

RESSALVA

Atendendo solicitação da
autora,

o texto completo desta

DISSERTAÇÃO

será

disponibilizado somente a partir

de

11/06/2021.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
Campus de Araçatuba

MARILENE OLIVEIRA DOS SANTOS MACIEL

***ELISA PLASMÔNICA NA DETECÇÃO DE ANTICORPOS IgG
anti-*Leishmania* sp.***

Araçatuba
2019

MARILENE OLIVEIRA DOS SANTOS MACIEL

***ELISA PLASMÔNICA NA DETECÇÃO DE ANTICORPOS IgG
anti-*Leishmania* sp.***

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Área de Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal).

Orientadora: Prof.^a Ass. Valéria Marçal Felix de Lima

Araçatuba

2019

M152e Maciel, Marilene O. dos Santos
ELISA plasmônica na detecção de anticorpos IgG anti-Leishmania sp. / Marilene O. dos Santos Maciel.
-- , 2019
109 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara,
Orientadora: Valéria Marçal Felix de Lima

1. Cães. 2. Diagnóstico. 3. Leishmaniose Visceral.
4. Nanopartículas metálicas. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp.
Biblioteca da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara. Dados
fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araçatuba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: ELISA PLASMÔNICA NA DETECÇÃO DE ANTICORPOS IgG anti-Leishmania sp.

AUTORA: MARILENE OLIVEIRA DOS SANTOS MACIEL

ORIENTADORA: VALERIA MARÇAL FELIX DE LIMA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIA ANIMAL, área: Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. VALERIA MARÇAL FELIX DE LIMA

Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

Prof. Dr. GUILHERME DE PAULA NOGUEIRA

Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

Profa. Dra. TÁTIANE FERREIRA PETRONI

Curso de Biomedicina / Centro Universitário Toledo / UNITOLEDO - Araçatuba/SP

Araçatuba, 10 de junho de 2019.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família, esposo, mãe, avô e avó materna e irmãos por todo incentivo e compreensão da importância dessa conquista na minha vida. Amo vocês!

A minha orientadora Prof^a Associada Valéria Marçal Félix de Lima que me propiciou essa oportunidade, compartilhando momentos de aprendizados, que muito contribuiu para meu crescimento científico e intelectual, e por sempre ter me incentivado e me ouvido nos momentos difíceis. Obrigada por tudo!

Ao Centro de Controle de Zoonoses de Araçatuba e de São Vicente por permitirem o acompanhamento de suas rotinas para realização das coletas das amostras. Ao Instituto Adolfo Lutz, por em parceria com o Centro de Controle de Zoonoses de Araçatuba, fornecer o kit TR-DPP®) para realização do teste imunocromatográfico.

Ao Instituto de Pesquisa de Doenças Infecciosas, Seattle, Washington, EUA, por fornecerem o antígeno recombinante rK28 para o desenvolvimento do ensaio.

A minha banca de qualificação, Prof^a Dra. Tatiane Ferreira Petroni e o Prof^o Dr. Guilherme de Paula Nogueira que são um exemplo profissional, por toda dedicação e comprometimento, obrigada pelas considerações dadas ao meu trabalho.

Agradeço a todos os professores que de alguma forma me ajudaram e me deram apoio nessa minha jornada. Obrigada!

Ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal e a Faculdade de Medicina Veterinária Campus de Araçatuba pela oportunidade, por toda a infraestrutura oferecida e por ser tão bem recebida por todos.

O apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) processos nº 2017/11016-6 e também ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) nº 302165 / 2018-5 que financiou a pesquisa que deu origem ao artigo científico.

E a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por financiar a discente por um período.

"Consagre ao Senhor tudo o que você faz, e os seus planos serão bem-sucedidos."

(Provérbios 16:3)

MACIEL, M.O.S. et al. **ELISA plasmônica na detecção de anticorpos IgG anti-*Leishmania* sp.** 2019. 109 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2019.

RESUMO

O cão tem sido alvo do controle da Leishmaniose Visceral (LV), pois são reservatórios potenciais de *Leishmania infantum* e desempenham um papel fundamental na cadeia epidemiológica da doença no homem. Portanto, o diagnóstico da leishmaniose canina (Lcan) no Brasil tem sido um desafio para os órgãos de controle de endemias, uma vez que apresentam limitações quanto à sensibilidade e especificidade em áreas endêmicas. Nesta perspectiva a presente pesquisa objetivou desenvolver e validar um ELISA plasmônica indireto rK28 (pELISA) para o diagnóstico da Lcan. Para o desenvolvimento do pELISA, foram realizados diferentes ensaios de otimização, determinação das concentrações ideais de peróxido de hidrogênio, íons ouro, anticorpo IgG anti-dog biotilado e também do soro. Para a validação do ensaio, 170 amostras de soro de cães de área endêmica para Lcan e 26 amostras de cães saudáveis de área não endêmica para a doença foram testadas pelo pELISA e comparadas com ELISA indireto rK28 e com o teste imunocromatográfico (Dual Path Platform, TR_DPP®) usando como teste padrão-ouro o qPCR em amostras de sangue e/ou swab de subconjuntival. O ensaio foi padronizado com as concentrações de 250 µM de peróxido de hidrogênio, 0,30 mM de íons ouro e a melhor diluição do conjugado de estreptavidina-catalase foi de 1/50. O TR_DPP®, ELISA indireto rK28 e pELISA apresentaram sensibilidade de 79,0%, 89,5% e 94,7% e especificidade de 90,1%, 91,4% e 100,0%, respectivamente. Os maiores valores preditivos positivos (100,0%), negativos (99,3%) e de precisão (99,4%) foram observados no pELISA. O coeficiente Kappa entre o pELISA e a qPCR mostrou excelente concordância (0,970), diferentemente do ELISA indireto rK28 e do TR_DPP®, que mostraram uma boa concordância (0,645 e 0,551, respectivamente). Os resultados revelaram que o pELISA melhorou a sensibilidade e apresentou alta especificidade em relação ao método oficial recomendado pelo Ministério da Saúde no Brasil e pode aumentar a praticidade do diagnóstico em países com recursos limitados, pois não requer instrumentos sofisticados para leitura, sugerindo que este método pode ser usado como uma ferramenta adicional para o diagnóstico de Lcan nessas áreas.

Palavras-chave: Cães. Diagnóstico. Leishmaniose Visceral. Nanopartículas metálicas.

MACIEL, M.O.S. et al. **plasmonic ELISA for the detection of *anti-leishmania sp. IgG antibodies***. 2019. 109 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2019.

ABSTRACT

Dogs have been the target of control of Visceral Leishmaniasis (VL) in humans, as they are potential reservoirs of *Leishmania infantum* and play a key role in the epidemiological chain of the disease. Therefore, the diagnosis of Canine Leishmaniasis (CanL) in Brazil has been a challenge for endemic control organs, since they have limitations on sensitivity and specificity in endemic areas. In this perspective the present research aimed to develop and validate an indirect plasmonic ELISA rK28 (pELISA) for the diagnosis of CanL. For the development of pELISA, different concentrations of hydrogen peroxide, gold ions, biotinylated anti-dog IgG antibody and serum were tested in order to establish ideal values to each parameter. For the validation of the assay, 170 dog serum samples from endemic area to CanL and 26 healthy dog samples from an area nonendemic to the disease were tested by pELISA and compared with indirect ELISA rK28 and the immunochromatographic test (Dual Path Platform, TR_DPP®) using as gold standard assay the real-time PCR in blood samples and/or subconjunctival swab. The assay was standardized with the concentrations of 250 µM hydrogen peroxide, 0.30 mM gold ions, and dilution of the streptavidin-catalase conjugate of 1/50. The TR_DPP®, indirect ELISA rK28 and pELISA presented sensitivity of 79.0%, 89.5% and 94.7% and specificity of 90.1%, 91.4% and 100%, respectively. The highest predictive positive (100%), negative (99.3%) and accuracy (99.4%) values were observed in pELISA. Kappa coefficient between pELISA with real-time PCR showed excellent agreement (0.970), differently of indirect ELISA rK28 and TR_DPP®, which showed good agreement (0.645 and 0.551 respectively). The results revealed that the pELISA improved sensitivity and presented higher specificity compared to official method recommended by the Ministry of Health in Brazil and may increasing the practicality of diagnosis in resource-constrained countries, because it does not require sophisticated instruments to read, suggesting that this method can be used as an additional tool for the diagnosis of CanL in these areas.

Keywords: Dogs. Diagnosis. Leishmaniasis Visceral. Metal nanoparticles.

REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL

ALVAR, J. et al. Canine Leishmaniasis. In: **Advances in Parasitology**. [s.l: s.n.]57p. 1–88.

ARAÚJO, V. E. M. de et al. Relative Risk of Visceral Leishmaniasis in Brazil: A Spatial Analysis in Urban Area. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 11, p. e2540, 7 nov. 2013. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0002540>>.

BHATIA, A. et al. Cloning, characterization and serological evaluation of K9 and K26: Two related hydrophilic antigens of *Leishmania chagasi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 102, n. 2, p. 249–261, 1999.

BOGGIATTO, P. M. et al. Transplacental Transmission of *Leishmania infantum* as a Means for Continued Disease Incidence in North America. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 4, p. e1019, 12 abr. 2011. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0001019>>.

BOURDOISEAU, G. et al. Lymphocyte subset abnormalities in canine leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 56, n. 3–4, p. 345–351, 1997.

BOUYAHIA, N. et al. Impedance spectroscopy and conductometric biosensing for probing catalase reaction with cyanide as ligand and inhibitor. **Bioelectrochemistry**, v. 80, n. 2, p. 155–161, fev. 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bioelechem.2010.07.006>>.

BRASIL. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica**. 1. ed. [s.l: s.n.]

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, 2006.

CAMARGO-NEVES, V. L. F. de et al. Utilização de ferramentas de análise espacial na vigilância epidemiológica de leishmaniose visceral americana – Araçatuba , São Paulo , Use of spatial analysis tools in the epidemiological surveillance of American visceral leishmaniasis ,. **Caderno de Saúde Pública**, v. 17 (5), n. 5, p. 1263–1267, 2001.

CÂNDIDO, T. C. et al. Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay based on crude and purified antigen in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in symptomatic and oligosymptomatic dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 157, n. 3–4, p. 175–181, 2008.

CARDIM, M. F. M. et al. Introduction and expansion of human American visceral leishmaniasis in the state of Sao Paulo, Brazil, 1999-2011. **Revista de Saude Publica**, v. 47, n. 4, p. 1–9, 2013.

CLARK, M. F.; LISTER, R. M.; BAR-JOSEPH, M. **ELISA techniques**. In: [s.l: s.n.]871p. 742–766.

COURTENAY, O. et al. Heterogeneities in *Leishmania infantum* Infection: Using Skin Parasite Burdens to Identify Highly Infectious Dogs. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 1, p. 26, 2014.

COUTINHO, M. T. Z. et al. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 128, n. 1–2, p. 149–155, mar. 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.11.011>>.

COUTINHO, M. T. Z.; LINARDI, P. M. Can fleas from dogs infected with canine visceral leishmaniasis transfer the infection to other mammals? **Veterinary Parasitology**, v. 147, n. 3–4, p. 320–325, jul. 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.04.008>>.

DANTAS-TORRES, F. et al. Detection of *Leishmania infantum* in *Rhipicephalus sanguineus* ticks from Brazil and Italy. **Parasitology Research**, v. 106, n. 4, p. 857–860, 3 mar. 2010. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00436-010-1722-4>>.

DANTAS-TORRES, F. et al. Further thoughts on “Asymptomatic dogs are highly competent to transmit *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* to the natural vector”. **Veterinary Parasitology**, v. 204, n. 3–4, p. 443–444, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.04.018>>.

DANTAS-TORRES, F.; OTRANTO, D. When is an “asymptomatic” dog asymptomatic? **Veterinary Parasitology**, v. 202, n. 3–4, p. 341–342, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.02.008>>.

DE ALMEIDA LEAL, G. G. et al. Immunological profile of resistance and susceptibility in naturally infected dogs by *Leishmania infantum*. **Veterinary Parasitology**, v. 205, n. 3–4, p. 472–482, out. 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.08.022>>.

DE ASSIS, J. et al. Estudo comparativo dos métodos diagnósticos para leishmaniose visceral em cães oriundos de Ilha Solteira, SP. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 1, p. 17–25, 2010.

DE LA RICA, R.; STEVENS, M. M. Plasmonic ELISA for the ultrasensitive detection of disease biomarkers with the naked eye. **Nature Nanotechnology**, v. 7, n. 12, p. 821–824, 2012.

DE LA RICA, R.; STEVENS, M. M. Plasmonic ELISA for the detection of analytes at ultralow concentrations with the naked eye. **Nature Protocols**, v. 8, n. 9, p. 1759–1764, 22 set. 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2013.085>>.

DE QUEIROZ, N. M. G. P. et al. Canine Visceral Leishmaniasis diagnosis by immunohistochemistry and PCR in skin tissues in association with RIFI and ELISA-test. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 1, p. 34–40, 2010.

DESJEUX, P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, n. 3, p. 239–243, 2001.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, v. 27, n. 5, p. 305–18, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15225981>>.

DO ROSÁRIO, E. Y. et al. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay using crude *Leishmania* and recombinant antigens as a diagnostic marker for canine visceral leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 2, p. 197–203, 2005.

DOS-SANTOS, W. L. C. et al. Associations among immunological, parasitological and clinical parameters in canine visceral leishmaniasis: Emaciation, spleen parasitism, specific antibodies and leishmanin skin test reaction. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 123, n. 3–4, p. 251–259, 2008.

EUSTIS, S.; EL-SAYED, M. A. Why gold nanoparticles are more precious than pretty gold: Noble metal surface plasmon resonance and its enhancement of the radiative and nonradiative properties of nanocrystals of different shapes. **Chemical Society Reviews**, v. 35, n. 3, p. 209–217, 2006.

FEITOSA, MM, IKEDA FA , LUVIZOTTO MCR, P. S. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba–São Paulo (Brasil). **Clínica Veterinária**, v. 5, n. 28, p. 36–44, 2000.

FERREIRA, M. G. P. A. et al. Potential role for dog fleas in the cycle of *Leishmania* spp. **Veterinary Parasitology**, v. 165, n. 1–2, p. 150–154, out. 2009. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304401709003689>>.

FERREIRA, S. de A. et al. Evaluation of the conjunctival swab for canine visceral leishmaniasis diagnosis by PCR-hybridization in Minas Gerais State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 152, n. 3–4, p. 257–263, 2008.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Visceral Leishmaniasis in Brazil: current status, challenges and prospects. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, p. 338–349, 2004. Disponível em:

<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-790X2004000300011&lng=pt&tlng=pt>.

GUO, L.; KIM, D. H. LSPR biomolecular assay with high sensitivity induced by aptamer-antigen-antibody sandwich complex. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 31, n. 1, p. 567–570, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2011.10.047>>.

IKONOMOPOULOS, J. et al. Molecular diagnosis of leishmaniosis in dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 113, n. 2, p. 99–113, abr. 2003. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030440170300061X>>.

LACHAUD, L. et al. Comparison of Six PCR Methods Using Peripheral Blood for Detection of Canine Visceral Leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 210–215, 1 jan. 2002. Disponível em: <<http://jcm.asm.org/cgi/doi/10.1128/JCM.40.1.210-215.2002>>.

LAURENTI, M. D. et al. Asymptomatic dogs are highly competent to transmit *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* to the natural vector. **Veterinary Parasitology**, v. 196, n. 3–4, p. 296–300, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.03.017>>.

LAURICELLA, M. A. et al. An rK28-based immunoenzymatic assay for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Latin America. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, n. 1, p. 92–98, 2016.

LEITE, R. S. et al. PCR diagnosis of visceral leishmaniasis in asymptomatic dogs using conjunctival swab samples. **Veterinary Parasitology**, v. 170, n. 3–4, p. 201–206, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.02.020>>.

LIMA, V. M. F. de et al. Apoptosis in T lymphocytes from spleen tissue and peripheral

blood of *L. (L.) chagasi* naturally infected dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 184, n. 2–4, p. 147–153, 2012.

LIMA, V. M. F. et al. Anti-leishmania antibodies in cerebrospinal fluid from dogs with visceral leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, n. 4, p. 485–489, 2003.

LIMA, V. M. F. et al. Evidence of *Leishmania* spp. Antibodies and DNA in Bush Dogs (*Speothos venaticus*) in Brazil. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 40, n. 1, p. 91–94, mar. 2009. Disponível em: <<http://www.bioone.org/doi/full/10.1638/2008-0043.1>>.

LIMA, W. G. et al. Canine visceral leishmaniasis: a histopathological study of lymph nodes. **Acta Tropica**, v. 92, n. 1, p. 43–53, set. 2004.

LOMBARDO, G. et al. Detection of *Leishmania infantum* DNA by real-time PCR in canine oral and conjunctival swabs and comparison with other diagnostic techniques. **Veterinary Parasitology**, v. 184, n. 1, p. 10–17, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.08.010>>.

LOPES, E. G. et al. Serological and molecular diagnostic tests for canine visceral leishmaniasis in Brazilian endemic area: One out of five seronegative dogs are infected. **Epidemiology and Infection**, v. 145, n. 12, p. 2436–2444, 2017.

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

MOLYNEUX, D. H.; ASHFORD, R. W. **The biology of Trypanosoma and Leishmania, parasites of man and domestic animals.** [s.l: s.n.]

MORENO, J.; ALVAR, J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. **Trends in Parasitology**, v. 18, n. 9, p. 399–405, set. 2002. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471492202023474>>.

NIE, X. M. et al. Plasmonic ELISA for the ultrasensitive detection of *Treponema pallidum*. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 58, p. 314–319, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2014.03.007>>.

NUNES, C. M. et al. Avaliação da reação em cadeia pela polimerase para diagnóstico da leishmaniose visceral em sangue de cães. **Revista brasileira de parasitologia veterinária = Brazilian journal of veterinary parasitology: Órgão Oficial do Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária**, v. 16, n. 1, p. 5–9, 2007.

OGISO, M. et al. Carbohydrate immobilized on a dendrimer-coated colloidal gold surface for fabrication of a lectin-sensing device based on localized surface plasmon resonance spectroscopy. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 41, n. 1, p. 465–470, 2013a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2012.09.003>>.

OGISO, M. et al. Carbohydrate immobilized on a dendrimer-coated colloidal gold surface for fabrication of a lectin-sensing device based on localized surface plasmon resonance spectroscopy. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 41, n. 12, p. 465–470, mar. 2013b. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956566312006094>>.

OWENS, S. D. et al. Transmission of visceral leishmaniasis through blood transfusions from infected English Foxhounds to anemic dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 219, n. 8, p. 1076–1083, out. 2001. Disponível em: <<https://doi.org/10.2460/javma.2001.219.1076>>.

PALATNIK-DE-SOUSA, C. B. et al. Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 65, n. 5, p. 510–517, 1 nov. 2001. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11716106>>.

PATTABHI, S. et al. Design, development and evaluation of rK28-based point-of-care tests for improving rapid diagnosis of visceral leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 9, 2010.

PORROZZI, R. et al. Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays based on crude and recombinant leishmanial antigens for serodiagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania infantum* visceral infections in dogs. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 14, n. 5, p. 544–548, 2007.

QUARESMA, P. F. et al. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Identification of *Leishmania* species by PCR-RFLP and quantification of parasite DNA by real-time PCR. **Acta Tropica**, v. 111, n. 3, p. 289–294, 2009.

READY. Epidemiology of visceral leishmaniasis. **Clinical Epidemiology**, v. 6, n. 1, p. 147–154, 2014.

REALE, S. et al. Detection of *Leishmania infantum* in dogs by PCR with lymph node aspirates and blood. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 9, p. 2931–2935, 1999.

RISSIN, D. M. et al. Single-molecule enzyme-linked immunosorbent assay detects serum proteins at subfemtomolar concentrations. **Nature Biotechnology**, v. 28, n. 6, p. 595–599, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nbt.1641>>.

ROSATI, S. et al. Prokaryotic Expression and Antigenic Characterization of Three Recombinant *Leishmania* Antigens for Serological Diagnosis of Canine Leishmaniasis. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 10, n. 6, p. 1153–1156, 2003.

ROSYPAL, A. C. et al. Serological survey of *Leishmania infantum* and *Trypanosoma cruzi* in dogs from urban areas of Brazil and Colombia. **Veterinary Parasitology**, v. 149, n. 3–4, p. 172–177, 2007.

SADICK, M. D. et al. Cytokine regulation of murine leishmaniasis: Interleukin 4 is not sufficient to mediate progressive disease in resistant C57BL/6 mice. **Infection and Immunity**, v. 59, n. 12, p. 4710–4714, 1991.

SANTA ROSA I.C.A.; OLIVEIRA I.C.S. Leishmaniose visceral: breve revisão sobre

uma zoonose reemergente. **Clinica Veterinária**, v. 2, n. 11, p. 24–28, 1997.

SANTANA, C. C. et al. Inflammation and structural changes of splenic lymphoid tissue in visceral leishmaniasis: a study on naturally infected dogs. **Parasite immunology**, v. 30, n. 10, p. 515–24, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18665902><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2592477>>.

SATIJA, J. et al. Plasmonic-ELISA: Expanding horizons. **RSC Advances**, v. 6, n. 88, p. 85440–85456, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1039/C6RA16750K>>.

SILVA, F. L. et al. Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 160, n. 1–2, p. 55–59, mar. 2009. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304401708006031>>.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. Prevalence of Leishmania infantum Infection in Dogs Living in an Area of Canine Leishmaniasis Endemicity Using PCR on Several Tissues and Serology. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 2, p. 560–563, 1 fev. 2001. Disponível em: <<http://jcm.asm.org/cgi/doi/10.1128/JCM.39.2.560-563.2001>>.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. Histological and immunohistochemical study of clinically normal skin of Leishmania infantum-infected dogs. **Journal of Comparative Pathology**, v. 130, n. 1, p. 7–12, 2004.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 165, n. 1–2, p. 1–18, out. 2009. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304401709003124>>.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. **Parasites & Vectors**, v. 4, n. 1, p. 86, 2011. Disponível em: <<http://www.parasitesandvectors.com/content/4/1/86>>.

STRAUSS-AYALI, D. et al. Polymerase Chain Reaction Using Noninvasively Obtained