de, Luna EA 2008. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. *Cad Saude Publica* 24: 2941–2947.
- Maia-Elkhoury ANS, Lucena, F., Sousa-Gomes, M. L., Alves, W. A., Paz, L. 2007. Co-infecção da leishmaniose visceral e AIDS no Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 40: 124.
- Mary C, Lamouroux D, Dunan S, Quilici M 1992. Western blot analysis of antibodies to *Leishmania infantum* antigens: potential of the 14-kD and 16-kD antigens for diagnosis and epidemiologic purposes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 47: 764–771.

Maurício IL, Stothard JR, Miles MA 2000. The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitol. Today (Regul. Ed.)* 16: 188–189.

MCTI 2012. Estratégia Nacional de Ciência, Tecnologia e Inovação 2012 – 2015 - Balanço das Atividades Estruturantes 2011, Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI).

Mendes T a. O, Lobo FP, Rodrigues TS, Rodrigues-Luiz GF, daRocha WD, Fujiwara RT, Teixeira SMR, Bartholomeu DC 2013. Repeat-Enriched Proteins Are Related to Host Cell Invasion and Immune Evasion in Parasitic Protozoa. *Mol Biol Evol* 30: 951–963.

Menezes-Souza D, Mendes TA de O, Gomes M de S, Reis-Cunha JL, Nagem RAP, Carneiro CM, Coelho EAF, Galvão LM da C, Fujiwara RT, Bartholomeu DC 2014a. Epitope mapping of the HSP83.1 protein of *Leishmania braziliensis* discloses novel targets for immunodiagnosis of tegumentary and visceral clinical forms of leishmaniasis. *Clin. Vaccine Immunol.* 21: 949–959.

Menezes-Souza D, Mendes TA de O, Nagem RAP, Santos TT de O, Silva ALT, Santoro MM, Carvalho SFG de, Coelho EAF, Bartholomeu DC, Fujiwara RT 2014b. Mapping B-cell epitopes for the peroxidoxin of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and its potential for the clinical diagnosis of tegumentary and visceral leishmaniasis. *PLoS ONE* 9: e99216.

Ministério da Saúde 2006. *Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral*. Ministério da Saúde Brasília.

Ministério da Saúde 2010. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Boletim Epidemiológico, 2010; 2:11-13.

Ministério da Saúde 2011. Plano Nacional de Saúde – PNS : 2012-2015 / Ministério da Saúde. Secretaria-Executiva. Subsecretaria de Planejamento e Orçamento. – Brasília : Ministério da Saúde, 2011. 114 p. : il. – (Série B. Textos Básicos de Saúde).

Mohapatra TM, Singh DP, Sen MR, Bharti K, Sundar S 2010. Comparative evaluation of rK9, rK26 and rK39 antigens in the serodiagnosis of Indian visceral leishmaniasis. *J Infect Dev Ctries* 4: 114–117.

Mollick JA, Hodi FS, Soiffer RJ, Nadler LM, Dranoff G 2003. MUC1-like tandem repeat proteins are broadly immunogenic in cancer patients. *Cancer Immun.* 3: 3.

Mosser DM, Brittingham A 1997. *Leishmania*, macrophages and complement: a tale of subversion and exploitation. *Parasitology* 115 Suppl: S9–S23.

Nguyen T-T, Zhou M, Ruttayaporn N, Nguyen QD, Nguyen VK, Goto Y, Suzuki Y, Kawazu S, Inoue N 2014. Diagnostic value of the recombinant tandem repeat antigen TeGM6-4r for surra in water buffaloes. *Veterinary Parasitology* 201: 18–23.

- Oliveira TMF de S, Furuta PI, Carvalho D de, Machado RZ 2008. A study of cross-reactivity in serum samples from dogs positive for *Leishmania* sp., *Babesia canis* and *Ehrlichia canis* in enzyme-linked immunosorbent assay and indirect fluorescent antibody test. *Rev Bras Parasitol Vet* 17: 7–11.
- Oskam L, Nieuwenhuijs JL, Hailu A 1999. Evaluation of the direct agglutination test (DAT) using freeze-dried antigen for the detection of anti-*Leishmania* antibodies in stored sera from various patient groups in Ethiopia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 93: 275–277.
- Palatnik-de-Sousa CB, Santos WR dos, França-Silva JC, Costa RT da, Reis AB, Palatnik M, Mayrink W, Genaro O 2001. Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 65: 510–517.
- Pappas MG, Cannon LT, Hockmeyer WT, Smith DH 1985. Evaluation of complement fixation procedures for the diagnosis of visceral leishmaniasis. *Ann Trop Med Parasitol* 79: 147–151.
- PIB P de I do B 2014. Brasil Maior: Inovar para competir. Competir para crescer - Plano 2011/2014.
- Qu JQ, Zhong L, Masoom-Yasinzai M, Abdur-Rab M, Aksu HS, Reed SG, Chang KP, Gilman-Sachs A 1994. Serodiagnosis of Asian leishmaniasis with a recombinant antigen from the repetitive domain of a *Leishmania* kinesin. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 88: 543–545.
- Rajasekariah GH, Ryan JR, Hillier SR, Yi LP, Stiteler JM, Cui L, Smithyman AM, Martin SK 2001a. Optimisation of an ELISA for the serodiagnosis of visceral leishmaniasis using in vitro derived promastigote antigens. *J. Immunol. Methods* 252: 105–119.
- Rajasekariah GH, Ryan JR, Hillier SR, Yi LP, Stiteler JM, Cui L, Smithyman AM, Martin SK 2001b. Optimisation of an ELISA for the serodiagnosis of visceral leishmaniasis using in vitro derived promastigote antigens. *J. Immunol. Methods* 252: 105–119.
- Ravindran R, Anam K, Bairagi BC, Saha B, Pramanik N, Guha SK, Goswami RP, Banerjee D, Ali N 2004. Characterization of immunoglobulin G and its subclass response to Indian kala-azar infection before and after chemotherapy. *Infect. Immun.* 72: 863–870.
- Reis AB, Martins-Filho OA, Teixeira-Carvalho A, Carvalho MG, Mayrink W, França-Silva JC, Giunchetti RC, Genaro O, Corrêa-Oliveira R 2006. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. *Res. Vet. Sci.* 81: 68–75.

Rijal S, Boelaert M, Regmi S, Karki BMS, Jacquet D, Singh R, Chance ML, Chappuis F, Hommel M, Desjeux P, Stuyft P Van der, Ray D Le, Koirala S 2004. Evaluation of a urinary antigen-based latex agglutination test in the diagnosis of kala-azar in eastern Nepal. *Trop. Med. Int. Health* 9: 724–729.

Ritmeijer K, Melaku Y, Mueller M, Kipngetich S, O'keeffe C, Davidson RN 2006. Evaluation of a new recombinant K39 rapid diagnostic test for Sudanese visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 74: 76–80.

Romero HD, Silva L de A, Silva-Vergara ML, Rodrigues V, Costa RT, Guimarães SF, Alecrim W, Moraes-Souza H, Prata A 2009. Comparative Study of Serologic Tests for the Diagnosis of Asymptomatic Visceral Leishmaniasis in an Endemic Area. *Am J Trop Med Hyg* 81: 27–33.

Ross R 1903. Further notes on leishman's bodies. *Br Med J* 2: 1401.

Ryan JR, Smithyman AM, Rajasekariah G-H, Hochberg L, Stiteler JM, Martin SK 2002. Enzyme-linked immunosorbent assay based on soluble promastigote antigen detects immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies in sera from cases of visceral and cutaneous leishmaniasis. *J. Clin. Microbiol.* 40: 1037–1043.

Sacks D, Kamhawi S 2001. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. *Annu. Rev. Microbiol.* 55: 453–483.

Santos-Gomes G, Gomes-Pereira S, Campino L, Araújo MD, Abranches P 2000. Performance of immunoblotting in diagnosis of visceral Leishmaniasis in human immunodeficiency virus-Leishmania sp.-coinfecting patients. *J. Clin. Microbiol.* 38: 175–178.

Sarkari B, Chance M, Hommel M 2002. Antigenuria in visceral leishmaniasis: detection and partial characterisation of a carbohydrate antigen. *Acta Trop.* 82: 339–348.

Schaefer KU, Kurtzhals JA, Gachihi GS, Muller AS, Kager PA 1995. A prospective sero-epidemiological study of visceral leishmaniasis in Baringo District, Rift Valley Province, Kenya. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 89: 471–475.

Schlein Y 1993. Leishmania and Sandflies: interactions in the life cycle and transmission. *Parasitol. Today (Regul. Ed.)* 9: 255–258.

Siddig M, Ghalib H, Shillington DC, Petersen EA 1988. Visceral leishmaniasis in the Sudan: comparative parasitological methods of diagnosis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 82: 66–68.

Sievers F, Higgins DG 2014. Clustal Omega, accurate alignment of very large numbers of sequences. *Methods Mol. Biol.* 1079: 105–116.

Silva, F. S. 2007. Patologia e patogênese da leishmaniose visceral canina. *Rev Trop Cienc Agr Biol* 1: 20–31.

Singh S, Gilman-Sachs A, Chang KP, Reed SG 1995. Diagnostic and prognostic value of K39 recombinant antigen in Indian leishmaniasis. *J. Parasitol.* 81: 1000–1003.

Sivakumar R, Sharma P, Chang K-P, Singh S 2006. Cloning, expression, and purification of a novel recombinant antigen from *Leishmania donovani*. *Protein Expr. Purif.* 46: 156–165.

Smith DH, Welde BT, Sabwa CL, Reardon MJ, Hockmeyer WT 1984. A complement fixation test for visceral leishmaniasis using homologous parasite antigen II. Results in an endemic area in Kenya. *Ann Trop Med Parasitol* 78: 495–500.

Sousa-Gomes ML de, Maia-Elkhoury ANS, Pelissari DM, Junior L, De FEF, Sena JM de, Cechinel MP 2011. Coinfecção *Leishmania*-HIV no Brasil: aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais. *Epidemiologia e Serviços de Saúde* 20: 519–526.

Stuart K, Brun R, Croft S, Fairlamb A, Gürtler RE, McKerrow J, Reed S, Tarleton R 2008. Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. *Journal of Clinical Investigation* 118: 1301–1310.

Sundar S, Pai K, Sahu M, Kumar V, Murray HW 2002. Immunochromatographic strip-test detection of anti-K39 antibody in Indian visceral leishmaniasis. *Ann Trop Med Parasitol* 96: 19–23.

Sundar S, Reed SG, Singh VP, Kumar PC, Murray HW 1998. Rapid accurate field diagnosis of Indian visceral leishmaniasis. *The Lancet* 351: 563–565.

Takagi H, Islam MZ, Itoh M, Islam AU, Saifuddin Ekram ARM, Hussain SM, Hashiguchi Y, Kimura E 2007. Short report: production of recombinant kinesin-related protein of *Leishmania donovani* and its application in the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 76: 902–905.

Thuy NT, Goto Y, Lun Z-R, Kawazu S-I, Inoue N 2012. Tandem repeat protein as potential diagnostic antigen for *Trypanosoma evansi* infection. *Parasitol Res* 110: 733–739.

Valiente-Gabioud AA, Veaute C, Perrig M, Galan-Romano FS, Sferco SJ, Marcipar IS 2011. Effect of repetitiveness on the immunogenicity and antigenicity of *Trypanosoma cruzi* FRA protein. *Exp. Parasitol.* 127: 672–679.

Vilaplana C, Blanco S, Domínguez J, Giménez M, Ausina V, Tural C, Muñoz C 2004. Noninvasive method for diagnosis of visceral leishmaniasis by a latex agglutination test for detection of antigens in urine samples. *J. Clin. Microbiol.* 42: 1853–1854.

Welch RJ, Anderson BL, Litwin CM 2008. Rapid immunochromatographic strip test for detection of anti-K39 immunoglobulin G antibodies for diagnosis of visceral leishmaniasis. *Clin. Vaccine Immunol.* 15: 1483–1484.

WHO 2010. Control of the leishmaniasis. *World Health Organ Tech Rep Ser*: xii – xiii, 1–186, back cover.

WHO 2013. Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases: second WHO report on neglected tropical diseases. *WHO/Department of control of neglected tropical diseases, chapter 3.9, page 67-71*.

WHO 2014. Leishmaniasis. *Fact sheet*, 375.

Zanette MF, Lima VMF de, Laurenti MD, Rossi CN, Vides JP, Vieira RF da C, Biondo AW, Marcondes M, Zanette MF, Lima VMF de, Laurenti MD, Rossi CN, Vides JP, Vieira RF da C, Biondo AW, Marcondes M 2014. Serological cross-reactivity of *Trypanosoma cruzi*, *Ehrlichia canis*, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Babesia canis* to *Leishmania infantum chagasi* tests in dogs. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 47: 105–107.

Zijlstra EE, Ali MS, el-Hassan AM, el-Toum IA, Satti M, Ghalib HW, Kager PA 1992. Kala-azar: a comparative study of parasitological methods and the direct agglutination test in diagnosis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 86: 505–507.