



**FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
CURSO DE DOUTORADO**



**AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DIAGNÓSTICO DE
NOVAS TÉCNICAS SOROLÓGICAS PARA
LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA**

NATHÁLIA LOPES FONTOURA MATEUS

Campo Grande – MS

2022

NATHÁLIA LOPES FONTOURA MATEUS

**AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DIAGNÓSTICO DE
NOVAS TÉCNICAS SOROLÓGICAS PARA
LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA**

*Evaluation of diagnostic performance of new serologic techniques for
canine visceral leishmaniasis*

NATHÁLIA LOPES FONTOURA MATEUS

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto do Nascimento Ramos

Coorientador: Prof. Dr. Manoel Sebastião da Costa Lima Junior

Tese apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências Veterinárias.

**CAMPO GRANDE, MS
2022**

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA ANIMAL

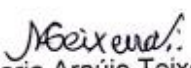


Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFMS



C E R T I F I C A D O

Certificamos que o Protocolo nº 645/2014 da Pesquisadora **Alessandra Gutierrez de Oliveira**, referente ao projeto de pesquisa "Leishmaniose Visceral Americana, estudo da prevalência canina e identificação de *Leishmania spp*, no município de Camapuã/MS", está de acordo com os princípios éticos adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), com a legislação vigente e demais disposições da ética em investigação que envolvem diretamente os animais e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA/UFMS, em reunião ordinária do dia 15 de dezembro de 2014.


Maria Araújo Teixeira
Coordenadora da CEUA/UFMS

Campo Grande, 15 de dezembro de 2014.

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA
<http://www.propp.ufms.br/ceua>
ceua.2000@gmail.com
fone (67) 3345-7186



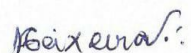
Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



C E R T I F I C A D O

Certificamos que o projeto intitulado “Diferentes abordagens diagnósticas de Leishmaniose Visceral Canina em área endêmica”, Protocolo nº 697/2015 sob a responsabilidade de **Alessandra Gutierrez de Oliveira** - que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul/UFMS, em reunião ordinária do dia 12 de agosto de 2015.

Vigência do Projeto	01/09/2015 a 01/12/2017
Espécie/Linhagem ou Raça	<i>Canis lupus familiaris</i> / Sem Raça Definida (SRD)
Números de Animais	200
Peso/Idade	Diversos/Variáveis
Sexo	Macho e Fêmea
Origem (fornecedor)	Hospital Veterinário da FAMEZ/UFMS e Centro de Controle de Zoonoses de Campo Grande/MS


Maria Araújo Teixeira

Coordenadora da CEUA/UFMS
Campo Grande, 13 de agosto de 2015.

Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação- PROPP
Cidade Universitária, s/n | Caixa Postal 549
Fone: 67 3345.7186 E-mail: gab.propp@ufms.br
CEP 79070-900 | Campo Grande | MS

ATA DE APROVAÇÃO



Serviço Público Federal
Ministério da Educação

Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



ATA DE DEFESA DE TESE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

DOUTORADO

Aos vinte e nove dias do mês de setembro do ano de dois mil e vinte e dois, via pareceristas *ad hoc*, a Banca Examinadora composta pelos membros: Carlos Alberto do Nascimento Ramos (UFMS), Cassia Rejane Brito Leal (UFMS), Manoel Sebastião da Costa Lima Junior (FIOCRUZ), Maria do Socorro Pires e Cruz (UFPI) e Wagner José Tenório dos Santos (FIOCRUZ), sob a presidência do primeiro, emitiu o parecer expresso conforme abaixo, referente ao trabalho da aluna: **NATHÁLIA LOPES FONTOURA MATEUS**, CPF 02286627100, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Curso de Doutorado, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, apresentado sob o título "**AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DIAGNÓSTICO DE NOVAS TÉCNICAS SOROLÓGICAS PARA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA**" e orientação de Carlos Alberto do Nascimento Ramos.

EXAMINADOR	AVALIAÇÃO
Dr. Carlos Alberto do Nascimento Ramos (Presidente)	(APROVADO)
Dra. Cassia Rejane Brito Leal (Interno)	(APROVADO)
Dr. Manoel Sebastião da Costa Lima Junior (Externo)	(APROVADO)
Dra. Maria do Socorro Pires e Cruz (Externo)	(REPROVADO)
Dr. Wagner José Tenório dos Santos (Externo)	(APROVADO)

RESULTADO FINAL:

() Aprovação (X) Aprovação com revisão () Reprovação

Assinatura



Documento assinado eletronicamente por **Carlos Alberto do Nascimento Ramos, Professor do Magisterio Superior**, em 29/09/2022, às 15:35, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Wagner José Tenório dos Santos, Usuário Externo**, em 29/09/2022, às 15:41, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **MARIA DO SOCORRO PIRES E CRUZ, Usuário Externo**, em 03/10/2022, às 11:02, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Cassia Rejane Brito Leal, Professora do Magistério Superior**, em 18/10/2022, às 09:56, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **NATHALIA LOPES FONTOURA MATEUS, Usuário Externo**, em 18/10/2022, às 19:56, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufms.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3585971** e o código CRC **2F3B5914**.

COLEGIADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

Av Costa e Silva, s/nº - Cidade Universitária

Fone:

CEP 79070-900 - Campo Grande - MS

Referência: Processo nº 23104.001703/2022-14

SEI nº 3585971

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família, por sempre acreditar em mim e me incentivar a buscar mais conquistas. Em especial, à minha mãe que com seu suporte e carinho, nunca me deixou desistir. Agradeço também ao meu noivo, Bruno, pela paciência, carinho e amparo durante essa jornada.

Agradeço às minhas sócias Cris, Thati e Rejane que me deram muita força no ambiente profissional para que eu conseguisse levar todas as tarefas adiante e sempre estiveram ao meu lado nos momentos difíceis. Sem o apoio de vocês não seria possível ter chegado até aqui.

Agradeço à professora Eliane que sempre foi minha mãe científica e estive ao meu lado, acreditando e me dando coragem em todas as etapas da minha vida profissional. Obrigada por todas as palavras de amor, incentivo e puxões de orelha prof.

Agradeço ao laboratório de Parasitologia Humana por serem a família Parasito, um local de cura e alegria nos dias difíceis; em especial à professora Alessandra por ter me recebido lá no começo da faculdade nesse local que tanto influenciou a minha formação profissional e pessoal, e me deu tantos exemplos de mulheres inteligentes, prestativas, determinadas e conquistadoras. A convivência com vocês me mostrou o que eu almejo como ambiente profissional para minha vida.

Agradeço ao Manoel pela oportunidade de conhecer e fazer pesquisa na Fiocruz e por todo o conhecimento, paciência e incentivo que tornaram o acontecimento do doutorado possível. Obrigada por ter me recebido em Recife e agradeço ao Mequi e a Fofa pela companhia nos dias fora de casa.

Agradeço ao Wagner por todo auxílio, paciência e hospitalidade nos dias em Recife. Obrigada por tanta atenção e conhecimento recebidos nesses dias. Sem o seu auxílio, este projeto nunca teria acontecido.

Agradeço ao professor Carlos por ter me aceitado como sua aluna e pela tamanha paciência durante a orientação. Obrigada por todo apoio e contribuições neste período do doutorado.

Agradeço a Mona, que sempre foi minha companheira nos dias de escrita.

Agradeço a minha prima, Maria Carolina, que descansou essa semana e foi exemplo de mulher forte, bondosa e apaixonada pela vida. Que mais pessoas possam viver e fazer o bem intensamente como você fazia.

MATEUS, N. L. F. Avaliação do desempenho diagnóstico de novas técnicas sorológicas para leishmaniose visceral canina. 2022. Doutorado em Ciências Veterinárias. Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2022.

RESUMO

A leishmaniose visceral (LV) é uma zoonose causada pelo protozoário *Leishmania infantum*. Os cães são considerados importantes reservatórios urbanos do parasita e o diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC) contribui no monitoramento de transmissão e emergência de LV. A confirmação da LVC instituída pelo Ministério da Saúde consiste na reação de imunoadsorção enzimática (ELISA), por meio da utilização de antígeno bruto de *L. major-like*; porém, esta técnica pode proporcionar resultados falsos positivos em animais infectados por outros tripanossomatídeos ou por *Ehrlichia canis*. Além disso, resultados falsos negativos são relatados em animais assintomáticos, promovendo a manutenção de reservatórios no ambiente. Neste âmbito, foram desenvolvidos antígenos recombinantes usados de maneira individual ou combinada no diagnóstico sorológico da LVC com intuito de aumentar a sensibilidade, especificidade e acurácia do teste. Este trabalho avaliou três testes sorológicos para o diagnóstico de LVC: dois ELISA com proteínas recombinantes quiméricas (Q1 e Q5) de desenvolvimento nacional e um teste rápido utilizando antígeno de membrana de promastigota de *Leishmania donovani* na apresentação de fitas reagentes (*dipstick*). Para avaliação das proteínas quiméricas, utilizou-se amostras de um banco sorológico provenientes de cães naturalmente infectados por *L. infantum* sintomáticos (n=30), oligossintomáticos (n=30), assintomáticos (n=10), cães saudáveis (n=30), vacinados com Leish-Tec® (n=5) e Leishmune® (n=5) e infectados com *Ehrlichia canis* (n=30). O resultado dos ELISA utilizando quimeras foi comparado ao ELISA com antígeno de extrato total de *L. infantum* e observou-se valores maiores de sensibilidade e especificidade, respectivamente, para Q1 (81,43%; 85,71%) e Q5 (74,29%; 90,0%), quando comparado ao antígeno bruto (71,43%; 82,86%). Apesar da proteína Q1 ter apresentado reação cruzada com amostras de cães vacinados com Leish-Tec®, esta quimera apresentou melhor sensibilidade no diagnóstico de animais assintomáticos (70%) e oligossintomáticos (73,33%). Para avaliação do teste rápido *dipstick* foram selecionadas amostras de um banco sorológico provenientes de cães naturalmente infectados por *L. infantum* sintomáticos (n=15), oligossintomáticos (n=15), assintomáticos (n=9), saudáveis (n=15), vacinados com Leish-Tec® (n=5) e infectados com *Ehrlichia canis* (n=15). O teste apresentou maior sensibilidade no grupo oligossintomático (93,33%), seguido do assintomático (77,78%) e sintomático (73,33%) e foi observado 100% de especificidade em todos os grupos. Desta maneira, Q5 pode ser um antígeno interessante para o desenvolvimento de testes sorológicos e as fitas reagentes (*dipstick*) podem ser uma ferramenta útil no diagnóstico da LVC devido a praticidade de realização. Ambos os métodos demonstraram bons resultados em situações em que a erliquiose canina pode ser diagnóstico diferencial do paciente.

Palavras-chave: ELISA, fitas reagentes, proteína recombinante; proteína quimera, teste rápido

MATEUS, N. L. F. Evaluation of diagnostic performance of new serologic techniques for canine visceral leishmaniasis. 2022. Doutorado – Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2021.

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis (VL) is a zoonosis caused by the protozoan *Leishmania infantum*. Dogs are considered important urban reservoir for the parasite and canine visceral leishmaniasis (CVL) diagnosis contributes for monitoring and reemergence of VL. CVL confirmatory diagnosis as recommended by the Ministry of Health is performed using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with crude antigen of *L. major-like*. However, this technique may provide false positive results for animals infected with other trypanosomatids or *Ehrlichia canis*. Besides that, false negative results may be obtained for asymptomatic dogs, which can act as the parasite reservoir in the urban environment. In this context, recombinant antigens have been developed individually or combined to increase sensitivity, specificity, and accuracy of CVL serodiagnosis. This study analyzed three serologic tests for CVL diagnosis: two national developed ELISA using recombinant proteins (Q1 and Q5) and one rapid test using antigen of *L. donovani* promastigote membrane, in dipstick presentation. To evaluate chimeric proteins performances in ELISA, samples from a serological bank were used. Samples from naturally infected dogs with *L. infantum* symptomatic (n=30), oligosymptomatic (n=30) and asymptomatic (n=10); healthy (n=30), vaccinated with Leish-Tec® (n=5) and Leishmune® (n=5) and infected with *E. canis* (n=30) were used. The performance of chimeric ELISAs were compared to the ELISA with *L. infantum* total extract as antigen. Greater values of sensitivity and specificity were observed, respectively, for Q1 (81.43%; 85.71%) and Q5 (74.29%; 90.0%), when compared to total extract antigen (71.43%; 82.86%). Although Q1 presented cross-reaction with Leish-Tec®-vaccinated dogs, this chimeric protein demonstrated better sensitivity to diagnose asymptomatic (70%) and oligosymptomatic (73,33%) dogs. To access dipstick performance, samples from naturally infected dogs with *L. infantum* symptomatic (n=15), oligosymptomatic (n=15) and asymptomatic (n=9); healthy (n=15); vaccinated with Leish-Tec® (n=5) and infected with *E. canis* (n=15) were obtained from a sera bank. The dipstick test presented higher sensitivity in the oligosymptomatic group (93.33%); followed by asymptomatic (77.88%) and symptomatic (73.33%); specificity value of 100% was observed for the test among all groups. Therefore, Q5 may be an interesting antigen for the development of serological tests and dipstick test could be a useful tool for CVL diagnosis due to its ease of performance. Both methods demonstrated good performance in situations where canine ehrlichiosis may be a differential diagnosis for the patient.

Keywords: chimeric protein, dipstick, ELISA, rapid test, recombinant protein.

LISTA DE FIGURAS

- Fig 1.** ROC curve displaying the performance of the chimeric proteins Q1 and Q5 and the total crude antigen extract of *Leishmania infantum* with canine sera of naturally infected animals (symptomatic, oligosymptomatic and asymptomatic, n= 90) with *L. infantum* and negative animals (vaccinated, infected with *Ehrlichia canis* and healthy, n= 56).....38
- Fig 2.** Anti-Leishmania IgG antibody level in dogs naturally infected with *Leishmania* sp. symptomatic (SYM; n=30); oligosymptomatic (OLI; n=30) and asymptomatic (ASY; n=16); dogs negative for canine visceral leishmaniasis (CVL) and hemoparasites (*Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Babesia canis*) (NEG; n=30); CVL-negative dogs infected only with *Ehrlichia canis* (EHR; n=30), and hemoparasites (*L. infantum*, *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Babesia canis*)-negative dogs vaccinated with Leish-Tec® (VLT; n=5) and Leishmune® (VLM; n=5) vaccines tested with different antigens: *L. infantum* crude antigen (*L. infantum* extract), chimeric protein Q1 and chimeric protein Q5.....41

LISTA DE TABELAS

Table 1.	Sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value and area under the curve of chimeric proteins Q1 and Q5 and total crude antigen extract of <i>Leishmania infantum</i> tested with sera from dogs naturally infected by <i>Leishmania</i> sp. asymptomatic (n=10), oligosymptomatic (n=30) and symptomatic (n=30); sera from canine visceral leishmaniasis (CVL)-negative animals infected with <i>Ehrlichia canis</i> (n=30) and hemoparasites (<i>L. infantum</i> , <i>Ehrlichia canis</i> , <i>Anaplasma platys</i> , <i>Babesia canis</i>)-negative dogs vaccinated with Leish-Tec® (n=5) and Leishmune® vaccines (n=5).....	39
Tabela 2.	Sensibilidade, especificidade e acurácia do teste <i>dipstick</i> com amostras sorológicas de cães naturalmente infectados por <i>Leishmania infantum</i> sintomáticos (n=15), oligossintomáticos (n=15) e assintomáticos (n=9); cães negativos para leishmaniose visceral canina (LVC-negativo) e hemoparasitas (<i>L. infantum</i> , <i>Ehrlichia canis</i> , <i>Anaplasma platys</i> , <i>Babesia canis</i>), infectados por <i>Ehrlichia canis</i> (n=15) e cães (<i>L. infantum</i> , <i>Ehrlichia canis</i> , <i>Anaplasma platys</i> , <i>Babesia canis</i>)-negativos vacinados com Leish-Tec® (n=5).....	54

*“A todos os veterinários que já sofreram com as situações em que a leishmaniose
nos coloca”*

SUMÁRIO

1. CAPÍTULO I	14
1.1. INTRODUÇÃO	14
1.2. OBJETIVOS	15
1.2.1. OBJETIVO GERAL.....	15
1.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
1.3 REVISÃO DE LITERATURA	16
1.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25
2 CAPÍTULO II – ARTIGO 1 – RECOMBINANT ELISA FOR CANINE VISCERAL LEISHMANIASIS DIAGNOSIS IN DISTINCT DOGS’ CLINICAL PROFILE	32
ABSTRACT	32
INTRODUCTION	33
METHODS	34
RESULTS	37
DISCUSSION	40
CONCLUSION	45
ACKNOWLEDGMENTS.....	45
REFERENCES.....	45
3 CAPÍTULO III – ARTIGO 2 – AVALIAÇÃO DE TESTE SOROLÓGICO RÁPIDO NO DIAGNÓSTICO DE CÃES COM DIFERENTES PERFIS CLÍNICOS NATURALMENTE INFECTADOS POR <i>LEISHMANIA INFANTUM</i>	51
RESUMO.....	51
INTRODUÇÃO.....	51
MATERIAL E MÉTODOS	52
RESULTADOS.....	54
DISCUSSÃO.....	54
DECLARAÇÃO DE ÉTICA	56
REFERÊNCIAS	57
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	61
5 IMPACTO ECONÔMICO, SOCIAL, TECNOLÓGICO E/OU INOVAÇÃO	62

1. CAPÍTULO I

1.1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é uma zoonose causada pelo protozoário *Leishmania infantum*, caracterizada como uma das principais doenças tropicais negligenciadas no mundo (BURZA et al., 2018). O Brasil é o país responsável por 90% dos casos de LV na América Latina (BRASIL, 2022), e a enfermidade pode ser considerada um problema importante na saúde pública do país devido a redução dos anos de vida produtiva do indivíduo acometido; gastos com internação e medicações de uso hospitalar e a possibilidade de óbito (MURRAY et al., 2015; CARVALHO et al., 2017).

Dentre as medidas de controle à LV preconizadas pelo Ministério da Saúde incluem-se o diagnóstico precoce e tratamento dos seres humanos; controle do vetor e, eutanásia dos cães soropositivos quando não há opção pelo tratamento, uma vez que os cães são considerados os principais reservatórios urbanos do parasita (BRASIL, 2014; LIMA et al., 2018). No entanto, o diagnóstico preciso da leishmaniose visceral canina (LVC) é um dos maiores entraves para o controle desta antroponose devido a inespecificidade e variedade de manifestações clínicas observadas durante o curso da doença, e pela inexistência de um método diagnóstico único com 100% de sensibilidade e especificidade; tornando necessária a associação de técnicas diagnósticas para a obtenção de um diagnóstico definitivo (MOREIRA et al., 2007).

Atualmente, o Ministério da Saúde preconiza a utilização do teste rápido imunocromatográfico Dual Path Platform – TR-DPP® (Bio-Manguinhos/ Fiocruz/ Brasil), como forma de triagem dos animais suspeitos; seguido da confirmação dos positivos pela reação de imunoadsorção enzimática (ELISA) (EIE-LVC®-Bio-Manguinhos/ Fiocruz/ Brasil), a qual utiliza antígeno bruto solúveis de *L. major-like* (BRASIL, 2011).

Contudo, a baixa sensibilidade do teste de triagem em animais com pouca ou nenhuma manifestação clínica coloca em questão a manutenção de animais reservatórios no ambiente (GRIMALDI et al., 2012; MATEUS, 2018). Por outro lado, a baixa especificidade e ocorrência de resultados falsos positivos no ELISA com antígeno bruto, devido à proximidade antigênica de *Leishmania* sp. a outros

protozoários patogênicos, também levam ao questionamento de eutanásias despropositadas (FERREIRA et al., 2007; DANTAS-TORRES et al., 2019).

Com a intenção de obter maior acurácia no diagnóstico da LVC, foram identificadas moléculas específicas, reconhecidas por soros de cães infectados, por meio de *screenings* sorológicos, os quais impulsionaram a produção de proteínas antigênicas recombinantes de *L. infantum* para utilização em ensaios imunológicos (BARBOSA et al., 2012). Contudo poucas destas proteínas foram testadas em cães com perfis clínicos distintos e em situações desafiadoras de diagnóstico, como na presença de cães vacinados contra LVC e cães infectados com *Ehrlichia canis*.

Considerando os fatos expostos, o presente trabalho avaliou o desempenho diagnóstico de dois testes de ELISA utilizando como antígeno recombinante as proteínas quiméricas Q1 e Q5, produzidas pela equipe de pesquisa da FIOCRUZ – Instituto Aggeu Magalhães (RECIFE-PE) (SANTOS et al., 2020) e do teste rápido utilizando fitas reagentes (*dipstick*) de Ejazi et al. (2019) em amostras de soro de cães com diferentes perfis clínicos.

1.2. OBJETIVOS

1.2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o desempenho de plataformas (fitas reagentes - *dipstick* e ELISA) para diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral canina em cães naturalmente infectados com *Leishmania* spp. de Mato Grosso do Sul.

1.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o desempenho dos ELISA recombinantes com as proteínas quiméricas Q1 e Q5 utilizando amostras de animais infectados apenas com *Ehrlichia canis*, animais sintomáticos, assintomáticos e oligossintomáticos para leishmaniose visceral canina e animais vacinados contra leishmaniose visceral canina;
- Comparar o desempenho dos ELISA recombinantes com o ELISA utilizando antígeno de extrato total de *Leishmania infantum*;
- Avaliar o desempenho do ELISA rápido em fita reagente (*dipstick*) em animais infectados com *Ehrlichia canis*, animais sintomáticos,

assintomáticos e oligossintomáticos para leishmaniose visceral canina e animais vacinados contra leishmaniose visceral canina;

1.3 REVISÃO DE LITERATURA

A leishmaniose visceral (LV) é uma antroponose reemergente causada pelo protozoário flagelado *Leishmania infantum*, transmitido durante o repasto sanguíneo de fêmeas de flebotomíneos (Psychodidae: *Phlebotominae*) (GRIMALDI; TESH, 1993; BURZA et al., 2018).

Na Índia descreve-se o ciclo antroponótico do protozoário flagelado *Leishmania donovani*, o qual tem como vetor flebotomíneos de hábito antropofílico, sendo o ser humano caracterizado neste ciclo por altas cargas parasitárias no sangue e na pele (BURZA et al., 2018).

Já no Brasil, país responsável por cerca de 90% dos casos de LV na América Latina (BRASIL, 2022), destaca-se o ciclo zoonótico associado a espécie *L. infantum* que tem como principal reservatório o cão doméstico (DEANE e DEANE, 1955; PALATNIK-DE-SOUZA e DAY, 2011) e principal vetor, a espécie de flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis*, com ampla distribuição geográfica pelo país e alta antropofilia e adaptação a ambientes urbanizados (AGUIAR e MEDEIROS, 2003; RANGEL e VILELA, 2008; SOUZA et al., 2009).

A LV trata-se de uma doença de notificação compulsória no Brasil, presente nas cinco regiões do país e endêmica no Norte, Centro-Oeste, Sudeste e Nordeste, sendo esta última responsável pelo maior índice de casos (BRASIL, 2022). O estado de Mato Grosso do Sul (MS), teve notificações da doença em 39 dos seus 79 municípios entre 2019 e 2021, sendo 5 destes, incluindo a capital, classificados como área de alta taxa de transmissão de LV (acima de 4,4 casos/ano). Foram confirmados 1.702 casos no estado, com 122 óbitos, no período de 2012 a 2021. A maior taxa de letalidade observada no MS nos últimos cinco anos foi registrada em 2019 com 12,12%; porém ressalta-se que no ano de 2022 até o final de junho, esta já se encontrava em 14%. Desta maneira, a elevada incidência e taxa de letalidade observadas no estado demonstram a gravidade da doença e as condições de assistência e vigilância (MATO GROSSO DO SUL, 2022).

A LV é considerada a terceira doença infecciosa de prioridade no mundo de acordo com a Organização Mundial da Saúde. Possui um elevado indicador econômico, chamado DAILYs (*"Disability-adjusted life years"*), pois trata-se de uma enfermidade debilitante que reduz os anos de vida produtiva do ser humano e pode levar ao óbito (MURRAY et al., 2015). É considerada uma doença de caráter crônico, que cursa geralmente com internação do paciente e uma média de permanência hospitalar de 14,3 dias; fato este que demonstra o impacto da LV nos gastos com saúde pública no país (CARVALHO et al., 2017).

Dentre os sinais clínicos mais observados na LV destaca-se febre, fraqueza emagrecimento, esplenomegalia e hepatomegalia. O período de incubação da doença varia entre 2 e 8 semanas e, na ausência de tratamento, pode evoluir para óbito em aproximadamente 2 anos, devido a anemia severa ou infecções bacterianas secundárias. Muitos indivíduos podem permanecer assintomáticos por anos e são fatores predisponentes a manifestação severa da doença: a desnutrição e imunossupressão; destacando-se a maior incidência de LV em pacientes infectados por HIV e crianças desnutridas (BURZA et al., 2018; LIMA et al., 2018).

As medidas de controle à LV preconizadas pelo Ministério da Saúde incluem o diagnóstico precoce e tratamento dos seres humanos; controle do vetor e eutanásia dos cães soropositivos (BRASIL, 2014).

Os cães são considerados importantes reservatórios de *L. infantum* devido à alta carga parasitária apresentada na pele mesmo quando estes animais estão assintomáticos, facilitando a infecção do vetor pelo parasita (LAURENTI et al., 2014). Ademais, os casos de leishmaniose visceral canina (LVC) usualmente precedem o aparecimento da doença humana, refletindo a importância do monitoramento da infecção canina como um possível marcador de transmissão de LV (MAGALHÃES-JUNIOR et al., 2016).

O diagnóstico acurado da LVC é um dos maiores entraves para o controle desta zoonose. Apesar da grande disponibilidade e variedade de métodos diagnósticos, ainda não se possui um método padronizado que apresente 100% de sensibilidade e especificidade (RAMIREZ et al., 2020). Dentre os métodos diagnósticos disponíveis pode-se citar o diagnóstico sorológico, que abrange desde a necessidade de equipamentos laboratoriais sofisticados até a possibilidade de realização a campo, sob plataformas de teste rápido e; os métodos parasitológicos,

os quais abrangem técnicas citológicas, de cultura celular ou moleculares (GONTIJO e MELO; 2004; SOLANO-GALLEGO et al., 2017).

O diagnóstico parasitológico direto apresenta 100% de especificidade e é realizado por meio da visualização de formas amastigotas do parasita *Leishmania spp.* em algum tecido do animal, sendo as amostras de linfonodo e medula óssea as mais utilizadas na rotina clínica, com sensibilidade entre 40-50% e 60-75%, respectivamente (ALVAR et al., 2004; GONTIJO; MELO, 2004; SANTOS et al., 2014). É considerado um diagnóstico definitivo e padrão ouro; porém a distribuição não homogênea dos parasitas nos tecidos, mesmo em cães sintomáticos, além da ausência de linfadenomegalia em alguns cães, e a invasividade na coleta de medula óssea reduzem a utilização destas técnicas na rotina. Ademais, são técnicas que requerem experiência do profissional responsável pela leitura do material e demandam maior tempo para sua execução, impossibilitando a aplicação em estudos epidemiológicos, por exemplo (GONTIJO; MELO, 2004; MOREIRA et al., 2007; SANTOS et al., 2014).

As técnicas moleculares para diagnóstico de LVC ganharam espaço devido a maior sensibilidade apresentada por métodos como a reação em cadeia da polimerase (PCR), capaz de detectar quantidades mínimas de DNA independente do estágio da doença (GONTIJO; MELO, 2004; GOMES et al., 2008). Além disso, apresenta a vantagem de ser aplicável em diferentes tipos de amostras, tais como biópsias de pele, aspirados de medula óssea e linfonodos e swab de mucosa ocular, com valores de sensibilidade variando entre 83,1%-92,3%, como demonstrado por Marcelino et al. (2020), na utilização do minicírculo-kDNA/145pb como alvo para reação.

A possibilidade de detecção de material genético de protozoários do gênero *Leishmania*, facilitou o diagnóstico em pacientes assintomáticos ou imunossuprimidos, como demonstrado por Queiroz et al. (2010) ao identificar animais infectados em estágios iniciais da enfermidade, mesmo antes da soroconversão. Contudo, os métodos moleculares requerem laboratórios equipados e profissionais capacitados para execução das técnicas; sendo assim, são considerados exames diagnósticos de custo elevado e maior tempo para obtenção, inviáveis para utilização em larga escala; além da ausência de uma

técnica padronizada de PCR pelo Ministério da Saúde (GONTIJO e MELO, 2004; QUEIROZ et al., 2010).

Neste contexto, o diagnóstico sorológico da LVC tem sido amplamente utilizado devido à facilidade de aplicação da técnica em um grande número amostral, envolvendo procedimentos minimamente invasivos, como a coleta de sangue. Aliado a estas vantagens, a hipergamaglobulinemia é uma das frequentes alterações observadas nos cães infectados por *L. infantum* justificando a utilização dos métodos sorológicos para diagnóstico (ALVAR et al., 2004; FONSECA et al., 2014).

O diagnóstico da LVC atualmente instituído pelo Ministério da Saúde para confirmação da doença consiste no teste rápido imunocromatográfico Dual Path Platform – TR-DPP® (Bio-Manguinhos/ Fiocruz/ Brasil), com uma fusão dos antígenos recombinantes rK9, rK26 e rK39, como forma de triagem dos animais suspeitos (BRASIL, 2011; FONSECA et al., 2014); seguido da reação de imunoabsorção enzimática (ELISA) (EIE-LVC®-Bio-Manguinhos/ Fiocruz/ Brasil), a qual utiliza antígeno bruto solúveis de *L. major-like*, agente etiológico da leishmaniose tegumentar no Velho Mundo (BRASIL, 2014).

Neste cenário, a utilização de um ELISA de alta especificidade é fundamental, uma vez que este representa o diagnóstico confirmatório da LVC e trata-se de uma informação decisiva para a eutanásia do animal. A utilização de antígenos brutos solúveis do parasita no ELISA apresenta alta sensibilidade, porém baixa especificidade devido à proximidade antigênica de *Leishmania* sp. a outros agentes patogênicos que compartilham epítomos antigênicos semelhantes, em especial com os tripanossomatídeos (FERREIRA et al., 2007).

Reações cruzadas no diagnóstico sorológico de LVC já foram reportadas por Ferreira et al. (2007), os quais observaram valores de sensibilidade e especificidade de 100% e 96%, respectivamente, ao utilizar o teste ELISA (EIE-LVC®-Bio-Manguinhos/ Fiocruz/ Brasil); com presença de resultados falsos positivos em amostras de cães infectados por *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania braziliensis* e *Ehrlichia canis*. Alves et al. (2012) também avaliaram o desempenho deste teste sorológico e observaram reação cruzada com um tripanossomatídeo não patogênico de cães, a espécie *Trypanosoma caninum*, relatando, valores de sensibilidade e especificidade de 100% e 68%, respectivamente.

A ocorrência de resultados falsos positivos e negativos no diagnóstico considerado confirmatório para LVC, bem como as questões éticas, financeiras e socioemocionais envolvidas na eutanásia dos cães sororreagentes, promoveram a busca por novos antígenos de *L. infantum* com potencial para aprimorar o diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral em cães e seres humanos (GOMES et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2011; FONSECA et al., 2014; MAGALHÃES et al., 2017). O uso de antígenos recombinantes pode trazer maior sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade aos exames sorológicos utilizados no diagnóstico da LVC (PASSOS et al., 2005; MAIA-ELKHOURY et al., 2008).

Diversas proteínas já foram demonstradas como promissoras no diagnóstico da LVC por meio de *screenings* sorológicos, os quais permitiram a identificação de moléculas específicas reconhecidas por soros de cães infectados e impulsionaram a produção de proteínas antigênicas recombinantes de *L. infantum* para utilização em ensaios imunológicos (BARBOSA et al., 2012). Dentre as proteínas recombinantes aplicadas em testes diagnósticos comerciais, destaca-se a rK39, presente como um dos antígenos que compõem o TR-DPP® e no teste IT-LEISH® (Diamed Latino-America S.A, Lagoa Santa, Brasil) usado para o diagnóstico de LV humana no Brasil.

A utilização do TR-DPP® como teste de triagem para LVC pelo Ministério da Saúde aumentou a sensibilidade no diagnóstico da enfermidade canina em substituição ao protocolo anterior, baseado na concordância de resultados entre ELISA e reação de imunofluorescência indireta (RIFI) (COURA-VITAL et al., 2014). No entanto, o desempenho deste teste imunocromatográfico ainda apresenta resultados discrepantes em animais com perfis clínicos distintos ou infectados por outros hemoparasitas, fatores que propiciam a ocorrência de resultados falsos negativos e manutenção de reservatórios no ambiente, bem como resultados falsos positivos e realização de eutanásias despropositadas (LAURENTI, 2014; MATEUS, 2018; DANTAS-TORRES et al., 2019).

Mateus (2018) relatou valores de sensibilidade inferiores do TR-DPP® no diagnóstico de animais assintomáticos para LVC nos municípios de Camapuã (58%) e Campo Grande (67%) ao comparar com animais sintomáticos dos mesmos municípios (65% em Camapuã e 92% em Campo Grande); corroborando o baixo

valor de sensibilidade (47%) observado por Grimaldi et al. (2012) ao avaliarem animais assintomáticos de um município endêmico para LVC no Espírito Santo.

As diferentes apresentações clínicas observadas nos animais acometidos por *L. infantum* são justificadas por tratar-se de uma protozoonose de acometimento sistêmico e complexa patofisiologia (SOLANO-GALLEGO et al., 2009). Assim, os sinais clínicos manifestados durante doença podem ser bastante variáveis de acordo com a parasitemia, local de inoculação do parasita, competência imunológica do cão e estágio da doença; fatores que dificultam a realização do diagnóstico clínico (PINELLI et al., 1994; QUINNELL et al., 2001; MORENO e ALVAR, 2002).

Dentre os principais sinais observados na LVC estão: linfadenomegalia, perda de peso, alterações dermatológicas, onicogrifose, hepatomegalia, esplenomegalia, glomerulopatias, claudicação, epistaxe e lesões oculares (MOREIRA et al., 2007; MAIA e CAMPINO, 2008).

É sabido que a expressividade das manifestações clínicas se altera durante o curso da LVC e está correlacionada à positividade nos exames diagnósticos para a enfermidade, uma vez que o perfil de resposta imune do animal, Th1 ou Th2, influencia a apresentação clínica da doença e a hipergamaglobulinemia detectada (SOLANO-GALLEGO et al., 2011). O paciente de perfil Th1 apresenta predominância de resposta imune celular, mediado pela ativação de células TCD4, produção de interferon- γ , interleucina-2 e fator de necrose tumoral- α , os quais estimulam a atividade leishmanicida de macrófagos e síntese de óxido nítrico findando, conseqüentemente, em baixas cargas parasitárias e manifestações clínicas menos intensas nos hospedeiros (SOLANO-GALLEGO et al., 2011).

Por outro lado, cães com perfil de resposta Th2 apresentam expressiva resposta imune humoral e resposta celular diminuída, promovendo intensa produção de anticorpos e resposta não-protetiva contra a infecção, a qual cursa com altas cargas parasitárias, intensas manifestações clínicas da doença e altos títulos de anticorpos anti-*Leishmania* sp. em testes diagnósticos (ALVAR et al., 2004; BANETH et al., 2008; SOLANO-GALLEGO et al., 2009, 2011).

A complexidade da resposta imune humoral envolvida nessa protozoonose dificulta a obtenção de antígenos únicos que proporcionem alta sensibilidade e especificidade ao diagnóstico da leishmaniose. Teixeira et al. (2007) ao analisarem

amostras de pacientes humanos com LV não encontraram nenhum antígeno do extrato de *L. infantum* que fosse reconhecido por anticorpos em todos os soros. Assim, a utilização de um único antígeno definido para avaliação da prevalência populacional e tomada de ações de vigilância pode ser falha; desta maneira, tem-se instigado o uso de múltiplos antígenos recombinantes para obtenção de um teste de desempenho superior aos já existentes no mercado (QUINNEL et al., 2013; SANTOS et al., 2019; RAMIREZ et al., 2020; PEREIRA et al., 2020; JESUS et al., 2021).

Santos et al. (2019) avaliaram três proteínas recombinantes (rFc, rC9 e rA2) previamente identificados por meio de estudos de proteômica e genômica como potenciais antígenos para o diagnóstico da leishmaniose visceral na espécie canina e humana. Os autores obtiveram maior sensibilidade (91,5%) e especificidade (87,2%) para a proteína rA2 no diagnóstico de seres humanos parasitologicamente confirmados para infecção por *L. infantum*, com uma única reação cruzada com amostra de soro de paciente infectado por *Toxoplasma* sp. Já na avaliação do desempenho diagnóstico para LVC, obtiveram valores de sensibilidade maior ou igual a 90% para os três antígenos testados com soros de cães sintomáticos e assintomáticos parasitologicamente diagnosticados com LVC e especificidades variando entre 81,2-87,5%. Contudo, estes autores não avaliaram a ocorrência de reações cruzadas com cães vacinados ou infectados por outros hemoparasitas.

Com o intuito de avaliar o desempenho de sete antígenos recombinantes (proteína de membrana dos cinetoplastídeos KMP-11, proteínas ácidas ribossomais LiP2a, LiP2b e LiP0, da histona H2A, proteínas de choque térmico HSP70 e HSP83) de maneira individual para o diagnóstico de LVC, Ramirez et al. (2020) avaliaram o desempenho destes não só em pacientes com diferentes perfis clínicos, mas também provenientes de diferentes regiões do país e, incluíram na avaliação de especificidade, cães saudáveis infectados por *E. canis*. As proteínas KMP-11, LiP0 e LiP2a não apresentaram reação cruzada com a bactéria transmitida pela picada do carrapato. Porém, não demonstraram boa sensibilidade para o diagnóstico de LVC, sendo o maior valor obtido com a proteína LiP0, a qual apresentou apenas 38% de sensibilidade para pacientes sintomáticos e 34,57% para assintomáticos.

Visando apurar o diagnóstico da leishmaniose visceral canina em animais assintomáticos, Jesus et al., (2021) estudaram o desempenho da proteína recombinante rLci5 de acordo com o tempo de infecção e sinais clínicos do canino acometido, utilizando um critério de pontuação de 0 a 24 pontos de acordo com a presença e intensidade das manifestações clínicas. Os pesquisadores demonstraram a habilidade do ELISA utilizando rLci5 em detectar 62,9% dos cães infectados com *L. infantum* com escore de 0-3 pontos e 64,3% com pontuação entre 4-7. Ademais, foi relatada a utilidade deste antígeno na identificação precoce de animais infectados, sendo capaz de reconhecer animais infectados até 24 meses antes dos outros testes utilizados como comparação (ELISA com antígeno bruto, TR-DPP®, PCR em tempo real e cultura de aspirado de baço).

Outro ponto importante a ser considerado na investigação de potenciais antígenos recombinantes para o diagnóstico da LVC é a sua capacidade de distinguir animais vacinados de animais infectados. Este foi o objetivo da pesquisa de Pereira et al., (2020) ao apurar a performance de dois antígenos recombinantes oriundos de *L. donovani* (rKLO8 e rK28) e dois de *L. braziliensis* (rK39 e rLb6H) em soros de cães sororreagentes no TR-DPP® e EIE-LVC e soros de cães negativos para LVC e hemoparasitas (*E. canis* e *Anaplasma* spp.) vacinados com Leish-Tec® (Ceva Saúde Animal Ltda, Paulínea, São Paulo, Brasil). Os resultados obtidos demonstraram alta sensibilidade (84%) de rK28 e baixa ocorrência de reações cruzadas (especificidade 95-100%) e, também revelaram a alta especificidade (93-100%) da proteína rKLO8, a qual poderia ser útil para confirmação da doença em situações de dúvida entre vacinação e infecção.

Almejando a melhoria de sensibilidade e especificidade, as quais nem sempre são obtidas em conjunto com a utilização de apenas um antígeno específico, Santos et al. (2020) identificaram antígenos imunodominantes de *L. infantum* candidatos ao diagnóstico de LVC e LV e produziram estes epítomos antigênicos de maneira combinada, em vetores bacterianos, sob a forma de proteínas recombinantes quiméricas, denominadas Q1 e Q5 (SANTOS et al., 2020). Estas proteínas foram testadas de maneira individual no diagnóstico da leishmaniose visceral canina e humana (OLIVEIRA et al., 2011; MAGALHÃES et al., 2017) e em suas apresentações quiméricas para o diagnóstico da enfermidade

em ambas as espécies (SANTOS et al., 2020), revelando maior potencial da proteína Q5 com sensibilidade de 82% para LV humana e 100% para LVC e, especificidade de 100% quando testadas em controles saudáveis de ambas as espécies. Todavia, uma única reação cruzada com amostra de soro humano acometido por leishmaniose tegumentar foi reportada durante o estudo.

Apesar de vantajoso por promover maior sensibilidade e especificidade no diagnóstico da leishmaniose visceral (SANTOS et al., 2019; JESUS et al., 2021), o ELISA fundamentado em proteínas recombinantes ainda requer a utilização de um laboratório equipado e profissionais treinados. Desta maneira, a utilização de testes rápidos e de aplicação a campo, facilitam o trabalho de vigilância da população canina e diagnóstico dos pacientes humanos em municípios menores ou mais afastados, os quais comumente necessitam encaminhar o paciente ou suas amostras a centros diagnósticos metropolitanos para confirmação dos casos de leishmaniose visceral. Este fato delonga a concretização do diagnóstico em ambas as espécies e o início do tratamento humano, bem como propicia a desistência de pacientes assintomáticos em obter um diagnóstico; além de contribuir com a manutenção de cães sororreagentes como reservatório no ambiente por tempo mais prolongado (GONTIJO e MELO, 2004).

Com o intuito de facilitar ainda mais o diagnóstico desta protozoonose e minimizar as dificuldades técnicas associadas à coleta de amostras sorológicas para realização dos exames, promoveu-se a utilização de amostras obtidas por coletas não-invasivas, como *swab* de conjuntiva ocular, urina e saliva para o diagnóstico da leishmaniose humana e canina por métodos moleculares e imunológicos (LOMBARDO et al., 2012; MOHAPATRA et al., 2016).

Neste contexto, Ejazi et al. (2016) avaliaram o desempenho de um teste utilizando fitas reagentes (*dipstick*) impregnadas com antígeno de membrana da promastigota de *Leishmania donovani* para o diagnóstico da infecção por *L. donovani*, agente etiológico de leishmaniose visceral na Índia. O teste utilizou como amostra urina de pacientes humanos infectados, pacientes saudáveis de área endêmica e não endêmica e pacientes infectados por outros agentes, porém, com sintomatologia clínica semelhante. Os autores observaram 97,94% de sensibilidade e 100% de especificidade neste teste e concordância de 100% com o teste parasitológico em amostras de pele dos pacientes positivos (EJAZI et al., 2016).

Apesar da distinção entre os agentes etiológicos envolvidos na leishmaniose visceral na Índia e nas Américas, a eficácia de diagnósticos sorológicos envolvendo antígeno de *L. donovani* já havia sido demonstrada como promissora para o diagnóstico de LV no Novo Mundo, como relatado por Vallur et al. (2015), os quais obtiveram 88% de sensibilidade ao utilizar o teste sorológico ELISA Leishmania Antigen Detect® na avaliação de amostras de urina de pacientes brasileiros com LV.

Ejazi et al. (2019) então aprimoraram as fitas reagentes (*dipstick*) capazes de identificar antígenos de membrana de *L. donovani*, previamente utilizadas para diagnóstico de LV em amostras de urina, de forma a permitir sua aplicabilidade em amostras de sangue. O estudo avaliou o desempenho desta técnica em amostras de soros de indivíduos provenientes de seis países distintos (Índia, Nepal, Sri Lanka, Brasil, Etiópia e Espanha) com diagnóstico de LV confirmado por meio de exame parasitológico. Obteve-se sensibilidade de 97,10% e especificidade de 93,44% para o teste, com 100% de sensibilidade e especificidade para amostras brasileiras, não havendo reação cruzada com os soros de pacientes humanos acometidos por leishmaniose cutânea.

Dando continuidade às pesquisas, em um estudo piloto, os pesquisadores indianos deste grupo, averiguaram a viabilidade das fitas reagentes (*dipstick*) de Ejazi et al (2019) para o diagnóstico de LVC, utilizando amostras de soro de cães infectados por *L. infantum* (dados não publicados) e obtiveram resultados promissores.

1.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, G.M.; MEDEIROS, W.M. Distribuição regional e habitats das espécies de flebotomíneos do Brasil. In: RANGEL, E.; LAINSON R. **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Fiocruz, cap.3, p.207-255, 2003.

ALVAR, J.; CAÑAVATE, C.; MOLINA, R.; MORENO, J.; NIETO, J. Canine leishmaniasis. **Advances in Parasitology**, v.57, p.1-88, 2004.

ALVES, A.S.; MOUTA-CONFORT, E.; FIGUEIREDO, F.B.; OLIVEIRA, R.V.C.; SCHUBACH, A.O.; MADEIRA, M.F. Evaluation of serological cross-reactivity between canine visceral leishmaniasis and natural infection by *Trypanosoma caninum*. **Research in Veterinary Science**, v.93, p.1329-1333, 2012.

BANETH, G.; KOUTINAS, A.F.; SOLANO-GALLEG0, L.; BOURDEAU, P.; FERRER, L. Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. **Trends in Parasitology**, v.24(7), p.324-330, 2008.

BARBOSA, E.B.; VIDOTTO, A.; POLACHINNI, G.M.; HENRIQUE, T.; MARQUI, A.B.T.; TAJARA, E.H. Proteômica: Metodologias e aplicações no estudo de doenças humanas. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.58(3), p.355-375, 2012.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Esclarecimentos sobre substituição do protocolo diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC)**. Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis/Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública). Brasília: Ministério da Saúde, 2011. 3p. Nota Técnica Conjunta nº 01/2011-CGDT-CGLAB/DEVIT/SVS/MS.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília, DF: Ministério da Saúde. 2014. 120p.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Leishmaniose Visceral**. 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/leishmaniose-visceral/situacao-epidemiologica-da-leishmaniose-visceral>. Acesso em: 20 junho de 2022.

BURZA, S.; CROFT, S.L.; BOELAERT M. Leishmaniasis. **The Lancet**. p. 951–970, 2018. doi:10.1016/S0140-6736(18)31204-2

CARVALHO, I.P.S.F.; PEIXOTO, H.M.; ROMERO, G.A.S.; OLIVEIRA, M.R.F. Cost of visceral leishmaniasis care in Brazil. **Tropical Medicine and International Health**, v.22 (12), p.1579-1589, 2017.

COURA-VITAL, W., KER, H.G.; ROATT, B.M.; AGUIAR-SOARES, R.D.O.; LEAL, G.G.A.; MOREIRA, N.D.; et al. Evaluation of changes in canine diagnosis protocol adopted by the Visceral Leishmaniasis Control Program in Brazil and a new protocol for diagnosis. **Plos One**, v.9 (3); e91009, 2014.

DANTAS-TORRES, F.; MIRÓ, G.; BOWMAN, D.D.; GARDONI, L.; OTRANTO, D. Culling dogs for zoonotic visceral Leishmaniasis Control: The wind of change. **Trends in Parasitology**, v. 35 (2); p. 97-101, 2019.

DEANE, L.M.; DEANE, M.P. Observações preliminares sobre a importância comparativa do homem, do cão e da raposa (*Lycalopex vetulus*) como reservatório da *Leishmania donovani* em área endêmica do calazar, no Ceará. **O Hospital**, v.48, p. 61-76, 1955.

EJAZI, S.A.; BHATTACHARYA, P.; BAKHTEYAR, M.A.K.; MUMTAZ, A.A.; PANDEY, K.; DAS, V.N.R.; DAS, P.; RAHAMAN; GOSWAMI, R.P.; ALI, N. Noninvasive diagnosis of visceral leishmaniasis: development and evaluation of two

urine-based immunoassays for detection of *Leishmania donovani* infection in India. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v.10 (10), e0005035, 2016.

EJAZI, S.A.; GHOSH, S.; SAHA, S.; CHOUDHURY, S.T.; BHATTACHARYYA, A.; CHATTERJE M. (2019) A multicentric evaluation of dipstick test for serodiagnosis of visceral leishmaniasis in India, Nepal, Sri Lanka, Brazil, Ethiopia, and Spain. **Scientific Reports**, v.11, p.1-7, 2019. doi: 10.1038/s41598-019-46283-9.

FERREIRA, E.C.; LANA, M.; CARNEIRO, M.; REIS, A.B.; PAES, D.V.; SILVA, E.S.; et al. Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. **Veterinary Parasitology**, v.146, p.235-241, 2007.

FONSECA, A.M.; FARIA, A.R.; RODRIGUES, F.T.G.; NAGEM, R.A.P.; MAGALHÃES, R.D.M.; CUNHA, J.L.R.; BARTHOLOMEU, D.C.; ANDRADE, H.M. Evaluation of three recombinant *Leishmania infantum* antigens in human and canine visceral leishmaniasis diagnosis. **Acta Tropica**, v.137, p.25-30, 2014.

GOMES, Y.M., CAVALCANTI, M.P., LIRA, R.A., ABATH, F.G.C., ALVES, L.C. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Biotechnological advances. **The Veterinary Journal**, v.175, p.45-52, 2008.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose Visceral no Brasil: Quadro Atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v.7(3), p.338-349, 2004.

GRIMALDI, J.R.; TESH, R.B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. **Clinical Microbiology Review**, v.36(3), p.230-250, 1993.

GRIMALDI G.; TEVA, A.; FERREIRA, A.L.; SANTOS, C.B.; PINTO, I.S.; AZEVEDO, C.T.; FALQUETO, A. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.106(1), p.54-59, 2012.

JESUS M.S.; CRUZ, J.V.A.; COELHO, L.B.; BORJA, L.S.; SILVA, E.D.; SOLCÁ, M.S. et al. Early detection and persistent positivity of anti-*Leishmania* antibodies using a recombinant protein-based ELISA in naturally infected dogs in Brazil. **Parasites & Vectors**. v.14: 398, p.1-9, 2021. doi: 10.1186/s13071-021-04895-z

LAURENTI, M.D.; JUNIOR, M.V.S.L.; TOMOKANE, T.Y.; DE LUCCA, H.L.R.; ASCHAR, M.; SOUZA, C.S.F.; et al. Comparative evaluation of the DPP® CVL rapid test for canine serodiagnosis in area of visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v.205, p.444-450, 2014.

LIMA, I.D.; LIMA, A.L.M.; MENDES-AGUIAR, C.D.O.; QUEIROZ, W.; COUTINHO, V.; WILSON, M.E.; et al. Changing demographics of visceral leishmaniasis in

northeast Brazil: Lessons for the future. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v.12(3), p. e0006164, 2018. doi: 10.1371/journal.pntd.0006164

LOMBARDO, G.; PENNISI, M.G.; LUPO, T.; MIGLIAZZO, A.; CAPRI, A.; SOLANO-GALLEO, L. 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, p.10-17, 2012.

MAGALHÃES-JUNIOR, J.T.; MOTA, T.F.; PORFIRIO-PASSOS, G.; LARANJEIRA, D.F.; FRANKE, C.R.; BARROUIN-MELO, S.M. Xenodiagnosis on dogs with visceral leishmaniasis: canine and sand fly aspects related to the parasite transmission. **Veterinary Parasitology**, v.223, p.120-126, 2016.

MAGALHÃES, F.B.; NETO, A.L.C.; NASCIMENTO, M.B.; SANTOS, W.J.T.; MEDEIROS, Z.M.; NETO, A.S.L.; et al. Evaluation of a new set of recombinant antigens for the serological diagnosis of human and canine visceral leishmaniasis. **PLOS One**, v.12(9), e0184867, 2017.

MAIA, C.; CAMPINO, L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. **Veterinary Parasitology**, v.158, p.274-287, 2008.

MAIA-ELKHOURY, A.N.S.; ALVES, W.A.; SOUSA-GOMES, M.L.; SENA, J.M.; LUNA, E.A. Leishmaniose visceral no Brasil: evolução e desafios. **Cadernos de Saúde Pública**, v.24(12), p. 2941-2947, 2008.

MARCELINO, A.P.; FILHO, J.A.S.; E BASTOS, C.V.; RIBEIRO, S.R.; MEDEIROS, F.A.C.; REIS, I.A.; et al. Comparative PCR-based diagnosis for the detection of *Leishmania infantum* in naturally infected dogs. **Acta Tropica**. v. 105495, 2020. doi: 10.1016/j.actatropica.2020.105495

MATEUS, N.L.F. **Diagnóstico de leishmaniose visceral canina: uso de proteínas antigênicas de *Leishmania infantum***. 98 f. [Dissertação]. Mestrado em Ciências Veterinárias – Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Mato Grosso do Sul, 2018.

MATO GROSSO DO SUL. **Boletim epidemiológico Leishmaniose Visceral Humana**. Secretaria de Estado de Saúde. Coordenadoria Estadual de Vigilância Epidemiológica. Gerência Estadual de Zoonoses. 2022. 19p.

MELO NETO, O.P.; Santos, W.J.T.; CASTRO NETO, A.L.; MAGALHAES, F.B.; TAVARES, D.H.C.; REZENDE, A.M.; et al. Proteína quimérica, seu método para produção e uso, bem como molécula de ácido nucleico, cassete de expressão, vetor de expressão, célula hospedeira, composição para diagnóstico de leishmaniose, kit de diagnóstico de leishmaniose e método de diagnóstico de leishmaniose in vitro, 2019, Brasil. **Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020190036397, título: "Proteína quimérica, seu método para produção e uso, bem como molécula de ácido nucleico, cassete de expressão, vetor de expressão, célula hospedeira, composição para diagnóstico de leishmaniose, kit de diagnóstico**

de leishmaniose e método de diagnóstico de leishmaniose in vitro", Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional 87-91, 2016.

MOHAPATRA, S.; SAMANTARAY, J.; GHOSH, A. A comparative study of serum, urine and saliva using rk39 strip for the diagnosis of visceral leishmaniasis. **Journal of Arthropod-Borne Diseases**, v.10(1), p.87-91, 2016.

MOREIRA, M.A.B.; LUVIZOTTO, M.C.R.; GARCIA, J.F.; CORBETT, C.E.P.; LAURENTI, M.D. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. **Veterinary Parasitology**, v.145, p.245-252, 2007.

MORENO, J.; ALVAR, J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. **Trends in Parasitology**, v.18(9), p.399-405, 2002.

MURRAY, C.J.; BARBER, R.M.; FOREMAN, K.J.; ABBASOGLU OZGOREN, A.; ABD-ALLAH, F.; ABERA, S.F. et al. Global, regional, and national disability-adjusted life years (DALYs) for 306 diseases and injuries and healthy life expectancy (HALE) for 188 countries, 1990–2013: quantifying the epidemiological transition. **The Lancet**, v.386 (10009), p. 2145-2191, 2015.

OLIVEIRA, G.G.S.; MAGALHÃES, F.B.; TEIXEIRA, M.C.A.; PEREIRA, A.M.; PINHEIRO, C.G.M.; SANTOS, L.R.; et al. Characterization of novel *Leishmania infantum* recombinant proteins encoded by genes from five families with distinct capacities for serodiagnosis of canine and human visceral leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.85(6), p.1025-1035, 2011.

PASSOS, S.; CARVALHO, L.P.; ORGE, G.; JERÔNIMO, S.M.; BEZERRA, G.; SOTO, M.; et al. Recombinant *Leishmania* antigens for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.12(10), p.1164-1167, 2005.

PALATNIK-DE-SOUSA, C.B.; DAY, M.J. One Health: the global challenge of epidemic and endemic leishmaniasis. **Parasites and Vectors**. v.,4, p. 197, 2011. doi:10.1186/1756-3305-4-197

PEREIRA, I.E.; SILVA, K.P.; MENEGATI, L.M.; PINHEIRO, A.C.; ASSUNÇÃO, E.A.O.; ARAÚJO, M.L.P. et al. Performance of recombinant proteins in diagnosis and differentiation of canine visceral leishmaniasis infected and vaccinated dogs. **European Journal of Microbiology & Immunology**. v.10(3), p.165-171, 2020. doi: 10.1556/1886.2020.00018.

PINELLI, E.; KILLICK-KENDRICK, R.; WAGENAAR, J.; BERNARDINA, W.; DEL REAL, G.; RUITENBERG, J. Cellular and immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infection and Immunity**, v.62(1), p.229-235, 1994.

QUEIROZ, N.M.G.P.; ASSIS, J.; OLIVEIRA, T.M.F.S.; MACHADO, R.Z.; NUNES, C.M.; STARKE-BUZETTI, W.A. Diagnóstico da leishmaniose visceral canina pelas

técnicas de imunohistoquímica e PCR em tecidos cutâneos e associação com a RIFI e ELISA-teste. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19 (1), p. 32-38, 2010.

QUINNELL, R.J.; COURTENAY, O.; DAVIDSON, S.; GARCEZ, L.; LAMBSON, B.; RAMOS, P.; et al. Detection of *Leishmania infantum* by PCR, sorology and cellular immune response in a cohort study of Brazilian dogs. **Parasitology**, v.122, p.253-261, 2001.

QUINNELL, R.J.; CARSON, C.; REITHINGER, R.; GARCEZ, L. M.; COURTNEY O. Evaluation of rK39 rapid diagnostic tests for canine visceral leishmaniasis: longitudinal study and meta-analysis. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v.7(1), e1992, 2013.

RAMIREZ, L.; DE MOURA, L.D.; MATEUS, N.L.F.; DE MORAES, M.H.; DO NASCIMENTO, L.F.M.; DE JESUS MELO, N.; et al. Improving the serodiagnosis of canine *Leishmania infantum* infection in geographical areas of Brazil with different disease prevalence. **Parasite Epidemiology and Control**. v. 8:e00126, 2020. doi:10.1016/j.parepi.2019.e00126

RANGEL, E.F.; VILELA, M.L. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 24 (12), p. 2948-2952, 2008.

SANTOS, T.R.; CARREIRA, V.S.; FERRARI, H.F.; MOREIRA, M.A.B.; LUVIZOTTO, M.C.R. Comparison of PCR with stained slides of bone marrow and lymph nodes aspirates with suspected diagnosis for leishmaniasis. **Acta Tropica**, v.140, p.137-140, 2014.

SANTOS, A.R.R.D.; SERUFO, A.V.; FIGUEIREDO, M.M.; GODOI, L.C.; VITÓRIO, J.G.; MARCELINO, A.P.; et al. Evaluation of three recombinant proteins for the development of ELISA and immunochromatographic tests for visceral leishmaniasis serodiagnosis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. e180405, 2019. doi: 10.1590/0074-02760180405.

SANTOS, W.J.T.; TAVARES, D.H.C.; CASTRO NETO, A.L.; NASCIMENTO, M.B.; DHALIA, R.; ALBUQUERQUE, A.L.; et al. Gene design, optimization of protein expression and preliminary evaluation of a new chimeric protein for the serological diagnosis of both human and canine visceral leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.14, p.1-21, 2020. doi:10.1371/journal.pntd.0008488

SOLANO-GALLEGO, L.; KOUTINAS, A.; MIRO, G.; CARDOSO, L.; PENNISI, M. G.; FERRER, L.; et al. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v.165, p.1-18, 2009.

SOLANO-GALLEGO, L.; MIRÓ, G.; KOUTINAS, A.; CARDOSO, L.; PENNISI, M. G.; FERRER, L.; et al. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. **Parasites & Vectors**, v.4(86), 2011. doi: 10.1186/1756-3305-4-86

- SOLANO-GALLEGO, L.; CARDOSO, L.; PENNISI, M.G.; PETERSEN, C.;
 BOURDEAU, P.; OLIVA, G.; et al. Diagnostic challenges in the era of canine
Leishmania infantum vaccines. **Trends in Parasitology**. v.33, p. 706–717, 2017.
 doi: 10.1016/j.pt.2017.06.004.
- SOUZA, G.G.; SANTOS, E.; ANDRADE-FILHO, J.D. The first report of the main
 vector of visceral leishmaniasis in America, *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva)
 (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), in the state of Rio Grande do Sul, Brazil.
Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 104 (8), p.1181-1182, 2009.
- TEIXEIRA, M.C.A.; OLIVEIRA, G.G.S.; SILVANY, M.A.; ALCÂNTARA-NEVES,
 N.M.; SOARES, M.B.P.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R.; et al. A strategy for
 identifying serodiagnostically relevant antigens of *Leishmania* or other pathogens in
 genetic libraries. **Biologicals**. v.35, p.51-54, 2007.
- VALLUR, A.C.; TUTTERROW, Y.L.; MOHAMATH, R.; PATTABHI, S.; HAILU, A.;
 ABDOUN, A.O.; et al. Development and comparative evaluation of two antigen
 detection tests for Visceral Leishmaniasis. **BMC Infectious Diseases**, v.15 (384),
 2015. doi: 10.1186/s12879-015-1125-3

2 CAPÍTULO II – ARTIGO 1 ¹– RECOMBINANT ELISA FOR CANINE VISCERAL LEISHMANIASIS DIAGNOSIS IN DISTINCT DOGS' CLINICAL PROFILE

Nathália Lopes Fontoura Mateus¹, Wagner José Tenório dos Santos², Osvaldo P. de Melo Neto², Eliane Mattos Piranda³, Manoel Sebastião da Costa Lima Junior^{2*}, Carlos Alberto do Nascimento Ramos¹

¹Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, (UFMS), Brazil

² Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos) - Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

³Instituto Aggeu Magalhães (IAM) – Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Recife, Pernambuco, Brazil

⁴Instituto de Biociências (Inbio), Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Brazil

*manoel.lima@fiocruz.br

ABSTRACT

Background

Visceral leishmaniasis (VL) is a zoonotic disease caused by the protozoan *Leishmania infantum* in Brazil and the dog is considered its main urban reservoir. Identifying infected dogs is a difficult task since the disease has various clinical and hematological manifestations and may mimic other common diseases in veterinary routine. Nowadays there is no test capable to identify 100% of symptomatic and asymptomatic dogs with canine visceral leishmaniasis (CVL) without any cross-reaction with vaccinated animals or dogs with other hemoparasites, like *Ehrlichia canis*.

Methodology/principal findings

¹ Artigo redigido de acordo com as normas do periódico Plos Neglected Tropical Diseases.

The performance of two chimeric recombinant proteins (Q1 and Q5) were compared with the total antigen extract of *L. infantum* in enzyme linked immunoassay (ELISA) for CVL diagnosis in a population scenario composed of naturally infected *L. infantum* dogs symptomatic, oligosymptomatic and asymptomatic; non infected dogs vaccinated with Leihsmune® and Leish-Tec®, infected with *E. canis* and healthy. Q1 (81.43%; 85.71%) and Q5 (74.29%; 90.0%) presented better sensitivity and specificity values, respectively, than total extract (71.43%;82.86%). Although Q1 had 100% of cross-reactivity with Leish-Tec® vaccinated dogs, it has shown greater sensitivity for asymptomatic (70%) and oligosymptomatic (73.33%) animals. Q5 could be a useful antigen in situations where ehrlichiosis may be a differential diagnosis, since its specificity value among this group was 93.33%.

Conclusion

Superior sensitivity and specificity of Q1 and Q5 as antigens for ELISA diagnosis for CVL was demonstrated here, when compared to total extract of *L. infantum*. Q5 has been previously demonstrated in other study as a promising antigen in the diagnosis of human VL, making it a potential antigen for serodiagnosis in both species.

INTRODUCTION

Visceral leishmaniasis (VL) is a zoonotic disease caused by the etiologic agent *Leishmania infantum* in Brazil (Burza, Croft and Boelart., 2018). Among with nine other countries, Brazil is responsible for more than 90% of VL new cases in the world. Additionally, Brazilian cases represent 97% of the American records and the disease remains a matter of public health concern due to its life-threatening potential and wide distribution in the country (Nunes et al., 2020; PAHO, 2019; WHO, 2022).

Originally characterized for its rural distribution, VL has nowadays spread out through large urban centers, and the dog (*Canis lupus familiaris*) is considered the protozoan most important urban reservoir (Lima et al., 2018). Therefore, some of the measures involving VL control refers to canine visceral leishmaniasis (CVL) diagnosis and euthanasia of infected animals (Brazilian Ministry of Health, 2014).

Identifying infected dogs may be tricky, since the disease is notable for its various clinical presentations. Dogs may show no clinical abnormalities or present multiple manifestations, including dermatologic, ophthalmic, and systemic signs (Solano-Gallego et al., 2009). Besides that, CVL clinical manifestations can resemble other common hemoparasitosis present in veterinary routine, like ehrlichiosis (Oliveira et al., 2008).

In this scenario CVL diagnosis depends on specific diagnostic tests, based on serological and/or parasitological methodologies (Solano-Gallego et al., 2009). Brazilian Ministry of Health set the combination of two serological tests for CVL diagnosis: the immunochromatographic rapid test (TR-DPP®; Bio-Manguinhos/Fiocruz/ Brazil) as screening method, followed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for TR-DPP®-positive dogs, as confirmatory method (Brazilian Ministry of Health, 2011).

However, it is known that serological tests can present different performance according to disease's prevalence (Mendonça et al. 2017), clinical manifestations and individual immune response (Baneth et al., 2008; Solano-Gallego et al., 2011). Moreover, cross-reactivity with other agents, such as *Trypanosoma* sp. and *Ehrlichia canis*, (Ferreira et al., 2007; Alves et al., 2012) and with vaccinated dogs has also been reported for *L. infantum* antigen ELISA (Carson et al., 2009).

The diagnosis of canine visceral leishmaniasis continues to be a complex task, since there is not a current method able to detect 100% of infected animals, which may imply in remaining reservoirs in the population or even in euthanasia of false positive dogs (Alvar et al., 2012).

In purpose to improve serological tests, recombinant proteins have been tested alone and combined in chimeric proteins to provide more accurate diagnosis for visceral leishmaniasis (Oliveira et al., 2011; Magalhães et al., 2017; Ramirez et al., 2020; Santos et al., 2020). In this work, the serodiagnostic capability of two chimeric recombinant proteins (Q1 and Q5) (Santos et al., 2020) were evaluated for enzyme-linked immunosorbent assay in different canine clinical profiles and compared with crude antigen ELISA.

METHODS

Study population

Dogs' sera samples were obtained from a previous study developed by the research team of Human Parasitology Laboratory at Federal University of Mato Grosso do Sul (UFMS). Samples were collected from canines living at Campo Grande and Camapuã, Mato Grosso do Sul State, Brazil. These samples were obtained under the approval of the ethics committee (protocol n. 645/2014 and 697/2015) and laboratory work was performed at Fiocruz - Instituto Aggeu Magalhães – Recife, Brazil, during January 2019.

CVL-positive dogs from the sera bank were considered infected as results of a positive parasitological test (direct examination of lymph node aspirate) and a reagent result on TR-DPP®. These animals went through physical evaluation by a veterinarian in search of CVL clinical signs: weight loss; bristle condition; onychogryphosis; lymph node enlargement; snout lesions; snout depigmentation; muzzle lesions; muzzle depigmentation; ear lesion; exfoliative dermatitis; ocular discharge; alopecia; blepharitis and nasal bleeding (Figueiredo et al., 2018). Animals were then classified according to the number of clinical signs: asymptomatic when no clinical signs were observed (ASY; n=10); oligosymptomatic (OLI; n=30) when one to three clinical abnormalities were seen and symptomatic (SYM; n=30) if more than three clinical manifestations were present (Mancianti et al., 1988).

Samples that formed the negative group (NEG; n=30) were obtained from dogs negative in parasitological examination for *Leishmania* sp. amastigotes (direct examination of lymph node aspirate); negative in CVL serological test (TR-DPP®; Bio-Manguinhos/ Fiocruz/ Brazil) and also negative in polymerase chain reaction (PCR) in search for hemoparasites: *Ehrlichia canis* (Dawson et al., 1994; 1996), *Babesia canis* (Carret et al., 1999) and *Anaplasma platys* (Inokuma et al., 2002). CVL-negative animals, negative for *Babesia* spp and *Anaplasma platys*, but infected with *Ehrlichia canis*, were used to compose *Ehrlichia canis*-infected group (EHR; n=30).

Sera samples from vaccinated animals were also recruited for this study. CVL-negative dogs (negative direct examination of lymph node aspirate and

negative TR-DPP®) that were vaccinated with Leish-Tec® (Ceva Saúde Animal Ltda, Paulínea, São Paulo, Brazil) at least three months before sampling, formed the VLT group (n=5); while dogs vaccinated with Leishmune® (Pfizer/Zoetis, Campinas, São Paulo, Brazil) participated in VLM group (n=5). Both groups were also screened for hemoparasites through PCR for *Ehrlichia canis*, *Babesia canis* and *Anaplasma platys* (Dawson et al., 1994; 1996; Carret et al., 1999; Inokuma et al., 2002) and only negative samples remained in the vaccinated groups.

ELISA

Before performing ELISA, the positive samples from sera bank that were stored at -80°C freezer, were retested with TR-DPP® to ensure their viability. To perform antigen *L. infantum* ELISA, the total extract antigen was obtained from *Leishmania infantum* culture (Magalhães et al., 2017). Recombinant chimeric protein (Q1 and Q5) production and purification was carried out according to the protocol described by Santos et al., (2020), and the determination of protein concentration was performed using the method of Bradford (1976). The chimeric proteins were diluted to 600ng/ml in 50 mM Na₂HCO₃/NaHCO₃ buffer (pH 9.6), with 100 µl added to each well of 96-well microtiter plates. This was followed by incubation at 4 °C for 16 hours and blocking with Phosphate-Buffered Saline plus 0.05% Tween-20 (PBS-T), pH 7.2, supplemented with 10% dry non-fat milk. Wells were incubated with the selected sera at dilutions of 1:900 for 1 hour at room temperature. After washing with PBS-T, the wells were incubated for 1 hour at room temperature with peroxidase- conjugated goat anti-dog IgG (diluted 1:1.200, from Jackson Immuno Research Laboratories, catalogue no. 304-005-003). The enzymatic activity was revealed with orto-phenylenediamine (OPD, from Sigma-Aldrich) in phosphate-citrate buffer, pH 5.0, and the plates were read with the 490nm filter on a Benchmark Plus Microplate Manager 5.2 (BIO-RAD). The cut off values for the ELISAs were defined based on the mean plus two standard deviations of the results generated with control sera from the NEG group (n=30) and were also calculated using R software package *pROC* (v.1.16.2.).

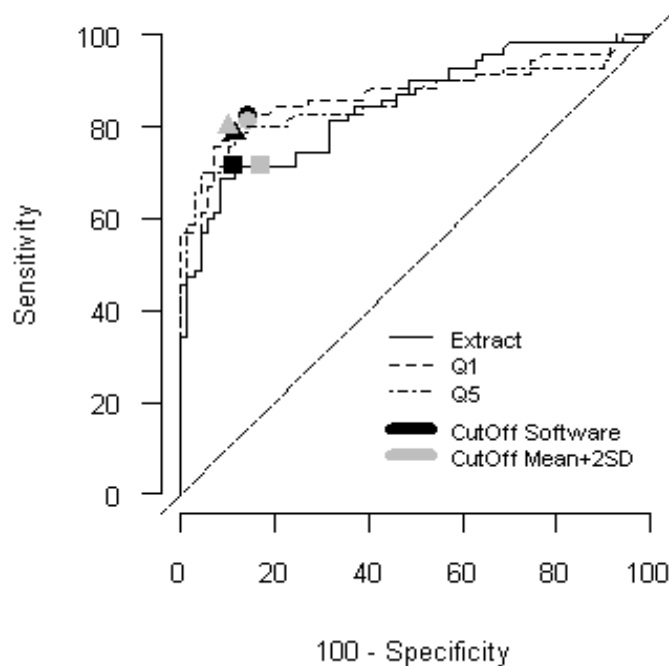
Statistical analysis

Statistical analysis was performed with R software package *pROC* (v.1.16.2.). ANOVA test was used to compare groups, followed by Kruskal Wallis test for multiple comparison of averages acquired from sera optical densities (OD) of each group with Mann-Whitney post-test, considering significance level of $p < 0,05$ and confidence interval (CI) of 95%. Graphs, ROC curves were generated by the same software. Sensitivity, specificity, positive likelihood ratio, negative likelihood ratio, negative predictive value, positive predictive value, and accuracy values were generated with Medcalc Software version 15.8.

RESULTS

Chimeric proteins and the total antigen extract had similar areas under the curve and the cut off values stablished by the mean plus two standard deviations of the NEG group agreed with the one generated by R software for Q1 and Q5 (Fig 1).

However, overall clinical profile groups (population), Q1 and Q5 had better sensitivity and specificity for canine visceral leishmaniasis diagnosis when compared to total antigen extract (Table 1).



828 **Fig 1.** ROC curve displaying the performance of the chimeric proteins Q1 and Q5 and the total
829 antigen extract of *Leishmania infantum* with canine sera of naturally infected animals (symptomatic,
830 oligosymptomatic and asymptomatic, n= 70) with *L. infantum* and negative animals (vaccinated,
831 infected with *Ehrlichia canis* and healthy, n= 70).

832

833 **Table 1.** Sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value and area under the curve of chimeric proteins Q1 and Q5 and total crude
 834 antigen extract of *Leishmania infantum* tested with sera from dogs naturally infected by *Leishmania* sp. asymptomatic (n=10), oligosymptomatic (n=30) and
 835 symptomatic (n=30); sera from canine visceral leishmaniasis (CVL)-negative animals infected with *Ehrlichia canis* (n=30) and hemoparasites (*L. infantum*,
 836 *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Babesia canis*)-negative dogs vaccinated with Leish-Tec® (n=5) and Leishmune® vaccines (n=5).

837

	Q1					Q5					<i>L. infantum</i> extract				
Group	Sb (%)	Sp (%)	PPV	NPV	AUC	Sb (%)	Sp (%)	PPV	NPV	AUC	Sb (%)	Sp (%)	PPV	NPV	AUC
SYM	93.33	----	----	----	----	90.00	----	----	----	----	86.67	----	----	----	----
OLI	73.33	----	----	----	----	66.67	----	----	----	----	63.33	----	----	----	----
ASY	70.00	----	----	----	----	50.00	----	----	----	----	50.00	----	----	----	----
EHR	----	90.00	----	----	----	----	93.33	----	----	----	----	76.67	----	----	----
VLT	----	0,00	----	----	----	----	40.00	----	----	----	----	100,0	----	----	----
VLM	----	100.00	----	----	----	----	80.00	----	----	----	----	40.0	----	----	----
NEG	----	93.33	----	----	----	----	96.67	----	----	----	----	93.33	----	----	----
POP	81.43	85.71	85.07	82.19	0.874	74.29	90.0	88.14	77.78	0.859	71.43	82.86	80.65	74.36	0.847

838

839 Sb: sensitivity; Sp: specificity; PPV: positive predictive value; NPV: negative predictive value; SYM: symptomatic; ASY: asymptomatic; OLI: oligosymptomatic;
 840 EHR: *Ehrlichia canis*; VLT: Leish-Tec®; VLM: Leishmune®; NEG: negative; POP: population. --- not calculated.

Although Q1 had better sensitivity for CVL diagnosis, it recognized negative-CVL animals vaccinated with Leish-Tec® as reagent for CVL (Figure 2), since it could not distinguish the VLT group from infected dogs. Therefore, the chimeric protein Q5 had greater specificity than Q1, but when analyzing individually by groups, the number of cross-reactions in EHR (2/30;3/30) and VLT (3/5;5/5) groups, are not so distant than Q1 results, respectively.

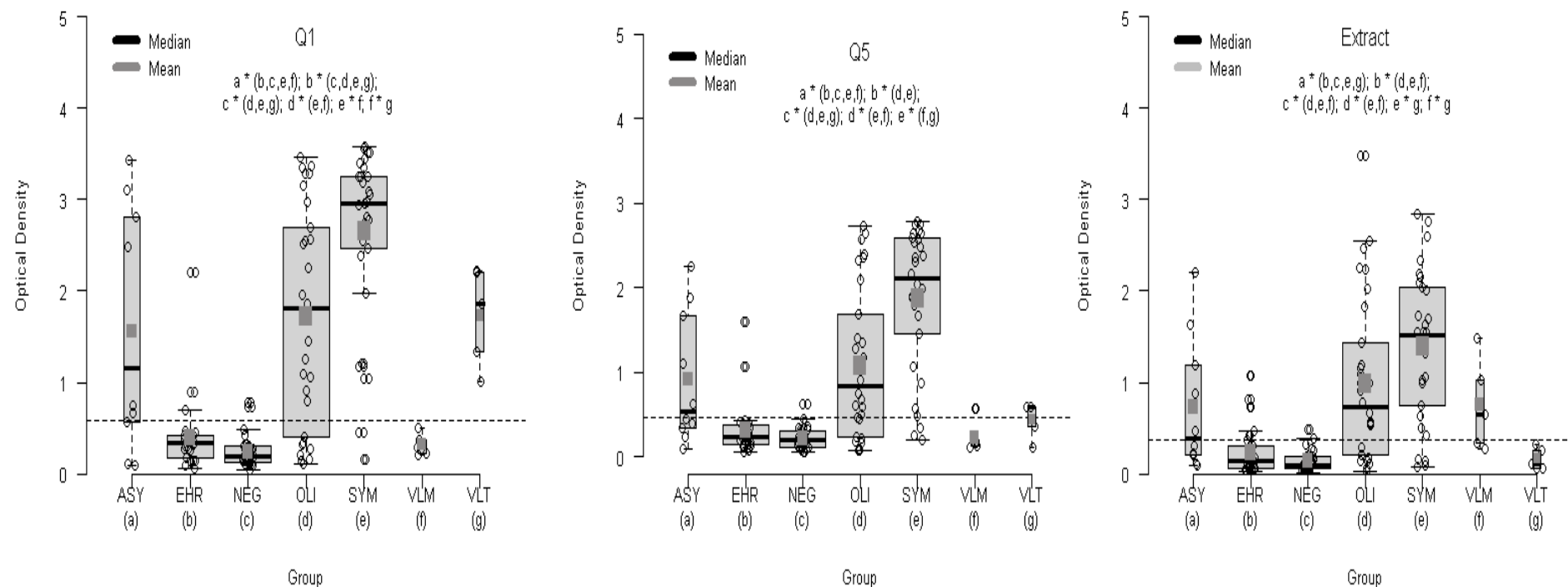
The chimeric recombinant protein Q5 displayed 50% of sensitivity, as the total extract for detection of asymptomatic animals. Nonetheless, the chimeric protein Q1 performed better in this group, with 70% of sensitivity.

DISCUSSION

Accurate canine visceral leishmaniasis diagnosis remains an obstacle to epidemiologic control measures regarding the elimination of the parasite reservoir, the dog. False positive and false negative results make room for discussions involving cross-reactions with other pathogens and vaccinated animals, as well as the maintenance of infected animals in the population.

The gold standard method to diagnose a patient with VL is parasitological examination due to its high specificity. However, microscopic analyses are time consuming procedures that depend upon personnel training (Pereira et al., 2020). Therefore, serodiagnostic tools won their place in epidemiological mass screenings because they are easy to perform, low-cost to implement, provide fast results and require non-invasive samples when compared to molecular and parasitological techniques (Santos et al., 2020; Siqueira et al., 2021).

Nevertheless, serological tests also present limitations, for example, their sensibility and specificity may vary according to the antigen used (Maia and Campino, 2008; Solano-Gallego et al., 2014; Ramirez et al., 2020). The use of crude antigen, as previously demonstrated, can result in cross-reaction with related diseases, like trypanosomiasis (Ferreira et al., 2007; Alves et al., 2012). Other hemoparasites, not so similar phylogenetically, have also been reported as cause of cross-reactivity in serological exams for CVL diagnosis, like *Ehrlichia canis* (Ferreira et al., 2007; Laurenti et al., 2014).



871 **Fig 2.** Anti-Leishmania IgG antibody level in dogs naturally infected with *Leishmania* sp. symptomatic (SYM; n=30); oligosymptomatic (OLI; n=30) and
872 asymptomatic (ASY; n=10); dogs negative for canine visceral leishmaniasis (CVL) and hemoparasites (*Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Babesia canis*) (NEG;
873 n=30); CVL-negative dogs infected only with *Ehrlichia canis* (EHR; n=30), and hemoparasites (*L. infantum*, *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Babesia canis*)-
874 negative dogs vaccinated with Leish-Tec® (VLT; n=5) and Leishmune® (VLM; n=5) vaccines tested with different antigens: *L. infantum* crude antigen (*L. infantum*
875 extract), chimeric protein Q1 and chimeric protein Q5. Horizontal dashed line represents cut off value. The letter outside the parentheses indicates a significant
876 difference in relation to the others (letters inside the parentheses).

Differentiation among ehrlichiosis and visceral leishmaniasis is a difficult task present in routine veterinary service at endemic areas. The seroprevalence of dogs infected with *E. canis* varies from 19.8-66.4% (Taques et al., 2020), with superior rates observed in warmer regions of the country. In the central-western Brazil, for example, elevated percentage (55,75%) of *Rhipicephalus sanguineus* have been identified as infected with this pathogen (Soares et al., 2017).

E. canis and *L. infantum* promote intense humoral response of the host, leading to similar immunomediated lesions, such as lymph adenomegaly, anemia, thrombocytopenia, ophthalmologic and renal injuries (Harrus and Waner, 2011; Solano-Gallego et al., 2011). Besides sharing clinical and laboratorial abnormalities, both hemoparasites share highly antigenic epitopes not only with the total extract of *Leishmania* spp., but also with recombinant proteins (Fonseca et al., 2019; Ramirez et al., 2020).

The hipergamaglobulinemia observed in ehrlichiosis promotes high antibody titers, which leads to serum samples with greater median value of relative reactivity that can be mistakenly interpreted as a positive result in serological assays for VL diagnosis. Ramirez et al. (2020) reported this fact when comparing sera samples from dogs infected with *E. canis* and healthy dogs, using total extract of *L. infantum* and three recombinant proteins (heat shock proteins 70 and 83 and LiP2b) as antigen in ELISA tests.

On the other hand, the authors reported no cross-reactivity with samples from dogs infected with *E. canis* in ELISA tests using recombinant proteins obtained from the surface located KMP-11 antigen and the acid ribosomal proteins P0 and P2a. However, to obtain specificity values over 90% in the serological exam, a significant decrease in sensitivity was seen (14.81% - 38.41%), with the lowest values obtained when asymptomatic animals were included (Ramirez et al., 2020).

The recognition of asymptomatic dogs in the population remains one of the main obstacles to VL control. *Leishmania* spp. can induce a heterogeneity of immune responses in the host, being the Th1 profile the most difficult to search for in the population. These dogs have predominant cellular immunity with low parasite load, therefore, low antibody titers and minimal or none clinical manifestation (Solano-Gallego et al., 2011). It is important to point out that in the present study, asymptomatic animals were represented by animals with zero clinical signs, while

the oligosymptomatic group consisted of dogs presenting few clinical signs (1-3 manifestations). Q5 and *L. infantum* extract presented sensitivity of 50% for asymptomatic animals and around 60% for oligosymptomatics; which was surpassed by Q1 with 70% and 73.33% of sensitivity for ASY and OLI groups, respectively.

It has been shown that molecular methods present higher sensitivity for CVL diagnosis in subclinical patients (Carvalho et al., 2018) and it could also be a useful tool for differential diagnosis between other hemoparasitosis and CVL (Nakaghi et al., 2008). Thus, instead of serological tests, molecular analyses, such as PCR, could be employed in the diagnosis of animals with Th1 profile, with low antibody production or in situations in need to exclude other etiologic agents. Nonetheless, the development of affordable and easy-to-implement molecular techniques are necessary for its routine use.

In the present study, cross-reactions with *E. canis* in the ELISAs with chimeric proteins and total extract were observed. However, the absorbances values obtained for samples from EHR group were not significantly higher than those obtained for NEG group when using Q5 or total extract as antigen; fact proven by the absence of significant difference between both groups. Furthermore, specificity values over 85% percent were observed with Q1 and Q5, with the maintenance of sensitivity values over 74%, even with the inclusion of asymptomatic and oligosymptomatic animals. A higher number of false positive results was seen in ELISA with total extract, when compared to chimeric proteins.

A seroreactive ELISA result is considered by the Ministry of Health confirmation of VL and could lead to euthanasia of the dog (Brazilian Ministry of Health, 2014). Therefore, avoiding cross-reactivity with ehrlichiosis should be a matter of interest for an epidemiological tool to aid in reservoir control. Besides that, uncertainty in tests results put in hands of veterinary professionals ethical, emotional, and economic discussions involved in the euthanasia decision, such as the owner's financial responsibility to bear the costs involved with differential diagnosis exams and the possibility of euthanasia without counterevidence.

Further studies about the duration of antibodies anti-*E. canis* in dogs, as well as standardized recommendations regarding safe time after infection to retest the

animal for CVL should be provided by official authorities responsible for implementing VL control measures.

Vaccination against CVL is also an important subject regarding cross-reactivity. The production of Leishmune[®] vaccine was discontinued on November 2014, due to non-compliance with technical regulation proposed by Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply (MAPA). Nevertheless, animals vaccinated with Leishmune[®], which was composed of the fucose-mannose ligand (FML) of *L. donovani*, and a saponin adjuvant, were included in the research because new vaccines based on this antigen may be developed in the future and no cross-reactivity was observed with the chimeric protein Q1, unlike with the total extract.

Both chimeric proteins have recognized vaccinated animals with Leish-Tec[®]. These results restrain their application in the development of diagnostic tests for CVL, since animals vaccinated with the A2 protein-based vaccine could be mistaken by seroreactive dogs for CVL. Although Q5 showed better specificity than Q1 for Leish-Tec[®] vaccinated dogs, a larger number of samples of healthy vaccinated dogs should be analyzed. Still, the difficulty to obtain a homogenous group of healthy dogs at an endemic region for *E. canis* and *L. infantum* should be pointed out.

Many studies involving the development of new recombinant proteins for the diagnosis of VL are available; however, few of them have been proved to be useful in the diagnosis of both human and canine VL. Herein we demonstrate Q5's ability to diagnose dogs presenting different clinical manifestations and its minor potential for cross-reactions with infected canines with *E. canis*. Santos et al. (2020) also demonstrated low cross-reactivity (2%) of Q5 with sera from patients with tegumentary leishmaniasis and high sensitivity (82%) when tested with sera from human patients diagnosed through parasitological methods for VL. These results reinforce its potential to be used in serological tests for the diagnosis of visceral leishmaniasis in both species.

Further studies including a bigger number of Leish-Tec[®] vaccinated dogs' samples, as well as canine and human serum samples from different endemic and non-endemic areas of the country are necessary to validate Q5, since geographical discrepancies in antigen performance are also an important point to be considered when validating a test for national use (Kuhne et al., 2019; Ramirez et al., 2020).

CONCLUSION

In the present study, we demonstrate superior sensitivity and specificity of two chimeric proteins Q1 and Q5 used as antigen for ELISA serodiagnostic test when compared to total extract of *L. infantum*. It should be highlighted that Q5 had 90% of specificity when applied in a difficult scenario of diagnosis, including dogs infected with *E. canis* and vaccinated canines. In addition, Q5 has also been demonstrated as a promising antigen in the diagnosis of human visceral leishmaniasis.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank George Diniz for statistical analysis and graphic creation in this work; Professor Alessandra Gutierrez de Oliveira who coordinated the project that originated the serological bank used in this study

REFERENCES

Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. PLoS ONE. 2012;7. doi:10.1371/journal.pone.0035671

Alves AS, Mouta-Confort E, Figueiredo FB, Oliveira RVC, Schubach AO, Madeira MF. Evaluation of serological cross-reactivity between canine visceral on leishmaniasis and natural infection by Trypanosoma caninum. Research in Veterinary Science. 2012;93: 1329–1333. doi:10.1016/j.rvsc.2012.07.006

Baneth G, Koutinas AF, Solano-Gallego L, Bourdeau P, Ferrer L. Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. Trends in Parasitology. 2008;24(7): 324–330. doi:10.1016/j.pt.2008.04.001

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry. 1976;7(72): 248-54.

Brazilian Ministry of Health. Nota Técnica Conjunta nº 01/2011-CGDT-CGLAB/DEVIT/SVS/MS. Esclarecimentos sobre substituição do protocolo diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC). (Coordenação Geral de

Doenças Transmissíveis/Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública). Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2011.

Brazilian Ministry of Health. Health Surveillance Secretariat. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília, DF: Ministério da Saúde. 2014.

Burza S, Croft SL, Boelaert M. Leishmaniasis. The Lancet. Lancet Publishing Group. 2018; 951–970. doi:10.1016/S0140-6736(18)31204-2

Carret C, Walas F, Carcy B, Grande N, Précigout E, Moubri K et al. *Babesia canis canis*, *Babesia canis vogeli*, *Babesia canis rossi*: differentiation of the three subspecies by a restriction length polymorphism analysis on amplified small subunit ribosomal RNA genes. Journal of Eukaryotic Microbiology. 1999; 46(3):298-303.

Carson C, Antoniou M, Christodoulou V, Messaritakis I, Quinnell RJ, Blackwell JM, et al. Selection of appropriate serological tests to measure the incidence of natural *Leishmania infantum* infection during DNA/MVA prime/boost canine vaccine trials. Veterinary Parasitology. 2009;162: 207–213. doi:10.1016/j.vetpar.2009.03.037

Carvalho FLN, Riboldi EO, Bello GL, Ramos RR, Barcellos RB, Gehlen M, et al. Canine visceral leishmaniasis diagnosis: a comparative performance of serological and molecular tests in symptomatic and asymptomatic dogs. Epidemiology and Infection. 2018;146:571-576. doi: 10.1017/S0950268818000225

Dawson JE, Stallknecht DE, Howerth EW, Warner C, Biggie K, Davidson WR et al. Susceptibility of White-Tailed Deer (*Odocoileus virginianus*) to Infection with *Ehrlichia chaffeensis*, the Etiologic Agent of Human Ehrlichiosis. Journal of Clinical Microbiology. 1994; 32(11):2725-2728.

Dawson JE, Warner CK, Standaert S, Olson J G. The interface between research and the diagnosis of an emerging tick-borne disease, human ehrlichiosis due to *Ehrlichia chaffeensis*. Archive of Internal Medicine. 1996; 156(2):137-142.

1039

1040 Ferreira E de C, de Lana M, Carneiro M, Reis AB, Paes DV, Silva ES da, et
1041 al. Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral
1042 leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. *Veterinary*
1043 *Parasitology*. 2007;146: 235–241. doi:10.1016/j.vetpar.2007.02.015

1044

1045 Figueiredo FB, de Vasconcelos TCB, Madeira M de F, Menezes RC, Maia-
1046 Elkhoury ANS, Marcelino AP, et al. Validation of the dual-path platform
1047 chromatographic immunoassay (Dpp® cvl rapid test) for the serodiagnosis of
1048 canine visceral leishmaniasis. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*.
1049 2018;113(11):e180260. doi:10.1590/0074-02760180260

1050

1051 Fonseca THS, Faria AR, Leite HM, Silveira JAG, Carneiro CM, Andrade HM.
1052 Chemiluminescent ELISA with multi-epitope proteins to improve the diagnosis of
1053 canine visceral leishmaniasis. *The Veterinary Journal*. 2019; 253:105387.
1054 doi:10.1016/j.tvjl.2019.105387

1055

1056 Harrus S, Waner T. Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (*Ehrlichia*
1057 *canis*): An overview. *The Veterinary Journal*. 2011; 187:292–296.
1058 doi:10.1016/j.tvjl.2010.02.001

1059

1060 Inokuma HH, Fujii K, Matsumoto K, Okuda M, Nakagome K, Kosugi R et al.
1061 Demonstration of Anaplasma (Ehrlichia) platys inclusions in peripheral blood
1062 platelets of a dog in Japan. *Veterinary Parasitology*. 2002; 110(1-2):145-152.

1063

1064 Kuhne V, Rezaei Z, Pitzinger P, Buscher P. Systematic review on antigens for
1065 serodiagnosis of visceral leishmaniasis, with a focus on East Africa. *Plos Neglected*
1066 *Tropical Diseases*. 2019;13(8):e0007658. doi:10.1371/journal. pntd.0007658

1067

1068 Laurenti MD, de Santana Leandro M v., Tomokane TY, de Lucca HRL, Aschar M,
1069 Souza CSF, et al. Comparative evaluation of the DPP® CVL rapid test for canine
1070 serodiagnosis in area of visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*. 2014; 205:
1071 444–450. doi:10.1016/j.vetpar.2014.09.002

1072 Lima ID, Lima ALM, Mendes-aguiar CDO, Queiroz W, Coutinho V, Wilson ME, et
 1073 al. Changing demographics of visceral leishmaniasis in northeast Brazil: Lessons
 1074 for the future. *Plos Neglected Tropical Diseases*. 2018;12(3): e0006164.
 1075 doi:10.1371/journal.pntd.0006164

1076 Magalhães FB, Castro Neto AL, Nascimento MB, Santos WJT, Medeiros ZM, Lima
 1077 Neto AS, et al. Evaluation of a new set of recombinant antigens for the serological
 1078 diagnosis of human and canine visceral leishmaniasis. *PLoS ONE*.
 1079 2017;12(9):e0184867. doi:10.1371/journal.pone.0184867

1080

1081 Maia C, Campino L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune
 1082 response to infection. *Veterinary Parasitology*. 2008;158(4):274-287. doi:
 1083 10.1016/j.vetpar.2008.07.028

1084

1085 Mancianti F, Gramiccia M, Gradoni L, Pieri S. Studies on canine leishmaniasis
 1086 control. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis
 1087 following antimonial treatment. *Transactions of the Royal Society of Tropical*
 1088 *Medicine and Hygiene*. 1988; 82: 566-567.

1089

1090 Mendonça IL, Batista JF, Schallig H, e Cruz M do SP, Alonso DP, Ribolla PEM, et
 1091 al. The performance of serological tests for *Leishmania infantum* infection screening
 1092 in dogs depends on the prevalence of the disease. *Revista do Instituto de Medicina*
 1093 *Tropical de São Paulo*. 2017;59. doi:10.1590/s1678-9946201759039

1094 Nakaghi ACH, Machado RZ, Costa MT, André MC, Baldani CD. Canine ehrlichiosis:
 1095 clinical hematological, serological and molecular aspects. *Ciência Rural*. 2008; 38
 1096 (3): 766-770. doi: 10.1590/S0103-84782008000300027.

1097 Nunes BEBR, Leal TC, Paiva JPS, Silva LF, Carmo RF, Machado MF, et al. Social
 1098 determinants of mortality due to visceral leishmaniasis in Brazil (2001-2015): an
 1099 ecological study. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2020;
 1100 53:e20190262. doi: 10.1590/0037-8682-0262-2019

1101

Oliveira TMF, Furuta PI, Carvalho D, Machado RZ. A study of cross-reactivity in serum samples from dogs positive for *Leishmania* sp., *Babesia canis* and *Ehrlichia canis* in enzyme-linked immunosorbent assay and indirect fluorescent antibody test. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária. 2008; 11:7–11. doi: 10.1590/S1984-29612008000100002

Oliveira GGS, Magalhães FB, Teixeira MCA, Pereira AM, Pinheiro CGM, Santos LR, et al. Characterization of novel *Leishmania infantum* recombinant proteins encoded by genes from five families with distinct capacities for serodiagnosis of canine and human visceral leishmaniasis. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 2011;85(6):1025–1034. doi:10.4269/ajtmh.2011;11-0102

PAHO. Manual of procedures for surveillance and control of leishmaniasis in the Americas. Washington, D. C.: Pan American Health Organization; 2019.

Pereira IE, Silva KP, Menegati M, Pinheiro AC, Elaine A, Lourdes MDE, et al. Performance of recombinant proteins in diagnosis and differentiation of canine visceral leishmaniasis infected and vaccinated dogs. European Journal of Microbiology and Immunology. 2020;10(3):165-171. doi: 10.1556/1886.2020.00018

Ramirez L, de Moura LD, Mateus NLF, de Moraes MH, do Nascimento LFM, de Jesus Melo N, et al. Improving the serodiagnosis of canine *Leishmania infantum* infection in geographical areas of Brazil with different disease prevalence. Parasite Epidemiology and Control. 2020;8:e00126. doi:10.1016/j.parepi.2019.e00126

Santos WJT, Tavares DHC, Castro Neto AL, Nascimento MB, Dhalia R, Albuquerque AL, et al. Gene design, optimization of protein expression and preliminary evaluation of a new chimeric protein for the serological diagnosis of both human and canine visceral leishmaniasis. PLoS Neglected Tropical Diseases. 2020;14: 1–21. doi:10.1371/journal.pntd.0008488

1133 Siqueira WM, Viana AG, Cunha JL, Rosa LM, Bueno LL, Bartholomeu DC, et al.
 1134 The increased presence of repetitive motifs in the KDDR-plus recombinant protein,
 1135 a kinesin-derived antigen from *Leishmania infantum*, improves the diagnostic
 1136 performance of serological tests for human and canine visceral leishmaniasis. Plos
 1137 Neglected Tropical Diseases. 2021;15(9): e0009759.
 1138 doi:10.1371/journal.pntd.0009759

1139 Soares R, Ramos CA, Pedroso T. Molecular survey of *Anaplasma platys* and
 1140 *Ehrlichia canis* in dogs from Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. Anais da
 1141 Academia Brasileira de Ciências. 2017. 89(1):301–306. doi:10.1590/0001-
 1142 3765201720150556

1143 Solano-Gallego L, Koutinas A, Miró G, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, et
 1144 al. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine
 1145 leishmaniosis. Veterinary Parasitology. 2009; 165(1-2): 1–18.
 1146 doi:10.1016/j.vetpar.2009.05.022
 1147

1148 Solano-Gallego L, Mirá G, Koutinas A, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, et
 1149 al. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis.
 1150 Parasites and Vectors. 2011.4:86. doi:10.1186/1756-3305-4-86

1151 Solano-Gallego L, Villanueva-saz S, Carbonell M, Trotta M, Furlanello T, Natale A.
 1152 Serological diagnosis of canine leishmaniosis: comparison of three commercial
 1153 ELISA tests (Leiscan®, ID Screen® and Leishmania 96®), a rapid test (Speed Leish
 1154 K®) and an in-house IFAT. Parasites and Vectors. 2014.7:111. doi:10.1186/1756-
 1155 3305-7-111

1156 Taques IIGG, Campos ANS, Kawasaki ML, Almeida SLH, Aguiar DM. Geographic
 1157 Distribution of *Ehrlichia canis* TRP Genotypes in Brazil. Veterinary Sciences.
 1158 2020.(7):165. doi:10.3390/vetsci7040165

1159 WHO. Leishmaniasis. Key facts. 8 January 2022. In: WHO [Internet]. World Health
 1160 Organization; 2022 <https://www.scielosp.org/article/ress/2022.v31n1/e2021339/en/>

3 CAPÍTULO III – ARTIGO 2 ²– AVALIAÇÃO DE TESTE SOROLÓGICO RÁPIDO NO DIAGNÓSTICO DE CÃES COM DIFERENTES PERFIS CLÍNICOS NATURALMENTE INFECTADOS POR *LEISHMANIA INFANTUM*

Nathália Lopes Fontoura Mateus¹, Herintha Coeto Neitzke-Abreu², Manoel Sebastião da Costa Lima-Junior³, Nahid Ali^{4*}, Sarfaraz Ahmad Ejazi⁴, Carlos Alberto do Nascimento Ramos¹

¹ Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

² Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil.

³ Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, Pernambuco, Brasil.

⁴ CSIR- Instituto Indiano de Biologia Química, Kolkata, Índia.

***Correspondence:** Nahid Ali, nali@iicb.res.in

Keywords: Dipstick, *Ehrlichia canis*, leishmaniose visceral canina, Leish-Tec[®], teste imunocromatográfico.

RESUMO

A leishmaniose visceral é uma das principais doenças tropicais negligenciadas do mundo, tendo os cães domésticos como reservatório urbano do parasita *Leishmania infantum* nas Américas. O diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC) faz parte das medidas de controle desta zoonose, uma vez que os casos caninos usualmente precedem os casos humanos. Técnicas sorológicas são amplamente utilizadas para o diagnóstico da LVC, porém apresentam limitações quanto a sensibilidade e especificidade, de acordo com o antígeno utilizado e apresentação clínica do paciente. O presente estudo avaliou sensibilidade e especificidade de um teste rápido sorológico, na apresentação *dipstick*, no diagnóstico de cães naturalmente infectados por *L. infantum* sintomáticos (n=15), oligossintomáticos (n=15), assintomáticos (n=9), saudáveis (n=15), vacinados com Leish-Tec[®] (n=5) e infectados com *Ehrlichia canis* (n=15). O teste apresentou maior sensibilidade no grupo oligossintomáticos (93,33%), seguido dos assintomáticos (77,78%) e sintomáticos (73,33%) e apresentou 100% de especificidade. O teste rápido *dipstick* mostrou-se uma ferramenta útil no diagnóstico da LVC devido a praticidade de realização a campo, principalmente, nos casos em que a infecção por *E. canis* pode ser um diagnóstico diferencial do paciente.

INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é uma das principais doenças tropicais negligenciadas no mundo devido a sua alta mortalidade e distribuição em países subdesenvolvidos, como a

²Artigo redigido de acordo com as normas do periódico *Frontiers in Cellular and Infecton Microbiology*.

Índia e Brasil (Dhamnetyia et al., 2021). Na Índia descreve-se o ciclo antroponótico do protozoário flagelado *Leishmania donovani*, o qual tem como vetor flebotomíneos de hábito antropofílico, sendo o ser humano caracterizado neste ciclo por altas cargas parasitárias no sangue e na pele (Adler and Theodor, 1932; Palatnik-de-Souza et al., 2001).

Já no Brasil, país responsável por 90% dos casos de LV na América Latina (Alvar et al., 2012), destaca-se o ciclo zoonótico associado a espécie *L. infantum* que tem como principal reservatório o cão doméstico (Deane e Deane, 1962; Palatnik-de-Souza e Day, 2011). Neste ciclo, os cães possuem alto parasitismo na pele e, portanto, representam o principal reservatório urbano do parasita (Palatnik-de-Souza et al., 2001).

Os casos de leishmaniose visceral canina (LVC) usualmente precedem os casos da enfermidade humana, refletindo a importância do monitoramento da infecção canina como um possível marcador de transmissão de *L. infantum* para a população humana (Peixoto et al., 2014). No entanto, o diagnóstico preciso da LVC é um dos maiores entraves para o controle desta antroponose (Moreira et al., 2007).

Atualmente, utiliza-se a reação de imunoadsorção enzimática (ELISA) como teste confirmatório pelo Ministério da Saúde para o diagnóstico da LVC (Brasil, 2011). Contudo, resultados falsos positivos são descritos em associação a técnicas de diagnóstico sorológico da LV devido a utilização de antígenos brutos solúveis do parasita no ELISA, o qual apresenta alta sensibilidade, porém baixa especificidade devido à proximidade antigênica de *Leishmania* sp. a outros protozoários patogênicos que apresentam epítomos semelhantes (Ferreira et al., 2007).

Sendo assim, em busca de métodos diagnósticos mais acurados e práticos para utilização em locais desprovidos de equipamentos laboratoriais onerosos e alta capacitação profissional, Ejazi et al., (2019) desenvolveram um método ELISA baseado em antígenos de membrana de promastigota de *L. donovani* impregnados em tiras reagentes para diagnóstico da LV humana.

O presente estudo tem como objetivo avaliar a sensibilidade, especificidade, de um novo teste sorológico *dipstick* desenvolvido por Ejazi et al., (2019) no diagnóstico da leishmaniose visceral canina em cães com perfis clínicos distintos.

MATERIAL E MÉTODOS

População de estudo

As amostras de soros dos cães foram obtidas do banco sorológico do Laboratório de Parasitologia Humana da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS); as quais advieram de cães residentes nos municípios de Campo Grande e Camapuã, Mato Grosso do Sul, Brasil. As amostras foram estocadas em freezer -80°C e as análises laboratoriais foram processadas na Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD) no Laboratório de Pesquisas em Ciências da Saúde.

As amostras de cães diagnosticados com LVC obtidas a partir do banco sorológico foram provenientes de animais cuja infecção foi comprovada por meio do exame parasitológico direto (visualização de formas amastigotas em aspirado de linfonodo) e teste imunocromatográfico TR-DPP® (Bio-Manguinhos/ Fiocruz/ Brasil) positivo. Previamente à realização do experimento com teste *dipstick*, as amostras positivas foram retestadas pelo TR-DPP® para avaliação da viabilidade das amostras, considerando aptas a serem utilizadas no experimento, apenas aquelas que não apresentaram degradação de anticorpos e mantiveram-se positivas no teste.

Os cães do banco sorológico foram avaliados fisicamente por médico veterinário em busca de sinais clínicos de LVC: caquexia; pelagem opaca/quebradiça; aumento de linfonodos; lesões e/ou despigmentação no focinho e nos lábios; lesões em ponta de orelha; dermatite esfoliativa; secreção ocular; alopecia; blefarite e sangramento nasal (adaptado de Figueiredo et al., 2018). De acordo com o número de sinais clínicos apresentados, os animais foram classificados em assintomáticos (n= 9) na ausência de manifestações clínicas; oligossintomáticos (n=15) na presença de até três sinais clínicos e sintomáticos (n = 15) quando mais de três sinais clínicos foram observados.

As amostras que formaram o grupo negativo (n = 15) foram obtidas de cães cujo exame parasitológico direto de aspirado de linfonodo não revelou a presença do protozoário, associado ao resultado negativo no teste imunocromatográfico TR-DPP® (Bio-Manguinhos/Fiocruz/ Brazil) e do resultado negativo para os seguintes hemoparasitas: *Ehrlichia canis* (Dawson et al., 1994; 1996), *Babesia canis* (Carret et al., 1999) and *Anaplasma platys* (Inokuma et al., 2002) por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR).

Amostras de cães negativos (parasitológico de linfonodo e TR-DPP®) para LVC, *A. platys* e *B. canis*, porém infectados por *E. canis* compuseram o grupo de animais diagnosticados com erliquiose (n=15). Amostras de cães vacinados (n=5) também foram utilizadas, sendo provenientes de cães negativos (parasitológico de linfonodo e TR-DPP®) para LVC e hemoparasitas, vacinados com a vacina Leish-Tec® (Ceva Saúde Animal Ltda, Paulínea, São Paulo, Brasil) há pelo menos 3 meses.

Fitas reagentes (teste dipstick)

As fitas reagentes (*dipstick*) foram cedidas pelo Instituto Indiano de Biologia Química, na pessoa da professora Dr^a. Nahid Ali e utilizadas de acordo com o protocolo de Ejazi et al., (2019).

As fitas de membrana de nitrocelulose contêm uma linha teste, na qual utilizou-se 1,5 µg do antígeno de membrana de promastigota de *Leishmania donovani* e uma linha controle na qual utilizou-se a diluição de 1:20 do conjugado anti-IgG de cão com peroxidase (SIGMA N° Cat: A6792). Os soros foram diluídos em 1:3500 em solução de lavagem (100mM Tris-Buffered-Saline -TBS, pH 7.4 + 0.05% Tween 20) e em seguida as fitas foram incubadas nos respectivos soros em tubos de polipropileno de 2ml, por 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, as fitas foram lavadas na solução de lavagem duas vezes. Em sequência, as fitas foram incubadas em tubos de polipropileno de 2ml com o conjugado anti-IgG de cão na diluição de 1:2000 em solução de lavagem, por 30 minutos em temperatura ambiente. As fitas foram lavadas duas vezes com solução de lavagem e depois, apenas com TBS (100mM TBS, pH 7.4). As fitas foram imergidas na solução de revelação (5 mg 3-3'-Diaminobenzidine em 10 ml 100mM TBS, pH 7.4 + 10 µl H₂O₂) durante 2 minutos e em seguida foram lavadas em água destilada por 5 minutos e colocadas para secagem e leitura a olho nu, sendo a presença de apenas uma linha – controle – indicativo de resultado não reagente e, a presença de duas linhas – controle e teste, indicativo de resultado reagente.

Análise estatística

Após tabulação dos resultados, valores de sensibilidade, especificidade foram calculados por meio do software Medcalc v. 15.8.

As diferenças entre as proporções de resultados positivos entre os grupos foram avaliadas pelo teste exato de Fisher, com nível de significância de 5%.

RESULTADOS

O teste de fitas reagentes (*dipstick*) apresentou sensibilidade geral de 82,05% e especificidade de 100%, com melhor desempenho para identificação dos pacientes que apresentavam entre um e três sinais clínicos (oligossintomáticos) (Tabela 1), embora não se tenha observado diferença estatisticamente significativa ($p=0,43$).

Não se observou reação cruzada com amostras de cães vacinados com Leish-Tec® ou infectados por *E. canis*.

Tabela 2. Sensibilidade, especificidade e acurácia do teste *dipstick* com amostras sorológicas de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum* sintomáticos (n=15), oligossintomáticos (n=15) e assintomáticos (n=9); cães negativos para leishmaniose visceral canina (LVC-negativo) e hemoparasitas (*L. infantum*, *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Babesia canis*), infectados por *Ehrlichia canis* (n=15) e cães (*L. infantum*, *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Babesia canis*)-negativos vacinados com Leish-Tec® (n=5).

	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	Acurácia (%)
Sintomático	73,33	-----	-----
Oligossintomático	93,33	-----	-----
Assintomático	77,78	-----	-----
Ehrlichia	-----	100	-----
Leish-Tec®	-----	100	-----
População	82,05	100	90,54

DISCUSSÃO

Cães com leishmaniose visceral canina podem apresentar diferentes respostas à infecção pelo parasita *Leishmania infantum*. São caracterizados dois perfis principais de resposta à infecção pelo protozoário: o perfil Th1 e o Th2. Este último é marcado por acentuada produção de anticorpos, ineficazes na eliminação do parasita e, responsáveis por diversos sinais clínicos devido a lesões imunomediadas pelos complexos antígeno-anticorpos (Solano-Gallego et al., 2011). Pacientes Th2 são facilmente reconhecidos por métodos sorológicos de diagnóstico devido a intensa resposta imune humoral do hospedeiro (Solano-Gallego et al., 2011), fato representado pela maior sensibilidade neste estudo para reconhecimento de animais oligossintomáticos.

Sabe-se que há correlação entre a produção de anticorpos e presença de sinais clínicos no hospedeiro; sendo esperado maior sensibilidade dos testes sorológicos em animais sintomáticos do que assintomáticos, devido a maior hipergamaglobulinemia (Da Costa Val et al., 2007; Cândido et al., 2008)

Contudo, no presente estudo foi observado maior sensibilidade do teste *dipstick* em pacientes oligossintomáticos e assintomáticos do que polissintomáticos. Cândido et al. (2008) também obtiveram maior sensibilidade para o diagnóstico sorológico em animais oligossintomáticos (90%) do que em pacientes com mais de três sinais clínicos (86,7%), ao utilizar um ELISA contendo o complexo antigênico fucose-manose ligante (FML) de *L. donovani*. Da mesma forma, Lemos et al. (2008) demonstraram maior sensibilidade no diagnóstico de animais oligossintomáticos (88%) do que sintomáticos (84%) pelo

teste rápido imunocromatográfico Kalazar Detect[®], baseado em antígeno rK39 de *L. infantum*.

Este fato pode estar associado à formação de complexos antígeno-anticorpo em animais com hipergamaglobulinemia, uma vez que os complexos imunes podem representar um fator limitante nos métodos diagnósticos sorológicos (De Carvalho et al., 2013; 2019; 2020). Ademais, pacientes sintomáticos refletem estágios mais avançados da doença, como demonstrado por Nicolato et al. (2013), os quais reportaram linfopenia como disfunção hematológica observada em cães com apresentação clínica severa da doença. A linfopenia pode justificar a redução da produção de anticorpos contra o parasita, além de estar associada a pior prognóstico para o paciente (Geisweid et al., 2012).

A presença de sinais clínicos também está associada ao grau de infectividade do hospedeiro ao vetor, sendo os cães sintomáticos e oligossintomáticos mais eficazes em infectar o flebotômio (Da Costa Val et al., 2007). Por outro lado, cães com perfil de resposta imune Th1, contam com a defesa celular, a qual é mais eficiente na eliminação do protozoário do que a produção de anticorpos. A atividade leishmanicida de macrófagos e a síntese de óxido nítrico levam à redução da carga parasitária e, portanto, manifestações clínicas menos intensas e menor infectividade ao vetor são esperadas (Da Costa Val et al., 2007; Solano Gallego et al., 2009; 2011).

Contudo, Laurenti et al. (2013) demonstraram a importância epidemiológica do cão assintomático ao evidenciarem 93% de infecção pelo flebótomo *Lutzomyia longipalpis* durante o xenodiagnóstico em animais sem sinais clínicos. Desta forma, métodos diagnósticos para LVC a serem empregados como parte das medidas de controle contra esta zoonose, devem ser capazes de identificar estes possíveis reservatórios do parasita no meio urbano.

Outros testes rápidos sorológicos, baseados no antígeno recombinante rK39 de *L. infantum* também apresentaram desempenho inferior na detecção dos cães assintomáticos, como o teste Dia-Med-Vet-IT-Leish (Cressier sur Morat, Suíça) (52,9%), na forma de apresentação *dipstick* e o imunocromatográfico Kalazar Detect[®] (Inbios International, Seattle, WA, EUA) (75%) (Mettler et al., 2005; Lemos et al., 2008).

O teste rápido *Dual-Path Platform immunochromatographic test* -TR-DPP[®] (Bio-Manguinhos/FIOCRUZ – Rio de Janeiro, RJ, Brasil), também utiliza o antígeno recombinante rK39 e faz parte do protocolo de diagnóstico da LVC utilizado pelo Ministério da Saúde (Brasil, 2011). Esta técnica é utilizada como triagem, sendo apenas os animais positivos por este método, submetidos ao ELISA confirmatório. Contudo, Grimaldi et al. (2012) encontraram baixa sensibilidade (47%) do TR-DPP[®] no diagnóstico de cães assintomáticos, favorecendo a manutenção de hospedeiros infectados e perpetuação da doença.

Borges et al. (2021) também avaliaram o desempenho do TR-DPP[®] em pacientes assintomáticos oriundos de Camapuã (Mato Grosso do Sul, Brasil), região de transmissão esporádica para leishmaniose visceral de acordo com a classificação do Ministério da Saúde e obtiveram sensibilidade de 62%. Desta região advieram 8/10 animais que compuseram o grupo assintomático no presente estudo; destacando, assim, a maior sensibilidade do teste *dipstick* para animais assintomáticos (77,78%) e, reduzindo o número de animais falsos negativos a permanecerem sem diagnóstico no ambiente.

Com intuito de aumentar a sensibilidade e especificidade dos testes sorológicos, reduzindo assim resultados falsos negativos e positivos, propagou-se a pesquisa de antígenos específicos em substituição ao antígeno total, usualmente utilizado em testes sorológicos. O ELISA EIE® (Biomanguinhos, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil), recomendado pelo Ministério da Saúde brasileiro como teste confirmatório para o diagnóstico da LVC, utiliza o antígeno solúvel de *Leishmania major*-like (MHOM/BR/76/JOF) em sua composição. Contudo, reações cruzadas em amostras de caninos infectados por outros patógenos com epítomos antigênicos semelhantes a *L. infantum*, tais como os tripanossomatídeos e a bactéria *Ehrlichia canis* já foram relatadas (Ferreira et al., 2007; Alves et al., 2012; Pereira et al., 2020).

A erliquiose canina é uma hemoparasitose frequente entre os cães de área endêmica para LVC, transmitida pela picada do carrapato *Rhipicephalus sanguineus*. Esta hemoparasitose é caracterizada por manifestações clínicas (linfadenomegalia, apatia, perda de peso, glomerulonefrite, uveíte, poliartrite) e hematológicas (anemia, trombocitopenia, hipergamaglobulinemia) semelhantes à leishmaniose visceral canina (Nakaghi et al., 2008), o que dificulta a diferenciação entre ambas pelo médico veterinário, e pode levar a eutanásias despropositadas por resultados falsos positivos.

Isto posto, frequentemente utilizam-se associações de técnicas diagnósticas para obtenção de um diagnóstico conclusivo para LVC. A técnica de reação em cadeia da polimerase apresenta alta sensibilidade e especificidade na identificação de cães sintomáticos e assintomáticos para LVC (De Carvalho et al., 2018). Esta técnica também pode ser utilizada para confirmação da infecção por *E. canis*, assim como técnicas sorológicas, baseadas na titulação de anticorpos (Nakaghi et al., 2008). Todavia, a realização de ELISA e/ou PCR requerem laboratórios equipados e profissionais treinados para execução das técnicas, sendo assim, consideradas laboriosas e dispendiosas (Pereira et al., 2020).

Frente às considerações expostas, o teste rápido *dipstick* de Ejazi et al. (2019) possui facilidade de execução e potencial para produção em plataforma imunocromatográfica. No presente estudo, observou-se desempenho eficaz no diagnóstico de cães naturalmente infectados por *L. infantum*, destacando-se a sensibilidade em animais oligossintomáticos e a especificidade de 100% entre os cães vacinados com Leish-Tec® e infectados por *E. canis*. Assim, pode-se considerá-lo um grande aliado em regiões com déficit de equipamentos e laboratórios de suporte e, principalmente, em situações de suspeita de erliquiose canina como diagnóstico diferencial.

Para validação de um teste sorológico, é necessário que o mesmo seja testado com amostras provenientes de regiões geográficas distintas, uma vez que a prevalência da LVC pode influenciar nos valores de sensibilidade e especificidade do teste (Mendonça et al 2017; Ramírez et al., 2019). Ressalta-se que o presente teste já foi submetido a uma avaliação multicêntrica em seis países diferentes (Brasil, Etiópia, Índia, Sri Lanka, Espanha e Nepal) para o diagnóstico de leishmaniose visceral humana e demonstrou valores de sensibilidade e especificidade variando entre 60%-100% e 79,06-100%, respectivamente (Ejazi et al., 2019). Desta maneira, o teste rápido *dipstick* possui aplicabilidade tanto no cenário da doença em seres humanos, como nos caninos, o que pode reduzir custos de produção e facilitar a distribuição do produto em regiões menos desenvolvidas.

DECLARAÇÃO DE ÉTICA

As amostras foram coletadas entre 2015 e 2017 sob aprovação do comitê de ética da UFMS (protocolos 645/2014 e 697/2015) com consentimento dos tutores após assinatura do termo de consentimento livre esclarecido.

REFERÊNCIAS

Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux, P, Cano J, Janin J, Den Boer M, Who LCT. (2012) Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. Plos One. 7(5): e35671. doi: 10.1371/journal.pone.0035671.

Adler S, Theodor O. (1932). Investigations on Mediterranean Kalazar VI canine visceral leishmaniasis. Proc. Royal Soc. B: Bio. Sci. 110: 402-412. doi: 10.1098/rspb.1932.0035.

Alves, AS, Mouta-Confort E, Figueiredo FB, Oliveira RVC, Schubach AO, Madeira, MF. (2012). Evaluation of serological cross-reactivity between canine visceral leishmaniasis and natural infection by *Trypanosoma caninum*. Res. Vet. Sci.. 93 (3): 1329-1333. doi: 10.1016/j.rvsc.2012.07.006.

Brasil, Ministério da Saúde. (2011) Nota Técnica Conjunta nº 01/2011-CGDT-CGLAB/DEVIT/SVS/MS. Esclarecimentos sobre substituição do protocolo diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC). (Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis/Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública). Brasília. Ministério da Saúde.

Borges, LM, de Oliveira AG, Mateus NLF, de Oliveira EF, Arrua AEC, Infran JOM, et al. (2021). Canine visceral leishmaniasis in an area of sporadic transmission in Brazil. Vector Borne Zoonotic Dis. 21 (7): 539-545. doi: 10.1089/vbz.2020.2701

Cândido TC, Perri SHV, Gerzoschkwitz TO, Luzivotto MCR, Lima VMF. (2008). Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay based on crude and purified antigen of canine visceral leishmaniasis in symptomatic and oligosymptomatic dogs. Vet. Parasitol. 157 (3-4): 175-181. doi: 10.1016/j.vetpar.2008.08.010.

Carret C, Walas F, Carcy B, Grande N, Précigout E, Moubri K et al. (1999). *Babesia canis canis*, *Babesia canis vogeli*, *Babesia canis rossi*: differentiation of the three subspecies by a restriction length polymorphism analysis on amplified small subunit ribosomal RNA genes. J. Eukaryo. Microbiol. 46 (3): 298-303. doi: 10.1111/j.1550-7408.1999.tb05128.x.

Da Costa-Val AP, Cavalvanti RR, Gontijo NF, Michalick SM, Alexander B, Williams P, et al. (2007). Canine visceral leishmaniasis: relationships between clinical status, humoral immune response, hematology and *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* infectivity. Vet. J. 174 (3): 636-643. doi: 10.1016/j.tvjl.2006.11.006.

Dawson JE, Stallknecht DE, Howerth EW, Warner C, Biggie K, Davidson WR et al. (1994). Susceptibility of White-Tailed Deer (*Odocoileus virginianus*) to Infection with *Ehrlichia chaffeensis*, the Etiologic Agent of Human Ehrlichiosis. J. Clin. Microbiol. 32 (11): 2725-2728. doi: 10.1128/jcm.32.11.2725-2728.1994.

1474 Dawson JE, Warner CK, Standaert S, Olson J G. (1996) The interface between research
1475 and the diagnosis of an emerging tick-borne disease, human ehrlichiosis due to
1476 *Ehrlichia chaffeensis*. Arch. Inter. Med. 156 (2): 137-142.
1477

1478 Dahmnetiya D, Jha RP, Bhattaharyya S, Bhattaharyya K. (2021). India's performance in
1479 controlling Visceral Leishmaniasis as compared to Brazil over past three decades:
1480 findings from global burden of disease study. J. Parasit. Dis. 45 (4), 877-886. 2021. doi:
1481 10.1007/s12639-021-01375-0.

1482 Deane LM, Deane MP. (1962). Visceral leishmaniasis in Brazil. Geographical
1483 distribution and transmission. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo. 4 (3): 198–212.

1484 De Carvalho CA, Partata AK, Hiramoto RM, Borborema SE, Meireles LR, Nascimento
1485 ND et al. (2013). A simple immune complex dissociation ELISA for leishmaniasis:
1486 standardization of the assay in experimental models and preliminary results in canine
1487 and human samples. Acta Trop. 125 (2): 128-136. doi:
1488 10.1016/j.actatropica.2012.10.010.

1489 De Carvalho FLN, Riboldi EO, Bello GL, Ramos RR, Barcellos RB, Gehlen M, et al.
1490 (2018). Canine visceral leishmaniasis diagnosis: a comparative performance of
1491 serological and molecular tests in symptomatic and asymptomatic dogs. Epidemiol.
1492 Infect. 146 (5): 571-576. doi: 10.1017/S0950268818000225.

1493 De Carvalho CA, Ferrão TF, de Freitas F, Andrade Jr HF. (2019). High levels of serum
1494 glycans monovalent IgG immune complexes detected by dissociative ELISA in
1495 experimental visceral leishmaniasis. Immunology. 158 (4): 314-321. doi:
1496 10.1111/imm.13118.

1497 De Carvalho CA, Ferrão TF, Cavalcante FS, de Freitas F, Meireles LR, Andrade Jr HF.
1498 (2020). Early high avidity specific IgG production in experimental hamster visceral
1499 leishmaniasis. Parasitol. Research. 119 (11): 3881-3885. doi: 10.1007/s00436-020-
1500 06851-9.

1501 Ejazi SA, Ghosh S, Saha S, Choudhury ST, Bhattacharyya A, Chatterje M. (2019) A
1502 multicentric evaluation of dipstick test for serodiagnosis of visceral leishmaniasis in
1503 India, Nepal, Sri Lanka, Brazil, Ethiopia, and Spain. Sci. Rep. 11: 3967.
1504 <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46283-9>.

1505 Ferreira E de C, de Lana M, Carneiro M, Reis AB, Paes DV, Silva ES da, et al. (2007)
1506 Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in
1507 animals presenting different clinical manifestations. Vet. Parasitol. 146 (3-4): 235–
1508 241. doi:10.1016/j.vetpar.2007.02.015.
1509

1510 Figueiredo FB, de Vasconcelos TCB, Madeira M de F, Menezes RC, Maia-
1511 Elkhoury ANS, Marcelino AP, et al. (2018). Validation of the dual-path platform
1512 chromatographic immunoassay (DPP® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine
1513 visceral leishmaniasis. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 113 (11). doi: 10.1590/0074-
1514 02760180260 .
1515

1516 Geisweid K, Mueller R, Sauter-Louis C, Hartmann K. (2012). Prognostic analytes in
1517 dogs with *Leishmania infantum* infection living in a non-endemic area. Vet Rec.
1518 171:399. doi: 10.1136/vr.100637.

- 1519 Grimaldi Jr G, Teva A, Ferreira AL, Santos CB, Pinto IS, de Azevedo CT, Falqueto A.
1520 (2012). Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path
1521 Platform technology (DPP® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral
1522 leishmaniasis. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 106 (1): 54-59. doi:
1523 10.1016/j.trstmh.2011.10.001.
- 1524 Inokuma HH, Fujii K, Matsumoto K, Okuda M, Nakagome K, Kosugi R et al. (2002).
1525 Demonstration of Anaplasma (Ehrlichia) platys inclusions in peripheral blood platelets
1526 of a dog in Japan. Vet. Parasitol. 110 (1-2): 145-152. doi: 10.1016/s0304-
1527 4017(02)00289-3.
- 1528 Laurenti MD, Rossi CN, Matta VLR, Tomokane TY, Corbett CEP, Secundino NFC, et
1529 al. (2013). Asymptomatic dogs are highly competent to transmit Leishmania
1530 (*Leishmania*) *infantum chagasi* to the natural vector. Vet. Parasitol. 196 (3-4): 296-300.
1531 doi: 10.1016/j.vetpar.2013.03.017
- 1532 Lemos EM, Laurenti MD, Moreira MAB, Reis AB, Giunchetti RC, Raychaudhuri S, et
1533 al. (2008). Canine visceral leishmaniasis: performance of a rapid diagnostic test (Kalazar
1534 Detect™) in dogs with and without signs of the disease. Acta Trop. 107 (2): 205-207.
1535 doi: 10.1016/j.actatropica.2008.04.023.
- 1536 Mendonça IL, Batista JF, Schallig H, e Cruz M do SP, Alonso DP, Ribolla PEM, et
1537 al. (2017). The performance of serological tests for Leishmania infantum infection
1538 screening in dogs depends on the prevalence of the disease. Rev. Inst. Med.
1539 Trop. Sao Paulo. 59. doi:10.1590/s1678-9946201759039.
- 1540 Mettler M, Grimm F, Capelli G, Camp H, Deplazes P. (2005). Evaluation of enzyme-
1541 linked immunosorbent assays, an immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests
1542 (Immunochromatographic-Dipstick and Gel Tests) for serological diagnosis of
1543 symptomatic and asymptomatic *Leishmania* infections in dogs. J. Clin. Microbiol. 43
1544 (1): 5515-5519. doi: 10.1128/JCM.43.11.5515-5519.2005.
- 1545 Moreira MAB, Luvizotto MCR, Garcia JF, Corbett CEP, Laurenti MD. (2007).
1546 Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis
1547 of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. Vet. Parasitol. 145: 245-252. doi:
1548 10.1016/j.vetpar.2006.12.012.
- 1549 Nakaghi ACH, Machado RZ, Costa MT, André MC, Baldani CD. (2008). Canine
1550 ehrlichiosis: clinical hematological, serological and molecular aspects. Cienc. Rural. 38
1551 (3): 766-770. doi: 10.1590/S0103-84782008000300027.
- 1552 Nicolato R, de Alberto. R, Roatt B, Aguiar-Soares R, Reis L, Carvalho M, et al. (2013).
1553 Clinical forms of canine visceral Leishmaniasis in naturally *Leishmania infantum*-
1554 infected dogs and related myelogram and hemogram changes. Plos One. 8:e82947. doi:
1555 10.1371/journal.pone.0082947.
- 1556 Palatnik-De-Sousa CB, Dos Santos WR, França-Silva JC, Da Costa RT, Barbosa Reis
1557 A, Palatnik M, Mayrink W, Genaro O. (2001). Impact of canine control on the

1558 epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. *Am. J. Trop. Med.*
1559 *Hyg.* 65(5): 510–517.

1560 Palatnik-de-Sousa CB, Day MJ. (2011). One Health: the global challenge of epidemic
1561 and endemic leishmaniasis. *Parasit. Vectors.* 4: 197. doi:10.1186/1756-3305-4-197
1562

1563 Peixoto HM, de Oliveira MRF, Romero GAS. (2014). Serological diagnosis of canine
1564 visceral leishmaniasis in Brazil: systematic review and meta-analysis. *Trop. Med. Inter.*
1565 *Health.*; 20(3): 334–352. doi:10.1111/tmi.12429.

1566 Pereira IE, Silva KP, Menegati M, Pinheiro AC, Elaine A, Lourdes MDE, et al. (2020).
1567 Performance of recombinant proteins in diagnosis and differentiation of canine visceral
1568 leishmaniasis infected and vaccinated dogs. *Eur. J. Microbiol. Immunol.* 10(3): 165-171.
1569 doi: 10.1556/1886.2020.00018.

1570 Ramírez L, de Moura LD, Mateus NLF, de Moraes MH, do Nascimento LFM, de Jesus
1571 Melo N, et al. (2019). Improving the serodiagnosis of canine *Leishmania infantum*
1572 infection in geographical areas of Brazil with different disease
1573 prevalence. *Parasite Epidemiol. Control.* 8:e00126. doi: 10.1016/j.parepi.2019.e00126

1574 Solano-Gallego L, Koutinas A, Miró G, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, et al. (2009).
1575 Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine
1576 leishmaniasis. *Vet. Parasitol.* 165 (1-2): 1-18. doi: 10.1016/j.vetpar.2009.05.022.

1577 Solano-Gallego L, Mirá G, Koutinas A, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, et al. (2011).
1578 LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasit.*
1579 *Vector.* 4:86. doi:10.1186/1756-3305-4-86.

1580

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O teste rápido *dipstick* de Ejazi et al. (2019) possui facilidade de execução e potencial para produção em plataforma imunocromatográfica, tendo sido demonstrado no presente estudo desempenho eficaz no diagnóstico de cães naturalmente infectados por *L. infantum*, destacando-se a sensibilidade em animais oligossintomáticos e assintomáticos, e a especificidade de 100% entre os cães vacinados com Leish-Tec® e infectados por *Ehrlichia canis*. Assim, pode-se considerá-lo um grande aliado em regiões com déficit de equipamentos e laboratórios de suporte e, principalmente, em situações de suspeita de erliquiose canina como diagnóstico diferencial.

Com relação as proteínas quiméricas Q1 e Q5, este trabalho demonstrou a sensibilidade e especificidade superior das mesmas, quando comparadas ao extrato total bruto de *Leishmania infantum*. Destaca-se que a proteína Q5 apresentou 90% de especificidade quando utilizada em um cenário de difícil diagnóstico, incluindo cães infectados com *E. canis* e animais vacinados. Além disso, Q5 pode ser um antígeno promissor para uso no diagnóstico da leishmaniose visceral humana também, como demonstrado por outros estudos.

Para validação dos testes sorológicos aqui previamente estudados, são necessários mais estudos incluindo um número amostral maior de cães vacinados e infectados com outros hemoparasitas, além de amostras provenientes de regiões geográficas distintas, uma vez que a prevalência da leishmaniose visceral canina pode influenciar nos valores de sensibilidade e especificidade do teste.

5 IMPACTO ECONÔMICO, SOCIAL, TECNOLÓGICO E/OU INOVAÇÃO

A avaliação do desempenho de um teste diagnóstico em diferentes perfis clínicos é parte importante do processo de validação da técnica antes da recomendação da produção em larga escala e usabilidade em cenário nacional.

Destaca-se que as quimeras aqui testadas são de produção nacional e maior rapidez de obtenção e pureza do antígeno do que o antígeno obtido a partir do extrato total de *Leishmania infantum*. Além disso a quimera Q5 possui potencial diagnóstico para leishmaniose visceral canina e humana, reduzindo custos de produção e facilitando a distribuição do teste pelos centros de diagnóstico do país, reduzindo problemas como escassez do teste e ausência de matéria prima para produção.

Este é o primeiro estudo a avaliar o desempenho de Q1 e Q5 em animais com perfis clínicos distintos (sintomáticos, oligossintomáticos e assintomáticos), saudáveis, vacinados e infectados por *Ehrlichia canis*, de maneira a simular cenários de difícil diagnóstico, os quais são comumente encontrados pelo país.

A avaliação do desempenho do teste *dipstick* indiano em amostras caninas com diferentes perfis clínicos demonstrou o potencial de utilização do teste em municípios brasileiros menores, desprovidos de instalações laboratoriais equipadas, uma vez que a técnica não necessita complexa capacitação laboratorial e emprega apenas vidrarias, micropipetas e reagentes laboratoriais, não sendo necessário aparelhos onerosos como o espectrofotômetro.