

**ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE UM TESTE SOROLÓGICO COMERCIAL
ELISA-Vetlisa/BIOCLIN(rK39) E UM ENSAIO BASEADO EM GLUTAMINA
SINTETASE PARA DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA**

SARA TORRES

**ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE UM TESTE SOROLÓGICO COMERCIAL
ELISA-Vetlisa/BIOCLIN(rK39) E UM ENSAIO BASEADO EM GLUTAMINA SINTETASE
PARA DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA**

SARA TORRES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza, da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Kelvinson Fernandes Viana

SARA TORRES

**ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE UM TESTE SOROLÓGICO COMERCIAL
ELISA-Vetlisa/BIOCLIN(rK39) E UM ENSAIO BASEADO EM GLUTAMINA SINTETASE
PARA DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza, da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Kelvinson Fernandes Viana
UNILA

Prof. Dr. Rodrigo Dian Aguiar Soares
UFOP

Prof. Dr. Flávio Tavares
UNILA

Foz do Iguaçu, 26 de Janeiro de 2026.

Catálogo elaborado pelo Setor de Tratamento da Informação
Catálogo de Publicação na Fonte. UNILA - BIBLIOTECA LATINO-AMERICANA - PTI

T693a

Torres, Sara.

Análise comparativa entre um teste sorológico comercial ELISA-Vetlisa/BIOCLIN (rK39) e um ensaio baseado em glutamina sintetase para diagnóstico da leishmaniose visceral canina / Sara Torres. – Foz do Iguaçu, 2026.

81 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Integração Latino-Americana. Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza. Programa de Pós-Graduação em Biociências. Foz do Iguaçu-PR, 2026.

Orientador: Kelvinson Fernandes Viana.

1. Leishmaniose visceral canina. 2. Sorodiagnóstico. 3. Ensaio imunoenzimático (ELISA). 4. Glutamina sintetase. 5. Proteína C Reativa (PCR). I. Viana, Kelvinson Fernandes. II. Título.

CDU 619:616.993.161

AGRADECIMENTOS

A Deus;

Aos familiares e amigos que me acompanharam, me apoiaram e confiaram em mim durante todo o processo;

Ao Orientador: Prof. Dr. Kelvinson Fernandes Viana;

A banca examinadora;

A Universidade Federal da Integração Latino - Americana;

Ao Programa de Pós-Graduação em Biociências;

A Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biociências

A Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Biociências;

Ao PROBIO (Programa de Bolsa Institucional);

Ao CNPQ (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, através do PIBPG - Programa Institucional de Bolsas de Pós-Graduação).

Até aqui, tudo Deus, daqui em diante também.

RESUMO

A leishmaniose visceral canina (LVC) é uma zoonose de grande relevância em saúde pública, amplamente distribuída em áreas endêmicas, cujo diagnóstico é desafiado pela diversidade de manifestações clínicas, pela complexidade da resposta imune dos cães infectados e pelas limitações associadas aos métodos diagnósticos disponíveis. A identificação precisa de animais infectados é fundamental para o manejo clínico e para as estratégias de vigilância e controle da doença. Este estudo realizou uma análise comparativa entre dois testes sorológicos utilizados no diagnóstico da LVC: o teste comercial ELISA-Vetlisa/BIOCLIN (rK39) e um ensaio experimental baseado na enzima glutamina sintetase (GS) de *Leishmania infantum*. Foram analisadas amostras séricas de cães provenientes de um laboratório parceiro, obtidas de animais submetidos à investigação diagnóstica para leishmaniose visceral canina e acompanhadas de informações clínicas compatíveis com a doença, incluindo perda de peso, alterações cutâneas, linfadenomegalia e manifestações oftalmológicas. No fluxo diagnóstico adotado, as amostras foram inicialmente avaliadas pelo teste imunocromatográfico rápido DPP® leishmaniose visceral canina (bio-manguinhos/fiocruz) como triagem sorológica. Posteriormente, as amostras foram analisadas pelo teste comercial ELISA-Vetlisa/BIOCLIN (rK39) e pelo ensaio experimental ELISA-GS. A detecção molecular por PCR foi realizada como método de referência para a identificação do DNA parasitário. O estudo avaliou o desempenho diagnóstico dos métodos por meio da análise de sensibilidade, especificidade, valores preditivos e curva ROC, considerando a complexidade da resposta imune e as limitações próprias das abordagens sorológicas e moleculares. A metodologia incluiu a padronização do ELISA-GS, a análise das absorbâncias, a identificação de concordâncias e discordâncias entre os métodos e a avaliação do impacto do rendimento e da qualidade da proteína recombinante expressa, fatores críticos para o desempenho de ensaios imunodiagnósticos baseados em antígenos recombinantes. Os resultados demonstraram que o teste comercial ELISA-Vetlisa/BIOCLIN (rK39) apresentou alta sensibilidade diagnóstica (100%) e especificidade de 90,3%, evidenciando elevada capacidade de detecção de anticorpos em amostras classificadas como positivas pela PCR. A presença de amostras soropositivas com PCR não detectável sugere persistência de anticorpos após exposição prévia ao parasita, variabilidade clínica entre os animais infectados e limitações da PCR quando aplicada a amostras com baixa carga parasitária, especialmente em sangue periférico. O ensaio ELISA-GS apresentou sensibilidade de 83,3% e especificidade de 100%, com ocorrência de dois falsos negativos e ausência de falsos positivos, indicando elevada capacidade de exclusão de animais não infectados, porém menor eficiência na detecção de todos os casos positivos quando comparado ao teste comercial. A análise das curvas ROC evidenciou maior capacidade discriminatória do teste comercial em relação ao ensaio experimental. A glutamina sintetase apresentou desempenho moderado como alvo para diagnóstico sorológico, possivelmente devido à sua natureza predominantemente intracelular e à limitada imunogenicidade humoral detectável. Os resultados reforçam a importância da interpretação integrada de métodos sorológicos e moleculares no diagnóstico da LVC e destacam a relevância do uso combinado de estratégias diagnósticas para aumentar a confiabilidade da detecção da infecção em cães provenientes de áreas endêmicas.

Palavras-chave: leishmaniose visceral canina; diagnóstico sorológico; ELISA; glutamina sintetase; PCR.

RESUMEN

La leishmaniasis visceral canina (LVC) es una zoonosis de gran relevancia para la salud pública, ampliamente distribuida en zonas endémicas, cuyo diagnóstico se ve dificultado por la diversidad de manifestaciones clínicas, la complejidad de la respuesta inmunitaria de los perros infectados y las limitaciones de los métodos diagnósticos disponibles. La identificación precisa de los animales infectados es fundamental para el manejo clínico y para las estrategias de vigilancia y control de la enfermedad. Este estudio realizó un análisis comparativo entre dos pruebas serológicas utilizadas en el diagnóstico de la LVC: la prueba comercial ELISA-Vetlisa/BIOCLIN (rK39) y un ensayo experimental basado en la enzima glutamina sintetasa (GS) de *Leishmania infantum*. Se analizaron muestras de suero de perros procedentes de un laboratorio colaborador; estas muestras se obtuvieron de animales sometidos a investigación diagnóstica de leishmaniasis visceral canina y presentaban información clínica compatible con la enfermedad, como pérdida de peso, alteraciones cutáneas, linfadenomegalia y manifestaciones oftalmológicas. En el flujo de trabajo diagnóstico adoptado, las muestras se evaluaron inicialmente mediante la prueba inmunocromatográfica rápida DPP® para leishmaniasis visceral canina (Bio-Manguinhos/Fiocruz) como prueba de cribado serológico. Posteriormente, las muestras se analizaron mediante la prueba ELISA-Vetlisa/BIOCLIN comercial (rK39) y el ensayo ELISA-GS experimental. La detección molecular por PCR se realizó como método de referencia para la identificación del ADN parasitario. El estudio evaluó el rendimiento diagnóstico de los métodos a través de la sensibilidad, la especificidad, los valores predictivos y el análisis de la curva ROC, considerando la complejidad de la respuesta inmune y las limitaciones inherentes de los enfoques serológicos y moleculares. La metodología incluyó la estandarización del ELISA-GS, el análisis de absorbancia, la identificación de concordancias y discordancias entre los métodos y la evaluación del impacto del rendimiento y la calidad de la proteína recombinante expresada, factores críticos para el rendimiento de los ensayos inmunodiagnósticos basados en antígenos recombinantes. Los resultados demostraron que la prueba comercial ELISA-Vetlisa/BIOCLIN (rK39) mostró una alta sensibilidad diagnóstica (100%) y una especificidad del 90,3%, lo que demuestra una alta capacidad para detectar anticuerpos en muestras clasificadas como positivas por PCR. La presencia de muestras seropositivas con PCR indetectable sugiere la persistencia de anticuerpos después de una exposición previa al parásito, variabilidad clínica entre animales infectados y limitaciones de la PCR cuando se aplica a muestras con baja carga parasitaria, especialmente en sangre periférica. El ensayo ELISA-GS mostró una sensibilidad del 83,3% y una especificidad del 100%, con dos falsos negativos y ningún falso positivo, lo que indica una alta capacidad para excluir animales no infectados, pero una menor eficiencia en la detección de todos los casos positivos en comparación con la prueba comercial. El análisis de la curva ROC mostró una mayor capacidad discriminatoria de la prueba comercial en comparación con el ensayo experimental. La glutamina sintetasa mostró un rendimiento moderado como objetivo para el diagnóstico serológico, posiblemente debido a su naturaleza predominantemente intracelular y a su limitada inmunogenicidad humoral detectable. Los resultados refuerzan la importancia de la interpretación integrada de los métodos serológicos y moleculares en el diagnóstico de la leishmaniasis visceral canina (LVC) y resaltan la relevancia del uso combinado de estrategias diagnósticas para aumentar la fiabilidad en la detección de la infección en perros de zonas endémicas.

Palabras clave: leishmaniasis visceral canina; diagnóstico serológico; ELISA; glutamina sintetasa; PCR.

ABSTRACT

Canine visceral leishmaniasis (CVL) is a zoonosis of great public health relevance, widely distributed in endemic areas, whose diagnosis is challenged by the diversity of clinical manifestations, the complexity of the immune response of infected dogs, and the limitations associated with available diagnostic methods. Accurate identification of infected animals is fundamental for clinical management and for disease surveillance and control strategies. This study performed a comparative analysis between two serological tests used in the diagnosis of CVL: the commercial ELISA-Vetlisa/BIOCLIN test (rK39) and an experimental assay based on the glutamine synthetase (GS) enzyme of *Leishmania infantum*. Serum samples from dogs from a partner laboratory were analyzed; these samples were obtained from animals undergoing diagnostic investigation for canine visceral leishmaniasis and accompanied by clinical information compatible with the disease, including weight loss, skin changes, lymphadenomegaly, and ophthalmological manifestations. In the adopted diagnostic workflow, samples were initially evaluated using the DPP® canine visceral leishmaniasis rapid immunochromatographic test (Bio-Manguinhos/Fiocruz) as a serological screening. Subsequently, samples were analyzed using the commercial ELISA-Vetlisa/BIOCLIN test (rK39) and the experimental ELISA-GS assay. Molecular detection by PCR was performed as the reference method for identifying parasitic DNA. The study evaluated the diagnostic performance of the methods through sensitivity, specificity, predictive values, and ROC curve analysis, considering the complexity of the immune response and the inherent limitations of serological and molecular approaches. The methodology included standardization of the ELISA-GS, absorbance analysis, identification of concordances and discordances between methods, and evaluation of the impact of yield and quality of the expressed recombinant protein, critical factors for the performance of immunodiagnostic assays based on recombinant antigens. The results demonstrated that the commercial ELISA-Vetlisa/BIOCLIN (rK39) test showed high diagnostic sensitivity (100%) and specificity of 90.3%, demonstrating a high capacity for detecting antibodies in samples classified as positive by PCR. The presence of seropositive samples with undetectable PCR suggests persistence of antibodies after previous exposure to the parasite, clinical variability among infected animals, and limitations of PCR when applied to samples with low parasite load, especially in peripheral blood. The ELISA-GS assay showed a sensitivity of 83.3% and specificity of 100%, with two false negatives and no false positives, indicating a high capacity for excluding uninfected animals, but lower efficiency in detecting all positive cases when compared to the commercial test. The ROC curve analysis showed a greater discriminatory capacity of the commercial test compared to the experimental assay. Glutamine synthetase showed moderate performance as a target for serological diagnosis, possibly due to its predominantly intracellular nature and limited detectable humoral immunogenicity. The results reinforce the importance of the integrated interpretation of serological and molecular methods in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis (CVL) and highlight the relevance of the combined use of diagnostic strategies to increase the reliability of detecting infection in dogs from endemic areas.

Key words: canine visceral leishmaniasis; serological diagnosis; ELISA; glutamine synthetase; PCR.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Ciclo de vida da <i>Leishmania spp.</i>	22
Figura 2 – Representação esquemática da resposta imune na Leishmaniose subclínica canina	30
Figura 3 – Representação esquemática da resposta imune na Leishmaniose clínica canina	31
Figura 4 - Análise por SDS-PAGE da expressão e purificação da Glutamina Sintetase recombinante de <i>Leishmania infantum</i> em sistema heterólogo de <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	56
Figura 5 - Gráfico de dispersão do ensaio baseado em Glutamina Sintetase	60
Figura 6 - Gráfico de dispersão do teste sorológico comercial ELISA-rK39	61
Figura 7 - Curva ROC	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Comparação entre o kit comercial, o ensaio baseado em GS e PCR	57
Tabela 2 – Tabela de contingência do ELISA-rK39 em relação à PCR (padrão ouro)	58
Tabela 3 - Tabela de contingência do ELISA-GS em relação à PCR (padrão ouro)	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ILACVN	Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza
UNILA	Universidade Federal da Integração Latino-Americana
ELISA	Ensaio Imunoenzimático de absorção (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)
DTNs	Doenças Tropicais Negligenciadas
FeL	Leishmaniose Felina
OMS	Organização Mundial da Saúde
LC	Leishmaniose Cutânea
LMC	Leishmaniose Mucocutânea
LV	Leishmaniose Visceral
GS	Glutamina Sintetase
PCR	Polymerase Chain Reaction
ROS	Espécies reativas de oxigênio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.2 OBJETIVOS	14
2 REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1 ASPECTOS GERAIS E DIVERSIDADE DE HOSPEDEIROS DAS LEISHMANIOSES NO CONTEXTO DA SAÚDE PÚBLICA	16
2.2 O CICLO BIOLÓGICO DA LEISHMANIA: EPIDEMIOLOGIA, DINÂMICA PARASITÁRIA E RESPOSTA IMUNE DOS HOSPEDEIROS	21
2.2.1 <i>Ciclo Biológico</i>	21
2.2.2 <i>Epidemiologia</i>	25
2.2.3 <i>Resposta imune dos hospedeiros</i>	28
2.3 DIAGNÓSTICO, TRATAMENTO E PREVENÇÃO	32
2.3.1 <i>Diagnóstico</i>	32
2.3.2 <i>Tratamento</i>	35
2.3.3 <i>Prevenção</i>	36
2.4 A IMPORTÂNCIA DA GLUTAMINA SINTETASE (GS) NO CICLO DA LEISHMANIA E SUA RELEVÂNCIA PARA O DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO	39
2.5 NOVAS PERSPECTIVAS PARA O DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA	42
3 METODOLOGIA	46
3.1. COLETA E PREPARO DAS AMOSTRAS DE SANGUE	46
3.2 EXPRESSÃO DA GLUTAMINA SINTETASE	46
3.3 PADRONIZAÇÃO DO ELISA-GS	47
3.3.1 <i>Sensibilização da microplaca com antígeno GS</i>	48
3.3.2 <i>Bloqueio de placa</i>	49
3.3.3 <i>Preparação das amostras e controles</i>	49
3.3.4 <i>Controle de qualidade das placas e definição da diluição do conjugado</i>	49
3.3.5 <i>Execução do ensaio ELISA-GS</i>	50
3.3.6 <i>Leitura dos resultados</i>	50
3.4 TESTE SOROLÓGICO COMERCIAL ELISA-rK39	50
3.4.1 <i>Princípio do ensaio</i>	50
3.4.2 <i>Diluição das amostras e preparo dos reagentes</i>	51
3.4.3 <i>Procedimento do ensaio imunoenzimático</i>	51
3.4.4 <i>Verificação da validade do ensaio</i>	52
3.4.5 <i>Cálculo do ponto de corte (cut-off) e índices das amostras</i>	52
3.4.6 <i>Considerações finais sobre o método</i>	52
3.4.7 <i>Análises Estatísticas</i>	53
3.4.8 <i>Questões éticas</i>	53
3.5 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)	53
3.5.1 <i>Extração de ácidos nucleicos</i>	54
3.5.2 <i>Preparação da reação de PCR em tempo real</i>	54

3.5.3 Condições de amplificação e leitura.....	54
3.5.4 Interpretação dos resultados.....	54
4 RESULTADOS.....	56
4.1 EXPRESSÃO DA GLUTAMINA SINTETASE (GS).....	56
4.2 AMOSTRAS VERDADEIRAS POSITIVAS E NEGATIVAS COM BASE NO PCR..	57
4.3 PADRONIZAÇÃO DO ELISA-GS.....	60
4.4 DESEMPENHO DO TESTE COMERCIAL (ELISA-rK39).....	61
4.5 SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE.....	62
4.6 CURVA ROC.....	62
5 DISCUSSÃO.....	65
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	72
REFERÊNCIAS.....	73

1 INTRODUÇÃO

As Leishmanioses estão entre as principais doenças tropicais mais negligenciadas do mundo, configurando um grave problema de saúde pública, especialmente em países em desenvolvimento (WHO, 2024; PAREYN et al., 2025). Trata-se de uma zoonose causada pela infecção de protozoários do gênero *Leishmania* e transmitida pela picada do inseto flebotomíneo infectado (*Lutzomyia*, principalmente *Lutzomyia longipalpis*, no caso da Leishmaniose Visceral Canina) (READY, 2014; CARDOSO et al., 2021). A importância do controle das Leishmanioses para a saúde pública é fundamental, considerando que o Brasil responde por aproximadamente 90% dos casos de Leishmaniose Visceral na América Latina, segundo dados do Ministério da Saúde (BRASIL, 2022; ARAÚJO et al., 2025).

No cão, hospedeiro intermediário principal da Leishmaniose Visceral Canina (LVC) em ambiente urbano (SOLANO-GALLEGO et al., 2017; SEGARRA et al., 2018), a doença pode se manifestar de forma assintomática ou apresentar sintomas clínicos inespecíficos como: emagrecimento, dermatopatias, linfadenomegalia (aumento dos linfonodos), onicogribose (alongamento e espessamento das unhas) e sinais oculares (CIARAMELLA et al., 1997; ALEXANDRE-PIRES et al., 2010). A presença de cães assintomáticos com carga parasitária significativa representa um desafio adicional para o controle da doença, uma vez que esses animais permanecem infectantes para os vetores, contribuindo silenciosamente para a disseminação da leishmaniose em áreas endêmicas (BORJA et al., 2016; SCORZA et al., 2021). Devido a complexidade do quadro clínico, o diagnóstico precoce é essencial para o controle da zoonose e com isso evidencia a necessidade de serem utilizados métodos diagnósticos cada vez mais sensíveis e específicos para identificar com precisão os animais infectados (SOLANO-GALLEGO et al., 2011; ANDRONIC et al., 2023). A utilização de métodos diagnósticos com baixa acurácia pode resultar tanto na eutanásia indevida de animais falsamente positivos quanto na manutenção de cães falsamente negativos no ciclo de transmissão, comprometendo estratégias de vigilância e controle (PEREIRA et al., 2020; CARDOSO et al., 2021).

Atualmente são utilizados como métodos diagnósticos da Leishmaniose Visceral Canina, técnicas parasitológicas, moleculares e sorológicas. Os métodos parasitológicos consistem na punção da medula óssea ou linfonodos para a visualização do parasita, são altamente específicos, porém, possuem baixa sensibilidade,

principalmente nos estágios iniciais da infecção ou em cães oligossintomáticos (MARY et al., 2004; SOLANO-GALLEGO et al., 2017). Em contrapartida, os testes moleculares, como a PCR em tempo real, são altamente específicos e sensíveis mas apresentam alto custo e demandam estruturas de laboratório e tecnologias avançadas, inviabilizando o uso em intervenções de vigilância em larga escala (MARY et al., 2004; FERREIRA et al., 2022). Diante do contexto exposto, os testes sorológicos são mais práticos e acessíveis para triagem e diagnóstico em campo, sendo amplamente utilizados em campanhas de controle da LVC (SOLANO-GALLEGO et al., 2011).

O ensaio Imunoenzimático de absorção (ELISA - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) é baseado na detecção de anticorpos específicos contra antígenos do parasita, mas a eficácia pode variar de acordo com o estágio da infecção e o tipo de antígeno utilizado (PEREIRA et al., 2020; ANDRONIC et al., 2023). Antígenos convencionais, frequentemente derivados de extratos totais ou proteínas altamente conservadas, como a rk39 e rk28, apresentam limitações relacionadas à ocorrência de reações cruzadas e à baixa sensibilidade em animais subclínicos ou em fases iniciais da infecção (PEREIRA et al., 2020; MAIA; CAMPINO, 2018). Essas limitações reforçam a necessidade de investigar novos alvos antigênicos capazes de melhorar a acurácia diagnóstica e reduzir interferências imunológicas. Por conta disso, o objetivo deste trabalho é analisar o desempenho diagnóstico de dois testes sorológicos, o teste comercial: ELISA-rK39 e o ensaio baseado na detecção de anticorpos contra a Glutamina Sintetase de *Leishmania infantum*.

A Leishmaniose Visceral Canina (LVC) representa um desafio expressivo para a saúde pública, especialmente no Brasil, que concentra a maior parte dos casos da América Latina e enfrenta dificuldades persistentes nos programas de vigilância e controle da doença (READY, 2014; CARDOSO et al., 2021; PAREYN et al., 2025). O diagnóstico precoce e preciso é um dos principais pilares para redução da transmissão e tomada de decisões sanitárias, uma vez que o cão doméstico constitui o principal reservatório urbano de *Leishmania infantum*, inclusive em animais assintomáticos que desempenham papel crítico na disseminação do parasita em áreas endêmicas (SOLANO-GALLEGO et al., 2017; SEGARRA et al., 2018; SCORZA et al., 2021). No entanto, os métodos diagnósticos atualmente empregados apresentam limitações significativas, como baixa sensibilidade em fases iniciais da infecção, reações cruzadas, dificuldade de diferenciar infecção ativa de memória imunológica e restrições no uso em larga escala, fato que pode resultar em falsos negativos e falsos positivos, comprometendo estratégias de controle e

decisões como eutanásia ou manutenção de cães infectados no ciclo de transmissão (PEREIRA et al., 2020; ANDRONIC et al., 2023; CARDOSO et al., 2021).

Nesse cenário, a Glutamina Sintetase emerge como um antígeno promissor, por ser uma enzima essencial no metabolismo nitrogenado de *Leishmania*, envolvida em processos fundamentais para a sobrevivência intracelular do parasita, incluindo adaptação metabólica, manutenção da homeostase celular e resistência ao estresse oxidativo (KUMAR et al., 2020; PAIVA-CAVACO et al., 2021; BRITO; SOUZA; SERAFIM, 2023). Evidências recentes indicam que a GS é diferencialmente expressa em fases críticas da infecção e pode estar associada à virulência e persistência tecidual do parasita, configurando-se como um alvo potencial para aplicações diagnósticas inovadoras (LIMA-JUNIOR et al., 2022; SILVA-SANTOS; FERREIRA, 2024).

Diante disso, surge a necessidade de avaliar comparativamente o desempenho diagnóstico de um ensaio experimental ELISA baseado na detecção de anticorpos anti-GS frente a testes sorológicos comerciais utilizados rotineiramente. Considerando a complexidade epidemiológica da LVC e as limitações observadas nos métodos tradicionais, formula-se o seguinte problema de pesquisa: “Os testes sorológicos comerciais atualmente empregados apresentam desempenho diagnóstico adequado para identificação de cães infectados em diferentes estágios clínicos, ou um ensaio baseado na Glutamina Sintetase pode demonstrar maior sensibilidade e especificidade, contribuindo para o diagnóstico precoce e para o controle epidemiológico da Leishmaniose?”

Assim, investigar novos antígenos capazes de aprimorar a acurácia diagnóstica representa não apenas um avanço científico, mas uma necessidade estratégica para políticas públicas eficazes e para a redução de impactos clínicos, epidemiológicos, éticos e socioeconômicos associados à doença.

1.2 OBJETIVOS

Objetivo geral

- Avaliar comparativamente o desempenho diagnóstico do teste comercial ELISA-Vetlisa/BIOCLIN(rK39) e de um ensaio experimental baseado na proteína glutamina sintetase no diagnóstico da leishmaniose visceral canina, considerando o

fluxo diagnóstico que inclui triagem por DPP® Leishmaniose Visceral Canina e confirmação molecular por PCR.

Objetivos específicos

- Analisar a viabilidade técnica da expressão da GS como alvo no diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina;
- Comparar a sensibilidade e especificidade do teste ELISA comercial utilizado atualmente no diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina;
- Estudar o desempenho diagnóstico de um ensaio baseado na detecção de anticorpos contra a glutamina sintetase de *Leishmania*.
- Realizar detecção molecular de *Leishmania infantum* por PCR nas amostras analisadas e, utilizar os resultados como referência para a comparação com os testes sorológicos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 ASPECTOS GERAIS E DIVERSIDADE DE HOSPEDEIROS DAS LEISHMANIOSES NO CONTEXTO DA SAÚDE PÚBLICA

As Leishmanioses são um grupo de doenças infecciosas causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, transmitidos por vetores flebotomíneos, particularmente fêmeas dos gêneros *Phlebotomus* (Velho Mundo) e *Lutzomyia* (Novo Mundo). Estima-se que existam mais de 50 espécies de *Leishmania*, das quais cerca de 20 são patogênicas a humanos e aproximadamente 12 infectam cães (CARDOSO et al., 2021, AKHOUNDI et al., 2016). Esta doença é endêmica em mais de 90 países e está presente em todos os continentes, exceto Oceania (COSMA, 2024), configurando-se como uma das principais Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs), segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) (WHO, 2024).

A distribuição geográfica das leishmanioses no mundo é heterogênea e resulta da interação complexa entre múltiplos fatores como: espécie do parasita envolvido, vetores presentes, e condições ambientais e socioeconômicas. Na Europa, por exemplo, *Leishmania infantum* é a espécie dominante (READY, 2014). O mesmo ocorre na China, no Norte da África, no Oriente Médio, e em algumas áreas da América Latina. Entretanto, na América Latina, as espécies mais comuns associadas à leishmaniose cutânea e mucocutânea são *Leishmania braziliensis* e *Leishmania mexicana* (TORRES-GUERRERO, 2017). Já na Ásia e na África, espécies como *Leishmania donovani*, *Leishmania major* e *Leishmania tropical* são responsáveis por muitos casos. (TALMI-FRANK, 2010)

Em determinadas regiões, os seres humanos também podem atuar como reservatórios do parasita, o que caracteriza ciclos de transmissão antroponótica, como ocorre com *L. donovani* em partes da África Oriental e no subcontinente indiano (READY, 2014). No período de 2005 a 2020, registrou-se expansão da leishmaniose por *L. infantum* em regiões da Europa anteriormente livres da doença - por exemplo, no norte da Itália e algumas áreas da França - um fenômeno associado a mudanças na aptidão climática para os vetores (STEVEDING, 2017).

Fatores que impulsionam a expansão da doença incluem transformações socioambientais e demográficas: guerras, migrações, desmatamento, urbanização e

degradação ambiental têm alterado os padrões de risco. Por exemplo, conflitos humanitários que provocam migrações em massa podem facilitar a introdução de espécies como *L. tropical* em novas regiões. Tal realidade evidencia a vulnerabilidade de populações em situação de crise e deslocamento.

Na América Latina, o desmatamento e o crescimento urbano sem estrutura adequada, expuseram populações humanas a novos ciclos zoonóticos, especialmente em áreas rurais e periurbanas. Países como o Brasil, a Colômbia, a Costa Rica e o Peru estão entre os que concentram maior número estimado de casos de leishmaniose cutânea no continente, contribuindo significativamente para a incidência global da doença. Nesses contextos, as espécies mais frequentemente identificadas são *L. braziliensis* (principalmente lesões cutâneas) e *L. infantum* (na forma visceral) (DANTAS-TORRES, 2024).

Mudanças ambientais e modificação de habitats naturais como urbanização acelerada e desmatamento, criam condições propícias para a multiplicação de vetores flebotomíneos e para o aumento do contato entre humanos, animais domésticos, silvestres e vetores (DESJEUX, 2004; WHO, 2024). Isso, somado a fatores socioeconômicos como pobreza, precariedade sanitária e falta de acesso a serviços de saúde, amplia a vulnerabilidade das populações ao agravo (HOTEZ, 2011). Além disso, as mudanças climáticas têm alterado os padrões de distribuição espacial e sazonalidade dos vetores, favorecendo a expansão da doença para latitudes e altitudes antes não consideradas de risco. Em consequência, mesmo com dificuldades nos sistemas de vigilância, muitos locais têm apresentado aumento da incidência da leishmaniose (BURZA, 2018; WHO, 2024)..

Clinicamente, a enfermidade é manifestada em três formas principais: Leishmaniose Cutânea (LC), é a forma mais comum, marcada pelas lesões ulceradas frequentemente irreversíveis na pele (GOTO, 2010), Leishmaniose Mucocutânea (LMC), que agride as membranas mucosas do nariz, da boca e da garganta e acarreta alto índice de óbito, se não tratada (VAN GRIENSVEN, 2019) e a Leishmaniose Visceral (LV), a forma mais grave, que quando sintomática, apresenta efeitos sistêmicos: febre contínua, perda de peso, aumento do baço, aumento do fígado e pancitopenia e pode desencadear em complicações como hemorragia, infecções secundárias ou disfunção hepática (BURZA, 2018).

O quadro clínico da infecção por *Leishmania* em animais domésticos, particularmente em cães, pode apresentar variação desde infecções assintomáticas até

apresentações sistêmicas de alta gravidade. Nos casos em que há manifestação clínica, pode-se observar perda de peso, alterações dermatológicas generalizadas ou restritas em determinadas regiões como focinho, orelhas e extremidades, além do aumento dos linfonodos. À medida que a doença evolui, muitos animais desenvolvem insuficiência renal crônica, condição amplamente reconhecida como uma das principais causas de mortalidade associada à infecção. Outros achados clínicos relevantes incluem episódios de epistaxe, atrofia muscular e acometimentos oculares, como uveíte, evidenciando a complexidade e o caráter multissistêmico da enfermidade (COSMA et al., 2024).

No Brasil a Leishmaniose Visceral é um problema grave de saúde pública, com registros de mais de 42 mil casos entre 2012 e 2022 (BRASIL, 2022), com altas taxas de letalidade e expansão para áreas urbanas. A leishmaniose cutânea também apresenta importância epidemiológica, atingindo principalmente as populações mais vulneráveis. Belo et al., (2013), aponta que a distribuição da Leishmaniose Visceral no Brasil tem se expandido para áreas anteriormente não endêmicas, com a urbanização do ciclo de transmissão, intensificada pela presença de cães infectados e alterações ambientais. A patogenia da doença é complexa e pode apresentar uma resposta imune robusta ou ineficaz, além da possibilidade de gerar múltiplos sintomas específicos que distraem o quadro diagnóstico de um caso inflamatório ou infeccioso (YASMIN, 2022; CHAUAN, 2023).

O contexto brasileiro apresenta uma dinâmica particularmente complexa e desafiadora quando se trata de leishmaniose, pela elevada biodiversidade de hospedeiros e da circulação de múltiplas espécies do gênero *Leishmania* em distintos biomas. Entre as espécies de maior relevância epidemiológica destacam-se *L. infantum*, agente etiológico tanto da leishmaniose visceral (LV), também conhecida como calazar, quanto de formas cutâneas; *L. donovani*, associada à LV e à leishmaniose dérmica pós-calazar (LDPK); além de *L. major*, *L. tropica* e *L. mexicana*, responsáveis por manifestações cutâneas, sendo a infecção por *L. tropica* conhecida como “botão oriental” (COSMA, 2024). No cenário neotropical, *L. braziliensis* assume importância especial por causar formas cutâneas e mucocutâneas. Conforme apontam Cardoso et al. (2015), mais de 70 espécies de mamíferos silvestres já foram registradas como potenciais reservatórios no Brasil, incluindo roedores — como *Necromys lasiurus* e *Rattus rattus* —, marsupiais do gênero *Didelphis*, tamanduás (*Myrmecophaga tridactyla*), além de carnívoros e primatas. Essa ampla variedade de hospedeiros dificulta estratégias padronizadas de controle, exigindo intervenções adaptadas às características ecológicas e geográficas de cada região.

No ciclo zoonótico da Leishmaniose Visceral, o cão doméstico (*Canis lupus familiaris*) é o principal reservatório urbano de *Leishmania infantum*. Contudo, estudos recentes têm ampliado o espectro de hospedeiros potenciais da doença, demonstrando a presença do parasita em muitas outras espécies animais. Alguns estudos demonstraram por exemplo, a infecção natural de gatos por *Leishmania infantum*, apresentando registros de positividade parasitológica e imunológica em populações felinas de áreas endêmicas localizadas na Europa e na América Latina.

Segundo Maia e Campino, 2018, felinos PCR-positivos frequentemente apresentam resultados negativos para anticorpos anti-*Leishmania*, revelando uma resposta imune humoral menos evidente do que a observada em cães (MAIA; CAMPINO, 2018). No Brasil, estudos realizados em Belo Horizonte - MG e Natal - RN, identificaram gatos soropositivos para *L. infantum*, reafirmando o potencial desses animais na epidemiologia da leishmaniose visceral zoonótica (PEREIRA, et. al., 2020).

Um outro estudo realizado em áreas endêmicas mostraram que uma parcela dos gatos expostos a *Leishmania infantum* é capaz de produzir IFN- γ , mesmo quando a PCR para detecção de DNA parasitário no sangue é negativa (PRIOLO et al., 2019). A resposta celular mediada por IFN- γ , portanto, pode indicar contato ou controle da infecção subclínica. Em termos histopatológicos, a leishmaniose felina frequentemente se manifesta com inflamação granulomatosas distribuídas de forma generalizada, com macrófagos contendo amastigotas, além de perifoliculite granulomatosa e dermatite de interface (lichenóide) (NAVARRO et al., 2010). Além disso, um estudo recente apontou que gatos naturalmente infectados apresentam níveis elevados de IL-12 e IFN- γ em soro, sugerindo que essas citocinas desempenham um papel importante na regulação da resposta imune contra o parasita, contribuindo para limitar a carga parasitária e a expressão clínica da doença (MACEDO et al., 2023).

Adicionalmente, estudos experimentais demonstraram que gatos naturalmente infectados podem ser fontes de infecção para flebotomíneos como *Phlebotomus perniciosus*. Em Portugal, 47,7% dos gatos testados apresentaram anticorpos IgG contra a saliva desse vetor, sugerindo exposição significativa e uma associação positiva com infecção por *Leishmania* (PEREIRA et al., 2019)

A diversidade de reservatórios potenciais foi ampliada com evidências de infecção em várias outras espécies. No Sul da Espanha, tigres cativos foram diagnosticados com *Leishmania infantum*, apresentando disproteinemia e gamopatia, mesmo sem sinais clínicos evidentes (MOLINA, et al., 2012). A infecção foi associada à alta densidade de *P.*

perniciosus no recinto. Em Madri, um surto de leishmaniose humana iniciado em 2009 evidenciou o papel epidemiológico da lebre ibérica (*Lepus granatensis*) como reservatório. Estudos de xenodiagnósticos demonstraram que lebres infectadas são capazes de transmitir *L. infantum* para fêmeas de *Phlebotomus perniciosus*, e o material genético do parasita isolado desses insetos coincidia com cepas de origem humana (MOLINA et al, 2012).

Também foram encontradas infecções em coelhos europeus (*Oryctolagus cuniculus*) com positividade em amostras de sangue, fígado, pele, medula óssea e coração. A infecção mostrou associação com tamanho corporal e época de captura, já que apresentou maior frequência em animais maiores e capturados no outono (MARTÍN-SANCHEZ et al., 2021). Em cavalos, (*Equus ferus caballus*), as infecções por *L. infantum* encontradas foram consideradas casos isolados, com soropositividade transitória e manifestações clínicas cutâneas localizadas. Embora a soroprevalência não seja alta, o contato próximo com áreas endêmicas e cães infectados sugere que os equinos possam atuar como hospedeiros ocasionais, com papel ainda pouco esclarecido na epidemiologia da doença (BANI, et al., 2013).

O estudo clínico de García, et al., 2022, em orangotangos (*Pongo pygmaeus pygmaeus*) confirmou a persistência do parasita por PCR, os animais apresentavam hepatoesplenomegalia (aumento simultâneo do fígado e do baço), anemia e sangramento nasal e foram tratados com miltefosina e alopurinol e tiveram melhora clínica. (GARCÍA, et al., 2022). No Brasil, primatas como *Callith jacchus* foram identificados com infecção por *Leishmania braziliensis* em áreas de mata atlântica (RONDÓN, et al., 2021), reacendendo o alerta para o risco de emergência zoonótica em áreas fragmentadas. Em camundongos (*Mus musculus*), também foram encontradas altas taxas de infecção por *L. infantum* com carga parasitária significativa na medula óssea, baço e pele. Nas fêmeas prenhas, observou-se transmissão vertical com detecção de DNA parasitário em fetos (MARTÍN-SÁNCHEZ, et al., 2020).

Anticorpos anti-Leishmania foram detectados pela primeira vez em faisões (*Phasianus colchicus*) na Itália. As aves não manifestaram sinais clínicos, contudo, a soropositividade aponta a necessidade de estudos sobre a resposta imune desses animais à infecção (LORENZI, et al., 2006).

Diante do exposto, nota-se que o controle da leishmaniose não pode se restringir ao monitoramento de cães e humanos. Vale ressaltar que a complexidade da cadeia de transmissão entre espécies hospedeiras diferentes e fatores ecológicos diversos,

requerem sistemas integrados de vigilância epidemiológica, prevenção e diagnóstico. A diversidade de hospedeiros e a capacidade dos vetores de se alimentarem de múltiplas espécies reforçam a necessidade de estratégias amplas no contexto da saúde pública, conforme orientações da OMS e das diretrizes de pesquisa translacional em zoonoses.

2.2 O CICLO BIOLÓGICO DA *LEISHMANIA*: EPIDEMIOLOGIA, DINÂMICA PARASITÁRIA E RESPOSTA IMUNE DOS HOSPEDEIROS

2.2.1 Ciclo Biológico

O gênero *Leishmania* abrange protozoários digenéticos que alternam entre dois hospedeiros ao longo do ciclo de vida: um vetor invertebrado (fêmeas de flebotomíneos hematófagos) e um hospedeiro vertebrado, que inclui humanos, cães e diversos mamíferos silvestres. Essas espécies causam um espectro de doenças conhecido como leishmanioses, que vão de formas cutâneas autolimitadas a quadros viscerais graves (D'LIU; UZZONA, 2012).

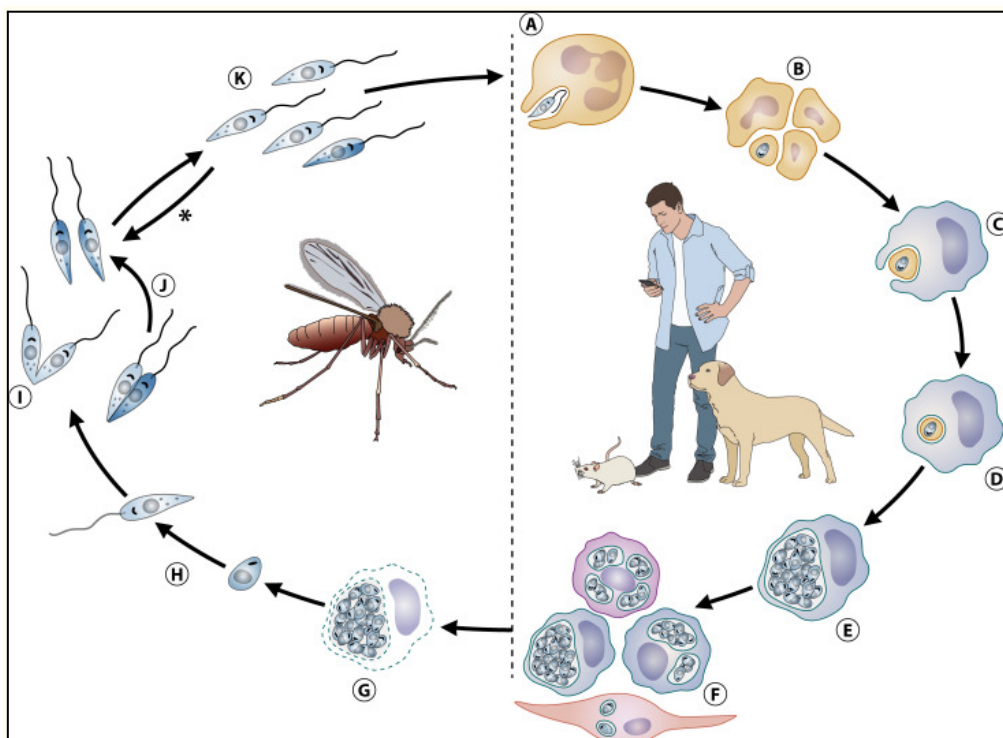
No hospedeiro vertebrado, *Leishmania* sobrevive como amastigota, forma oval, aflagelada, obrigatoriamente intracelular, localizada em vacúolos parasitóforos de origem fagolisossomal no interior de células do sistema fagocítico mononuclear, principalmente macrófagos. Esses vacúolos apresentam características de lisossomos tardios, com pH ácido e presença de hidrolases, e sua biogênese é central para a capacidade do parasita de persistir no interior das células (ANTOINE; PRINA; COURRET, 1998).

Assim, o ciclo é heteroxênico: no vetor, predominam as formas flageladas (promastigotas), que se desenvolvem no trato digestório do inseto; no vertebrado, o parasita assume a forma amastigota, adaptada à vida intracelular em ambiente ácido (D'LIU; UZZONA, 2012).

O ciclo biológico da leishmaniose é complexo e envolve ao menos dois vetores principais: o inseto flebotomíneo e o hospedeiro vertebrado, principalmente o cão, em ambientes urbanos, mas pode se apresentar em diversos animais silvestres, como mencionado anteriormente. No inseto vetor, os parasitas se desenvolvem sob a forma promastigota, enquanto que no hospedeiro vertebrado, esse desenvolvimento acontece de forma amastigota implantando infecções que se apresentam de diversas maneiras clinicamente, desde casos assintomáticos, a leves, moderados ou graves, depende da

espécie de *Leishmania*, das condições ambientais e do sistema imunológico do hospedeiro (MACEDO, 2023).

Figura 1: Ciclo de vida da *Leishmania spp.* (A) A fêmea infectada do flebótomo regurgita promastigotas metacíclicas infectantes na derme de um hospedeiro mamífero durante a alimentação sanguínea, infectando neutrófilos atraídos para o local da picada. (B) Os parasitas se transformam em amastigotas intracelulares antes que os neutrófilos sofram morte apoptótica. (C) Corpos apoptóticos de neutrófilos infectados mortos são capturados por macrófagos, (D) que se infectam. (E) Os amastigotas se multiplicam por fissão binária em vacúolos intracelulares ácidos ricos em marcadores lisossômicos, aumentando o número de parasitas por célula infectada ao longo do tempo. (F) Por mecanismo ainda pouco compreendidos, a infecção se propaga e o número de células infectadas também aumenta, levando à amplificação da infecção. Os macrófagos são as principais células infectadas, embora outros tipos celulares também tenham sido caracterizados como portadores de amastigotas intracelulares em tecidos infectados. Infecção do hospedeiro invertebrado (vetor): (G): A fêmea do flebótomo se infecta após ingerir células infectadas contendo amastigotas durante uma refeição de sangue em um hospedeiro infectado (comumente um reservatório do parasita, como o cão doméstico ou mamíferos selvagens). (H) No trato digestivo do vetor, os amastigotas são liberados e se transformam em promastigotas flagelados, que (I) se multiplicam por fissão binária. (J) Durante esta etapa do seu ciclo de vida, ocorre um ciclo semelhante ao sexual, com hibridização de parasitas fundidos em acasalamento. (K) No trato digestivo do flebotomíneo, os promastigotas procíclicos não infectantes sofrem uma sequência de alterações bioquímicas e morfológicas até que promastigotas metacíclicos altamente infectantes sejam gerados, os quais são inoculados na derme de um hospedeiro mamífero em uma segunda refeição de sangue.



Fonte: Traduzido de Silva-Moreira, et al., (2025).

O ciclo tem início quando uma fêmea do inseto flebotomíneo dos gêneros *Phlebotomus* ou *Lutzomyia*, ingere formas amastigotas durante o repasto sanguíneo em hospedeiro infectado. No intestino do vetor, as formas amastigotas de *Leishmania* se transformam em promastigotas (alongadas, flageladas e móveis). Essas novas formas promastigotas se multiplicam por divisão binária para se diferenciarem em formas promastigotas metacíclicas e assumirem a forma infectante para o hospedeiro vertebrado (COURTENAY, et al., 2021). Na forma infectante, o protozoário migra para o aparelho sugador do inseto e é inoculado durante uma nova picada. Proteínas imunomoduladoras presentes na saliva do vetor, contribuem para a fuga do sistema imune inicial do hospedeiro vertebrado e contribui para a sobrevivência do parasita (RODRIGUEZ-GARCIA, et al., 2022).

Ao longo de sua permanência no intestino médio, as promastigotas passam por uma sequência de estágios morfológicos e funcionais, marcados por intensa replicação, migração em direção à região anterior do intestino e adaptação progressiva ao papel de forma infectante. Nessas fases, os parasitas aderem ao epitélio intestinal e secretam um gel rico em fosfoglicanos (plug estomodal), que obstrui parcialmente a válvula estomodeal (ALCOLEA, et al., 2019).

A metaciclogênese, processo de diferenciação em promastigotas metacíclicos, gera formas não replicativas, metabolicamente adaptadas à sobrevivência no hospedeiro mamífero e mais resistentes à lise pelo complemento. Esses promastigotas metacíclicos acumulam-se na porção anterior do trato digestivo e na região da válvula estomodeal, sendo inoculados na pele do hospedeiro vertebrado durante um novo repasto sanguíneo, juntamente com a saliva e outros componentes do inseto (ALCOLEA, 2019).

Estudos recentes demonstraram que, em algumas espécies, a ingestão de uma segunda refeição por flebotomíneos previamente infectados desencadeia um fenômeno de “metaciclogênese reversa”: parte dos promastigotas metacíclicos revertem a diferenciação para formas replicativas, aumentam rapidamente a carga parasitária no intestino do vetor e, em seguida, voltam a se diferenciar em formas metacíclicas altamente infectantes (SILVA-MOREIRA, et al., 2023). Esse mecanismo contribui para a formação de vetores “superinfectantes”, com maior capacidade de transmissão.

A Figura 2 apresenta as principais etapas do ciclo biológico do parasita *Leishmania*. (1) O ciclo inicia-se quando o flebotomíneo inocula promastigotas

metacíclicas, a forma infectante no hospedeiro vertebrado, durante a refeição sanguínea, juntamente com saliva, microbiota intestinal e vesículas extracelulares do parasita. (2) Após a inoculação, essas formas são fagocitadas por macrófagos e outras células mononucleares, nas quais se diferenciam em amastigotas. (3) No interior dessas células, as amastigotas se multiplicam e se disseminam para outras células hospedeiras. (4) Em uma alimentação subsequente, o flebotomíneo ingere células infectadas. (5) No intestino médio do vetor, as amastigotas voltam a se transformar em promastigotas. (6) Finalmente, essas formas evoluem para promastigotas metacíclicas e migram para a válvula estomodeal, tornando-se aptas a iniciar um novo ciclo infeccioso (COSMA, et al., 2024).

No cão (hospedeiro vertebrado), os promastigotas são fagocitados por células do sistema imune inato, como neutrófilos e macrófagos. No interior dos macrófagos, ocorre a transformação dos promastigotas em amastigotas, a forma aflagelada e adaptada à vida intracelular (HANDMAN; BULLEN, 2022; RITTIG; BOGDAN, 2000). As formas amastigotas, por sua vez, multiplicam-se por divisão binária até que ocorra a lise celular e a consequente liberação dos novos parasitas para infectar demais células fagocíticas. A infecção pode então ser controlada pela resposta imune ou alastrar para um estágio crônico (KAYE; SCOTT, 2011; TERRAZAS, et al., 2015).

Quando ocorre a infecção, os neutrófilos são as primeiras células de defesa enviadas para o local de entrada do agente externo, fagocitam os promastigotas e produzem espécies reativas de oxigênio (ROS), além de liberarem citocinas como IL-8, TNF- γ , que ativam macrófagos e promovem a eliminação do parasita (ALMEIDA, et al., 2013; CARLSEN, et al., 2015; WARDINI, et al., 2019). Entretanto, durante a infecção clínica, os parasitas induzem apoptose celular precoce nos neutrófilos, permitindo que as formas amastigotas sobrevivam e infectem macrófagos mais eficientemente. Assim, os macrófagos ativados produzem IL-12 e promovem uma resposta imune do tipo TH1 através da ativação de células TCD4⁺ e INF- γ (STRAUSS-AYALI, et al., 2005).

Os neutrófilos fagocitam rapidamente as promastigotas, porém apresentam tempo de vida curto. Trabalhos experimentais demonstram que diferentes espécies de *Leishmania* podem modular a apoptose e as funções microbicidas dos neutrófilos, retardando sua morte ou alterando a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), de forma a favorecer a sobrevivência do parasita (REGLI, 2017).

Células apoptóticas de neutrófilos infectados são então fagocitadas por macrófagos, que internalizam simultaneamente restos celulares e parasitas viáveis. Esse mecanismo, clássico na literatura, é conhecido como “cavalo de Troia”, pois permite a

entrada silenciosa de *Leishmania* em seus hospedeiros definitivos (macrófagos) sem induzir forte ativação inflamatória (D'LIU; UZZONA, 2012).

Dentro dos macrófagos, os promastigotas diferenciam-se em amastigotas e passam a proliferar por fissão binária em vacúolos parasitóforos ácido-lisossomais. A intensa multiplicação leva à sobrecarga dessas organelas e à morte celular (por apoptose ou necrose), com liberação de amastigotas que infectam novos fagócitos. Estudos de microscopia intravital mostram que a transferência de amastigotas e material celular de macrófagos infectados para macrófagos não infectados pode ocorrer sem exposição prolongada de parasitas ao meio extracelular, sugerindo um mecanismo eficiente de disseminação intracelular entre células mieloides (REGLI, et al., 2017).

Embora os macrófagos sejam considerados o principal nicho celular, *Leishmania* também pode infectar outras populações, como células dendríticas, monócitos inflamatórios e, em contextos crônicos, células não fagocíticas (fibroblastos, células endoteliais e outras). A colonização desses nichos alternativos contribui para a persistência de parasitas em locais menos acessíveis à resposta imune e aos fármacos, configurando reservatórios celulares durante a fase crônica da infecção (BOGDAN, 2020).

Na cadeia epidemiológica das leishmanioses, diversos mamíferos desempenham o papel de reservatórios, mantendo o ciclo do parasita na natureza. Enquanto o cão doméstico é o principal reservatório em áreas urbanas de leishmaniose visceral, vários mamíferos silvestres, como roedores, marsupiais, carnívoros e primatas, também podem abrigar *Leishmania* e servir de fonte de infecção para flebotomíneos em ambientes silvestres ou periurbanos (BOGDAN, 2020).

A compreensão da diversidade de reservatórios, associada às particularidades ecológicas dos diferentes vetores, é essencial para o planejamento de medidas de vigilância e controle. Estratégias eficazes precisam considerar a complexidade dos ciclos zoonóticos, as interfaces entre ambientes silvestres, rurais e urbanos e o papel de hospedeiros assintomáticos na manutenção da enzootia (OLIVEIRA, 2015).

2.2.2 Epidemiologia

Em áreas endêmicas, onde ocorre a transmissão por insetos flebotomíneos, cães e outros hospedeiros podem estar infectados por *Leishmania spp.* em contextos epidemiológicos complexos, frequentemente associados à presença simultânea de outros

patógenos transmitidos por vetores. Essas coinfeções representam um desafio adicional à resposta imune do hospedeiro, uma vez que modulam mecanismos celulares e humorais envolvidos tanto no controle da infecção quanto na progressão clínica da leishmaniose, com potenciais implicações para estratégias de vacinação e imunoterapia (TOEPP; PETERSEN, 2020; ANDRONIC et al., 2023).

Co-infecções transmitidas por carrapatos, envolvendo agentes como *Anaplasma spp.*, *Ehrlichia spp.* e *Babesia spp.*, são amplamente prevalentes em países onde ocorrem transmissão vertical e por flebotomíneos. No Brasil, *Ehrlichia spp.* apresenta elevadas taxas de soroprevalência canina, com valores históricos próximos a 75% em regiões endêmicas, especialmente em países tropicais e subtropicais (LABARTHE, et al., 2003), enquanto *Anaplasma spp.* e *Babesia spp.* exibem soroprevalência estimadas em aproximadamente 18% e 10 % respectivamente (DANTAS-TORRES, 2008; ROTONDANO, et al., 2015). A presença concomitante desses agentes infecciosos pode alterar o perfil imunológico do hospedeiro, favorecendo disfunções imunorregulatórias que impactam a evolução da infecção por *Leishmania* e aumentam a complexidade do manejo clínico e epidemiológico da doença (TOEPP; PETERSEN, 2020).

A dinâmica da transmissão da leishmaniose está intimamente ligada à interação entre vetor e hospedeiro, parasita e variáveis ambientais e antropogênicas. Entre os fatores ecológicos que influenciam na prevalência e manifestação da doença, o clima destaca-se como fator determinante na regulação da distribuição, densidade e sazonalidade dos flebotomíneos. Estudos recentes mostram que a crise climática global e o aumento persistente de temperatura e alterações de precipitação, influencia diretamente a distribuição e a abundância de vetores, modificando a epidemiologia da doença (SHLOMIT, 2024; DE SOUZA; WEAVER, 2024).

Modelagens de adequação climática apontam que, com o aquecimento global, várias regiões historicamente temperadas podem tornar-se adequadas para a proliferação de vetores - incluindo áreas da Europa antes consideradas livres de leishmaniose. Esse fato evidencia a capacidade de expansão geográfica da doença (GONZALEZ et al., 2025; PAZ, et al., 2024) e a emergência de novos cenários epidemiológicos. Resultados semelhantes têm sido observados em estudos conduzidos no norte da África, no Mediterrâneo e em países da América Latina, sugerindo que a crise climática atua como fator estimulador para vetores e reservatórios, deslocando gradativamente seu nicho geográfico (DAOUDI, et al., 2025).

Além disso, a urbanização acelerada, o desmatamento, o crescimento

populacional, a migração, a globalização, os deslocamentos rurais-urbanos e a mobilidade humana têm alterado a ecologia da doença. A conversão de habitats naturais em zonas periurbanas e urbanas favorece o contato entre humanos, reservatórios animais, vetores e o parasita (MORALES, et al., 2024). Essas transformações ambientais e socioespaciais, unidas às mudanças climáticas, configuram um sistema dinâmico, adaptativo e em constante reorganização, como impacto direto sobre a incidência da leishmaniose.

Em regiões onde a distribuição espacial da infecção por *Leishmania* em cães correlaciona-se com casos humanos, a vigilância canina torna-se um componente fundamental da vigilância em saúde pública. A expansão de áreas com risco é um chamado à revisão e ampliação dos sistemas de monitoramento, considerando não apenas fatores zoonóticos, mas também mudanças ambientais e climáticas.

Na América Latina, a migração campo-cidade, associada ao crescimento de assentamentos periféricos e à precariedade de infraestrutura urbana, tem sido relacionada à urbanização do ciclo de transmissão da leishmaniose visceral, com registro de casos em centros urbanos onde antes a doença era ausente ou esporádica. Em municípios brasileiros, estudos têm demonstrado correlação espacial entre a distribuição de casos caninos, a presença de vetores e a ocorrência de casos humanos, reforçando a importância da vigilância integrada homem-animal-ambiente (SILVA-NINA, et al., 2023).

Do ponto de vista social e econômico, a leishmaniose impacta de forma mais severa populações de baixa renda, tanto pela maior exposição a ambientes de risco quanto pela dificuldade de acesso a serviços de saúde, diagnóstico e tratamento. Os custos diretos com hospitalizações, medicamentos de alto custo e acompanhamento clínico prolongado, somados aos custos indiretos decorrentes da perda de capacidade laboral, agravam a situação de vulnerabilidade econômica das famílias em países de baixa e média renda. Em alguns cenários, o tratamento da leishmaniose visceral pode consumir parcela expressiva da renda familiar, levando ao endividamento e perpetuando um ciclo de pobreza e doença (SUNDAR, 2024; VAN GRIENSVEN, et al., 2024)

No setor veterinário, o manejo de cães infectados por *Leishmania* também representa uma exigência financeira considerável, dado o caráter crônico da doença e a necessidade de tratamentos prolongados, exames seriados e monitoramento de comorbidades, como insuficiência renal crônica. A notificação de casos animais, no entanto, ainda é insuficiente em muitos países, dificultando a estimativa real da carga zoonótica e a implementação de políticas integradas de saúde pública (One Health).

2.2.3 Resposta imune dos hospedeiros

A interação entre *Leishmania* e o sistema imune do hospedeiro é marcada por um delicado equilíbrio entre mecanismos efetores de controle do parasita e respostas regulatórias que evitam dano tecidual excessivo, mas que, se exacerbadas, favorecem a persistência da infecção. Esse balanço é particularmente evidente na leishmaniose visceral canina, na qual a mesma espécie (*L. infantum*) pode gerar desde infecções subclínicas até quadros sistêmicos graves (HOSEIN; BLAKE; SOLANO-GALLEGO, 2017).

Do ponto de vista da imunidade celular, a resposta TH1 mediada por linfócitos TCD4+, com produção de INF- γ , TNF- α e IL-2, é crucial para a ativação clássica de macrófagos e a indução de óxido nítrico e ERO, efetores centrais na eliminação de amastigotas. A IL-12 produzida por células apresentadoras de antígeno (macrófagos e células dendríticas) exerce papel chave na diferenciação de linfócitos TH1 (D'LIU; UZZONA, 2012).

Em contrapartida, a produção de citocinas regulatórias e anti-inflamatórias, como IL-10 e TGF- β , bem como a expansão de células T reguladoras (Treg), contribuem para limitar o dano inflamatório, mas, quando predominantes, associam-se à falha no controle da carga parasitária e à progressão clínica da doença. Estudos em cães sugerem que formas sintomáticas graves se correlacionam com altos títulos de anticorpos, resposta linfoproliferativa específica reduzida e aumento de IL-10, enquanto animais assintomáticos apresentam respostas celulares mais robustas, com perfil TH1 predominante (BOGGIATTO, et al., 2010).

Além dos linfócitos TCD4+, linfócitos TCD8+ citotóxicos também participam do controle da infecção, contribuindo para a eliminação de macrófagos infectados e a produção adicional de INF- γ . Em cães com infecção subclínica, observa-se frequentemente proliferação de células TCD8+ e manutenção de resposta celular efetora, ao passo que, em animais com doença avançada, há sinais de exaustão de linfócitos T, com queda da proliferação e da produção de citocinas pró-inflamatórias (ALEXANDRE-PIRES, 2010).

Na infecção inicial, neutrófilos e macrófagos constituem os principais fagócitos envolvidos no encontro com o parasita. Em cães, alterações no metabolismo oxidativo dos neutrófilos variam de acordo com o estágio da leishmaniose visceral, sugerindo que esses leucócitos podem tanto contribuir para a eliminação do parasita, por meio de burst oxidativo, quanto favorecer sua persistência, quando têm suas funções microbicidas

prejudicadas (ALMEIDA, et al., 2013).

Leishmania emprega múltiplas estratégias para subverter as funções desses fagócitos: modulação da apoptose de neutrófilos, alteração de vias de sinalização em macrófagos (como MAPK), interferência na produção de NO e ERO, e indução de um perfil mais próximo de macrófagos do tipo M2, permissivos à infecção. Esses mecanismos asseguram a sobrevivência em vacúolos parasitóforos e permitem a disseminação silenciosa do parasita em tecidos ricos em células do sistema fagocítico mononuclear, como baço, fígado, linfonodos e medula óssea (ELMAHALLAWY; ALKHALDI; SALEH, 2021). O conceito de “cavalo de Troia” estende-se também para a fase crônica, na qual a morte programada de macrófagos infectados, seguida da fagocitose de restos celulares contendo amastigotas por outros fagócitos, contribui para a propagação do parasita entre células mieloides, sem exposição ao meio extracelular (REGLI, et al., 2017).

A leishmaniose visceral canina apresenta ampla variabilidade clínica, indo de formas oligossintomáticas ou assintomáticas a quadros graves, caracterizados por anemia, linfadenomegalia, perda de peso, alterações cutâneas, epistaxe, distúrbios renais e comprometimento multissistêmico (CIARAMELLA, et al., 1997). Essa diversidade de apresentações relaciona-se à constituição genética e ao perfil de resposta imune de cada animal, que determinam maior susceptibilidade ou resistência à infecção.

Do ponto de vista de saúde pública, representando um desafio particular em países como o Brasil, cães sem manifestações clínicas evidentes podem possuir carga parasitária suficiente para infectar flebotomíneos, funcionando como reservatórios silenciosos e contribuindo para a manutenção da transmissão zoonótica em áreas urbanas e periurbanas (SEGARRA, et al., 2018).

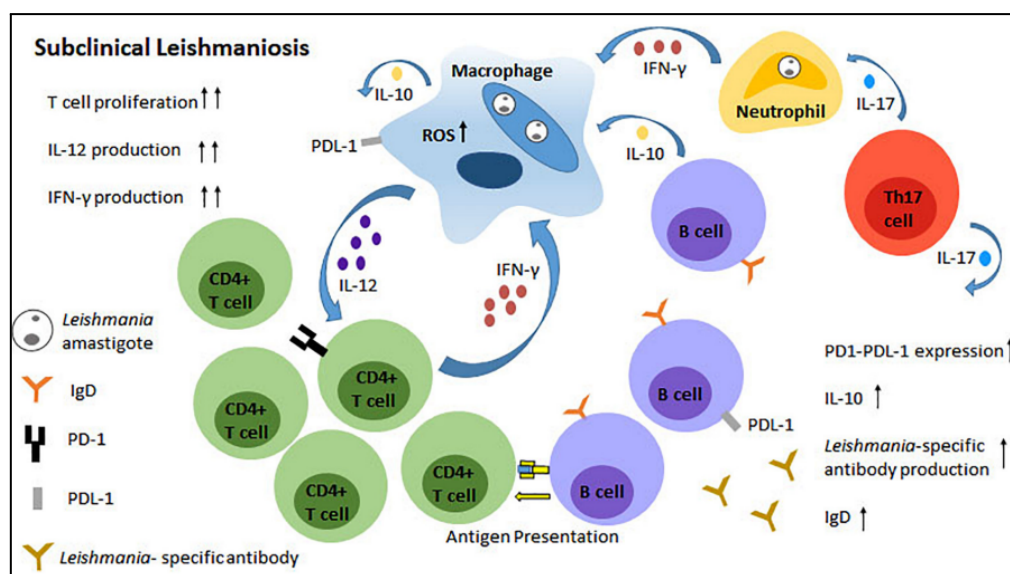
Estudos que correlacionam carga parasitária em pele e sangue com a infectividade para vetores reforçam a importância epidemiológica desses animais subclínicos. Evidências obtidas por xenodiagnóstico indicam forte associação entre parasitismo cutâneo e transmissão efetiva para flebotomíneos (BORJA, et al., 2016), incluindo cães infectados verticalmente, que, apesar de clinicamente assintomáticos, apresentam elevado tropismo dérmico do parasita e infectam eficientemente vetores competentes (SCORZA, et al., 2021). Adicionalmente, pesquisas recentes apontam a carga parasitária dérmica como marcador crítico de transmissibilidade, sustentando o papel de hospedeiros subclínicos na persistência e expansão da leishmaniose em contextos endêmicos (ARUMUGAM, et al., 2022).

Na leishmaniose cutânea, as lesões podem cicatrizar espontaneamente à

medida que as respostas mediadas por IFN- γ levam à ativação de macrófagos e à eliminação de amastigotas. No entanto, recidivas após a cicatrização ou tratamento não são incomuns, sugerindo que parasitas persistem em nichos celulares pouco acessíveis à resposta imune e aos fármacos, incluindo células não fagocíticas que não expressam intensamente efetores microbicidas (GABRIEL, et al., 2019).

Do ponto de vista terapêutico, fármacos como antimoniato de meglumina e formulações lipídicas de anfotericina B têm como principal alvo macrófagos infectados em órgãos viscerais. Assim, parasitas residentes em outros tipos celulares podem escapar à ação dessas drogas, contribuindo para recidivas ou para a manutenção de infecção latente (D'LIU; UZZONA, 2012).

Figura 2 - Representação esquemática da resposta imune na Leishmaniose subclínica canina. A figura ilustra os principais eventos imunológicos associados ao estado subclínico da infecção por *Leishmania*, caracterizado pelo equilíbrio entre mecanismos efetores e regulatórios da resposta imune. Macrófagos infectados por amastigotas de *Leishmania* apresentam antígenos aos linfócitos T CD4+, promovendo ativação celular e produção aumentada de citocinas pró-inflamatórias, especialmente IL-12 e INF- γ , fundamentais para a ativação microbicida dos macrófagos e geração de espécies reativas de oxigênio (ROS). Observa-se expansão da resposta Th1 com estímulo à proliferação de linfócitos T e controle da carga parasitária. Paralelamente, mecanismos regulatórios mediados por IL-10 e pela expressão do eixo inibitório PD-1/PD-L1 modulam a intensidade da resposta imune, prevenindo dano tecidual excessivo. Células B participam da resposta humoral com produção de anticorpos específicos anti-*Leishmania*, predominantemente IgD, em níveis controlados. Neutrófilos e células Th17 contribuem de forma acessória por meio da produção de IL-17. Esse balanço imunológico explica a ausência de sinais clínicos evidentes, apesar da infecção estabelecida.

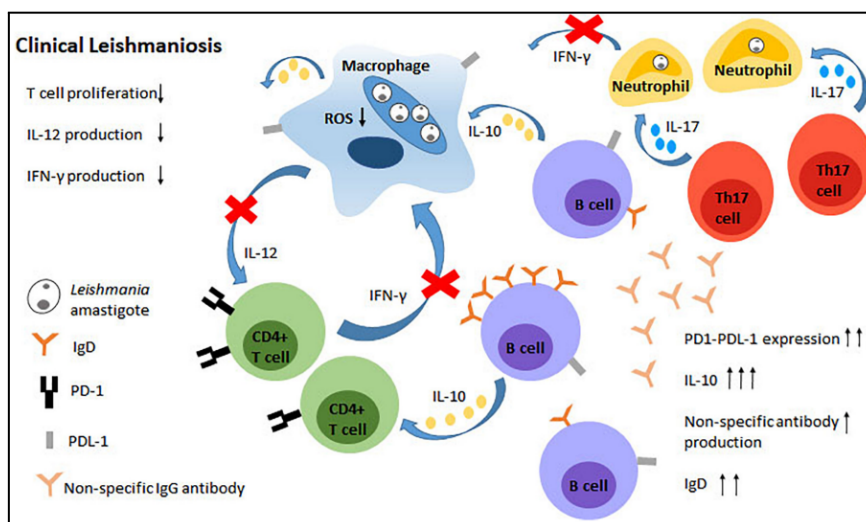


Fonte: Adaptado de Toepp; Petersen, 2020.

A figura 3 representa uma resposta TH1 robusta, onde há produção de IL-12, INF- γ e a ativação eficiente de macrófagos, células TCD4+ e neutrófilos mantêm os níveis parasitários sob controle. A presença de antígenos por células B estimula a produção de anticorpos específicos e mantém a infecção em estado latente (VIDA, et al., 2016).

Por outro lado, na figura 4, há uma decadência da resposta imune TH1 e prevalência de mecanismos imunossupressores. A produção de IL-10 por células B supre a ativação dos macrófagos, enquanto a expressão de PD-1 e PDL-1 em células T e B promove o decaimento imunológico (SCHAUT, et al., 2016). A cronicidade da infecção resulta na formação de complexos imunes e lesão tecidual (GIBSON-CORLEY, et al., 2014). As células B atuam como apresentadoras de antígenos (APCs) e como produtoras de anticorpos. No início da infecção, anticorpos específicos induzem a opsonização (remoção de patógenos pelo sistema imunológico) e fagocitose eficiente dos parasitas. Contudo, em estágios avançados, ocorre produção excessiva de IgG não específica, o que corrobora para a formação de complexos imunes patogênicos (RODRIGUEZ-PINTO, et al., 2014). Tem se investigado a recuperação da funcionalidade das células T através do bloqueio de receptores PD-1 como estratégia terapêutica em humanos e modelos animais (PATNAIK, et al., 2015; RECK, et al., 2016; ESCH, et al., 2013).

Figura 3 - Representação esquemática da resposta imune na Leishmaniose clínica canina. A figura 3 ilustra os principais mecanismos imunológicos associados à forma clínica da leishmaniose, caracterizada por desequilíbrio da resposta imune e falha no controle da infecção por *Leishmania*. observa-se redução da proliferação de linfócitos T, bem como diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias essenciais, como IL-12 e IFN- γ , comprometendo a ativação efetiva dos macrófagos e a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), favorecendo a persistência e multiplicação do parasita no interior dessas células. Concomitantemente, há aumento expressivo de citocinas regulatórias, especialmente IL-10, associado à intensificação de via inibitória PD-1/PD-L1, que promove exaustão funcional de linfócitos T e supressão da resposta celular. A resposta humoral torna-se exacerbada e desregulada com expansão de células B e produção aumentada de anticorpos não específicos, incluindo elevação de IgD, sem eficácia no controle parasitário. A participação de neutrófilos e células Th17 com produção de IL-17, contribui para o estado inflamatório crônico e para a imunopatogênese da doença. Esse conjunto de alterações imunológicas está associado ao aparecimento e à progressão dos sinais clínicos da leishmaniose visceral canina.



Fonte: Adaptado de Toepp; Petersen, 2020.

2.3 DIAGNÓSTICO, TRATAMENTO E PREVENÇÃO

2.3.1 Diagnóstico

O diagnóstico da leishmaniose é baseado na combinação da avaliação clínica, exames laboratoriais e testes específicos de detecção do parasita ou da resposta imunológica estimulada no organismo do hospedeiro. Os métodos diagnósticos mais utilizados são os testes sorológicos, parasitológicos e moleculares, sendo cada um recomendado de acordo com a fase da doença e os recursos disponíveis (PEREIRA, et al, 2020).

Os testes sorológicos são amplamente usados para triagem e diagnóstico devido à sua praticidade e sensibilidade. Entre os mais comuns estão o teste de imunofluorescência indireta (RIFI/IFAT), o ensaio imunoenzimático (ELISA) e os testes rápidos imunocromatográficos (TR), frequentemente baseados em antígenos recombinantes como rK39, rK28, rK26 e variantes regionais (GUZMAN et al., 2023).

Antígenos metabólicos têm mostrado alto desempenho diagnóstico, particularmente em estágios assintomáticos, nos quais antígenos tradicionais, como rK39 e rK28 apresentam acurácia reduzida (TEIXEIRA et al., 2024). No entanto, os pontos de corte sorológicos variam conforme o método, o antígeno empregado e o fabricante do kit, não sendo adequado generalizar um único valor interpretativo para todos os ensaios ELISA. No caso do teste comercial ELISA-Vetlisa/BIOCLIN, utilizado no presente estudo,

a interpretação é realizada por índice, sendo consideradas negativas as amostras com índice $<0,9$, positivas aquelas com índice $>1,1$ e indeterminadas as amostras com índice entre 0,9 e 1,1, conforme instruções do fabricante (BIOCLIN, 2020/2023).

De modo semelhante na RIFI/IFAT, o título considerado reagente também depende do protocolo adotado, embora títulos iguais ou superiores a 1:80 sejam frequentemente utilizados em estudos e rotinas laboratoriais para leishmaniose visceral canina (CAMARGO; LANGONI, 2006; SOLANO-GALLEGO et al., 2017). Esses métodos detectam anticorpos específicos contra antígenos de *Leishmania*, porém não distinguem infecção ativa de exposição passada (COURA-VITAL, et al., 2014). Os testes sorológicos (IFAT/ELISA e testes rápidos imunocromáticos) são amplamente utilizados por sua praticidade e sensibilidade. No entanto, detectam anticorpos contra antígenos de *Leishmania spp.*, não diferenciando a infecção ativa de exposição prévia.

Na leishmaniose visceral sintomática, observa-se elevação significativa da resposta humoral, com títulos de anticorpos elevados tanto em cães quanto em humanos. Nesses casos, ensaios ELISA ou testes rápidos baseados em rK39 e rK28 têm apresentado alta sensibilidade, sendo recomendados pela OMS e por programas nacionais de controle (VENTURIN et al., 2015; GUZMAN et al., 2023; SIQUEIRA et al., 2023).

A acurácia dos testes sorológicos, entretanto, apresenta variação significativa entre estudos, dependendo do perfil clínico dos animais, do antígeno utilizado e do método de referência empregado. Camargo et al (2010) observaram sensibilidade de 97,78% e especificidade de 100% para IFAT, enquanto o ELISA apresentou sensibilidade de 93,33% e especificidade de 99%. Em contrapartida, Ferreira et al (2007) relataram sensibilidade de 72% para IFI e 95% para ELISA, com especificidades de 52% e 64%, respectivamente, evidenciando impacto de reações cruzadas e da heterogeneidade clínica das amostras. De forma complementar, Lira et al (2006) demonstraram que a utilização combinada de testes (EIE-LVC e IFI-LVC) pode aumentar a sensibilidade ou especificidade conforme a estratégia aplicada (paralelo ou sequencial), reforçando a importância da abordagem diagnóstica integrada.

Para testes baseados no antígeno recombinante rK39, estudos recentes indicam desempenho elevado. Medeiros et al (2021) relataram sensibilidade de 99% e especificidade de 100% na validação do ELISA rK39/Vetlisa no Brasil, enquanto Venturin et al (2015) observaram sensibilidade de 97% e especificidade de 95% para ELISA baseado no mesmo antígeno, confirmando o alto potencial diagnóstico dessa classe de

ensaios.

Apesar disso, o diagnóstico sorológico enfrenta limitações importantes: como a incapacidade de discriminar infecção ativa de infecção latente; sensibilidade reduzida em indivíduos assintomáticos ou imunocomprometidos; reações cruzadas com outras infecções, como doença de Chagas, tuberculose, malária e outras doenças parasitárias e micóticas; influência da vacinação canina com antígenos de *Leishmania*, que podem gerar resultados sorológicos positivos, dificultando a distinção entre animais vacinados e infectados (SOLANO-GALLEGO, 2017; PEREIRA et al., 2020).

Embora apresente alta especificidade, a sensibilidade da microscopia é influenciada pela qualidade da lâmina, pela experiência do examinador, pela técnica de coloração e pelo tempo decorrido entre a coleta e a leitura (WHO, 2010; BESADA, et al., 2013). Em pacientes coinfectados pelo HIV, por exemplo, a sensibilidade do exame parasitológico pode variar significativamente, sendo frequentemente necessária a repetição de amostras de medula óssea ou a associação com cultura e PCR.

A sensibilidade da microscopia depende diretamente da qualidade da amostra, da experiência do examinador e do estágio da doença, podendo variar amplamente entre diferentes contextos clínicos (BESADA et al., 2013; SOLANO-GALLEGO et al., 2017).

O isolamento do parasita em cultura (meios específicos como Schneider, etc) permite a caracterização de espécies, mas é um método trabalhoso, de crescimento lento e suscetível a contaminações, o que limita seu uso na rotina de serviços de saúde pública. A inoculação experimental em hamsters (*Mesocricetus auratus*) ainda é utilizada em contexto de pesquisa para amplificação de parasitas, mas não é viável como ferramenta de rotina.

As técnicas moleculares, especialmente a reação em cadeia da polimerase (PCR) têm se consolidado como ferramentas de alta sensibilidade e especificidade para detecção de DNA de *Leishmania* em diferentes matrizes clínicas (sangue periférico, medula óssea, aspirados de linfonodo, biópsias de pele, etc). A PCR detecta o DNA do parasita com alta sensibilidade e especificidade, mesmo em infecções subclínicas, permite quantificar a carga parasitária, informação útil para monitorar a resposta ao tratamento, detectar recidivas e realizar estudos de dinâmica de transmissão (LANGONI et al., 2016). Embora seja uma técnica limitada pelo custo e infraestrutura laboratorial, este método tem se firmado como uma ferramenta de diagnóstico confirmatório importante, especialmente nos casos em que o teste sorológico foi indeterminado (MARY, et al., 2004).

Métodos moleculares, especialmente a reação em cadeia da polimerase (PCR,qPCR), oferecem sensibilidade e especificidade elevadas, inclusive em infecções subclínicas. Apesar do custo e demanda de infraestrutura laboratorial, são cada vez mais valorizados como ferramenta confirmatória, útil também para quantificação da carga parasitária e monitoramento terapêutico ou recidivas (MARY et al., 2004; FERREIRA et al., 2022).

Apesar de não haver completo consenso sobre um protocolo padronizado único, acumulam-se evidências de que a combinação de testes sorológicos e moleculares aumenta substancialmente a sensibilidade diagnóstica, sobretudo em infecções subclínicas e em pacientes coinfectados com HIV (ALVAR et al., 2008; CONCEIÇÃO-SILVA; ALVES, 2014).

Diante dessas limitações, estudos recentes têm reforçado que a combinação de métodos sorológicos e moleculares aumenta significativamente a sensibilidade diagnóstica, especialmente em animais assintomáticos e em contextos de co-infecção, contribuindo para maior precisão diagnóstica e melhor tomada de decisão clínica (ALVAR et al, 2008); CONCEIÇÃO-SILVA; ALVES, 2014; SOLANO-GALLEGO et al., 2017)..

2.3.2 Tratamento

No caso da LVC, o tratamento visa a melhora da qualidade de vida do animal, o controle clínico da doença, a redução da carga parasitária tecidual e a diminuição da infectividade dos cães para os vetores, uma vez que a eliminação completa de *Leishmania infantum* não é alcançada com os protocolos terapêuticos atualmente disponíveis (SOLANO-GALLEGO et al., 2017; TOEPP; PETERSEN, 2020). Embora diretrizes internacionais reconheçam diferentes esquemas terapêuticos para cães em contextos regulatórios distintos, no Brasil, o uso de antimoniais pentavalentes (como o antimoniato de meglumina) é proibido em cães, conforme normativas do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, devido ao risco sanitário, ao potencial impacto na resistência medicamentosa e à sua relevância no tratamento humano da leishmaniose (BRASIL, MAPA; SOLANO-GALLEGO, 2017).

Atualmente, a miltefosina associada ao alopurinol constitui o principal esquema terapêutico autorizado para cães no Brasil, sendo indicada para o controle clínico da LVC, sempre acompanhada de terapias de suporte, especialmente para o manejo da

insuficiência renal e de outras comorbidades frequentemente associadas à infecção (MIRÓ et al., 2018; MONTEIRO et al., 2021). Ressalta-se que esse tratamento não promove cura parasitológica, mas pode reduzir a carga parasitária e a progressão clínica quando instituído precocemente (SOLANO-GALLEG0 et al., 2017).

Do ponto de vista epidemiológico, cães tratados podem permanecer infectados e potencialmente infectantes para flebotomíneos, especialmente quando o controle clínico é incompleto ou quando ocorrem recaídas. Esse fato reforça a necessidade de associar o tratamento individual a estratégias contínuas de controle vetorial e vigilância epidemiológica, incluindo o uso de coleiras impregnadas com inseticidas, manejo ambiental e monitoramento entomológico (SEGARRA et al., 2018; SCORZA et al., 2021)

Além disso, a persistência de anticorpos após o tratamento impacta diretamente a interpretação dos testes sorológicos, dificultando a distinção entre infecção ativa, infecção controlada e a exposição prévia, sobretudo em áreas endêmicas. Dessa forma, o diagnóstico precoce e a integração entre métodos laboratoriais, critérios clínicos e dados epidemiológicos permanecem centrais para a tomada de decisões sanitárias no manejo da LVC, em consonância com o foco deste trabalho (PEREIRA et al., 2020; ANDRONIC et al., 2023).

2.3.3 Prevenção

A prevenção da Leishmaniose Visceral Canina, causada predominantemente por *Leishmania infantum* no Brasil, deve ser compreendida como um conjunto integrado de intervenções capaz de reduzir a exposição do cão ao vetor, diminuir a probabilidade de infecção e, reduzir a infectividade do reservatório doméstico em nível comunitário. A literatura acentua que medidas isoladas tendem a produzir impacto limitado quando não são acompanhadas por cobertura adequada, continuidade operacional, adesão do tutor e vigilância epidemiológica/entomológica, elementos que definem a efetividade real em áreas urbanas e periurbanas endêmicas. Nesse sentido, a dinâmica de transmissão reflete condições ambientais (acúmulo de matéria orgânica, sombreamento, umidade, presença de abrigos peridomiciliares), determinantes socioeconômicos e mudanças climáticas que podem modular sazonalidade, densidade vetorial e expansão territorial do risco (PAREYN, et atl. 2025).

No componente diretamente relacionado ao cão, as intervenções com melhor racional biológico e maior consistência de resultados em campo são aquelas que previnem a picada do flebotomíneo, uma vez que interrompem o elo crítico do ciclo: o

repasto sanguíneo. Coleiras impregnadas com inseticidas/repelentes e, em determinados cenários, ectoparasitas tópicos com ação repelente-inseticida reduzem o contato vetor-hospedeiro, diminuindo a chance de inoculação e, secundariamente, a probabilidade do vetor adquirir o parasito ao se alimentar em cães infectados. Em estudo de coorte conduzido no Brasil, uma coleira de matriz polimérica contendo 10% de imidacloprida e 4,5% de flumetrina mostrou alta efetividade para prevenir infecção por *L. infantum*, com diferença expressiva entre grupos ao longo seguimento (ALVES, et al., 2022).

Do ponto de vista da prevenção, tais resultados sustentam o uso de coleiras como intervenção prioritária, especialmente quando o objetivo é reduzir a incidência canina em áreas endêmicas. No entanto, a efetividade comunitária depende de fatores operacionais como: distribuição, reposição no tempo correto, monitoramento de perdas e adesão dos tutores, pois qualquer interrupção tende a reintroduzir risco individual e reduzir o efeito coletivo.

A importância das coleiras ultrapassa a proteção individual do cão. No Brasil, o uso ampliado de coleiras impregnadas com deltametrina foi associado à redução na incidência de leishmaniose visceral humana durante o período de entrega/manutenção da intervenção, com diminuição do efeito após a interrupção, sugerindo que a prevenção baseada em coleiras, para ser sustentada em nível populacional, requer continuidade e estabilidade (WERNECK; FIGUEIREDO; CRUZ, 2024). Embora o contexto humano não seja o foco central deste trabalho, esse resultado reforça o papel do cão como reservatório doméstico em cenários urbanos e justifica a priorização de medidas que diminuam a interação vetor-cão como estratégia de prevenção integrada.

Paralelamente ao uso de coleiras e produtos repelentes, a prevenção da LVC exige fortalecimento do controle vetorial e do manejo ambiental em escala domiciliar e comunitária. A literatura destaca que a eficácia de medidas químicas, como a borrifação intra/peridomiciliar, é heterogênea e dependente de espécie vetorial, padrão de repouso do flebotomíneo, condições da moradia, resistência a inseticidas e qualidade da execução. Há evidências de que a borrifação residual para controle da leishmaniose visceral reduziu vetores em determinados cenários, porém, os resultados variam e a efetividade comunitária depende de desenho operacional, cobertura e manutenção (FABER et al., 2022). Estudos recentes também apontam que intervenções vetoriais, como borrifação residual, podem influenciar abundância vetorial e transmissão, contudo seus benefícios são condicionados por frequência, durabilidade do efeito inseticida e contextos ecoepidemiológicos distintos, o que reforça a necessidade de estratégias

adaptativas e baseadas em dados (COFFENG et al., 2024). Dessa forma, é determinante para a prevenção da leishmaniose que o controle vetorial seja articulado a redução de matéria orgânica úmida e resíduos no peridomicílio; ao manejo de abrigos de animais e estruturas sombreadas; a educação comunitária para mitigação de criadouros; e a vigilância entomológica quando factível, para orientar e avaliar respostas.

A vacinação canina permanece um eixo preventivo em desenvolvimento e deve ser tratada como componente complementar às medidas anti-picada e ao manejo ambiental, não como substituta. Ensaio recentes em grande escala com vacina de DNA (Neoleish) demonstraram redução do risco de infecção, de doença clínica e diminuição de carga parasitária, além de apontar segurança e ausência de interferência com testes sorológicos usuais em determinados cenários avaliados (PÁEZ et al., 2025). Em contrapartida, outro estudo relatou proteção relevante de um candidato vacinal vivo atenuado (LmCen-/-) em condições de exposição natural, sinalizando avanço tecnológico para prevenção de LVC (BOUSSOFFARA et al., 2025). Assim, em termos preventivos, a vacinação deve ser posicionada como estratégia potencialmente útil para reduzir adoecimento e carga parasitária, desde que integrada a coleiras/repelentes e à vigilância, mitigando o risco de falsa segurança pelo tutor.

No contexto de manejo do animal e do domicílio, medidas comportamentais e estruturais podem reduzir exposição e complementar intervenções químicas. Considerando a atividade vetorial mais intensa ao entardecer e à noite, recomenda-se limitar a permanência do cão em áreas externas nesses períodos quando possível, melhorar condições de canis (limpeza, redução de umidade, remoção de matéria orgânica, barreiras físicas) e, uso de telas ou barreiras que reduzem a entrada de flebotômíneos em áreas de repouso do animal. Diretrizes e consensos clínicos recentes em dermatologia/veterinária enfatizam, em áreas endêmicas, o uso de medidas repelentes como parte do padrão preventivo, reforçando o consenso técnico (WORLD ASSOCIATION FOR VETERINARY DERMATOLOGY, 2025).

Um elemento transversal decisivo para prevenção efetiva, é a qualificação da vigilância. Intervenções preventivas dependem de estratificação de risco, monitoramento de cobertura (como o percentual de cães com coleira e reposição no prazo), avaliação de incidência e identificação de áreas prioritárias. Nesse ponto, o diagnóstico assume papel preventivo indireto, porém estratégico: testes mais confiáveis permitem estimativas mais estáveis de prevalência/incidência, reduzem erros de classificação entre ELISA comercial e ensaio baseado em glutamina sintetase (GS), o aprimoramento diagnóstico pode

sustentar prevenção na orientação de decisões sanitárias e ações de campo com menor incerteza; no monitoramento da efetividade de intervenções (coleiras, vacinação, ações vetoriais) com maior validade; e reduzir conflitos e baixa adesão decorrentes de resultados contestáveis, especialmente em cenários em que decisões afetam diretamente tutores e comunidades. Conforme corrobora Pareyn et al., 2025, os avanços sustentáveis no controle de leishmanioses exigem melhoria contínua de diagnósticos, intervenções vetoriais e desenvolvimento de vacinas, além de vigilância aprimorada e compromisso político-institucional (PAREYN et al., 2025).

Por fim, é essencial reconhecer que a prevenção da LVC é afetada por problemas de implementação. Pesquisas recentes demonstram que perdas de coleira e interrupções operacionais reduzem acentuadamente o efeito protetivo e podem reverter ganhos obtidos, exigindo estratégias educativas e logísticas persistentes (MATSUMOTO et al., 2025). Do mesmo modo, intervenções que geram impacto em determinado período podem perder efeito quando descontinuadas, como observado em avaliação comunitária com desfecho humano, o que reforça que programas precisam ser estruturados para continuidade e não apenas para ações episódicas (WERNECK; FIGUEIREDO; CRUZ, 2024). Assim, a prevenção da LVC deve ser tratada como política integrada e sustentada: proteção anti-picada como eixo central, controle vetorial e manejo ambiental como base, vacinação como componente complementar em consolidação, e vigilância ancorada em diagnóstico robusto - exatamente o ponto em que o presente trabalho se insere ao avaliar um ensaio sorológico baseado em glutamina sintetase frente a um ELISA comercial.

2.4 A IMPORTÂNCIA DA GLUTAMINA SINTETASE (GS) NO CICLO DA *LEISHMANIA* E SUA RELEVÂNCIA PARA O DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO

A Glutamina Sintetase (GS) é uma enzima essencial no metabolismo do nitrogênio e desempenha papel central na sobrevivência, virulência e adaptação fisiológica de diversos protozoários parasitários, incluindo espécies do gênero *Leishmania* (KUMAR et al., 2020). Sua função primária é catalisar a conversão de glutamato e amônio em glutamina, reação dependente de ATP e fundamental para biossíntese proteica, produção de metabólitos nitrogenados e manutenção da homeostase celular, especialmente sob condições de estresse nutricional e oxidativo (BRITO; SOUZA; SERAFIM, 2023). Em parasitas intracelulares obrigatórios, como *Leishmania infantum*, a

GS assume importância estratégica, contribuindo para a adaptação dos macrófagos, permitindo replicação, evasão imunológica e persistência crônica (PAIVA-CAVACO et al., 2021).

Estudos transcriptômicos e proteômicos demonstram que a GS apresenta expressão significativamente aumentada na fase amastigota, refletindo sua importância na adaptação às condições hostis do ambiente intracelular, caracterizado por baixa disponibilidade de nutrientes, pH ácido e elevada pressão oxidativa (MONTES et al., 2021; LIMA-JUNIOR et al., 2022). Esse aumento na expressão sugere que a glutamina sintetase integra um conjunto de mecanismos adaptativos que favorecem a persistência do parasita em tecidos-alvo, como baço, fígado e medula óssea, particularmente relevantes na leishmaniose visceral canina (SEGARRA et al., 2018).

Evidências experimentais reforçam o caráter essencial da GS para a viabilidade e virulência de *Leishmania*. Modelos baseados em mutantes com atividade reduzida ou suprimida da GS demonstraram queda significativa da sobrevivência intracelular e diminuição da infectividade em modelos in vivo e in vitro, indicando que a enzima é indispensável para a manutenção do parasita no hospedeiro mamífero (GHOSH et al., 2020). Além disso, a deficiência funcional da GS compromete a capacidade do parasita de resistir às respostas microbidas do hospedeiro, resultando em maior suscetibilidade à morte celular induzida por mecanismos imunológicos (HANDMAN; BULLEN, 2022).

No contexto da resposta imune inata, a infecção por *Leishmania* desencadeia intensa produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN) por neutrófilos e macrófagos ativados, constituindo um dos principais mecanismos de controle parasitário inicial (HANDMAN; BULLEN, 2022). A glutamina sintetase participa de forma indireta, porém crucial, da resistência antioxidante do parasita, ao garantir o suprimento de glutamina necessário para a síntese de glutathione e outros antioxidantes celulares. Esse mecanismo contribui para a neutralização do estresse oxidativo e permite que as amastigotas sobrevivam e se multipliquem no interior das células hospedeiras (LIMA-JUNIOR et al., 2022). Na leishmaniose visceral canina, essa adaptação favorece a persistência subclínica do parasita, condição epidemiologicamente relevante para a manutenção da transmissão zoonótica (SEGARRA et al., 2018).

Além de sua relevância metabólica, evidências crescentes indicam que proteínas metabólicas de *Leishmania*, como GS, atuam como antígenos imunogênicos altamente estáveis e conservados, despertando respostas humorais robustas que podem ser exploradas para diagnósticos sorológicos (SILVA-SANTOS; FERREIRA, 2024; KUMAR et

al., 2020).

Do ponto de vista genético, análises do transcriptoma demonstram que genes relacionados ao metabolismo do nitrogênio encontram-se hiperexpressos durante a fase amastigota, reforçando sua importância adaptativa (MONTES et al., 2021). Tais achados indicam que GS pode funcionar como marcador molecular da fase intracelular ativa e, portanto, como alvo diagnóstico mais eficaz do que antígenos de superfície tradicionais.

Os testes sorológicos baseados em rk39 ou rk28 demonstram alta sensibilidade em cães sintomáticos, porém apresentam limitações críticas em indivíduos assintomáticos ou coinfeções, resultando em falsos negativos que comprometem o controle sanitário (SOLANO-GALLEGO, 2017; PEREIRA et al., 2020). A utilização de GS como antígeno apresenta vantagens, tais como: baixa variabilidade genética entre cepas, possibilitando padronização internacional (SILVA-SANTOS; FERREIRA, 2024), elevada imunogenicidade em fases iniciais da infecção, menor probabilidade de reações cruzadas com protozoários filogeneticamente próximos. Essas características tornam estratégica a exploração de GS como alvo para novas metodologias diagnósticas e terapêuticas, abrindo perspectiva para desenvolvimento de vacinas e inibidores metabólicos específicos.

Nesse contexto, a escolha da Glutamina Sintetase como alvo antigênico neste estudo não se fundamenta apenas em evidências isoladas da literatura, mas insere-se em uma linha contínua de investigação desenvolvida pelo grupo de pesquisa ao qual este trabalho está vinculado. A importância de proteínas metabólicas de *Leishmania*, incluindo aquelas envolvidas no metabolismo do nitrogênio, foi inicialmente explorada na tese de doutorado de Viana (2016), na qual abordagens imunoproteômicas foram empregadas para identificação de antígenos imunorreativos com potencial aplicação translacional no contexto da leishmaniose visceral. A partir desses resultados, o grupo avançou na avaliação de candidatos antigênicos em estratégias imunoterapêuticas e, mais recentemente, em plataformas vacinais experimentais, consolidando a Glutamina Sintetase como um alvo biologicamente relevante, imunologicamente ativo e promissor para aplicações diagnósticas e imunológicas. Assim, o presente estudo dá continuidade lógica e científica a essa trajetória investigativa, avaliando o desempenho da GS como antígeno em ensaio sorológico experimental para leishmaniose visceral canina.

Adicionalmente, a relevância biológica da glutamina sintetase no metabolismo e na virulência da *Leishmania* amplia seu interesse não apenas para diagnóstico, mas também como alvo terapêutico e vacinal. Inibidores metabólicos direcionados à GS têm

sido explorados como estratégia para comprometer a sobrevivência do parasita sem afetar diretamente células do hospedeiro, enquanto abordagens vacinais baseadas em proteínas metabólicas conservadas despontam como alternativa para indução de resposta imune protetora mais ampla (BRITO; SOUZA; SERAFIM, 2023). Dessa forma, a GS se insere em uma perspectiva translacional que integra diagnóstico, tratamento e prevenção.

Em síntese, a Glutamina Sintetase ocupa posição estratégica no ciclo biológico da *Leishmania*, sustentando sua adaptação metabólica, resistência ao estresse oxidativo e persistência intracelular. Sua elevada conservação, imunogenicidade e expressão aumentada na fase amastigota justificam sua exploração como alvo diagnóstico sorológico inovador, especialmente no contexto da leishmaniose visceral canina. Assim, a investigação comparativa entre um ensaio baseado em GS e um teste comercial tradicional se fundamenta não apenas em critérios técnicos de desempenho diagnóstico, mas também em sólida base biológica e fisiopatológica, alinhando-se às demandas atuais por métodos mais sensíveis, específicos e aplicáveis à vigilância em saúde pública.

Este estudo caracteriza-se como uma pesquisa experimental, comparativa e quantitativa, voltada à avaliação de desempenho diagnóstico entre dois ensaios sorológicos para detecção de anticorpos IgG anti-*Leishmania infantum* em cães: (i) um teste comercial amplamente utilizado na rotina veterinária (ELISA-rK39) e (ii) um ensaio imunoenzimático experimental desenvolvido experimentalmente com base na proteína Glutamina Sintetase (GS) de *Leishmania infantum*. A escolha por um desenho comparativo visa estabelecer a eficiência, concordância e potencial de aplicação clínica do ensaio experimental em relação ao teste comercial de referência, conforme diretrizes metodológicas de validação diagnóstica recomendadas para imunodiagnósticos (GREINER; PFEIFFER; SMITH, 2020; DOUEK et al., 2022). O objetivo é analisar a capacidade comparativa de detecção de anticorpos IgG anti-*Leishmania* em amostras de soro ou plasma de cães suspeitos de leishmaniose visceral canina.

2.5 NOVAS PERSPECTIVAS PARA O DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

Nos últimos anos, avanços significativos têm sido observado no desenvolvimento de novas abordagens diagnósticas e terapêuticas para a leishmaniose visceral canina (LVC), impulsionados pela necessidade de superar as limitações dos

métodos tradicionais, como baixa sensibilidade em estágios iniciais, reações cruzadas e dificuldade de distinção entre infecção ativa e exposição prévia (SOLANO-GALLEGO et al., 2017; ANDRONIC et al., 2023). Nesse contexto, destaca-se a busca por novos alvos antigênicos, métodos moleculares mais acessíveis e estratégias terapêuticas mais eficazes e seguras.

No campo do diagnóstico sorológico, uma das principais tendências é o desenvolvimento de antígenos quiméricos e multiepitopo, que combinam diferentes regiões imunogênicas de proteínas de *Leishmania*, aumentando a sensibilidade e especificidade dos testes. Estudos recentes demonstram que proteínas quiméricas, como Q5 e rMELEISH3, apresentam desempenho superior aos antígenos convencionais, com sensibilidade superior a 90% e especificidade próxima de 100% especialmente em cães sintomáticos (SILVA-SANTOS; FERREIRA, 2024; FONSECA et al., 2023). Esses avanços indicam uma tendência de substituição progressiva de antígenos isolados por construções sintéticas mais robustas e específicas.

Outra inovação relevante é a incorporação de plataformas diagnósticas baseadas em biossensores e nanotecnologia. Ensaio utilizando nanopartículas metálicas, como ouro coloidal, têm sido aplicados em testes imunocromatográficos com maior sensibilidade analítica e menor tempo de resposta. Além disso, biossensores eletroquímicos e ópticos têm demonstrado potencial para detecção rápida e quantitativa de biomarcadores de *Leishmania*, permitindo aplicações em campo e em sistemas point-of-care (POC) (SOUZA et al., 2022; KUMAR et al., 2023).

No âmbito molecular, destacam-se métodos alternativos à PCR convencional, como a amplificação isotérmica mediada por alça (LAMP) que permite a detecção de DNA parasitário sem a necessidade de termocicladores. Essa técnica apresenta alta sensibilidade, rapidez e custo reduzido, sendo particularmente promissora para uso em áreas endêmicas com infraestrutura limitada. Estudos recentes demonstram que a LAMP aplicada a amostras com swab conjuntival e sangue periférico pode alcançar sensibilidade superior a 90% em condições otimizadas (SANTOS et al., 2024; NOGUEIRA et al., 2023).

Além disso, abordagens baseadas em citometria de fluxo e microesferas têm sido exploradas para diagnóstico sorológico de alta precisão. Esses sistemas permitem a detecção simultânea de múltiplos antígenos e a análise quantitativa da resposta imune, contribuindo para maior acurácia diagnóstica e possibilidade de estratificação clínica dos animais infectados (FARIA et al., 2023).

Outra linha emergente de pesquisa envolve a identificação de biomarcadores

imunológicos e moleculares capazes de diferenciar infecção ativa de exposição prévia. Citocinas como IFN- γ , IL-10 e IL-12, bem como perfis de expressão gênica, têm sido investigados como ferramentas complementares ao diagnóstico sorológico, permitindo uma abordagem mais integrada e funcional da resposta imune do hospedeiro (MACEDO et al., 2023; PAIVA-CAVACO et al., 2021).

No campo terapêutico, embora os protocolos tradicionais baseados em miltefosina e antimoniato de meglumina associados ao alopurinol ainda sejam amplamente utilizados, novas estratégias vêm sendo investigadas com o objetivo de aumentar a eficácia clínica, reduzir efeitos adversos e limitar a transmissibilidade do parasita. Entre essas abordagens, destaca-se o uso de imunoterapia, que busca modular a resposta imune do hospedeiro para favorecer a eliminação do parasita (RIBEIRO et al., 2023).

Estudos recentes demonstram que imunoterapias baseadas em vacinas terapêuticas, antígenos recombinantes e nanopartículas imunomoduladoras podem reduzir a carga parasitária e melhorar os sinais clínicos em cães infectados. Ensaios experimentais com vacinas intranasais e formulações contendo proteínas recombinantes associadas a adjuvantes têm apresentado resultados promissores, com redução significativa da carga parasitária em tecidos como pele e medula óssea (RAMOS et al., 2023).

Adicionalmente, novas moléculas com potencial leishmanicida vêm sendo investigadas, incluindo compostos naturais, derivados sintéticos e fármacos reposicionados. Estudos com compostos derivados de plantas medicinais, peptídeos antimicrobianos e inibidores metabólicos têm demonstrado atividade contra *Leishmania infantum*, abrindo perspectivas para terapias alternativas ou complementares (SILVA et al., 2022; OLIVEIRA et al., 2023).

Outra abordagem inovadora envolve o uso de vacinas preventivas de nova geração, incluindo vacinas de DNA e vacinas baseadas em vetores virais. Ensaios clínicos recentes indicam que essas estratégias podem reduzir a incidência da infecção e carga parasitária, contribuindo não apenas para a proteção individual dos animais, mas também para a redução da transmissão da doença em áreas endêmicas (FERNANDES et al., 2024).

Dessa forma, as novas perspectivas para o diagnóstico e tratamento da leishmaniose visceral canina apontam para uma abordagem integrada, baseada na combinação de métodos mais sensíveis, específicos e acessíveis, aliados a estratégias

terapêuticas inovadoras e imunomodulatórias. Esses avanços têm potencial para melhorar significativamente o controle da doença, reduzir sua transmissão e aprimorar a qualidade de vida dos animais infectados, contribuindo para o fortalecimento das ações de saúde pública em áreas endêmicas.

3 METODOLOGIA

3.1. COLETA E PREPARO DAS AMOSTRAS DE SANGUE

As amostras foram coletadas previamente para fins diagnósticos e disponibilizadas de forma anonimizada. Dessa forma, o estudo utiliza material biológico secundário, sem intervenção direta em animais, atendendo às normas éticas vigentes de pesquisa com seres vivos e biossegurança (CONCEA, 2016).

As amostras foram mantidas sob refrigeração controlada (2-8°C) até momento do processamento, evitando ciclos repetidos de congelamento e descongelamento, de modo a preservar a integridade proteica e reduzir interferências analíticas, uma vez que tais variações podem degradar proteínas e comprometer a acurácia analítica (ANDERSON; ANDERSON, 2002).

Foram utilizadas 43 amostras de soro sanguíneo disponibilizadas por um laboratório parceiro, provenientes de cães com suspeita clínica de leishmaniose visceral canina, coletadas previamente no âmbito da rotina diagnóstica. As amostras de sangue foram obtidas por venopunção, utilizando tubos apropriados sem anticoagulante, e mantidas em repouso até completa coagulação, seguida de centrifugação para separação do soro. O soro obtido foi cuidadosamente transferido para microtubos estéreis, devidamente identificados e numerados, evitando-se contaminação cruzada e hemólise. As amostras foram armazenadas a -20 °C, em alíquotas, até o momento das análises, de modo a preservar a integridade das imunoglobulinas e minimizar perdas por ciclos repetidos de congelamento e descongelamento.

3.2 EXPRESSÃO DA GLUTAMINA SINTETASE

A expressão da proteína Glutamina Sintetase recombinante foi realizada por meio de sistema heterólogo em *Escherichia coli* BL21 (DE3) SlyD, Scienco, previamente transformada com o gene de interesse. Inicialmente, uma colônia isolada proveniente de placa seletiva, ou alternativamente 200 µL de uma alíquota bacteriana previamente estocada, foi inoculada em 30 mL de meio Luria-Bertani (LB) suplementado com ampicilina e cloranfenicol, nas concentrações finais correspondentes às soluções estoque utilizadas. O pré-inóculo foi incubado sob agitação constante de 120 rpm, a 37 °C, durante aproximadamente 16 horas, permitindo o crescimento bacteriano até a fase estacionária.

No dia seguinte, uma alíquota do meio LB estéril foi reservada para uso como branco em leituras espectrofotométricas. Em seguida, 15 mL do pré-inóculo foram transferidos para frascos contendo 2 litros de meio LB fresco, igualmente suplementado com os antibióticos seletivos nas mesmas proporções. O cultivo foi mantido sob agitação a 37 °C, com monitoramento periódico do crescimento celular por leitura da densidade óptica a 600 nm. Ao atingir valores entre 0,6 e 0,8 indicativos da fase exponencial de crescimento, a expressão da proteína recombinante foi induzida pela adição de isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG) na concentração final de 0,625 mM. Após a indução, o cultivo permaneceu sob as mesmas condições de temperatura e agitação por um período adicional de três horas.

Concluída a etapa de expressão, as células bacterianas foram coletadas por centrifugação a 8.000 rpm, durante 20 minutos, a 4 °C, em tubos de 50 mL. O sobrenadante foi descartado, e o procedimento de centrifugação foi repetido até o processamento completo do volume cultivado. Os pellets celulares obtidos foram submetidos a duas etapas consecutivas de lavagem com tampão fosfato salino (PBS), seguidas de centrifugação a 8.000 rpm por 10 minutos, a 4 °C, com o objetivo de remover resíduos do meio de cultura.

Para a lise celular, cada pellet foi ressuspensionado em tampão A, composto por Tris-base e cloreto de sódio em pH alcalino, sendo posteriormente reunidos em um único recipiente apropriado para sonicação. A ruptura celular foi realizada em banho de gelo, utilizando ponteira macro, com potência ajustada para 70 %, em dois pulsos. Foram executados dez ciclos de sonicação, cada um com duração de um minuto, intercalados por intervalos de um minuto, de modo a minimizar o aquecimento da amostra e preservar a integridade da proteína recombinante.

Após a lise, o material foi centrifugado a 8.000 rpm por 45 minutos, a 4 °C, permitindo a separação do sobrenadante, que contém a fração solúvel da proteína recombinante, do pellet insolúvel, o qual foi descartado.

3.3 PADRONIZAÇÃO DO ELISA-GS

A padronização do ensaio imunoenzimático indireto (ELISA) utilizando a Glutamina Sintetase recombinante (GS) como antígeno (ELISA-GS) teve como objetivo estabelecer condições experimentais estáveis, reprodutíveis e capazes de discriminar

adequadamente amostras sorológicas reagentes e não reagentes. A definição criteriosa dos parâmetros do ensaio é fundamental para garantir sensibilidade, especificidade e confiabilidade analítica, especialmente em estudos voltados à validação diagnóstica.

O experimento foi conduzido contemplando as etapas de sensibilização da microplaca, bloqueio, incubação com amostras e controles, aplicação do anticorpo conjugado, desenvolvimento cromogênico e leitura espectrofotométrica. A padronização considerou como pontos críticos a concentração do antígeno por poço, as condições de incubação, a diluição do conjugado, o número de lavagens e o controle do tempo de desenvolvimento da reação.

O ELISA-GS indireto baseia-se na adsorção passiva da proteína GS ao fundo de microplacas de poliestireno de alta afinidade. Após a sensibilização, anticorpos específicos presentes nas amostras de soro ligam-se ao antígeno imobilizado. Um anticorpo secundário conjugado a enzima, específico para imunoglobulinas da espécie de interesse, reconhece os anticorpos ligados. A adição do substrato cromogênico tetrametilbenzidina (TMB) resulta em reação enzimática mensurável, cuja intensidade é proporcional à quantidade de anticorpos específicos presentes na amostra. A reação é interrompida por solução ácida H_2SO_4 1M e a densidade óptica (DO) é quantificada em leitor de microplacas.

3.3.1 Sensibilização da microplaca com antígeno GS

A sensibilização das microplacas foi realizada utilizando-se solução de GS recombinante na concentração correspondente a 0,2 µg de proteína por poço, adicionando-se 100 µL da solução a cada poço. As placas foram incubadas sob refrigeração (2-8 °C) por um período de 12 a 18 horas, permitindo adsorção eficiente do antígeno à superfície do poliestireno.

Após a incubação, as placas foram submetidas a três lavagens com solução tampão PBS contendo Tween 20 (PBS-T), com a finalidade de remover o excesso de antígeno não adsorvido e reduzir a possibilidade de ligações inespecíficas nas etapas subsequentes.

3.3.2 Bloqueio de placa

O bloqueio dos sítios livres da microplaca foi realizado pela adição de 100 µL por poço de solução bloqueadora (47mL PBS 1x + 3mL SFB), seguida de incubação a 30-37 °C por 1h. Essa etapa tem como finalidade minimizar a adsorção inespecífica de proteínas séricas e do conjugado à superfície de placa, contribuindo para a redução do sinal de fundo e aumento da relação sinal/ruído do ensaio.

Após o bloqueio, as placas foram novamente lavadas três vezes com PBS-T, visando a remoção do excesso da solução bloqueadora antes da adição das amostras.

3.3.3 Preparação das amostras e controles

As amostras de soro de cães verdadeiros positivos e negativos diagnosticados por PCR foram diluídas na proporção 1:100 em PBS-T + SFB. As diluições foram preparadas de forma individualizada, devidamente identificadas e organizadas em placas de diluição, assegurando rastreabilidade e redução de erros de pipetagem. Controles positivos e controles negativos foram incluídos em todas as placas, garantindo o monitoramento do desempenho do ensaio em cada execução.

3.3.4 Controle de qualidade das placas e definição da diluição do conjugado

Antes da análise das amostras experimentais, foi realizado o controle de qualidade das placas sensibilizadas utilizando controles positivos e controles negativos em duplicata. Essa etapa teve como objetivo confirmar a eficiência da sensibilização, do bloqueio e das lavagens, bem como verificar a ausência de sinal inespecífico elevado.

A diluição do anticorpo conjugado (Goat anti-canine IgG (H+L) - HRP - Southern Biotech) foi previamente definida e padronizada em 1:4000, preparada em PBS-T+SFB. Essa condição foi selecionada por proporcionar adequada separação entre os sinais dos controles positivos e controles negativos, com baixo ruído de fundo e boa repetibilidade intra-placa. A utilização de duplicatas permitiu avaliar a consistência dos resultados e identificar eventuais variações técnicas.

3.3.5 Execução do ensaio ELISA-GS

Após a validação da placa, foram adicionados 100 µL por poço das amostras diluídas e dos controles, seguidos de incubação a 30-37 °C por 30 minutos. Em seguida, as placas foram lavadas três vezes com PBS-T. Posteriormente adicionou-se 100 µL por poço do anticorpo conjugado diluído a 1:4.000, com incubação por 30 minutos a 30-37 °C. Ao final dessa etapa, as placas passaram por novo ciclo de lavagem (três vezes) para remoção do conjugado não ligado.

O desenvolvimento cromogênico foi realizado pela adição de 100 uL de TMB *Southern Biotech* diluído na proporção 1:1 em PBS 1X por poço, com incubação em ambiente protegido da luz, a 0-37 °C por 5 minutos. A reação foi interrompida com a adição de 30 uL de ácido sulfúrico (H₂SO₄ 1 M).

3.3.6 Leitura dos resultados

A leitura das placas foi realizada imediatamente após a interrupção da reação, em leitora de microplacas ajustado para 450 nm. Os valores de densidade óptica obtidos foram registrados e associados ao mapa de placa previamente elaborado, garantindo a correta identificação dos dados.

3.4 TESTE SOROLÓGICO COMERCIAL ELISA-rK39

3.4.1 Princípio do ensaio

O teste sorológico comercial ELISA-rK39 é um ensaio imunoenzimático em fase sólida, baseado no princípio imunocaptura, destinado à detecção qualitativa de anticorpos IgG anti-*Leishmania infantum* em amostras de soro ou plasma canino. As microplacas fornecidas no kit são previamente sensibilizadas com antígeno recombinante de promastigotas de *Leishmania infantum*. Anticorpos específicos presentes na amostra ligam-se ao antígeno imobilizado, formando complexos antígeno-anticorpo. Após as etapas de lavagem, esses complexos são detectados por meio de um conjugado composto por anticorpo anti-IgG canina ligado à enzima peroxidase. A reação enzimática é revelada pela adição do substrato cromogênico TMB, resultado em desenvolvimento de

cor proporcional à quantidade de anticorpos presentes na amostra, mensurada por leitura espectrofotométrica.

3.4.2 Diluição das amostras e preparo dos reagentes

As amostras de soro ou plasma canino foram previamente diluídas na proporção de 1:20 em diluente fornecido pelo kit. Para isso, foram adicionados 15 µL da amostra a 300 µL de diluente, quando o ensaio foi realizado em duplicata, conforme orientação do fabricante. As diluições foram preparadas imediatamente antes do uso, não sendo armazenadas após o preparo.

O conjugado concentrado (100X) foi diluído na proporção de 1:100 em diluente, sendo preparado apenas no momento do ensaio. Para cada tira de 8 cavidades, utilizou-se 10 µL do conjugado concentrado em 1mL de diluente. A solução de lavagem foi preparada pela diluição do concentrado 20X em água destilada ou deionizada, conforme instruções do fabricante (BIOCLIN, manual do kit ELISA Vetlisa rK39).

3.4.3 Procedimento do ensaio imunoenzimático

Inicialmente, todos os reagentes, controles e amostras foram estabilizados à temperatura ambiente (15-30 °C) por no mínimo 30 minutos. As cavidades da microplaca foram organizadas para receber os controles positivo e negativo, além das amostras testadas.

Foram pipetados 100 µL do controle negativo e do controle positivo, ambos prontos para uso, nas cavidades designadas. Em seguida, 100 µL das amostras previamente diluídas foram adicionadas às respectivas cavidades. A placa foi homogeneizada suavemente, selada e incubada por 30 minutos à temperatura ambiente.

Após a incubação, o conteúdo das cavidades foi descartado e a placa submetida a três ciclos de lavagem com aproximadamente 300 µL de solução de lavagem por cavidade. Posteriormente, foram adicionados 100 µL do conjugado diluído em todas as cavidades, incluindo o branco, seguido de nova incubação por 30 minutos à temperatura ambiente. Após nova etapa de lavagem, foram adicionados 100 µL do substrato TMB,

incubando-se a placa por 10 minutos, protegida da luz.

A reação enzimática foi interrompida com a adição de 100 µL da solução de parada em cada cavidade. A leitura da absorbância foi realizada em leitor de microplacas utilizando filtro primário de 450 nm e filtro secundário de 630 nm, no prazo máximo de 10 minutos após a adição da solução de parada (BIOCLIN, manual do kit).

3.4.4 Verificação da validade do ensaio

A validade do ensaio foi confirmada a partir dos valores de absorbância obtidos para os controles interno do kit. Foram considerados válidos ensaios nos quais o branco apresentou absorbância inferior a 0,050, o controle negativo apresentou valor inferior a 0,450 e o controle positivo apresentou absorbância superior a 1,000. Ensaios que não atenderam a esses critérios foram descartados e repetidos.

3.4.5 Cálculo do ponto de corte (cut-off) e índices das amostras

O ponto de corte (cutoff) do ensaio foi determinado conforme metodologia estabelecida pelo fabricante, utilizando a média das absorbâncias do controle negativo acrescida de um fator fixo de 0,500. O cálculo foi realizado de acordo com a seguinte fórmula: $\text{Cutoff} = \text{Absorbância média do controle negativo} + 0,500$.

Após a determinação do cutoff, o índice de cada amostra foi calculado pela razão entre a absorbância da amostra e o valor do cutoff. Os resultados foram interpretados qualitativamente, sendo considerados negativos os índices inferiores a 0,9, positivos os índices superiores a 1,1 e indeterminados aqueles compreendidos entre 0,9 e 1,1. Amostras com resultado indeterminado foram submetidas a nova testagem.

3.4.6 Considerações finais sobre o método

O ensaio sorológico comercial ELISA-rK39 foi conduzido rigorosamente conforme o protocolo do fabricante, assegurando a padronização das etapas analíticas e a confiabilidade dos resultados obtidos. A metodologia empregada permitiu a detecção

qualitativa de anticorpos IgG anti-*Leishmania*, com critérios objetivos para validação do ensaio e interpretação dos resultados, sendo utilizada neste estudo como teste comercial de referência para comparação com o ensaio ELISA experimental desenvolvido.

3.4.7 Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram conduzidas com o objetivo de estabelecer ponto de corte (cutoff) para classificação das amostras no ensaio sorológico; quantificar o desempenho diagnóstico por sensibilidade, especificidade e valores preditivos; avaliar poder discriminatório por curva ROC e área sob a curva (AUC); estimar concordâncias entre testes por coeficiente Kappa; e testar diferenças entre medidas contínuas (absorbâncias) e modelar predição de positividade por regressão logística, conforme práticas recomendadas para estudos de acurácia diagnóstica (GREINER; PFEIFFER; SMITH, 2000).

3.4.8 Questões éticas

Por se tratar de material biológico obtido previamente para fins clínicos, sem identificação ou manipulação direta dos animais, o estudo não configurou atividade experimental direta com seres vivos e atendeu às normas éticas aplicáveis à pesquisa laboratorial com material clínico secundário.

O projeto foi devidamente aprovado pelo comitê de ética competente, sob o protocolo nº 02437/2022.

3.5 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

A detecção molecular de *Leishmania infantum* foi realizada por meio de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em tempo real, utilizando o kit de detecção de ácido nucleico - Bioguard, conforme instruções do fabricante. As amostras utilizadas foram previamente coletadas em tubos anticoagulante EDTA e mantidas sob refrigeração (2-8°C) até o processamento, evitando ciclos repetidos de congelamento e descongelamento.

3.5.1 Extração de ácidos nucleicos

A extração do ácido nucleico foi realizada previamente à amplificação por PCR, utilizando o reagente de extração (solução salina) recomendado pelo fabricante. Para cada amostra líquida, foram utilizados 200 µL, adicionados ao tubo contendo o tampão de lise fornecido pelo kit. Em casos de amostras viscosas, foi realizada diluição prévia em tampão de conservação.

A mistura foi homogeneizada por pipetagem e agitação manual até completa dissolução do material. Após a etapa de lise, o procedimento de extração foi conduzido conforme o protocolo do reagente, obtendo-se o ácido nucleico purificado. O material extraído foi utilizado imediatamente na reação de PCR.

3.5.2 Preparação da reação de PCR em tempo real

A amplificação foi realizada em analisador de PCR em tempo real compatível com detecção por fluorescência. Para cada reação, foram pipetados 20 µL da solução de reação, composta pelo reagente de amplificação liofilizado reconstituído com o ácido nucleico extraído.

O reagente liofilizado foi dissolvido por pipetagem repetida e homogeneização suave. Após a dissolução completa, a mistura foi submetida à centrifugação rápida (5-10 segundos) para deposição do conteúdo no fundo do tubo e remoção de bolhas. Controles positivo e negativo fornecidos pelo kit foram incluídos em todas as corridas de PCR.

3.5.3 Condições de amplificação e leitura

As amostras foram posicionadas no termociclador conforme o layout programado no software do equipamento. O programa específico para patógenos de mascotes foi selecionado e a reação foi iniciada conforme os parâmetros pré-configurados pelo sistema. A detecção do produto amplificado foi realizada no canal de fluorescência FAM, com monitoramento em tempo real da amplificação.

3.5.4 Interpretação dos resultados

A interpretação dos resultados foi realizada de acordo com os critérios estabelecidos pelo fabricante. Dessa forma, amostras que apresentaram curva de amplificação no canal FAM com valor de $CT \leq 35$ foram classificadas como positivas. Enquanto as amostras sem curva de amplificação detectada ou com $CT \geq 35$ foram classificadas como negativas. Resultados inconclusivos foram submetidos a nova extração e repetição da PCR.

3.5.5 Controle de qualidade e biossegurança

Todas as etapas foram realizadas seguindo normas de biossegurança e boas práticas laboratoriais para procedimentos moleculares. A preparação dos reagentes, manipulação de amostras e análise dos produtos de amplificação foram conduzidas em áreas separadas. Foram utilizadas ponteiras com filtro e materiais estéreis descartáveis. As superfícies de trabalho foram descontaminadas antes e após os procedimentos.

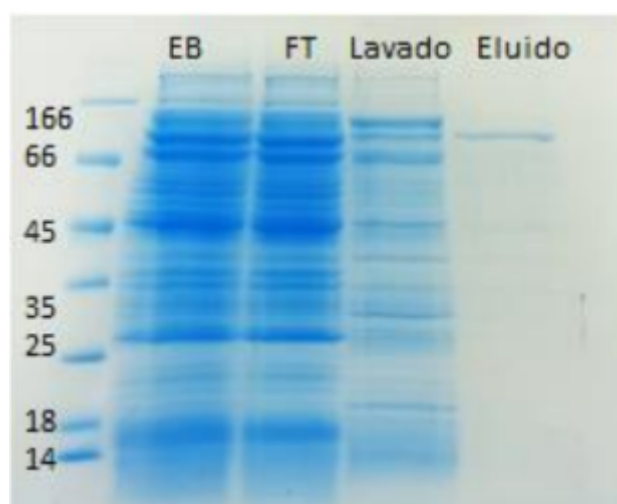
4 RESULTADOS

4.1 EXPRESSÃO DA GLUTAMINA SINTETASE (GS)

A expressão da proteína recombinante Glutamina Sintetase de *Leishmania infantum* foi realizada conforme descrito na metodologia. A análise por SDS-PAGE evidenciou a presença de banda compatível com o peso molecular esperado para a GS recombinante, confirmando a expressão da proteína recombinante.

A eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) revelou a presença da banda correspondente à GS principalmente nas frações eluídas após a purificação por afinidade, conforme demonstrado na figura 4.

Figura 4 - Análise por SDS-PAGE da expressão e purificação da Glutamina Sintetase recombinante de *Leishmania infantum* em sistema heterólogo de *Escherichia coli* BL21(DE3). M: marcador de peso molecular (kDa); EB: extrato bruto total obtido após lise celular por sonicação; FT (flow-through): fração correspondente às proteínas não ligadas à resina durante a cromatografia de afinidade; Lavado: fração obtida após a lavagem da coluna com tampão contendo imidazol em baixa concentração, destinada à remoção de proteínas ligadas de forma inespecífica; Eluído: fração eluída com alta concentração de imidazol contendo a proteína GS recombinante purificada. Observa-se uma banda predominante com massa molecular aproximada de ~45-47 kDa na fração eluída, compatível com a Glutamina Sintetase recombinante de *L. infantum*, indicando sua expressão e enriquecimento após o processo de purificação.



Fonte: Scienco, 2025.

Entretanto, o rendimento final obtido foi limitado, com recuperação aproximada de

0,485 mg de proteína total, valor considerado baixo para preparações destinadas a ensaios imunodiagnósticos em escala laboratorial. A proteína purificada foi utilizada nas etapas subsequentes de sensibilização das microplacas e padronização do ELISA-GS.

4.2 AMOSTRAS VERDADEIRAS POSITIVAS E NEGATIVAS COM BASE NO PCR

Do total de 43 amostras submetidas aos testes sorológicos e à PCR, 12 amostras (27,9%) foram classificadas como verdadeiramente positivas e 31 amostras (72,1%) como verdadeiramente negativas para *Leishmania infantum*, considerando a PCR como método de referência (padrão-ouro). A distribuição das amostras segundo os resultados da PCR encontra-se apresentada na Tabela 1.

Tabela 1 - Comparação entre o kit comercial, o ensaio baseado em GS e PCR. A tabela apresenta a distribuição das 43 amostras de soro canino analisadas de acordo com os resultados obtidos por três metodologias diagnósticas distintas: PCR, utilizada como método de referência para detecção de *Leishmania infantum*; o teste sorológico comercial ELISA-rK39; e o ensaio experimental baseado na Glutamina Sintetase (ELISA-GS). Para cada método, as amostras foram classificadas como “detectáveis” ou não “detectáveis”. No ELISA-rK39, 15 amostras foram classificadas como detectáveis e 28 como não detectáveis. Pela PCR, 12 amostras foram identificadas como verdadeiramente positivas (detectáveis) e 31 como verdadeiramente negativas (não detectáveis). No ensaio ELISA-GS, 10 amostras apresentaram resultado detectável, enquanto 33 foram classificadas como não detectáveis. Essa comparação evidencia as diferenças no desempenho diagnóstico entre os métodos sorológicos e a técnica molecular, permitindo a análise de concordâncias e discordâncias em relação ao método de referência.

	Detectáveis	Não detectáveis
Amostras testadas no kit comercial ELISA-rK39	15	28
Amostras testadas PCR	12 (verdadeiro positivo)	31 (verdadeiro negativo)
Amostras testadas Glutamina Sintetase	10	33

Fonte: Autora, 2025.

Os ensaios sorológicos foram interpretados em duas categorias (“detectável”/“não detectável”). No kit comercial ELISA-rK39, observaram-se 15 amostras detectáveis e 28 não detectáveis. No ensaio ELISA baseado em Glutamina Sintetase (ELISA-GS), após a determinação do cutoff = 0,358, identificaram-se 10 amostras detectáveis e 33 não detectáveis.

Para estimativa do desempenho diagnóstico, foram definidos: Verdadeiro

positivo (VP ou TP): amostras com PCR positivo e teste sorológico detectável; Falso negativo (FN): amostras com PCR positivo e teste sorológico não detectável; Falso positivo: amostras com PCR negativo e teste sorológico detectável; Verdadeiro negativo (VN ou TN): PCR negativo e teste sorológico não detectável.

Assim sendo, calculou-se sensibilidade e especificidade conforme as métricas descritas abaixo:

Sensibilidade (%) = $TP/TP+FN \times 100$

Especificidade (%) = $TN/TN+FP \times 100$

Dessa forma, para o teste **ELISA-rK39**, tem-se:

TN (total de negativos)=28

FP (falsos positivos)= $31 - TN = 31 - 28 = 3$

ELISA-rK39 positivos = $15 - FP = 15 - 3 = 12$

FN (falsos negativos) = $12 - TP = 12 - 12 = 0$

Sensibilidade (%)

Sens (%) = $15/15+0 \times 100 = 15/15 \times 100 = 100\%$

Especificidade (%)

Esp (%) = $28/28+3 \times 100 = 28/31 \times 100 = 90,3\%$

Tabela 2 - Tabela de contingência do ELISA-rK39 em relação à PCR (padrão ouro). A tabela apresenta a distribuição dos resultados do ensaio sorológico comercial ELISA - rK39 em relação à PCR, considerada o padrão de referência para a detecção de *Leishmania infantum*. As amostras classificadas como verdadeiramente positivas (VP) correspondem aos casos detectados simultaneamente pelo ELISA-rK39 e pela PCR, totalizando 15 amostras. Não foram observados resultados falso-negativos (VP- não detectado), indicando ausência de amostras negativas no ELISA-rK39 entre aquelas positivas pela PCR. As amostras classificadas como falso-positivas correspondem a três casos detectados pelo ELISA-rK39, mas não confirmados pela PCR, sendo designadas como verdadeiramente negativas (VN detectadas). Por fim, 28 amostras foram classificadas como verdadeiramente negativas, não detectadas por nenhum dos dois métodos. Essa distribuição constitui a base para o cálculo dos parâmetros de desempenho diagnóstico do teste ELISA-rK39, incluindo sensibilidade, especificidade e valores preditivos.

VP (detectado)	VP (não detectado) (FN)
12	0
VN (detectado) (FP)	VN (não detectado)
3	28

Fonte: Autora, 2026.

Para o **ELISA-GS**:

TP (total de positivos) = 10

FN = 2

TN = 31

VN = 31

FP=0

Sensibilidade (%)

$$\text{Sens (\%)} = 10/(10+2) \times 100 = 10/12 \times 100 = \mathbf{83,3\%}$$

Especificidade (%)

$$\text{Esp (\%)} = 31/(31+0) \times 100 = 1 \times 100 = \mathbf{100\%}$$

Tabela 3 - Tabela de contingência do ELISA-GS em relação à PCR (padrão ouro). A tabela apresenta a distribuição dos resultados obtidos com o ensaio sorológico experimental baseado em Glutamina Sintetase (ELISA-GS), em comparação com a PCR, considerada o padrão-ouro para a detecção de *Leishmania infantum*. As amostras classificadas como verdadeiramente positivas (VP) correspondem àquelas detectadas simultaneamente pelo ELISA-GS e pela PCR, totalizando 10 amostras. Duas amostras foram classificadas como falso-negativas (FN), uma vez que foram detectadas pela PCR, mas não pelo ELISA-GS. Não foram observados resultados falso-positivos (FP), indicando ausência de amostras positivas no ELISA-GS entre aquelas negativas pela PCR. Por fim, 31 amostras foram classificadas como verdadeiramente negativas (VN), não detectadas por nenhum dos dois métodos. Essa distribuição fundamenta o cálculo dos parâmetros de desempenho diagnóstico do ELISA-GS, incluindo sensibilidade, especificidade e valores preditivos.

VP (detectado)	VP (não detectado) (FN)
10	2
VN (detectado) (FP)	VN (não detectado)
0	31

Fonte: Autora: 2026.

No ensaio ELISA-GS, das 33 amostras classificadas como não detectáveis, 31 corresponderam a verdadeiros negativos (PCR-) e 2 a falsos negativos (PCR+), sinalizando a ocorrência de resultados não detectados em amostras comprovadamente positivas pelo método molecular.

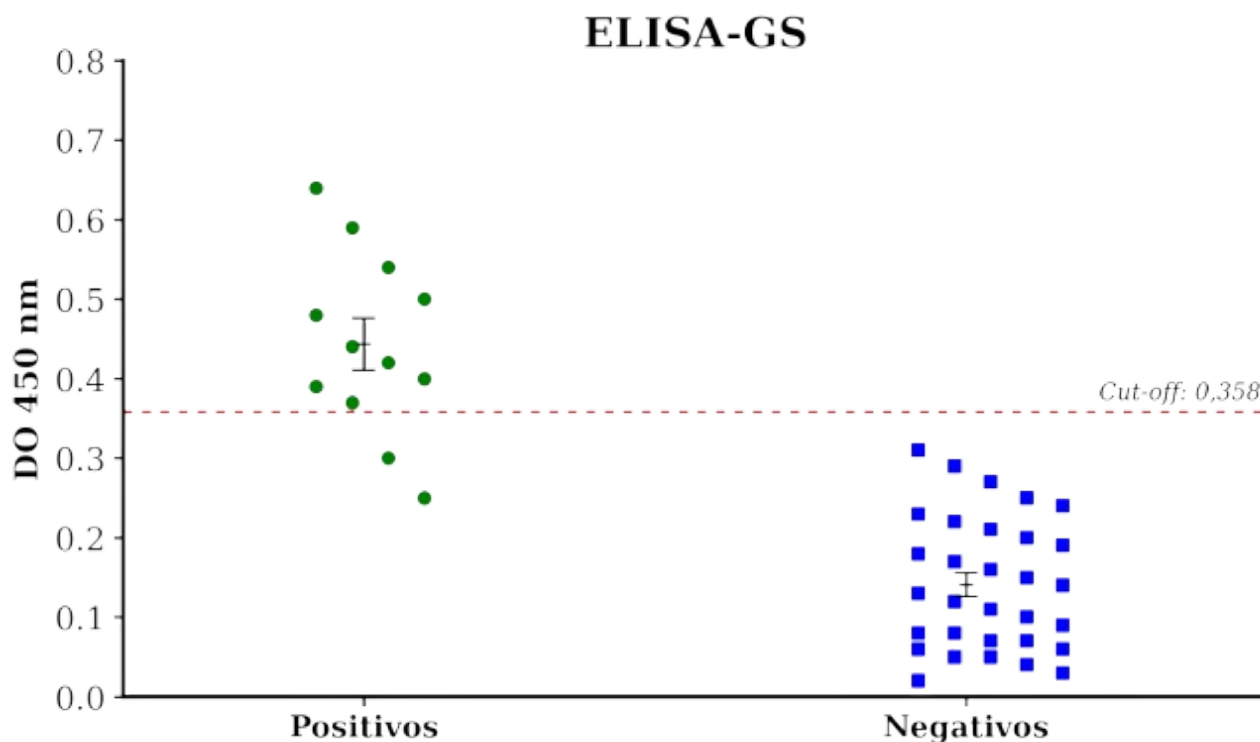
Considerando a PCR como padrão-ouro, o ELISA-rK39 apresentou sensibilidade de 100%, e especificidade de 90,3%, com 12 verdadeiros positivos, 28 verdadeiros negativos, 3 falsos positivos e ausência de falsos negativos. Por sua vez, o ELISA-GS, após determinação do cutoff (0,358), classificou 10 das 43 amostras como detectáveis e 33 como não detectáveis. Dentre as 12 amostras verdadeiramente positivas pela PCR, 10 foram corretamente identificadas pelo ELISA-GS, resultando em 2 falsos negativos, enquanto todas as 31 amostras verdadeiramente negativas foram corretamente classificadas como não detectáveis, não sendo observados falsos positivos. Dessa forma, o ELISA-GS apresentou sensibilidade de 83,3% e especificidade de 100%, indicando elevada capacidade de exclusão de resultados falso-positivos, embora com perda limitada de sensibilidade associada à ocorrência de falsos negativos.

4.3 PADRONIZAÇÃO DO ELISA-GS

A padronização do ensaio ELISA baseado em Glutamina Sintetase (ELISA-GS) foi realizada a partir da definição da concentração ótima do antígeno, diluição do conjugado e determinação do ponto de corte (cutoff). O cutoff foi estabelecido pela média dos controles negativos acrescida do fator de correção (1.28), resultando em valor final de 0,358. O fator de correção foi determinado através da média de absorbância de todas as amostras (28 amostras) tidas como não detectáveis no teste comercial ELISA-rK39.

As absorbâncias das amostras negativas variam entre 0,028 e 0,309, enquanto as amostras positivas apresentaram valores entre 0,339 e 0,637. Com base nesse critério, o ELISA-GS classificou 10 amostras como detectáveis e 33 como não detectáveis dentre as 43 amostras analisadas. A distribuição das absorbâncias encontra-se no gráfico de dispersão, representado pela figura 6 e na tabela 2.

Figura 5 - Gráfico de dispersão do ensaio baseado em Glutamina Sintetase. O eixo x representa as amostras de soro canino analisadas, individualmente identificadas, enquanto o eixo y corresponde aos valores de densidade óptica (DO) medidos a 450 nm, refletindo a intensidade da reação antígeno-anticorpo. A linha horizontal vermelha tracejada indica o valor de cutoff (DO=0,358), determinado a partir dos controles negativos, utilizado como critério para classificação sorológica. Amostras com valores de DO acima do cutoff foram consideradas detectáveis no ELISA-GS, enquanto aquelas com valores abaixo do cutoff foram classificadas como não detectáveis. A definição de positividade e negatividade das amostras foi realizada com base no resultado da PCR para *Leishmania infantum*, adotada como método de referência.

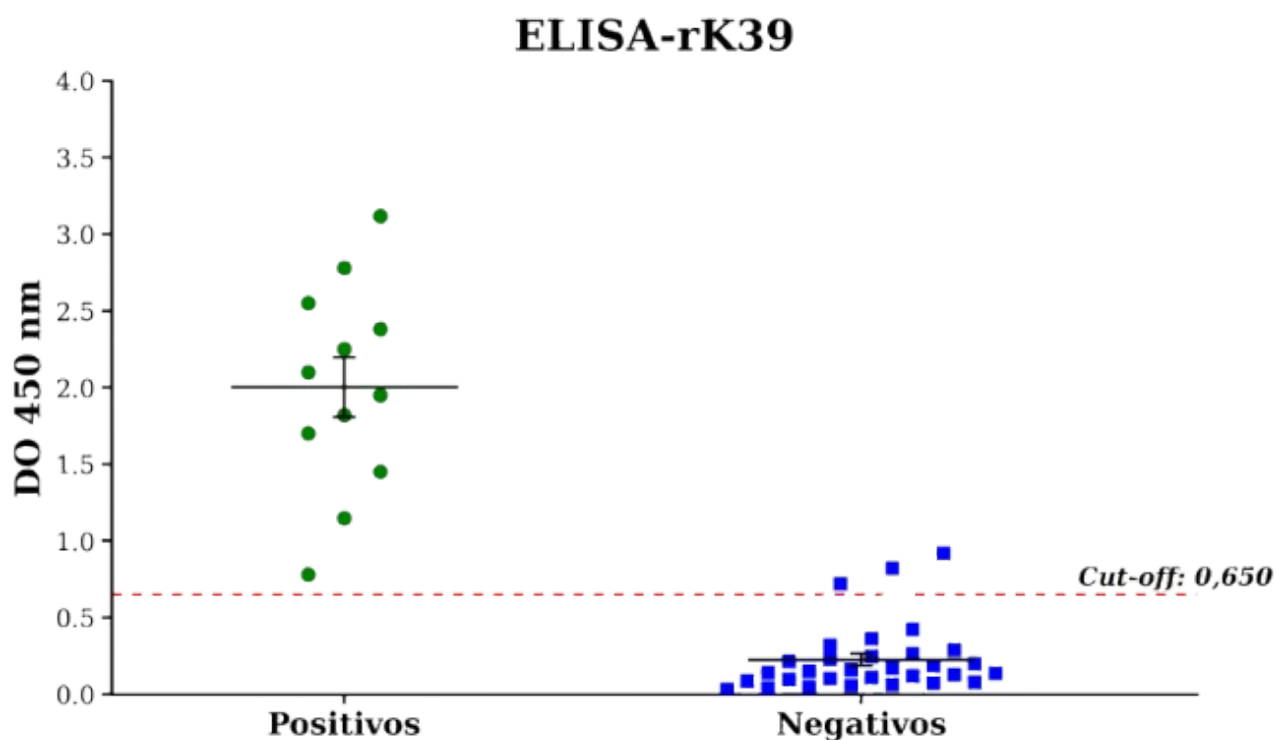


4.4 DESEMPENHO DO TESTE COMERCIAL (ELISA-rK39)

O teste sorológico comercial ELISA-rK39 foi realizado conforme protocolo do fabricante. As absorbâncias obtidas variaram entre 0,032 e 3,116 nas 43 amostras analisadas. O ponto de corte foi determinado automaticamente pelo kit, de acordo com o critério estabelecido pelo fabricante, baseado na média das absorbâncias dos controles negativos acrescida do fator de correção especificado no protocolo do ensaio (0,500).

De acordo com esse critério, 15 amostras (34,9%), foram classificadas como detectáveis e 28 amostras (65,1%) foram classificadas como não detectáveis no conjunto total de amostras avaliadas. A distribuição dos resultados encontra-se no gráfico de dispersão representado pela figura 6 e na tabela 2.

Figura 6 - Gráfico de dispersão do teste sorológico comercial ELISA-rK39. O eixo x representa as amostras de soro canino analisadas, enquanto o eixo y indica os valores de densidade óptica (DO) medidos a 450 nm como filtro primário e 630 nm como filtro secundário, conforme especificação do fabricante. A linha horizontal vermelha tracejada corresponde ao cutoff estabelecido pelo kit, utilizado para interpretação dos resultados. Amostras com valores de DO acima do cutoff foram classificadas como detectáveis, e aquelas abaixo do cutoff, como não detectáveis, de acordo com os critérios do ensaio comercial. A categorização das amostras em verdadeiramente positivas e verdadeiramente negativas foi definida com base na detecção molecular por PCR para *Leishmania infantum*, utilizada como padrão de referência para a análise comparativa do desempenho diagnóstico.



Fonte: Autora, 2025.

4.5 SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE

No subconjunto de 43 amostras submetidas à PCR (padrão-ouro), 12 foram classificadas como PCR positivas e 31 como PCR negativas. A partir das tabelas de contingência (Tabela 2 e Tabela 3) foram calculados os parâmetros diagnósticos de sensibilidade e especificidade para os testes sorológicos.

Segundo os resultados obtidos, os parâmetros diagnósticos foram:

ELISA-GS

TP = 10; FN = 2; FP = 0; TN = 31

Sensibilidade (%) = $TP/(TP+FN) = 10/(10+2) = 10/12 = 83,3\%$

Especificidade (%) = $TN/(TN+FP) = 31/(31+0) = 31/31 = 100,0\%$

ELISA-rK39

TP = 12; FN = 0; FP = 3; TN = 28

Sensibilidade = $TP/(TP+FN) = 12/(12+0) = 12/12 = 100,0\%$

Especificidade = $TN/(TN+FP) = 28/(28+3) = 28/31 = 90,3\%$

4.6 CURVA ROC

A análise da curva ROC demonstrou maior capacidade discriminatória do teste sorológico comercial ELISA-rK39, em relação ao ensaio ELISA-GS, considerando a PCR como método de referência. O ELISA-rK39 apresentou área sob a curva (AUC) 0,944, indicando excelente desempenho diagnóstico, enquanto o ELISA-GS apresentou AUC = 0,417, valor inferior ao desempenho aleatório (AUC = 0,5), refletindo baixa capacidade discriminatória no conjunto amostral avaliado.

O modelo de regressão logística combinando os marcadores apresentou AUC de 0,944, valor idêntico ao observado para o ELISA-rK39 isoladamente, indicando que nas condições do presente estudo, a inclusão do ELISA-GS não promoveu ganho adicional de discriminação em relação ao teste comercial. As curvas ROC correspondentes encontram-se representadas na Figura 9.

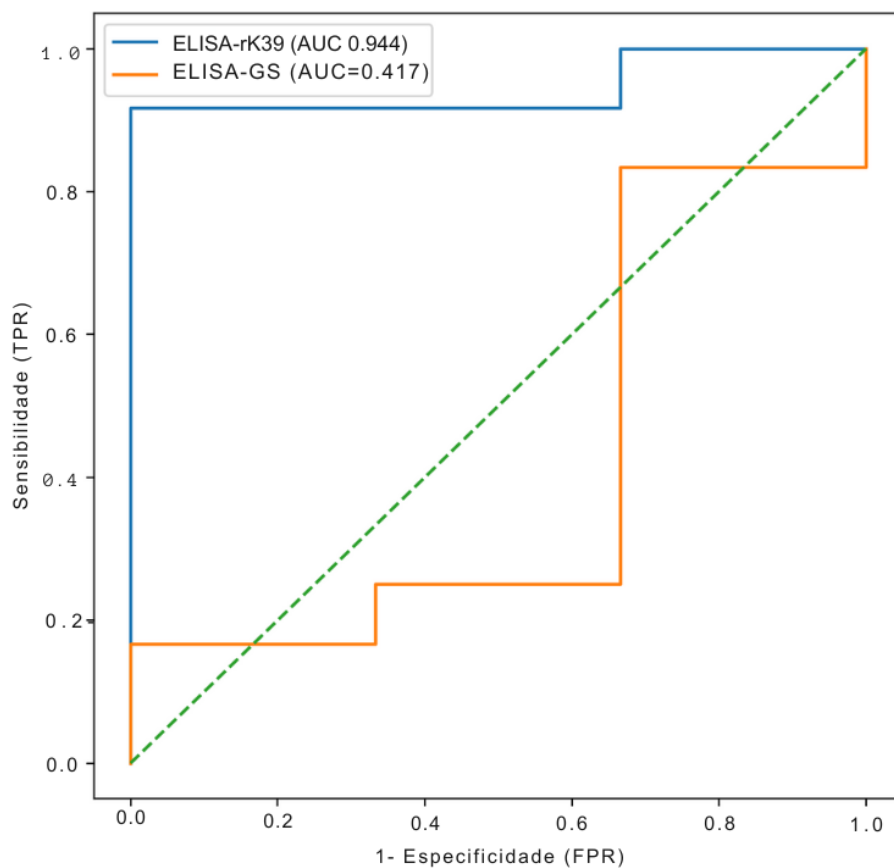
A concordância entre os testes sorológicos e a PCR foi avaliada por meio do coeficiente Kappa (k), que mede a concordância além do acaso para variáveis categóricas dicotomizadas, observando-se concordância elevada para o ELISA-rK39 e baixa

concordância para o ELISA-GS, em consonância com os valores de sensibilidade, especificidade e AUC previamente descritos. Esse coeficiente é especialmente relevante em estudos diagnósticos, pois evita superestimar concordância em cenários de alta prevalência ou alta taxa de uma das categorias, ou seja, em cenários de distribuição assimétrica das classes.

A comparação entre as medidas contínuas emparelhadas (como as absorbâncias no ELISA-rK39 e as médias do ELISA-GS obtidas nas mesmas amostras), evidenciou valores de absorbância consistentemente mais elevados no ELISA-rK39 em relação ao ELISA-GS. Foi considerado o teste t pareado quando os resíduos apresentaram distribuição aproximadamente normal; entretanto, em dados laboratoriais, assimetria e outliers são comuns, o que justifica o uso do teste de Wilcoxon pareado como alternativa não paramétrica.

Por fim, aplicou-se regressão logística para modelar a probabilidade de positividade em função das absorbâncias. A regressão logística demonstrou associação positiva entre o aumento das absorbâncias do teste sorológico comercial ELISA-rK39 e a probabilidade de positividade, enquanto no ELISA-GS essa associação foi menos pronunciada, em concordância com a menor capacidade discriminatória observada na análise da curva ROC.

Figura 7 - Curva ROC. O eixo y representa a sensibilidade (*True Positive Rate - TPR*), definida como a proporção de amostras verdadeiramente positivas corretamente identificadas pelos testes, enquanto o eixo x representa 1 - especificidade (*False Positive Rate - FPR*), correspondente à proporção de amostras verdadeiramente negativas classificadas incorretamente como positivas. A linha azul contínua corresponde à curva ROC do teste comercial ELISA-rK-39, que apresentou área sob a curva ($AUC=0,944$), indicando elevada capacidade discriminatória. A linha laranja contínua representa a curva ROC do ensaio ELISA-GS, com $AUC = 0,417$, sugerindo desempenho diagnóstico limitado nas condições avaliadas. A linha verde tracejada diagonal representa a linha de não discriminação ($AUC=0,5$) que indica um teste sem capacidade diagnóstica, no qual a classificação das amostras ocorre aleatoriamente. Os pontos que compõem as curvas ROC resultam da variação estatística dos limiares de decisão utilizados na análise ROC e não representam múltiplos cutoffs experimentais, uma vez que o ELISA-GS foi interpretado com um único valor de cutoff previamente definido para a classificação das amostras. Curvas posicionadas mais próximas ao canto superior esquerdo do gráfico indicam melhor desempenho diagnóstico por associarem alta sensibilidade a baixas taxas de falsos positivos.



Fonte: Autora, 2025.

A PCR detectou DNA de *Leishmania infantum* em 12 das 43 amostras analisadas, com valores de CT variando conforme a carga parasitária. As 31 amostras restantes não apresentaram amplificação detectável. A comparação entre PCR e os testes sorológicos encontra-se detalhada na Tabela 1 e nas figuras 4 e 5.

5 DISCUSSÃO

A Leishmaniose Visceral Canina (LVC) permanece como um dos maiores desafios diagnósticos no contexto das zoonoses, especialmente em áreas endêmicas, onde a heterogeneidade clínica, imunológica e parasitológica dos cães infectados compromete a acurácia de métodos isolados de detecção (SOLANO-GALLEGO et al., 2017; MAIA; CAMPINO, 2018; ANDRONIC et al., 2023). Nesse cenário, a comparação entre testes sorológicos comerciais consolidados e ensaios experimentais baseados em novos alvos antigênicos, como a Glutamina Sintetase (GS), assume relevância estratégica para a compreensão das limitações e potencialidades de diferentes abordagens diagnósticas (KUMAR et al., 2020; BRITO; SOUZA; SERAFIM, 2023).

As divergências observadas entre o teste sorológico comercial ELISA-rK39 e PCR, particularmente nas amostras 2, 11 e 14, classificadas como detectáveis pelo teste sorológico e não detectáveis pela PCR, podem ser justificadas por diferentes mecanismos biológicos amplamente descritos na literatura, sobretudo a persistência de anticorpos circulantes após exposição prévia ao parasita ou após redução significativa da carga parasitária tecidual (BANETH, 2008; PALTRINIERI et al., 2016). Estudos demonstram que a resposta humoral pode permanecer detectável por longos períodos, mesmo quando o DNA parasitário não é mais identificado no tecido analisado (BANETH et al., 2008; PALTRINIERI et al., 2016). Em áreas endêmicas, é comum que cães apresentem títulos sorológicos positivos mesmo na ausência de parasitemia detectável em amostras de sangue periférico, em razão da memória imunológica e da exposição repetida ao vetor (COHEN et al., 2016; MAIA; CAMPINO, 2018).

Maia e Campino (2018) destacam que testes baseados em antígenos recombinantes, como rK39 e rK28, amplamente utilizados em kits comerciais, apresentam alta especificidade em cães sintomáticos, mas podem exibir reatividade em animais expostos previamente ao parasita, mesmo na ausência de infecção ativa, sobretudo em áreas hiperendêmicas.

Esses achados são consistentes com a literatura que descreve que a elevada sensibilidade dos testes sorológicos comerciais em programas de vigilância, nos quais a prioridade é minimizar falsos negativos e identificar o maior número possível de cães potencialmente infectados (SOLANO-GALLEGO et al., 2011; COURTENAY et al., 2021). Entretanto, essa estratégia pode resultar em menor especificidade clínica, especialmente em populações com alta taxa de exposição ao vetor, nas quais a soropositividade nem

sempre reflete infecção ativa (COHEN et al., 2016; MAIA; CAMPINO, 2018).

No subconjunto de amostras avaliadas por PCR (n=43), a especificidade do ELISA-rK39 foi estimada em 90,3%. Estudos de validação em larga escala reportam especificidade clínica próxima de 96% (SIQUEIRA et al., 2023; SOLANO-GALLEGO et al., 2017; COURA-VITAL., 2014), conforme descrito pelo fabricante.

De acordo com os dados fornecidos pelo fabricante, o desempenho diagnóstico do ELISA-rK39 foi avaliado por meio da comparação com outros métodos de ensaio imunoenzimático, utilizando amostras clínicas previamente caracterizadas. O teste apresentou sensibilidade clínica superior a 99,9%, correspondendo à correta identificação de 150 amostras positivas entre 150 analisadas, e especificidade clínica de 96%, com correta identificação de 144 amostras negativas entre 150 testadas. A precisão global do ensaio foi estimada em 98%, demonstrando elevada confiabilidade para o diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral canina.

Além disso, a PCR pode apresentar resultados falso-negativos devido à distribuição heterogênea do parasita nos tecidos, especialmente quando amostras de sangue periférico são utilizadas, uma vez que este compartimento frequentemente apresenta cargas parasitárias inferiores quando comparado à pele, linfonodos ou medula óssea (SOLANO-GALLEGO et al., 2014; MOREIRA et al., 2021). A presença de inibidores da reação ou degradação do DNA também pode comprometer a amplificação, contribuindo para resultados não detectáveis (DE PAULA et al., 2020). Estudos demonstram que tecidos como pele, linfonodos e medula óssea frequentemente apresentam maior densidade parasitária quando comparados ao sangue periférico, o que explica resultados falso-negativos em PCR quando este compartimento é utilizado como única fonte de DNA (BORJA et al., 2016; SCORZA et al., 2021).

Por outro lado, a amostra 43 apresentou resultado não detectável no teste sorológico ELISA-rK39 e detectável na PCR, configuração compatível com infecção recente ou fase inicial da doença, caracterizada por presença do parasita sem desenvolvimento pleno de resposta humoral mensurável. Esse fenômeno conhecido como janela imunológica, é bem descrito na LVC e reforça que testes sorológicos isolados podem falhar na detecção precoce da infecção (ALVAR et al., 2012; COSTA et al., 2019). Ademais, fatores individuais do hospedeiro, como imunossupressão ou variabilidade na produção de anticorpos, podem resultar em sorologia negativa mesmo na presença do parasita (PALTRINIERI et al., 2016).

A análise do ensaio ELISA-GS revelou desempenho inferior ao teste sorológico

comercial ELISA-rK39, apresentando sensibilidade de 83,3% e especificidade de 100% quando comparado à PCR como padrão-ouro. Embora tenha sido observada a ocorrência de dois falsos negativos, todas as amostras verdadeiramente negativas pela PCR foram corretamente classificadas como não detectáveis pelo ELISA-GS, evidenciando elevada capacidade de exclusão de resultados falso-positivos (KANG; KIM, 2020; BRITO; SOUZA; SERAFIM, 2023). Esses achados sugerem que, apesar de limitações na detecção de todos os casos positivos, o ELISA-GS demonstrou desempenho consistente na identificação de animais não infectados, característica relevante em contextos diagnósticos confirmatórios (SOLANO-GALLEGO et al., 2017). A Glutamina Sintetase é uma enzima essencial para o metabolismo nitrogenado de *Leishmania* e desempenha papel central na adaptação intracelular do parasita (KUMAR et al., 2020; LIMA-JUNIOR et al., 2022). Entretanto, estudos indicam que proteínas predominantemente intracelulares tendem a induzir respostas humorais menos robustas quando comparadas a antígenos de superfície ou secretados, que estão mais expostos ao sistema imune do hospedeiro (VENTURA; VILLAVARDE, 2006; ROSANO; CECCARELLI, 2014).

Conforme descrito pelo fabricante, o rendimento final da Glutamina Sintetase recombinante foi baixo, com recuperação aproximada de 0,485 mg de proteína total, valor considerado limitado para preparações em escala laboratorial destinadas a ensaios imunológicos, sobretudo quando se considera a necessidade de padronização, reprodutibilidade e validação multicêntrica (ROSANO; CECCARELLI, 2014; SINGH et al., 2015).

Baixos rendimentos de proteínas recombinantes expressas em *Escherichia coli* são frequentemente associados à formação de corpos de inclusão, dobramento incorreto da proteína, proteólise e perdas durante as etapas de purificação (ROSANO; CECCARELLI, 2014; SINGH et al., 2015). Essas condições podem comprometer a integridade estrutural do antígeno e, conseqüentemente, a exposição de epítomos conformacionais essenciais para o reconhecimento por anticorpos específicos presentes no soro de animais infectados.

A literatura sobre antígenos recombinantes utilizados no diagnóstico da LVC demonstra que proteínas como rK39, rK28 e rK26, derivadas de regiões repetitivas de cinesinas e outras proteínas estruturais, apresentam elevada imunogenicidade por serem abundantes, parcialmente secretadas ou expostas durante o ciclo do parasita (BURNS et al., 1993; MAIA; CAMPINO, 2018; GUZMAN et al., 2023). Esses antígenos foram selecionados após extensos processos de triagem e validação em grandes coortes,

visando maximizar a reatividade com anticorpos circulantes em cães infectados (SOLANO-GALLEGO et al., 2017; SIQUEIRA et al., 2023).

Em contrapartida, a Glutamina Sintetase embora seja essencial para a sobrevivência de *Leishmania*, sua imunogenicidade pode variar entre indivíduos e fases da infecção (KANG; KIM, 2020). Diferentemente de kits comerciais como ELISA-rK39, que utilizam misturas antigênicas ou antígenos selecionados após extensos processos de validação, o uso de um único antígeno recombinante pode limitar a capacidade do teste em captar a heterogeneidade da resposta humoral observada na LVC (PALTRINIERI et al., 2010; MOREIRA et al., 2021). Estudos de imunoproteômica indicam que antígenos metabólicos, embora promissores como alvos terapêuticos ou vacinais, nem sempre apresentam desempenho satisfatório como marcadores sorológicos, justamente por não serem fortemente reconhecidos por anticorpos circulantes (VENTURINI et al., 2020; KANG; KIM, 2020).

Além disso, fatores relacionados à expressão heteróloga da proteína recombinante podem influenciar a conformação estrutural do antígeno e, conseqüentemente a exposição de epítomos conformacionais essenciais para o reconhecimento por anticorpos específicos (ROSANO; CECCARELLI, 2014; SINGH et al., 2015). A expressão em sistemas procarióticos, como *Escherichia coli*, é frequentemente associada à formação de corpos de inclusão, dobramento incorreto e ausência de modificações pós-traducionais, o que pode comprometer a integridade antigênica da proteína (VENTURA; VILLAVARDE, 2006; ROSANO; CECCARELLI, 2014). Esses fatores são reconhecidos como limitantes na produção de antígenos recombinantes destinados a ensaios imunodiagnósticos (SINGH et al., 2015).

A avaliação dos parâmetros diagnósticos reforça essa interpretação. No subconjunto de amostras comparadas à PCR, o ELISA-rk39 apresentou elevada sensibilidade, evidenciada pela detecção da maioria das amostras classificadas como positivas molecularmente. Esse resultado é consistente com o uso de testes ELISA comerciais em programas de vigilância, que priorizam minimizar falsos negativos. Entretanto, a especificidade não pôde ser estimada de forma robusta neste conjunto, uma vez que amostras PCR negativas apresentaram reatividade sorológica, situação já descrita em populações de áreas endêmicas, onde a exposição prévia ao parasita pode gerar anticorpos detectáveis na ausência de infecção ativa (BANETH et al., 2008; COHEN et al., 2016).

É importante ressaltar que o baixo rendimento na expressão da GS, não está

diretamente relacionado ao baixo poder de detecção dos verdadeiros positivos, mas sim a aspectos de viabilidade econômica e escalabilidade do processo produtivo. O desempenho diagnóstico está mais fortemente associado à natureza imunológica do antígeno, à preservação de epítomos relevantes e à capacidade do ensaio em capturar a heterogeneidade da resposta humoral dos cães infectados (VENTURINI et al., 2015; GUZMAN et al., 2023).

O ELISA-GS, por sua vez, apresentou sensibilidade inferior, refletida pelo elevado número de falsos-negativos em relação à PCR. Esse desempenho compromete seu valor como teste de triagem isolado, embora a análise da curva ROC (Figura 8) indique que ajustes no ponto de corte ou melhorias na qualidade e padronização do antígeno possam potencialmente aumentar sua acurácia.

A análise da curva ROC reforça essas interpretações. A curva ROC é uma ferramenta estatística fundamental para avaliar a capacidade discriminatória de um teste diagnóstico, permitindo analisar entre sensibilidade e especificidade em diferentes pontos de corte (HANLEY; MCNEIL, 1982; METZ, 2006). No presente estudo, o teste sorológico comercial ELISA-Rk39 apresentou maior área sob a curva (AUC), indicando melhor capacidade de discriminar entre cães infectados e não infectados, quando comparados ao ELISA-GS. Valores elevados de AUC são indicativos de testes com alto poder discriminatório e desempenho global superior (METZ, 2006; PEPE et al., 2008).

O ELISA-GS, por sua vez, apresentou AUC inferior, refletindo menor acurácia global e maior sobreposição entre os valores de absorbância de amostras positivas e negativas. Esse padrão é compatível com a limitada imunogenicidade humoral da GS e com a variabilidade interindividual da resposta imune em cães naturalmente infectados (KANG; KIM, 2020; BRITO; SOUZA; SERAFIM, 2023). Estudos que avaliaram outros antígenos recombinantes experimentais para LVC demonstraram comportamento semelhante, com curvas ROC menos acentuadas e necessidade de ajustes finos no ponto de corte para otimizar o equilíbrio entre a sensibilidade e especificidade (TEIXEIRA et al., 2024; GUZMAN et al., 2023).

Quando comparado a testes desenvolvidos por instituições como Biomanguinhos/Fiocruz, que utilizam antígenos recombinantes selecionados após extensas validações multicêntricas, o desempenho do ELISA-GS mostra-se inferior, reforçando a importância de processos rigorosos de triagem antigênica e validação populacional antes da aplicação diagnóstica em larga escala (COURA-VITAL et al., 2014; SIQUEIRA et al., 2023). Ensaio baseados em rK39, apesar de amplamente utilizados,

também apresentam limitações conhecidas, como sensibilidade reduzida em cães assintomáticos e variabilidade geográfica na performance, o que levou ao desenvolvimento de antígenos quiméricos, como rK28, para tentar superar essas deficiências (MAIA; CAMPINO, 2018; GUZMAN et al., 2023).

Nesse contexto, a comparação entre ELISA-GS e ELISA-rK39 é particularmente relevante. Enquanto rK39 é derivado de uma cinesina altamente imunogênica, com regiões repetitivas que estimulam forte resposta humoral, a GS não apresenta essas características estruturais, o que pode explicar sua menor capacidade de induzir produção de anticorpos detectáveis (BURNS et al., 1993; KANG; KIM, 2020). Estudos comparativos indicam que antígenos de superfície e proteínas associadas ao citoesqueleto do parasita tendem a apresentar melhor desempenho diagnóstico do que enzimas metabólicas intracelulares (VENTURINI et al., 2015; TEIXEIRA et al., 2024).

A literatura destaca que a validação de novos ensaios sorológicos requer otimização cuidadosa do antígeno, avaliação em grandes populações e comparação com múltiplos métodos de referência (OIE, 2021; SOLANO-GALLEGO et al., 2017).

A PCR, considerada técnica de alta sensibilidade analítica por detectar diretamente o DNA do parasita, foi utilizada como referência neste estudo. Entretanto, sua sensibilidade diagnóstica depende criticamente da carga parasitária, do tecido analisado e das condições pré-analíticas (SOLANO-GALLEGO et al., 2017; DE PAULA et al., 2020). Assim, resultados negativos em PCR não excluem necessariamente a infecção, especialmente em animais com baixa parasitemia ou em fases subclínicas.

Quando se comparam os três métodos, deve-se considerar que a PCR detecta a presença direta do parasita, enquanto os ELISAs refletem a resposta imunológica, que pode persistir mesmo quando o DNA não é detectável no compartimento analisado. Dessa forma, discordâncias não representam necessariamente erro, mas diferentes estágios e manifestações no processo infeccioso. A PCR detecta a presença direta do hospedeiro, que pode persistir mesmo após a redução da carga parasitária (BANETH et al., 2008; PALTRINIERI et al., 2016). Por essa razão, a combinação de métodos sorológicos e moleculares tende a oferecer maior robustez diagnóstica, especialmente em contextos de vigilância epidemiológica e tomada de decisão sanitária.

Em suma, os resultados deste estudo reforçam que nenhum método diagnóstico, isoladamente, é capaz de refletir com precisão absoluta o status infeccioso na Leishmaniose Visceral Canina. O ELISA-rK39 demonstrou desempenho superior em termos de sensibilidade e capacidade discriminatória, compatível com sua ampla

validação e registro pela ANVISA para comercialização no mercado privado. Contudo, o uso consolidado em programas de vigilância ainda depende de decisões e diretrizes específicas do Ministério da Saúde e da aprovação do Departamento de Vigilância de Doenças Transmissíveis. O ELISA-GS, embora baseado em alvo biologicamente relevante, apresentou desempenho diagnóstico caracterizado por elevada especificidade e sensibilidade moderadamente reduzida, associada à ocorrência de falsos negativos. Esses achados indicam que aprimoramentos nos processos de expressão, purificação e validação do antígeno, bem como ajustes no ponto de corte, são necessários para que ensaios baseados na Glutamina Sintetase alcancem desempenho comparável aos testes comerciais consolidados (KUMAR et al., 2020; BRITO; SOUZA; SERAFIM, 2023; GUZMAN et al., 2023).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo, a análise comparativa entre o teste sorológico comercial (ELISA-rK39) e o ensaio experimental baseado na Glutamina Sintetase permitiu aprofundar a compreensão das potencialidades e limitações de diferentes abordagens diagnósticas. Os resultados demonstraram que o teste comercial sorológico comercial (ELISA-rK39) apresentou desempenho superior em termos de sensibilidade diagnóstica, confirmando sua validação e aplicabilidade no mercado privado, além do uso como triagem em larga escala. No entanto, as discordâncias observadas entre os resultados sorológicos e moleculares evidenciam que a interpretação isolada de um único método pode conduzir a equívocos diagnósticos, sobretudo em cenários de infecção subclínica, baixa carga parasitária ou persistência da resposta humoral.

A avaliação do ensaio ELISA baseado na Glutamina Sintetase revelou desempenho inferior no conjunto analisado, particularmente no que se refere à sensibilidade. A análise crítica dos dados experimentais permitiu associar esse resultado a fatores técnicos relevantes, como o baixo rendimento da proteína recombinante, possíveis alterações conformacionais e a perda de epítomos imunorreativos durante os processos de expressão e purificação. Esses achados demonstram que a escolha de um alvo biologicamente promissor como marcador antigênico para diagnóstico sorológico não garante a eficácia diagnóstica, sendo imprescindível a otimização dos processos de obtenção do antígeno e sua rigorosa validação.

REFERÊNCIAS

AKHOUNDI, M. et al. A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 10, n. 3, e0004349, 2016.

ALCOLEA, P. J.; ALONSO, A.; MOLINA, R.; JIMÉNEZ, M.; MYLER, P. J.; LARRAGA, V. Functional genomics in sand fly-derived *Leishmania* promastigotes. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 13, n. 5, e0007288, 2019. DOI: 10.1371/journal.pntd.0007288.

ALEXANDRE-PIRES, G. et al. Canine leishmaniosis: immunophenotypic profile of leukocytes in different compartments of symptomatic, asymptomatic and treated dogs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 137, n. 3–4, p. 275–283, 2010.

ALMEIDA, B. F. et al. Neutrophil dysfunction varies with the stage of canine visceral leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*, v. 196, n. 1–2, p. 6–12, 2013. DOI: 10.1016/j.vetpar.2013.02.016.

ANDERSON, N. L.; ANDERSON, N. G. The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Molecular & Cellular Proteomics*, v. 1, n. 11, p. 845–867, 2002.

ALVAR, J. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS ONE*, v. 7, n. 5, e3571, 2012.

ALVES, G. B. et al. Efficacy of imidacloprid/flumethrin collar in preventing canine leishmaniosis in Brazil. *Transboundary and Emerging Diseases*, v. 69, n. 5, p. e2302–e2311, 2022. DOI: 10.1111/tbed.14571. Disponível em: PubMed. Acesso em: 29 dez. 2025.

ANDRONIC, B. L. et al. The immune response in canine and human leishmaniasis and how this influences the diagnosis – a review and assessment of recent research. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 13, 2023. DOI: 10.3389/fcimb.2023.1326521.

ANTONIE, J. C.; PRINA, E.; LANG, T.; COURRET, N. The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour *Leishmania* in murine macrophages. *Trends in Microbiology*, v. 6, n. 10, p. 392–401, 1998.

ARAÚJO, J. V. B. et al. Análise epidemiológica da leishmaniose no Brasil nos anos de 2018 a 2023. *Journal of Medical and Biosciences Research*, v. 2, n. 1, p. 961–968, 2025. DOI: 10.70164/jmbr.v2i1.527. Acesso em: 14 jun. 2025.

ARUMUGAM, S. et al. Visceral leishmaniasis and the skin: dermal parasite burden as a marker of infectiousness to sand flies. *Pathogens*, v. 11, n. 6, 610, 2022. DOI: 10.3390/pathogens11060610.

ARYAL, S.; UPENDRA, C.; SHEKHAR, P. Leishmaniasis: global epidemiology, transmission dynamics, and integrated control strategies. *International Journal of Tropical*

Disease & Health, v. 46, n. 7, p. 93–109, 2025. DOI:

<https://doi.org/10.9734/ijtdh/2025/v46i71676>. Acesso em: 15 ago. 2025.

BANETH, G. Canine leishmaniasis: a review of epidemiology, diagnosis and control. *Veterinary Journal*, v. 175, n. 3, p. 324–336, 2008.

BANETH, G. et al. Canine leishmaniasis: new concepts and insights on an expanding zoonosis. *Trends in Parasitology*, v. 24, n. 7, p. 324–330, 2008.

BELO, V. S. et al. Factors associated with visceral leishmaniasis in the Americas: a systematic review and meta-analysis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 7, n. 4, e2182, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002182>. Acesso em: 24 nov. 2025.

BOGGIATTO, P. M. et al. Immunologic indicators of clinical progression during canine *Leishmania infantum* infection. *Clinical and Vaccine Immunology*, v. 17, n. 2, p. 267–273, 2010. DOI: 10.1128/CVI.00456-09.

BOGDAN, C. Macrophages as host, effector and immunoregulatory cells in *Leishmania* infection: impact of tissue micro-environment and metabolism. *The FEBS Journal*, v. 287, n. 13, p. 2660–2681, 2020.

BORJA, L. S. et al. Parasite load in the blood and skin of dogs naturally infected by *Leishmania infantum* is correlated with their capacity to infect sand fly vectors. *Veterinary Parasitology*, v. 229, p. 110–117, 2016. DOI: 10.1016/j.vetpar.2016.10.004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27809965/>. Acesso em: set. 2024.

BOUSSOFFARA, T. et al. LmCen^{-/-} based vaccine is protective against canine visceral leishmaniasis following three natural exposures in Tunisia. *NPJ Vaccines*, v. 10, art. 31, 2025. DOI: 10.1038/s41541-025-01070-8. Disponível em: Nature. Acesso em: 29 dez. 2025.

BRASIL. Ministério da Saúde. *Indicadores e dados básicos para leishmaniose visceral*. Brasília: Ministério da Saúde, 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/>. Acesso em: 15 jul. 2025.

BRITO, L.; SOUZA, L.; SERAFIM, T. Nitrogen metabolism in kinetoplastids. *Frontiers in Microbiology*, 2023.

BURNS, J. M. et al. Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 90, n. 2, p. 775–779, 1993.

BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. *The Lancet*, v. 392, p. 951–970, 2018.

CARDOSO, R. M.; DE ARAÚJO, N. N. S. L.; ROMERO, G. A. S. et al. Expanding the knowledge about *Leishmania* species in wild mammals and dogs in the Brazilian savannah. *Parasites & Vectors*, v. 8, art. 171, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0780-y>.

CARDOSO, L.; PERSICHETTI, M. F.; PENNISI, M. G. New epidemiological aspects of animal leishmaniosis in Europe: the role of vertebrate hosts other than dogs. *Pathogens*, v. 10, n. 3, p. 1–44, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/pathogens10030307>. Acesso em: dez. 2024.

CARDOSO, L. et al. Leishmaniosis in dogs and cats: current concepts and challenges. *Veterinary Parasitology*, v. 294, p. 109431, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2021.109431>. Acesso em: 15 jun. 2025.

CHAUHAN, Y.; NIKITA, R.; MADAAN, P.; JAIN, M. Insight into immunopathology of leishmaniasis. In: MUKHERJEE, B. et al. (eds.). *Pathobiology of parasitic protozoa: dynamics and dimensions*. Singapore: Springer Nature, 2023. p. 217–229. ISBN 978-981-19822-4-8.

CIARAMELA, P. et al. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Veterinary Record*, v. 141, n. 21, p. 539–543, 1997. DOI: 10.1136/vr.141.21.539.

COFFENG, L. E. et al. Effect of indoor residual spraying on sandfly abundance and transmission of visceral leishmaniasis: a modelling study. *The Lancet Infectious Diseases*, 2024. Disponível em: The Lancet. Acesso em: 29 dez. 2025.

COSMA, C.; MAIA, C.; KHAN, N.; INFANTINO, M.; DEL RICCIO, M. Leishmaniose em humanos e animais: uma abordagem de saúde única para vigilância, prevenção e controle em um mundo em transformação. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, v. 9, p. 258, 2024. DOI: 10.3390/tropicalmed9110258.

COURA-VITAL, W. et al. Performance of recombinant antigens in the serological diagnosis of canine visceral leishmaniasis. *PLoS ONE*, v. 9, n. 9, 2014.

COURTENAY, O. et al. Incidence of human free-ranging wild rodent infections with *Leishmania (Viannia) braziliensis*, aetiological agent of cutaneous leishmaniasis. *Pathogens*, v. 12, n. 1395, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/pathogens12121395>. Acesso em: 12 fev. 2025.

DANTAS-TORRES, F. et al. Vacinação contra leishmaniose canina no Brasil. *International Journal for Parasitology*, v. 50, p. 171–176, 2020. Acesso em: nov. 2025.

DAOUDI, M. et al. Modeling the impact of climate change for the potential distribution of the main vector and reservoirs of zoonotic cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major* in Morocco. *Frontiers in Tropical Diseases*, v. 6, art. 1629454, 2025. DOI: 10.3389/fitd.2025.1629454.

DE OLIVEIRA, D. S. et al. New approaches to the prevention of visceral leishmaniasis: a review of recent patents of potential candidates for a chimeric protein vaccine. *Vaccines*, v. 12, n. 3, art. 271, 2024. Disponível em: MDPI. Acesso em: 9 dez. 2025.

D'LIU, D.; UZONNA, J. The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 2, p. 1–18, 2012.

DE SOUZA, W. M.; WEAVER, S. C. Efeitos das mudanças climáticas e das atividades humanas sobre doenças transmitidas por vetores. *Nature Reviews Microbiology*, v. 22, p. 476–491, 2024. Acesso em: nov. 2025.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, v. 27, n. 5, p. 305–318, 2004. DOI: 10.1016/j.cimid.2004.03.004.

ELMAHALLAWY, E. K.; ALKHALDI, A. A. M.; SALEH, A. A. Host immune response against leishmaniasis and parasite persistence strategies: a review and assessment of recent research. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 139, art. 111671, 2021. DOI: 10.1016/j.biopha.2021.111671.

FABER, C. et al. Indoor residual spraying for the control of visceral leishmaniasis: a systematic review. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 16, n. 5, e0010391, 2022. DOI: 10.1371/journal.pntd.0010391. Disponível em: PLOS. Acesso em: 9 dez. 2025.

FERREIRA, A. L. et al. Molecular detection of *Leishmania* spp. in small rodents and synanthropic mammals in urban areas of Brazil. *Acta Tropica*, v. 229, p. 106377, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2022.106377>. Acesso em: 15 jun. 2025.

GABRIEL, Á. et al. Cutaneous leishmaniasis: the complexity of host's effective immune response against a polymorphic parasitic disease. *Journal of Immunology Research*, v. 2019, art. 2603730, 2019. DOI: 10.1155/2019/2603730.

GARCÍA, A. L. et al. Leishmaniasis in captive great apes: report of two clinical cases in orangutans. *Journal of Medical Primatology*, v. 51, n. 1, p. 36–43, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2849-0>. Acesso em: 15 jun. 2025.

GHOSH, S. et al. Essential metabolic pathways in intracellular survival of *Leishmania*. *Nature Microbiology*, 2020.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Diagnóstico e tratamento atuais da leishmaniose cutânea e mucocutânea. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, v. 9, n. 11, p. 419–433, 2010. Acesso em: ago. 2025.

GUZMAN, L. et al. Advances in recombinant antigens for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Pathogens*, v. 12, n. 4, p. 1–18, 2023.

HANDMAN, E.; BULLEN, D. V. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. *Trends in Parasitology*, v. 18, n. 8, p. 332–334, 2002. DOI: 10.1016/S1471-4922(02)02352-8. Acesso em: 15 jul. 2025.

HANDMAN, E.; BULLEN, J. Macrophage interaction and immune mechanisms in *Leishmania* infection. *Trends in Parasitology*, 2022.

HOSEIN, S.; BLAKE, D. P.; SOLANO-GALLEGO, L. Insights on adaptive and innate immunity in canine leishmaniosis. *Parasitology*, v. 144, n. 1, p. 95–115, 2017. DOI: 10.1017/S003118201600055X.

HOTEZ, P. Enlarging the “Audacious Goal”: elimination of the world’s high prevalence neglected tropical diseases. *Vaccine*, v. 29, supl. 4, p. D104–D110, 2011. DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.06.024.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host–pathogen interface. *Nature Reviews Microbiology*, v. 9, p. 604–615, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrmicro2608>. Acesso em: 9 mar. 2025.

KUMAR, V. et al. Structural exploration of glutamine synthetase from *Leishmania donovani*: insights from *in silico* and *in vitro* analysis. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 146, p. 860–874, 2020. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.09.209.

KUMAR, A. et al. Metabolic adaptations of *Leishmania* parasites in host environments. *Trends in Parasitology*, v. 36, n. 9, p. 761–773, 2020.

LABARTHE, N.; CAMPOS PEREIRA, M. de; BARBARINI, O.; MCKEE, W.; COIMBRA, C. A.; HOSKINS, J. Serologic prevalence of *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis* and *Borrelia burgdorferi* infections in Brazil. *Veterinary Therapeutics*, v. 4, n. 1, p. 67–75, 2003.

LIMA, C. M. et al. Perspectivas veterinárias sobre a urbanização da leishmaniose em Marrocos. *Parasites & Vectors*, v. 17, art. 348, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13071-024-06411-5>. Acesso em: 15 jun. 2025.

LIMA-JUNIOR, D. et al. Glutamine synthetase as an adaptive enzyme in *Leishmania* infection. *Parasites & Vectors*, 2022.

LIMA-JUNIOR, D. S. et al. Oxidative stress responses and metabolic remodeling in *Leishmania* amastigotes. *Cellular Microbiology*, v. 24, n. 4, e13387, 2022.

MAIA, C. et al. Feline *Leishmania* infection in a canine leishmaniasis endemic region, Portugal. *Veterinary Parasitology*, v. 174, p. 336–340, 2010. DOI: 10.1016/j.vetpar.2010.08.030. Acesso em: 12 fev. 2025.

MAIA, C.; CAMPINO, L. Biomarkers associated with *Leishmania infantum* exposure, infection and disease in dogs. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 8, p. 302, 2018. DOI: 10.3389/fcimb.2018.00302. Acesso em: 12 fev. 2025.

MACEDO, Rosana Karla Aires de. *Estudo sorológico exploratório da presença de anticorpos anti-Leishmania spp. em gatos domésticos (Felis catus) na cidade de*

Natal/RN. 2023. 117 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2023.

MARTÍN-SÁNCHEZ, J. et al. Vertical transmission may play a greater role in the spread of *Leishmania infantum* in synanthropic *Mus musculus* rodents than previously believed. *Transboundary and Emerging Diseases*, v. 67, n. 3, p. 1113–1118, 2020. Acesso em: nov. 2025.

MARTÍN-SÁNCHEZ, J. et al. Role of wild rabbits as reservoirs of leishmaniasis in a non-epidemic Mediterranean hot spot in Spain. *Acta Tropica*, v. 222, p. 106036, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34224717/>. Acesso em: jul. 2025.

MARY, C. et al. Quantification of *Leishmania infantum* DNA by real-time PCR assay with high sensitivity. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 42, n. 11, p. 5249–5255, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1128/JCM.42.11.5249-5255.2004>. Acesso em: 15 jul. 2025.

MATSUMOTO, P. S. S. et al. Efficacies of insecticide dog collars against visceral leishmaniasis in low- and high-income areas and the effects for non-collared neighbor dogs. *Acta Tropica*, v. 235, art. 106626, 2022. DOI: 10.1016/j.actatropica.2022.106626. Acesso em: 29 dez. 2025.

MATSUMOTO, P. S. S. et al. Efficacy of 4% deltamethrin-impregnated collars against canine visceral leishmaniasis across different areas and the sociocultural burden of collar loss in a middle-income country. *One Health*, v. 21, art. 101262, 2025. DOI: 10.1016/j.onehlt.2025.101262. Acesso em: 29 dez. 2025.

MOLINA, R. et al. Role of the Iberian hare in the recent human leishmaniasis outbreak in Madrid, Spain. *Eurosurveillance*, v. 17, n. 30, p. 1–6, 2012. Acesso em: 12 fev. 2025.

MONTES, C. L. et al. Transcriptomic profiling reveals stage-specific metabolic pathways in *Leishmania infantum*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 15, n. 8, e0009723, 2021.

MOREIRA, M. et al. Metabolic reprogramming and oxidative stress in *Leishmania*. *Cell Reports*, 2023.

NAVARRO, J. A.; SÁNCHEZ, J.; PEÑAFIEL-VERDÚ, C.; BUENDÍA, A. J.; ALTIMIRA, J.; VILAFRANCA, M. Histopathological lesions in 15 cats with leishmaniosis. *Journal of Comparative Pathology*, v. 143, n. 4, p. 297–302, 2010. DOI: 10.1016/j.jcpa.2010.03.003.

OLIVEIRA, V. V. G. de; ALVES, L. C.; SILVA JUNIOR, V. A. da. Transmission routes of visceral leishmaniasis in mammals. *Ciência Rural*, v. 45, n. 9, p. 1622–1628, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20141368>. Acesso em: nov. 2025.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). *Leishmaniose*. 12 jan. 2023. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>. Acesso em: 11 out. 2024.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). *Doenças tropicais negligenciadas*. Disponível em: https://www.who.int/health-topics/neglected-tropical-diseases#tab=tab_1. Acesso em: 11 out. 2024.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE (OPAS). *Leishmaniose*. Disponível em:

<https://www.paho.org/en/topics/leishmaniasis>. Acesso em: 11 out. 2024.

PÁEZ, L. et al. Large-scale randomized double-blind field clinical trial for safety and efficacy assessment of the DNA vaccine Neoleish against canine leishmaniasis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 19, n. 11, e0012707, 2025. DOI: 10.1371/journal.pntd.0012707. Disponível em: PLOS. Acesso em: 29 jul. 2025.

PAIVA-CAVACO, A. et al. Nitrogen regulation and stress-response mechanisms in *Leishmania*. *International Journal for Parasitology*, 2021.

PAIVA-CAVACO, A. et al. Intracellular adaptation mechanisms of *Leishmania infantum* in macrophages. *International Journal for Parasitology*, v. 51, n. 10, p. 803–814, 2021.

PALTRINIERI, S. et al. Canine leishmaniasis: diagnosis and management. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, v. 40, n. 4, p. 673–689, 2010.

PALTRINIERI, S. et al. Laboratory tests for diagnosing and monitoring canine leishmaniasis. *Veterinary Clinical Pathology*, v. 45, n. 4, p. 552–578, 2016.

PAREYN, M. et al. Leishmaniasis. *Nature Reviews Disease Primers*, v. 11, art. 81, 2025. Disponível em: Nature. Acesso em: 29 jul. 2025.

PATNAIK, A. et al. Phase I study of pembrolizumab in patients with advanced solid tumors. *The Lancet Oncology*, v. 16, n. 7, p. 757–765, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-2607>.

PEREIRA, A. et al. Antibody response to *Phlebotomus perniciosus* saliva in cats naturally exposed to phlebotomine sand flies is positively associated with *Leishmania* infection. *Parasites & Vectors*, v. 12, p. 128, 2019. DOI: 10.1186/s13071-019-3376-0. Acesso em: nov. 2025.

PEREIRA, L. O. R. et al. Limitations of rk39-based serological tests for canine visceral leishmaniasis in endemic areas. *Veterinary Parasitology*, v. 283, p. 109162, 2020.

PEREIRA, M. A. et al. Prognostic factors and life expectancy in canine leishmaniosis. *Veterinary Sciences*, v. 7, art. 128, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/vetsci7030128>. Acesso em: 17 fev. 2025.

PRIOLO, V.; MARTÍNEZ-ORELLANA, P.; PENNISI, M. G. et al. *Leishmania infantum*-specific IFN- γ production in stimulated blood from cats living in areas where canine leishmaniosis is endemic. *Parasites & Vectors*, v. 12, p. 133, 2019. DOI: 10.1186/s13071-019-3386-y. Acesso em: jun. 2025.

READY, P. D. Epidemiology of visceral leishmaniasis. *Clinical Epidemiology*, v. 6, p. 147–154, 2014. DOI: 10.2147/CLEP.S44267.

RECK, M. et al. Pembrolizumab versus chemotherapy for PD-L1-positive non-small-cell lung cancer. *The New England Journal of Medicine*, v. 375, n. 19, p. 1823–1833, 2016. DOI: 10.1056/NEJMoa1606774. Acesso em: 9 mar. 2025.

REGLI, I. B. et al. Survival mechanisms used by some *Leishmania* species to escape neutrophil killing. *Frontiers in Immunology*, v. 8, art. 1558, 2017.

RITTIG, M. G.; BOGDAN, C. *Leishmania*-host-cell interaction: complexities and alternative views. *Parasitology Today*, v. 16, n. 7, p. 292–297, 2000. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0169-4758\(00\)01692-6](https://doi.org/10.1016/S0169-4758(00)01692-6). Acesso em: 9 mar. 2025.

RONDÓN, S. et al. Parasites of free-ranging and captive American primates: a systematic review. *Microorganisms*, v. 9, n. 12, p. 2546, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/microorganisms9122546>. Acesso em: 26 nov. 2025.

ROSANO, G. L.; CECCARELLI, E. A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, v. 5, p. 1–17, 2014.

SACKS, D.; NOBEN-TRAUT, N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nature Reviews Immunology*, v. 2, p. 845–858, 2002. DOI: 10.4049/jimmunol.1502249. Acesso em: 15 jul. 2025.

SHLOMIT, P. The potential of climatic suitability indicator for *Leishmania* transmission modelling in Europe: insights and suggested directions. *The Lancet Regional Health – Europe*, v. 43, 2024.

SCORZA, B. M. et al. *Leishmania infantum* xenodiagnosis from vertically infected dogs reveals significant skin tropism. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 15, n. 10, e0009842, 2021. DOI: 10.1371/journal.pntd.0009842.

SEGARRA, S. et al. Prevenção da progressão da doença em cães infectados por *Leishmania infantum* com nucleotídeos dietéticos e composto ativo correlacionado com hexose. *Parasites & Vectors*, v. 11, art. 103, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2705-z>. Acesso em: set. 2025.

SEGARRA, S. et al. Subclinical canine leishmaniasis: epidemiological relevance and implications for disease control. *Parasites & Vectors*, v. 11, 2018.

SILVA-MOREIRA, A. L. et al. New insights into the life cycle, host cell tropism, and infection amplification of *Leishmania* spp. *Infection and Immunity*, v. 93, n. 7, e00123-25, 2025. DOI: 10.1128/iai.00123-25.

SILVA-SANTOS, G. C.; FERREIRA, A. W. Metabolic enzymes as diagnostic antigens in leishmaniasis: focus on glutamine synthetase. *Experimental Parasitology*, v. 255, art. 108456, 2024.

SOLANO-GALLEGÓ, L. et al. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasites & Vectors*, v. 4, p. 86, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-86>. Acesso em: 4 abr. 2025.

SOLANO-GALLEGÓ, L. et al. Leishmaniosis in dogs: diagnosis and management. *Veterinary Journal*, v. 231, p. 45–55, 2017.

STEVERDING, D. The history of leishmaniasis. *Parasites & Vectors*, v. 10, art. 82, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2028-5>.

SYMEONIDOU, I. et al. Canine leishmaniosis in Greece: an updated countrywide serological study and associated risk factors. *Pathogens*, v. 10, n. 1129, p. 1–14, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/pathogens10091129>. Acesso em: dez. 2024.

SYMEONIDOU, I.; SIOUTAS, G.; GELASAKIS, A. I.; TSOKANA, C. N.; PAPADOPOULOS, E. Leishmaniosis in Greece: the veterinary perspective. *Pathogens*, v. 12, n. 6, art. 769, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/pathogens12060769>.

TALMI-FRAN, D. et al. Detection and identification of Old World *Leishmania* by high resolution melt analysis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 4, n. 1, e581, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000581>.

TOEPP, A. J.; PETERSEN, C. A. The balancing act: immunology of leishmaniosis. *Research in Veterinary Science*, v. 130, p. 19–25, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.02.004>. Acesso em: 17 fev. 2025.

TORRES-GUERRERO, E.; QUINTANILLA-CEDILLO, M. R.; RUIZ-ESMENJAUD, J.; ARENAS, R. Leishmaniasis: a review. *F1000Research*, v. 6, art. 750, 2017. DOI: 10.12688/f1000research.11120.1.

VAN GRIENSVEN, J.; DIRO, E. Visceral leishmaniasis. *Infectious Disease Clinics of North America*, v. 33, n. 1, p. 79–99, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.idc.2018.10.005>. Acesso em: jun. 2025.

VENTURA, S.; VILLAVERDE, A. Protein quality in bacterial inclusion bodies. *Trends in Biotechnology*, v. 24, n. 4, p. 179–185, 2006.

VENTURINI, C. et al. Immunoproteomics of *Leishmania* antigens. *Parasite Immunology*, v. 37, n. 6, p. 1–11, 2015.

WERNECK, G. L.; FIGUEIREDO, F. B.; CRUZ, M. S. P. Impact of 4% deltamethrin-impregnated dog collars on the incidence of human visceral leishmaniasis: a community intervention trial in Brazil. *Pathogens*, v. 13, n. 2, art. 135, 2024. DOI: 10.3390/pathogens13020135. Disponível em: MDPI. Acesso em: 9 dez. 2025.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *Ending the neglect to attain the Sustainable Development Goals: a road map for neglected tropical diseases 2021–2030*. Geneva: World Health Organization, 2023. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240010352>. Acesso em: 15 jul. 2025.

WORLD ASSOCIATION FOR VETERINARY DERMATOLOGY. Consensus recommendations for prevention of canine leishmaniasis in endemic areas. *Veterinary Dermatology*, 2025. Disponível em: Wiley Online Library. Acesso em: nov. 2025.

YASMIN, H.; ADHIKARY, A.; AL-AHDAL, M. N.; ROY, S.; KISHORE, U. Interação hospedeiro–patógeno na leishmaniose: resposta imune e estratégias de vacinação. *Immuno*, v. 2, n. 1, p. 218–254, 2022.