



**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

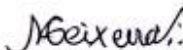


Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFMS



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



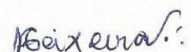
Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



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

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 *Leishmania infantum* tested with sera from dogs naturally infected by *Leishmania* sp. asymptomatic (n=10), oligosymptomatic (n=30) and symptomatic (n=30); sera from canine visceral leishmaniasis (CVL)-negative animals infected with *Ehrlichia canis* (n=30) and hemoparasites (*L. infantum*, *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Babesia canis*)-negative dogs vaccinated with Leish-Tec® (n=5) and Leishmune® vaccines (n=5).....39
- 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).....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 antropozoonose 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 imunoabsorção 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

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

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

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

49

50 **1.2. OBJETIVOS**

51 **1.2.1. OBJETIVO GERAL**

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

55

56 **1.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

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

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

68

69 **1.3 REVISÃO DE LITERATURA**

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

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

78 Já no Brasil, país responsável por cerca de 90% dos casos de LV na América
79 Latina (BRASIL, 2022), destaca-se o ciclo zoonótico associado a espécie *L.*
80 *infantum* que tem como principal reservatório o cão doméstico (DEANE e DEANE,
81 1955; PALATNIK-DE-SOUZA e DAY, 2011) e principal vetor, a espécie de
82 flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis*, com ampla distribuição geográfica pelo país e
83 alta antropofilia e adaptação a ambientes urbanizados (AGUIAR e MEDEIROS,
84 2003; RANGEL e VILELA, 2008; SOUZA et al., 2009).

85 A LV trata-se de uma doença de notificação compulsória no Brasil, presente
86 nas cinco regiões do país e endêmica no Norte, Centro-Oeste, Sudeste e Nordeste,
87 sendo esta última responsável pelo maior índice de casos (BRASIL, 2022). O
88 estado de Mato Grosso do Sul (MS), teve notificações da doença em 39 dos seus
89 79 municípios entre 2019 e 2021, sendo 5 destes, incluindo a capital, classificados
90 como área de alta taxa de transmissão de LV (acima de 4,4 casos/ano). Foram
91 confirmados 1.702 casos no estado, com 122 óbitos, no período de 2012 a 2021. A
92 maior taxa de letalidade observada no MS nos últimos cinco anos foi registrada em
93 2019 com 12,12%; porém ressalta-se que no ano de 2022 até o final de junho, esta
94 já se encontrava em 14%. Desta maneira, a elevada incidência e taxa de letalidade
95 observadas no estado demonstram a gravidade da doença e as condições de
96 assistência e vigilância (MATO GROSSO DO SUL, 2022).

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

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

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

116 Os cães são considerados importantes reservatórios de *L. infantum* devido
117 à alta carga parasitária apresentada na pele mesmo quando estes animais estão
118 assintomáticos, facilitando a infecção do vetor pelo parasita (LAURENTI et al.,
119 2014). Ademais, os casos de leishmaniose visceral canina (LVC) usualmente
120 precedem o aparecimento da doença humana, refletindo a importância do
121 monitoramento da infecção canina como um possível marcador de transmissão de
122 LV (MAGALHÃES-JUNIOR et al., 2016).

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

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

132 O diagnóstico parasitológico direto apresenta 100% de especificidade e é
133 realizado por meio da visualização de formas amastigotas do parasita *Leishmania*
134 *spp.* em algum tecido do animal, sendo as amostras de linfonodo e medula óssea
135 as mais utilizadas na rotina clínica, com sensibilidade entre 40-50% e 60-75%,
136 respectivamente (ALVAR et al., 2004; GONTIJO; MELO, 2004; SANTOS et al.,
137 2014). É considerado um diagnóstico definitivo e padrão ouro; porém a distribuição
138 não homogênea dos parasitas nos tecidos, mesmo em cães sintomáticos, além da
139 ausência de linfadenomegalia em alguns cães, e a invasividade na coleta de
140 medula óssea reduzem a utilização destas técnicas na rotina. Ademais, são
141 técnicas que requerem experiência do profissional responsável pela leitura do
142 material e demandam maior tempo para sua execução, impossibilitando a aplicação
143 em estudos epidemiológicos, por exemplo (GONTIJO; MELO, 2004; MOREIRA et
144 al., 2007; SANTOS et al., 2014).

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

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

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

164 Neste contexto, o diagnóstico sorológico da LVC tem sido amplamente
165 utilizado devido à facilidade de aplicação da técnica em um grande número
166 amostral, envolvendo procedimentos minimamente invasivos, como a coleta de
167 sangue. Aliado a estas vantagens, a hipergamaglobulinemia é uma das frequentes
168 alterações observadas nos cães infectados por *L. infantum* justificando a utilização
169 dos métodos sorológicos para diagnóstico (ALVAR et al., 2004; FONSECA et al.,
170 2014).

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

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

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

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

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

213 A utilização do TR-DPP® como teste de triagem para LVC pelo Ministério da
214 Saúde aumentou a sensibilidade no diagnóstico da enfermidade canina em
215 substituição ao protocolo anterior, baseado na concordância de resultados entre
216 ELISA e reação de imunofluorescência indireta (RIFI) (COURA-VITAL et al., 2014).
217 No entanto, o desempenho deste teste imunocromatográfico ainda apresenta
218 resultados discrepantes em animais com perfis clínicos distintos ou infectados por
219 outros hemoparasitas, fatores que propiciam a ocorrência de resultados falsos
220 negativos e manutenção de reservatórios no ambiente, bem como resultados falsos
221 positivos e realização de eutanásias despropositadas (LAURENTI, 2014; MATEUS,
222 2018; DANTAS-TORRES et al., 2019).

223 Mateus (2018) relatou valores de sensibilidade inferiores do TR-DPP® no
224 diagnóstico de animais assintomáticos para LVC nos municípios de Camapuã
225 (58%) e Campo Grande (67%) ao comparar com animais sintomáticos dos mesmos
226 municípios (65% em Camapuã e 92% em Campo Grande); corroborando o baixo

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

229 As diferentes apresentações clínicas observadas nos animais acometidos
230 por *L. infantum* são justificadas por tratar-se de uma protozoonose de
231 acometimento sistêmico e complexa patofisiologia (SOLANO-GALLEGO et al.,
232 2009). Assim, os sinais clínicos manifestados durante doença podem ser bastante
233 variáveis de acordo com a parasitemia, local de inoculação do parasita,
234 competência imunológica do cão e estágio da doença; fatores que dificultam a
235 realização do diagnóstico clínico (PINELLI et al., 1994; QUINNELL et al., 2001;
236 MORENO e ALVAR, 2002).

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

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

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

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

260 amostras de pacientes humanos com LV não encontraram nenhum antígeno do
261 extrato de *L. infantum* que fosse reconhecido por anticorpos em todos os soros.
262 Assim, a utilização de um único antígeno definido para avaliação da prevalência
263 populacional e tomada de ações de vigilância pode ser falha; desta maneira, tem-
264 se instigado o uso de múltiplos antígenos recombinantes para obtenção de um teste
265 de desempenho superior aos já existentes no mercado (QUINNEL et al., 2013;
266 SANTOS et al., 2019; RAMIREZ et al., 2020; PEREIRA et al., 2020; JESUS et al.,
267 2021).

268 Santos et al. (2019) avaliaram três proteínas recombinantes (rFc, rC9 e rA2)
269 previamente identificados por meio de estudos de proteômica e genômica como
270 potenciais antígenos para o diagnóstico da leishmaniose visceral na espécie canina
271 e humana. Os autores obtiveram maior sensibilidade (91,5%) e especificidade
272 (87,2%) para a proteína rA2 no diagnóstico de seres humanos parasitologicamente
273 confirmados para infecção por *L. infantum*, com uma única reação cruzada com
274 amostra de soro de paciente infectado por *Toxoplasma* sp. Já na avaliação do
275 desempenho diagnóstico para LVC, obtiveram valores de sensibilidade maior ou
276 igual a 90% para os três antígenos testados com soros de cães sintomáticos e
277 assintomáticos parasitologicamente diagnosticados com LVC e especificidades
278 variando entre 81,2-87,5%. Contudo, estes autores não avaliaram a ocorrência de
279 reações cruzadas com cães vacinados ou infectados por outros hemoparasitas.

280 Com o intuito de avaliar o desempenho de sete antígenos recombinantes
281 (proteína de membrana dos cinetoplastídeos KMP-11, proteínas ácidas
282 ribossomais LiP2a, LiP2b e LiP0, da histona H2A, proteínas de choque térmico
283 HSP70 e HSP83) de maneira individual para o diagnóstico de LVC, Ramirez et al.
284 (2020) avaliaram o desempenho destes não só em pacientes com diferentes perfis
285 clínicos, mas também provenientes de diferentes regiões do país e, incluíram na
286 avaliação de especificidade, cães saudáveis infectados por *E. canis*. As proteínas
287 KMP-11, LiP0 e LiP2a não apresentaram reação cruzada com a bactéria
288 transmitida pela picada do carrapato. Porém, não demonstraram boa sensibilidade
289 para o diagnóstico de LVC, sendo o maior valor obtido com a proteína LiP0, a qual
290 apresentou apenas 38% de sensibilidade para pacientes sintomáticos e 34,57%
291 para assintomáticos.

292 Visando apurar o diagnóstico da leishmaniose visceral canina em animais
293 assintomáticos, Jesus et al., (2021) estudaram o desempenho da proteína
294 recombinante rLci5 de acordo com o tempo de infecção e sinais clínicos do canino
295 acometido, utilizando um critério de pontuação de 0 a 24 pontos de acordo com a
296 presença e intensidade das manifestações clínicas. Os pesquisadores
297 demonstraram a habilidade do ELISA utilizando rLci5 em detectar 62,9% dos cães
298 infectados com *L. infantum* com escore de 0-3 pontos e 64,3% com pontuação entre
299 4-7. Ademais, foi relatada a utilidade deste antígeno na identificação precoce de
300 animais infectados, sendo capaz de reconhecer animais infectados até 24 meses
301 antes dos outros testes utilizados como comparação (ELISA com antígeno bruto,
302 TR-DPP®, PCR em tempo real e cultura de aspirado de baço).

303 Outro ponto importante a ser considerado na investigação de potenciais
304 antígenos recombinantes para o diagnóstico da LVC é a sua capacidade de
305 distinguir animais vacinados de animais infectados. Este foi o objetivo da pesquisa
306 de Pereira et al., (2020) ao apurar a performance de dois antígenos recombinantes
307 oriundos de *L. donovani* (rKLO8 e rK28) e dois de *L. braziliensis* (rK39 e rLb6H) em
308 soros de cães sororreagentes no TR-DPP® e EIE-LVC e soros de cães negativos
309 para LVC e hemoparasitas (*E. canis* e *Anaplasma* spp.) vacinados com Leish-Tec®
310 (Ceva Saúde Animal Ltda, Paulínea, São Paulo, Brasil). Os resultados obtidos
311 demonstraram alta sensibilidade (84%) de rK28 e baixa ocorrência de reações
312 cruzadas (especificidade 95-100%) e, também revelaram a alta especificidade (93-
313 100%) da proteína rKLO8, a qual poderia ser útil para confirmação da doença em
314 situações de dúvida entre vacinação e infecção.

315 Almejando a melhoria de sensibilidade e especificidade, as quais nem
316 sempre são obtidas em conjunto com a utilização de apenas um antígeno
317 específico, Santos et al. (2020) identificaram antígenos imunodominantes de *L.*
318 *infantum* candidatos ao diagnóstico de LVC e LV e produziram estes epítomos
319 antigênicos de maneira combinada, em vetores bacterianos, sob a forma de
320 proteínas recombinantes quiméricas, denominadas Q1 e Q5 (SANTOS et al.,
321 2020). Estas proteínas foram testadas de maneira individual no diagnóstico da
322 leishmaniose visceral canina e humana (OLIVEIRA et al., 2011; MAGALHÃES et
323 al., 2017) e em suas apresentações quiméricas para o diagnóstico da enfermidade

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

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

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

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

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

364 Ejazi et al. (2019) então aprimoraram as fitas reagentes (*dipstick*) capazes
365 de identificar antígenos de membrana de *L. donovani*, previamente utilizadas para
366 diagnóstico de LV em amostras de urina, de forma a permitir sua aplicabilidade em
367 amostras de sangue. O estudo avaliou o desempenho desta técnica em amostras
368 de soros de indivíduos provenientes de seis países distintos (Índia, Nepal, Sri
369 Lanka, Brasil, Etiópia e Espanha) com diagnóstico de LV confirmado por meio de
370 exame parasitológico. Obteve-se sensibilidade de 97,10% e especificidade de
371 93,44% para o teste, com 100% de sensibilidade e especificidade para amostras
372 brasileiras, não havendo reação cruzada com os soros de pacientes humanos
373 acometidos por leishmaniose cutânea.

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

379

380 1.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

384

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

387

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

392

393 BANETH, G.; KOUTINAS, A.F.; SOLANO-GALLEGO, L.; BOURDEAU, P.;
394 FERRER, L. Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding
395 zoonosis: part one. **Trends in Parasitology**, v.24(7), p.324-330, 2008.
396
397 BARBOSA, E.B.; VIDOTTO, A.; POLACHINNI, G.M.; HENRIQUE, T.; MARQUI,
398 A.B.T.; TAJARA, E.H. Proteômica: Metodologias e aplicações no estudo de
399 doenças humanas. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.58(3), p.355-375,
400 2012.
401
402 BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Esclarecimentos sobre substituição do**
403 **protocolo diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC)**. Coordenação
404 Geral de Doenças Transmissíveis/Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde
405 Pública). Brasília: Ministério da Saúde, 2011. 3p. Nota Técnica Conjunta nº
406 01/2011-CGDT-CGLAB/DEVIT/SVS/MS.
407
408 BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de**
409 **vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília, DF: Ministério da Saúde.
410 2014. 120p.
411
412 BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Leishmaniose Visceral**. 2022. Disponível em:
413 [https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/leishmaniose-](https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/leishmaniose-visceral/situacao-epidemiologica-da-leishmaniose-visceral)
414 [visceral/situacao-epidemiologica-da-leishmaniose-visceral](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
415 de 2022.
416
417 BURZA, S.; CROFT, S.L.; BOELAERT M. Leishmaniasis. **The Lancet**. p. 951–970,
418 2018. doi:10.1016/S0140-6736(18)31204-2
419
420 CARVALHO, I.P.S.F.; PEIXOTO, H.M.; ROMERO, G.A.S.; OLIVEIRA, M.R.F. Cost
421 of visceral leishmaniasis care in Brazil. **Tropical Medicine and International**
422 **Health**, v.22 (12), p.1579-1589, 2017.
423
424 COURA-VITAL, W., KER, H.G.; ROATT, B.M.; AGUIAR-SOARES, R.D.O.; LEAL,
425 G.G.A.; MOREIRA, N.D.; et al. Evaluation of changes in canine diagnosis protocol
426 adopted by the Visceral Leishmaniasis Control Program in Brazil and a new protocol
427 for diagnosis. **Plos One**, v.9 (3); e91009, 2014.
428
429 DANTAS-TORRES, F.; MIRÓ, G.; BOWMAN, D.D.; GARDONI, L.; OTRANTO, D.
430 Culling dogs for zoonotic visceral Leishmaniasis Control: The wind of change.
431 **Trends in Parasitology**, v. 35 (2); p. 97-101, 2019.
432
433 DEANE, L.M.; DEANE, M.P. Observações preliminares sobre a importância
434 comparativa do homem, do cão e da raposa (*Lycalopex vetulus*) como reservatório
435 da *Leishmania donovani* em área endêmica do calazar, no Ceará. **O Hospital**, v.48,
436 p. 61-76, 1955.
437
438 EJAZI, S.A.; BHATTACHARYA, P.; BAKHTEYAR, M.A.K.; MUMTAZ, A.A.;
439 PANDEY, K.; DAS, V.N.R.; DAS, P.; RAHAMAN; GOSWAMI, R.P.; ALI, N.
440 Noninvasive diagnosis of visceral leishmaniasis: development and evaluation of two

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

443
444 EJAZI, S.A.; GHOSH, S.; SAHA, S.; CHOUDHURY, S.T.; BHATTACHARYYA, A.;
445 CHATTERJE M. (2019) A multicentric evaluation of dipstick test for serodiagnosis
446 of visceral leishmaniasis in India, Nepal, Sri Lanka, Brazil, Ethiopia, and Spain.
447 **Scientific Reports**, v.11, p.1-7, 2019. doi: 10.1038/s41598-019-46283-9.

448
449 FERREIRA, E.C.; LANA, M.; CARNEIRO, M.; REIS, A.B.; PAES, D.V.; SILVA, E.S.;
450 et al. Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral
451 leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. **Veterinary**
452 **Parasitology**, v.146, p.235-241, 2007.

453
454 FONSECA, A.M.; FARIA, A.R.; RODRIGUES, F.T.G.; NAGEM, R.A.P.;
455 MAGALHÃES, R.D.M.; CUNHA, J.L.R.; BARTHOLOMEU, D.C.; ANDRADE, H.M.
456 Evaluation of three recombinant *Leishmania infantum* antigens in human and canine
457 visceral leishmaniasis diagnosis. **Acta Tropica**, v.137, p.25-30, 2014.

458
459 GOMES, Y.M., CAVALCANTI, M.P., LIRA, R.A., ABATH, F.G.C., ALVES, L.C.
460 Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Biotechnological advances. **The**
461 **Veterinary Journal**, v.175, p.45-52, 2008.

462
463 GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose Visceral no Brasil: Quadro Atual,
464 desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v.7(3), p.338-349,
465 2004.

466
467 GRIMALDI, J.R.; TESH, R.B. Leishmaniasis of the New World: current concepts
468 and implications for future research. **Clinical Microbiology Review**, v.36(3), p.230-
469 250, 1993.

470
471 GRIMALDI G.; TEVA, A.; FERREIRA, A.L.; SANTOS, C.B.; PINTO, I.S.; AZEVEDO,
472 C.T.; FALQUETO, A. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based
473 on Dual-Path Platform technology (DPP® CVL rapid test) for the serodiagnosis of
474 canine visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical**
475 **Medicine and Hygiene**, v.106(1), p.54-59, 2012.

476
477 JESUS M.S.; CRUZ, J.V.A.; COELHO, L.B.; BORJA, L.S.; SILVA, E.D.; SOLCÁ,
478 M.S. et al. Early detection and persistent positivity of anti-*Leishmania* antibodies
479 using a recombinant protein-based ELISA in naturally infected dogs in
480 Brazil. **Parasites & Vectors**. v.14: 398, p.1-9, 2021. doi: 10.1186/s13071-021-
481 04895-z

482
483 LAURENTI, M.D.; JUNIOR, M.V.S.L.; TOMOKANE, T.Y.; DE LUCCA, H.L.R.;
484 ASCHAR, M.; SOUZA, C.S.F.; et al. Comparative evaluation of the DPP® CVL rapid
485 test for canine serodiagnosis in area of visceral leishmaniasis. **Veterinary**
486 **Parasitology**, v.205, p.444-450, 2014.

487
488 LIMA, I.D.; LIMA, A.L.M.; MENDES-AGUIAR, C.D.O.; QUEIROZ, W.; COUTINHO,
489 V.; WILSON, M.E.; et al. Changing demographics of visceral leishmaniasis in

490 northeast Brazil: Lessons for the future. **Plos Neglected Tropical Diseases**,
491 v.12(3), p. e0006164, 2018. doi: 10.1371/journal.pntd.0006164
492
493 LOMBARDO, G.; PENNISI, M.G.; LUPO, T.; MIGLIAZZO, A.; CAPRI, A.; SOLANO-
494 GALLEO, L. Detection of *Leishmania infantum* DNA by real-time PCR in canine oral
495 and conjunctival swabs and comparison with other diagnostic techniques.
496 **Veterinary Parasitology**, v.184, p.10-17, 2012.
497
498 MAGALHÃES-JUNIOR, J.T.; MOTA, T.F.; PORFIRIO-PASSOS, G.; LARANJEIRA,
499 D.F.; FRANKE, C.R.; BARROUIN-MELO, S.M. Xenodiagnosis on dogs with visceral
500 leishmaniasis: canine and sand fly aspects related to the parasite transmission.
501 **Veterinary Parasitology**, v.223, p.120-126, 2016.
502
503 MAGALHÃES, F.B.; NETO, A.L.C.; NASCIMENTO, M.B.; SANTOS, W.J.T.;
504 MEDEIROS, Z.M.; NETO, A S.L.; et al. Evaluation of a new set of recombinant
505 antigens for the serological diagnosis of human and canine visceral leishmaniasis.
506 **PLOS One**, v.12(9), e0184867, 2017.
507
508 MAIA, C.; CAMPINO, L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune
509 response to infection. **Veterinary Parasitology**, v.158, p.274-287, 2008.
510
511 MAIA-ELKHOURY, A.N.S.; ALVES, W.A.; SOUSA-GOMES, M.L.; SENA, J.M.;
512 LUNA, E.A. Leishmaniose visceral no Brasil: evolução e desafios. **Cadernos de**
513 **Saúde Pública**, v.24(12), p. 2941-2947, 2008.
514
515 MARCELINO, A.P.; FILHO, J.A.S.; E BASTOS, C.V.; RIBEIRO, S.R.; MEDEIROS,
516 F.A.C.; REIS, I.A.; et al. Comparative PCR-based diagnosis for the detection of
517 *Leishmania infantum* in naturally infected dogs. **Acta Tropica**. v. 105495, 2020. doi:
518 10.1016/j.actatropica.2020.105495
519
520 MATEUS, N.L.F. **Diagnóstico de leishmaniose visceral canina: uso de**
521 **proteínas antigênicas de *Leishmania infantum***. 98 f. [Dissertação]. Mestrado em
522 Ciências Veterinárias – Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Mato Grosso
523 do Sul, 2018.
524
525 MATO GROSSO DO SUL. **Boletim epidemiológico Leishmaniose Visceral**
526 **Humana**. Secretaria de Estado de Saúde. Coordenadoria Estadual de Vigilância
527 Epidemiológica. Gerência Estadual de Zoonoses. 2022. 19p.
528
529 MELO NETO, O.P.; Santos, W.J.T.; CASTRO NETO, A.L.; MAGALHAES, F.B.;
530 TAVARES, D.H.C.; REZENDE, A.M.; et al. Proteína quimérica, seu método para
531 produção e uso, bem como molécula de ácido nucleico, cassete de expressão,
532 vetor de expressão, célula hospedeira, composição para diagnóstico de
533 leishmaniose, kit de diagnóstico de leishmaniose e método de diagnóstico de
534 leishmaniose in vitro, 2019, Brasil.
535 **Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020190036397,**
536 **título: "Proteína quimérica, seu método para produção e uso, bem como**
537 **molécula de ácido nucleico, cassete de expressão, vetor de expressão, célula**
538 **hospedeira, composição para diagnóstico de leishmaniose, kit de diagnóstico**

539 **de leishmaniose e método de diagnóstico de leishmaniose in vitro"**, Instituição
540 de registro: INPI - Instituto Nacional 87-91, 2016.
541
542 MOHAPATRA, S.; SAMANTARAY, J.; GHOSH, A. A comparative study of serum,
543 urine and saliva using rk39 strip for the diagnosis of visceral leishmaniasis. **Journal**
544 **of Arthropod-Borne Diseases**, v.10(1), p.87-91, 2016.
545
546 MOREIRA, M.A.B.; LUVIZOTTO, M.C.R.; GARCIA, J.F.; CORBETT, C.E.P.;
547 LAURENTI, M.D. Comparison of parasitological, immunological and molecular
548 methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs.
549 **Veterinary Parasitology**, v.145, p.245-252, 2007.
550
551 MORENO, J.; ALVAR, J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the
552 experimental model. **Trends in Parasitology**, v.18(9), p.399-405, 2002.
553
554 MURRAY, C.J.; BARBER, R.M.; FOREMAN, K.J.; ABBASOGLU OZGOREN, A.;
555 ABD-ALLAH, F.; ABERA, S.F. et al. Global, regional, and national disability-
556 adjusted life years (DALYs) for 306 diseases and injuries and healthy life
557 expectancy (HALE) for 188 countries, 1990–2013: quantifying the epidemiological
558 transition. **The Lancet**, v.386 (10009), p. 2145-2191, 2015.
559
560 OLIVEIRA, G.G.S.; MAGALHÃES, F.B.; TEIXEIRA, M.C.A.; PEREIRA, A.M.;
561 PINHEIRO, C.G.M.; SANTOS, L.R.; et al. Characterization of novel *Leishmania*
562 *infantum* recombinant proteins encoded by genes from five families with distinct
563 capacities for serodiagnosis of canine and human visceral leishmaniasis. **American**
564 **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.85(6), p.1025-1035, 2011.
565
566 PASSOS, S.; CARVALHO, L.P.; ORGE, G.; JERÔNIMO, S.M.; BEZERRA, G.;
567 SOTO, M.; et al. Recombinant *Leishmania* antigens for serodiagnosis of visceral
568 leishmaniasis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.12(10),
569 p.1164-1167, 2005.
570
571 PALATNIK-DE-SOUSA, C.B.; DAY, M.J. One Health: the global challenge of
572 epidemic and endemic leishmaniasis. **Parasites and Vectors**. v.,4, p. 197, 2011.
573 doi:10.1186/1756-3305-4-197
574
575 PEREIRA, I.E.; SILVA, K.P.; MENEGATI, L.M.; PINHEIRO, A.C.; ASSUNÇÃO,
576 E.A.O.; ARAÚJO, M.L.P. et al. Performance of recombinant proteins in diagnosis
577 and differentiation of canine visceral leishmaniasis infected and vaccinated dogs.
578 **European Journal of Microbiology & Immunology**. v.10(3), p.165-171, 2020. doi:
579 10.1556/1886.2020.00018.
580
581 PINELLI, E.; KILLICK-KENDRICK, R.; WAGENAAR, J.; BERNARDINA, W.; DEL
582 REAL, G.; RUITENBERG, J. Cellular and immune responses in dogs experimentally
583 and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infection and Immunity**, v.62(1),
584 p.229-235, 1994.
585
586 QUEIROZ, N.M.G.P.; ASSIS, J.; OLIVEIRA, T.M.F.S.; MACHADO, R.Z.; NUNES,
587 C.M.; STARKE-BUZETTI, W.A. Diagnóstico da leishmaniose visceral canina pelas

588 técnicas de imunohistoquímica e PCR em tecidos cutâneos e associação com a
589 RIFI e ELISA-teste. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19 (1), p.
590 32-38, 2010.

591
592 QUINNELL, R.J.; COURTENAY, O.; DAVIDSON, S.; GARCEZ, L.; LAMBSON, B.;
593 RAMOS, P.; et al. Detection of *Leishmania infantum* by PCR, sorology and cellular
594 immune response in a cohort study of Brazilian dogs. **Parasitology**, v.122, p.253-
595 261, 2001.

596
597 QUINNELL, R.J.; CARSON, C.; REITHINGER, R.; GARCEZ, L. M.; COURTNEY O.
598 Evaluation of rK39 rapid diagnostic tests for canine visceral leishmaniasis:
599 longitudinal study and meta-analysis. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v.7(1),
600 e1992, 2013.

601
602 RAMIREZ, L.; DE MOURA, L.D.; MATEUS, N.L.F.; DE MORAES, M.H.; DO
603 NASCIMENTO, L.F.M.; DE JESUS MELO, N.; et al. Improving the serodiagnosis of
604 canine *Leishmania infantum* infection in geographical areas of Brazil with different
605 disease prevalence. **Parasite Epidemiology and Control**. v. 8:e00126, 2020.
606 doi:10.1016/j.parepi.2019.e00126

607
608 RANGEL, E.F.; VILELA, M.L. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae,
609 Phlebotominae) and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. **Cadernos de**
610 **Saúde Pública**, v. 24 (12), p. 2948-2952, 2008.

611
612 SANTOS, T.R.; CARREIRA, V.S.; FERRARI, H.F.; MOREIRA, M.A.B.;
613 LUVIZOTTO, M.C.R. Comparison of PCR with stained slides of bone marrow and
614 lymph nodes aspirates with suspected diagnosis for leishmaniasis. **Acta Tropica**,
615 v.140, p.137-140, 2014.

616
617 SANTOS, A.R.R.D.; SERUFO, A.V.; FIGUEIREDO, M.M.; GODOI, L.C.; VITÓRIO,
618 J.G.; MARCELINO, A.P.; et al. Evaluation of three recombinant proteins for the
619 development of ELISA and immunochromatographic tests for visceral leishmaniasis
620 serodiagnosis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. e180405, 2019. doi:
621 10.1590/0074-02760180405.

622
623 SANTOS, W.J.T.; TAVARES, D.H.C.; CASTRO NETO, A.L.; NASCIMENTO,
624 M.B.; DHALIA, R.; ALBUQUERQUE, A.L.; et al. Gene design, optimization of
625 protein expression and preliminary evaluation of a new chimeric protein for the
626 serological diagnosis of both human and canine visceral
627 leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.14, p.1-21, 2020.
628 doi:10.1371/journal.pntd.0008488

629
630 SOLANO-GALLEGO, L.; KOUTINAS, A.; MIRO, G.; CARDOSO, L.; PENNISI, M.
631 G.; FERRER, L.; et al. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and
632 prevention of canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v.165, p.1-18, 2009.

633
634 SOLANO-GALLEGO, L.; MIRÓ, G.; KOUTINAS, A.; CARDOSO, L.; PENNISI, M.
635 G.; FERRER, L.; et al. LeishVet guidelines for the practical management of canine
636 leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, v.4(86), 2011. doi: 10.1186/1756-3305-4-86

637
638 SOLANO-GALLEGO, L.; CARDOSO, L.; PENNISI, M.G.; PETERSEN, C.;
639 BOURDEAU, P.; OLIVA, G.; et al. Diagnostic challenges in the era of canine
640 *Leishmania infantum* vaccines. **Trends in Parasitology**. v.33, p. 706–717, 2017.
641 doi: 10.1016/j.pt.2017.06.004.
642
643 SOUZA, G.G.; SANTOS, E.; ANDRADE-FILHO, J.D. The first report of the main
644 vector of visceral leishmaniasis in America, *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva)
645 (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), in the state of Rio Grande do Sul, Brazil.
646 **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104 (8), p.1181-1182, 2009.
647
648 TEIXEIRA, M.C.A.; OLIVEIRA, G.G.S.; SILVANY, M.A.; ALCÂNTARA-NEVES,
649 N.M.; SOARES, M.B.P.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R.; et al. A strategy for
650 identifying serodiagnostically relevant antigens of *Leishmania* or other pathogens in
651 genetic libraries. **Biologicals**. v.35, p.51-54, 2007.
652
653 VALLUR, A.C.; TUTTERROW, Y.L.; MOHAMATH, R.; PATTABHI, S.; HAILU, A.;
654 ABDOUN, A.O.; et al. Development and comparative evaluation of two antigen
655 detection tests for Visceral Leishmaniasis. **BMC Infectious Diseases**, v.15 (384),
656 2015. doi: 10.1186/s12879-015-1125-3
657

658 **2 CAPÍTULO II – ARTIGO 1 1– RECOMBINANT ELISA FOR**
659 **CANINE VISCERAL LEISHMANIASIS DIAGNOSIS IN DISTINCT**
660 **DOGS’ CLINICAL PROFILE**

661
662 Nathália Lopes Fontoura Mateus¹, Wagner José Tenório dos Santos², Osvaldo P. de Melo
663 Neto², Eliane Mattos Piranda³, Manoel Sebastião da Costa Lima Junior^{2*}, Carlos Alberto do
664 Nascimento Ramos¹
665

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

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

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

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

674

675 *manoel.lima@fiocruz.br

676

677 **ABSTRACT**

678 **Background**

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

687

688 **Methodology/principal findings**

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

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

700

701 **Conclusion**

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

707

708 **INTRODUCTION**

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

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

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

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

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

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

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

750 **METHODS**

751 **Study population**

752 Dogs' sera samples were obtained from a previous study developed by the
753 research team of Human Parasitology Laboratory at Federal University of Mato
754 Grosso do Sul (UFMS). Samples were collected from canines living at Campo
755 Grande and Camapuã, Mato Grosso do Sul State, Brazil. These samples were
756 obtained under the approval of the ethics committee (protocol n. 645/2014 and
757 697/2015) and laboratory work was performed at Fiocruz - Instituto Aggeu
758 Magalhães – Recife, Brazil, during January 2019.

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

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

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

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

789 **ELISA**

790 Before performing ELISA, the positive samples from sera bank that were
791 stored at -80°C freezer, were retested with TR-DPP® to ensure their viability. To
792 perform antigen *L. infantum* ELISA, the total extract antigen was obtained from
793 *Leishmania infantum* culture (Magalhães et al., 2017). Recombinant chimeric
794 protein (Q1 and Q5) production and purification was carried out according to the
795 protocol described by Santos et al., (2020), and the determination of protein
796 concentration was performed using the method of Bradford (1976). The chimeric
797 proteins were diluted to 600ng/ml in 50 mM Na₂HCO₃/NaHCO₃ buffer (pH 9.6), with
798 100 µl added to each well of 96-well microtiter plates. This was followed by
799 incubation at 4 °C for 16 hours and blocking with Phosphate-Buffered Saline plus
800 0.05% Tween-20 (PBS-T), pH 7.2, supplemented with 10% dry non-fat milk. Wells
801 were incubated with the selected sera at dilutions of 1:900 for 1 hour at room
802 temperature. After washing with PBS-T, the wells were incubated for 1 hour at room
803 temperature with peroxidase- conjugated goat anti-dog IgG (diluted 1:1.200, from
804 Jackson Immuno Research Laboratories, catalogue no. 304-005-003). The
805 enzymatic activity was revealed with orto-phenylenodiamine (OPD, from Sigma-
806 Aldrich) in phosphate-citrate buffer, pH 5.0, and the plates were read with the 490nm
807 filter on a Benchmark Plus Microplate Manager 5.2 (BIO-RAD). The cut off values
808 for the ELISAs were defined based on the mean plus two standard deviations of the
809 results generated with control sera from the NEG group (n=30) and were also
810 calculated using R software package *pROC* (v.1.16.2.).

811 **Statistical analysis**

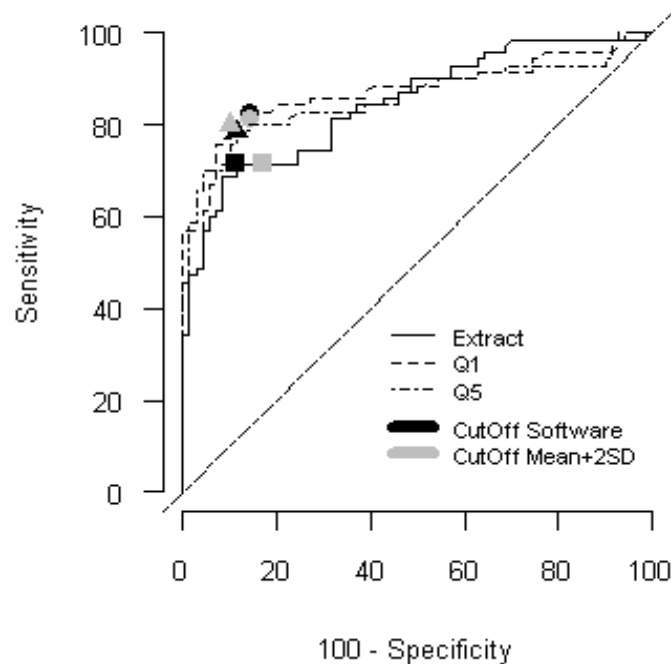
812 Statistical analysis was performed with R software
813 package *pROC* (v.1.16.2.). ANOVA test was used to compare groups, followed by
814 Kruskal Wallis test for multiple comparison of averages acquired from sera optical
815 densities (OD) of each group with Mann-Whitney post-test, considering significance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

820 RESULTS

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

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

827



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

Group	Q1					Q5					<i>L. infantum</i> extract				
	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.

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

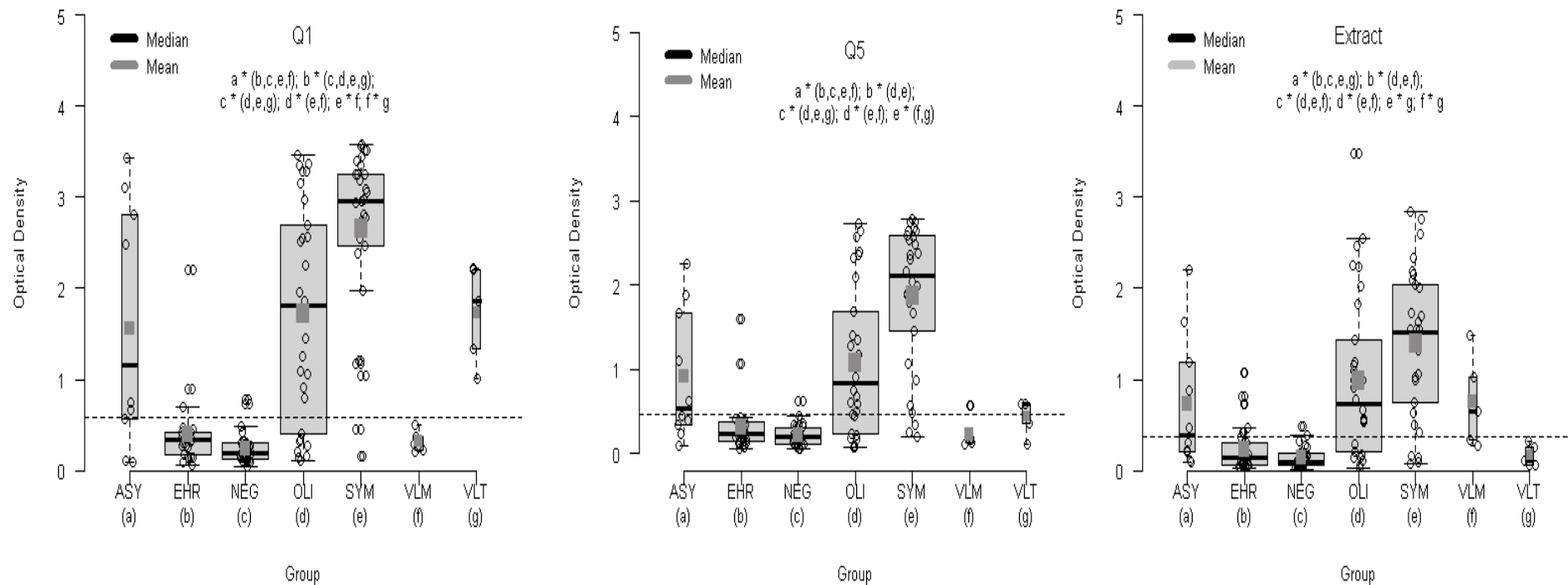
847 The chimeric recombinant protein Q5 displayed 50% of sensitivity, as the
848 total extract for detection of asymptomatic animals. Nonetheless, the chimeric
849 protein Q1 performed better in this group, with 70% of sensitivity.

850 **DISCUSSION**

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

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

863 Nevertheless, serological tests also present limitations, for example, their
864 sensibility and specificity may vary according to the antigen used (Maia and
865 Campino, 2008; Solano-Gallego et al., 2014; Ramirez et al., 2020). The use of crude
866 antigen, as previously demonstrated, can result in cross-reaction with related
867 diseases, like trypanosomiasis (Ferreira et al., 2007; Alves et al., 2012). Other
868 hemoparasites, not so similar phylogenetically, have also been reported as cause
869 of cross-reactivity in serological exams for CVL diagnosis, like *Ehrlichia canis*
870 (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).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

974 **CONCLUSION**

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

981 **ACKNOWLEDGMENTS**

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

985 **REFERENCES**

- 986 Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis
987 worldwide and global estimates of its incidence. PLoS ONE. 2012;7.
988 doi:10.1371/journal.pone.0035671
- 989
- 990 Alves AS, Mouta-Confort E, Figueiredo FB, Oliveira RVC, Schubach AO, Madeira
991 MF. Evaluation of serological cross-reactivity between canine visceral on
992 leishmaniasis and natural infection by *Trypanosoma caninum*. Research in
993 Veterinary Science. 2012;93: 1329–1333. doi:10.1016/j.rvsc.2012.07.006
- 994
- 995 Baneth G, Koutinas AF, Solano-Gallego L, Bourdeau P, Ferrer L. Canine
996 leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part
997 one. Trends in Parasitology. 2008;24(7): 324–330. doi:10.1016/j.pt.2008.04.001
- 998
- 999 Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram
1000 quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical
1001 Biochemistry. 1976;7(72): 248-54.
- 1002
- 1003 Brazilian Ministry of Health. Nota Técnica Conjunta nº 01/2011-CGDT-
1004 CGLAB/DEVIT/SVS/MS. Esclarecimentos sobre substituição do protocolo
1005 diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC). (Coordenação Geral de

1006 Doenças Transmissíveis/Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde
1007 Pública). Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2011.

1008

1009 Brazilian Ministry of Health. Health Surveillance Secretariat. Manual de vigilância e
1010 controle da leishmaniose visceral. Brasília, DF: Ministério da Saúde. 2014.

1011

1012 Burza S, Croft SL, Boelaert M. Leishmaniasis. The Lancet. Lancet Publishing
1013 Group. 2018; 951–970. doi:10.1016/S0140-6736(18)31204-2

1014

1015 Carret C, Walas F, Carcy B, Grande N, Précigout E, Moubri K et
1016 al. *Babesia canis canis*, *Babesia canis vogeli*, *Babesia canis rossi*: differentiation of
1017 the three subspecies by a restriction length polymorphism analysis on amplified
1018 small subunit ribosomal RNA genes. Journal of Eukaryotic Microbiology. 1999;
1019 46(3):298-303.

1020

1021 Carson C, Antoniou M, Christodoulou V, Messaritakis I, Quinnell RJ, Blackwell JM,
1022 et al. Selection of appropriate serological tests to measure the incidence of natural
1023 *Leishmania infantum* infection during DNA/MVA prime/boost canine vaccine trials.
1024 Veterinary Parasitology. 2009;162: 207–213. doi:10.1016/j.vetpar.2009.03.037

1025

1026 Carvalho FLN, Riboldi EO, Bello GL, Ramos RR, Barcellos RB, Gehlen M, et al.
1027 Canine visceral leishmaniasis diagnosis: a comparative performance of serological
1028 and molecular tests in symptomatic and asymptomatic dogs. Epidemiology and
1029 Infection. 2018;146:571-576. doi: 10.1017/S0950268818000225

1030

1031 Dawson JE, Stallknecht DE, Howerth EW, Warner C, Biggie K, Davidson WR et al.
1032 Susceptibility of White-Tailed Deer (*Odocoileus virginianus*) to Infection with
1033 *Ehrlichia chaffeensis*, the Etiologic Agent of Human Ehrlichiosis. Journal
1034 of Clinical Microbiology. 1994; 32(11):2725-2728.

1035

1036 Dawson JE, Warner CK, Standaert S, Olson J G. The interface between research
1037 and the diagnosis of an emerging tick-borne disease, human ehrlichiosis due to
1038 *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

1102 Oliveira TMF, Furuta PI, Carvalho D, Machado RZ. A study of cross-reactivity in
1103 serum samples from dogs positive for *Leishmania* sp., *Babesia canis* and *Ehrlichia*
1104 *canis* in enzyme-linked immunosorbent assay and indirect fluorescent antibody test.
1105 Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária. 2008; 11:7–11. doi: 10.1590/S1984-
1106 29612008000100002
1107
1108 Oliveira GGS, Magalhães FB, Teixeira MCA, Pereira AM, Pinheiro CGM, Santos
1109 LR, et al. Characterization of novel *Leishmania infantum* recombinant proteins
1110 encoded by genes from five families with distinct capacities for serodiagnosis of
1111 canine and human visceral leishmaniasis. American Journal of Tropical
1112 Medicine and Hygiene. 2011;85(6):1025–1034. doi:10.4269/ajtmh.2011;11-0102
1113
1114 PAHO. Manual of procedures for surveillance and control of leishmaniasis in the
1115 Americas. Washington, D. C.: Pan American Health Organization; 2019.
1116
1117 Pereira IE, Silva KP, Menegati M, Pinheiro AC, Elaine A, Lourdes MDE, et al.
1118 Performance of recombinant proteins in diagnosis and differentiation of canine
1119 visceral leishmaniasis infected and vaccinated dogs. European Journal of
1120 Microbiology and Immunology. 2020;10(3):165-171. doi: 10.1556/1886.2020.00018
1121
1122 Ramirez L, de Moura LD, Mateus NLF, de Moraes MH, do Nascimento LFM, de
1123 Jesus Melo N, et al. Improving the serodiagnosis of canine *Leishmania infantum*
1124 infection in geographical areas of Brazil with different disease
1125 prevalence. Parasite Epidemiology and Control.2020;8:e00126.
1126 doi:10.1016/j.parepi.2019.e00126
1127
1128 Santos WJT, Tavares DHC, Castro Neto AL, Nascimento MB, Dhália R,
1129 Albuquerque AL, et al. Gene design, optimization of protein expression and
1130 preliminary evaluation of a new chimeric protein for the serological diagnosis of both
1131 human and canine visceral leishmaniasis. PLoS Neglected Tropical Diseases.
1132 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/>

1161 **3 CAPÍTULO III – ARTIGO 2²– AVALIAÇÃO DE TESTE**
1162 **SOROLÓGICO RÁPIDO NO DIAGNÓSTICO DE CÃES COM**
1163 **DIFERENTES PERFIS CLÍNICOS NATURALMENTE**
1164 **INFECTADOS POR *LEISHMANIA INFANTUM***

1165

1166 **Nathália Lopes Fontoura Mateus¹, Herintha Coeto Neitzke-Abreu², Manoel Sebastião**
1167 **da Costa Lima-Junior³, Nahid Ali^{4*}, Sarfaraz Ahmad Ejazi⁴, Carlos Alberto do**
1168 **Nascimento Ramos¹**

1169

1170 ¹ Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do
1171 Sul (UFMS), Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

1172 ² Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD),
1173 Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil.

1174 ³ Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, Pernambuco, Brasil.

1175 ⁴ CSIR- Instituto Indiano de Biologia Química, Kolkata, Índia.

1176

1177 ***Correspondence:** Nahid Ali, nali@iicb.res.in

1178

1179 **Keywords:** Dipstick, *Ehrlichia canis*, leishmaniose visceral canina, Leish-Tec[®], teste
1180 imunocromatográfico.

1181

1182 **RESUMO**

1183 A leishmaniose visceral é uma das principais doenças tropicais negligenciadas do mundo,
1184 tendo os cães domésticos como reservatório urbano do parasita *Leishmania infantum* nas
1185 Américas. O diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC) faz parte das medidas de
1186 controle desta zoonose, uma vez que os casos caninos usualmente precedem os casos
1187 humanos. Técnicas sorológicas são amplamente utilizadas para o diagnóstico da LVC,
1188 porém apresentam limitações quanto a sensibilidade e especificidade, de acordo com o
1189 antígeno utilizado e apresentação clínica do paciente. O presente estudo avaliou
1190 sensibilidade e especificidade de um teste rápido sorológico, na apresentação *dipstick*, no
1191 diagnóstico de cães naturalmente infectados por *L. infantum* sintomáticos (n=15),
1192 oligossintomáticos (n=15), assintomáticos (n=9), saudáveis (n=15), vacinados com Leish-
1193 Tec[®] (n=5) e infectados com *Ehrlichia canis* (n=15). O teste apresentou maior sensibilidade
1194 no grupo oligossintomáticos (93,33%), seguido dos assintomáticos (77,78%) e sintomáticos
1195 (73,33%) e apresentou 100% de especificidade. O teste rápido *dipstick* mostrou-se uma
1196 ferramenta útil no diagnóstico da LVC devido a praticidade de realização a campo,
1197 principalmente, nos casos em que a infecção por *E. canis* pode ser um diagnóstico diferencial
1198 do paciente.

1199

1200 **INTRODUÇÃO**

1201 A leishmaniose visceral (LV) é uma das principais doenças tropicais negligenciadas
1202 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*.

1203 Índia e Brasil (Dhamnetyia et al., 2021). Na Índia descreve-se o ciclo antroponótico do
1204 protozoário flagelado *Leishmania donovani*, o qual tem como vetor flebotomíneos de hábito
1205 antropofílico, sendo o ser humano caracterizado neste ciclo por altas cargas parasitárias no
1206 sangue e na pele (Adler and Theodor, 1932; Palatnik-de-Souza et al., 2001).

1207 Já no Brasil, país responsável por 90% dos casos de LV na América Latina (Alvar et al.,
1208 2012), destaca-se o ciclo zoonótico associado a espécie *L. infantum* que tem como principal
1209 reservatório o cão doméstico (Deane e Deane, 1962; Palatnik-de-Souza e Day, 2011). Neste
1210 ciclo, os cães possuem alto parasitismo na pele e, portanto, representam o principal
1211 reservatório urbano do parasita (Palatnik-de-Souza et al., 2001).

1212 Os casos de leishmaniose visceral canina (LVC) usualmente precedem os casos da
1213 enfermidade humana, refletindo a importância do monitoramento da infecção canina como
1214 um possível marcador de transmissão de *L. infantum* para a população humana (Peixoto et
1215 al., 2014). No entanto, o diagnóstico preciso da LVC é um dos maiores entraves para o
1216 controle desta antropozoonose (Moreira et al., 2007).

1217 Atualmente, utiliza-se a reação de imunoadsorção enzimática (ELISA) como teste
1218 confirmatório pelo Ministério da Saúde para o diagnóstico da LVC (Brasil, 2011). Contudo,
1219 resultados falsos positivos são descritos em associação a técnicas de diagnóstico sorológico
1220 da LV devido a utilização de antígenos brutos solúveis do parasita no ELISA, o qual
1221 apresenta alta sensibilidade, porém baixa especificidade devido à proximidade antigênica de
1222 *Leishmania* sp. a outros protozoários patogênicos que apresentam epítomos semelhantes
1223 (Ferreira et al., 2007).

1224 Sendo assim, em busca de métodos diagnósticos mais acurados e práticos para utilização
1225 em locais desprovidos de equipamentos laboratoriais onerosos e alta capacitação
1226 profissional, Ejazi et al., (2019) desenvolveram um método ELISA baseado em antígenos
1227 de membrana de promastigota de *L. donovani* impregnados em tiras reagentes para
1228 diagnóstico da LV humana.

1229 O presente estudo tem como objetivo avaliar a sensibilidade, especificidade, de um novo
1230 teste sorológico *dipstick* desenvolvido por Ejazi et al., (2019) no diagnóstico da leishmaniose
1231 visceral canina em cães com perfis clínicos distintos.

1232

1233 MATERIAL E MÉTODOS

1234 População de estudo

1235 As amostras de soros dos cães foram obtidas do banco sorológico do Laboratório de
1236 Parasitologia Humana da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS); as quais
1237 advieram de cães residentes nos municípios de Campo Grande e Camapuã, Mato Grosso do
1238 Sul, Brasil. As amostras foram estocadas em freezer -80°C e as análises laboratoriais foram
1239 processadas na Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD) no Laboratório de
1240 Pesquisas em Ciências da Saúde.

1241 As amostras de cães diagnosticados com LVC obtidas a partir do banco sorológico
1242 foram provenientes de animais cuja infecção foi comprovada por meio do exame
1243 parasitológico direto (visualização de formas amastigotas em aspirado de linfonodo) e teste
1244 imunocromatográfico TR-DPP® (Bio-Manguinhos/ Fiocruz/ Brazil) positivo. Previamente à
1245 realização do experimento com teste *dipstick*, as amostras positivas foram retestadas pelo
1246 TR-DPP® para avaliação da viabilidade das amostras, considerando aptas a serem utilizadas
1247 no experimento, apenas aquelas que não apresentaram degradação de anticorpos e
1248 mantiveram-se positivas no teste.

1249 Os cães do banco sorológico foram avaliados fisicamente por médico veterinário em
1250 busca de sinais clínicos de LVC: caquexia; pelagem opaca/quebradiça; aumento de
1251 linfonodos; lesões e/ou despigmentação no focinho e nos lábios; lesões em ponta de orelha;
1252 dermatite esfoliativa; secreção ocular; alopecia; blefarite e sangramento nasal (adaptado de
1253 Figueiredo et al., 2018). De acordo com o número de sinais clínicos apresentados, os animais
1254 foram classificados em assintomáticos (n= 9) na ausência de manifestações clínicas;
1255 oligossintomáticos (n=15) na presença de até três sinais clínicos e sintomáticos (n = 15)
1256 quando mais de três sinais clínicos foram observados.

1257 As amostras que formaram o grupo negativo (n = 15) foram obtidas de cães cujo
1258 exame parasitológico direto de aspirado de linfonodo não revelou a presença do protozoário,
1259 associado ao resultado negativo no teste imunocromatográfico TR-DPP® (Bio-Manguinhos/
1260 Fiocruz/ Brazil) e do resultado negativo para os seguintes hemoparasitas: *Ehrlichia canis*
1261 (Dawson et al., 1994; 1996), *Babesia canis* (Carret et al., 1999) and *Anaplasma platys*
1262 (Inokuma et al., 2002) por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR).

1263 Amostras de cães negativos (parasitológico de linfonodo e TR-DPP®) para LVC, *A.*
1264 *platys* e *B. canis*, porém infectados por *E. canis* compuseram o grupo de animais
1265 diagnosticados com erliquiose (n=15). Amostras de cães vacinados (n=5) também foram
1266 utilizadas, sendo provenientes de cães negativos (parasitológico de linfonodo e TR-DPP®)
1267 para LVC e hemoparasitas, vacinados com a vacina Leish-Tec®(Ceva Saúde Animal Ltda,
1268 Paulínea, São Paulo, Brasil) há pelo menos 3 meses.

1269 **Fitas reagentes (teste dipstick)**

1270 As fitas reagentes (*dipstick*) foram cedidas pelo Instituto Indiano de Biologia
1271 Química, na pessoa da professora Dr^a. Nahid Ali e utilizadas de acordo com o protocolo de
1272 Ejazi et al., (2019).

1273 As fitas de membrana de nitrocelulose contêm uma linha teste, na qual utilizou-se
1274 1,5 µg do antígeno de membrana de promastigota de *Leishmania donovani* e uma linha
1275 controle na qual utilizou-se a diluição de 1:20 do conjugado anti-IgG de cão com peroxidase
1276 (SIGMA N° Cat: A6792). Os soros foram diluídos em 1:3500 em solução de lavagem
1277 (100mM Tris-Buffered-Saline -TBS, pH 7.4 + 0.05% Tween 20) e em seguida as fitas foram
1278 incubadas nos respectivos soros em tubos de polipropileno de 2ml, por 30 minutos a
1279 temperatura ambiente. Posteriormente, as fitas foram lavadas na solução de lavagem duas
1280 vezes. Em sequência, as fitas foram incubadas em tubos de polipropileno de 2ml com o
1281 conjugado anti-IgG de cão na diluição de 1:2000 em solução de lavagem, por 30 minutos
1282 em temperatura ambiente. As fitas foram lavadas duas vezes com solução de lavagem e
1283 depois, apenas com TBS (100mM TBS, pH 7.4). As fitas foram imergidas na solução de
1284 revelação (5 mg 3-3'-Diaminobenzidine em 10 ml 100mM TBS, pH 7.4 + 10 µl H₂O₂)
1285 durante 2 minutos e em seguida foram lavadas em água destilada por 5 minutos e colocadas
1286 para secagem e leitura a olho nu, sendo a presença de apenas uma linha – controle –
1287 indicativo de resultado não reagente e, a presença de duas linhas – controle e teste, indicativo
1288 de resultado reagente.

1289 **Análise estatística**

1290 Após tabulação dos resultados, valores de sensibilidade, especificidade foram
1291 calculados por meio do software Medcalc v. 15.8.

1292 As diferenças entre as proporções de resultados positivos entre os grupos foram
1293 avaliadas pelo teste exato de Fisher, com nível de significância de 5%.

1294 RESULTADOS

1295 O teste de fitas reagentes (*dipstick*) apresentou sensibilidade geral de 82,05% e
1296 especificidade de 100%, com melhor desempenho para identificação dos pacientes que
1297 apresentavam entre um e três sinais clínicos (oligossintomáticos) (Tabela 1), embora não se
1298 tenha observado diferença estatisticamente significativa ($p=0,43$).

1299 Não se observou reação cruzada com amostras de cães vacinados com Leish-Tec®
1300 ou infectados por *E. canis*.

1301

1302 Tabela 2. Sensibilidade, especificidade e acurácia do teste *dipstick* com amostras sorológicas de cães
1303 naturalmente infectados por *Leishmania infantum* sintomáticos (n=15), oligossintomáticos (n=15) e
1304 assintomáticos (n=9); cães negativos para leishmaniose visceral canina (LVC-negativo) e
1305 hemoparasitas (*L. infantum*, *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Babesia canis*), infectados por
1306 *Ehrlichia canis* (n=15) e cães (*L. infantum*, *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Babesia canis*)-
1307 negativos vacinados com Leish-Tec® (n=5).
1308

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

1309

1310

1311 DISCUSSÃO

1312 Cães com leishmaniose visceral canina podem apresentar diferentes respostas à
1313 infecção pelo parasita *Leishmania infantum*. São caracterizados dois perfis principais de
1314 resposta à infecção pelo protozoário: o perfil Th1 e o Th2. Este último é marcado por
1315 acentuada produção de anticorpos, ineficazes na eliminação do parasita e, responsáveis
1316 por diversos sinais clínicos devido a lesões imunomediadas pelos complexos antígeno-
1317 anticorpos (Solano-Gallego et al., 2011). Pacientes Th2 são facilmente reconhecidos por
1318 métodos sorológicos de diagnóstico devido a intensa resposta imune humoral do
1319 hospedeiro (Solano-Gallego et al., 2011), fato representado pela maior sensibilidade
1320 neste estudo para reconhecimento de animais oligossintomáticos.

1321 Sabe-se que há correlação entre a produção de anticorpos e presença de sinais
1322 clínicos no hospedeiro; sendo esperado maior sensibilidade dos testes sorológicos em
1323 animais sintomáticos do que assintomáticos, devido a maior hipergamaglobulinemia (Da
1324 Costa Val et al., 2007; Cândido et al., 2008)

1325 Contudo, no presente estudo foi observado maior sensibilidade do teste *dipstick* em
1326 pacientes oligossintomáticos e assintomáticos do que polissintomáticos. Cândido et al.
1327 (2008) também obtiveram maior sensibilidade para o diagnóstico sorológico em animais
1328 oligossintomáticos (90%) do que em pacientes com mais de três sinais clínicos (86,7%),
1329 ao utilizar um ELISA contendo o complexo antigênico fucose-manose ligante (FML) de
1330 *L. donovani*. Da mesma forma, Lemos et al. (2008) demonstraram maior sensibilidade
1331 no diagnóstico de animais oligossintomáticos (88%) do que sintomáticos (84%) pelo

1332 teste rápido imunocromatográfico Kalazar Detect[®], baseado em antígeno rK39 de *L.*
1333 *infantum*.

1334 Este fato pode estar associado à formação de complexos antígeno-anticorpo em
1335 animais com hipergamaglobulinemia, uma vez que os complexos imunes podem
1336 representar um fator limitante nos métodos diagnósticos sorológicos (De Carvalho et al.,
1337 2013; 2019; 2020). Ademais, pacientes sintomáticos refletem estágios mais avançados
1338 da doença, como demonstrado por Nicolato et al. (2013), os quais reportaram linfopenia
1339 como disfunção hematológica observada em cães com apresentação clínica severa da
1340 doença. A linfopenia pode justificar a redução da produção de anticorpos contra o
1341 parasita, além de estar associada a pior prognóstico para o paciente (Geisweid et al.,
1342 2012).

1343 A presença de sinais clínicos também está associada ao grau de infectividade do
1344 hospedeiro ao vetor, sendo os cães sintomáticos e oligossintomáticos mais eficazes em
1345 infectar o flebotômio (Da Costa Val et al., 2007). Por outro lado, cães com perfil de
1346 resposta imune Th1, contam com a defesa celular, a qual é mais eficiente na eliminação
1347 do protozoário do que a produção de anticorpos. A atividade leishmanicida de
1348 macrófagos e a síntese de óxido nítrico levam à redução da carga parasitária e, portanto,
1349 manifestações clínicas menos intensas e menor infectividade ao vetor são esperadas (Da
1350 Costa Val et al., 2007; Solano Gallego et al., 2009; 2011).

1351 Contudo, Laurenti et al. (2013) demonstraram a importância epidemiológica do cão
1352 assintomático ao evidenciarem 93% de infecção pelo flebótomo *Lutzomyia longipalpis*
1353 durante o xenodiagnóstico em animais sem sinais clínicos. Desta forma, métodos
1354 diagnósticos para LVC a serem empregados como parte das medidas de controle contra
1355 esta zoonose, devem ser capazes de identificar estes possíveis reservatórios do parasita
1356 no meio urbano.

1357 Outros testes rápidos sorológicos, baseados no antígeno recombinante rK39 de *L.*
1358 *infantum* também apresentaram desempenho inferior na detecção dos cães
1359 assintomáticos, como o teste Dia-Med-Vet-IT-Leish (Cressier sur Morat, Suíça)
1360 (52,9%), na forma de apresentação *dipstick* e o imunocromatográfico Kalazar Detect[®]
1361 (Inbios International, Seattle, WA, EUA) (75%) (Mettler et al., 2005; Lemos et al.,
1362 2008).

1363 O teste rápido *Dual-Path Platform immunochromatographic test -TR-DPP[®]* (Bio-
1364 Manguinhos/FIOCRUZ – Rio de Janeiro, RJ, Brasil), também utiliza o antígeno
1365 recombinante rK39 e faz parte do protocolo de diagnóstico da LVC utilizado pelo
1366 Ministério da Saúde (Brasil, 2011). Esta técnica é utilizada como triagem, sendo apenas
1367 os animais positivos por este método, submetidos ao ELISA confirmatório. Contudo,
1368 Grimaldi et al. (2012) encontraram baixa sensibilidade (47%) do TR-DPP[®] no
1369 diagnóstico de cães assintomáticos, favorecendo a manutenção de hospedeiros
1370 infectados e perpetuação da doença.

1371 Borges et al. (2021) também avaliaram o desempenho do TR-DPP[®] em pacientes
1372 assintomáticos oriundos de Camapuã (Mato Grosso do Sul, Brasil), região de
1373 transmissão esporádica para leishmaniose visceral de acordo com a classificação do
1374 Ministério da Saúde e obtiveram sensibilidade de 62%. Desta região advieram 8/10
1375 animais que compuseram o grupo assintomático no presente estudo; destacando, assim,
1376 a maior sensibilidade do teste *dipstick* para animais assintomáticos (77,78%) e,
1377 reduzindo o número de animais falsos negativos a permanecerem sem diagnóstico no
1378 ambiente.

1379 Com intuito de aumentar a sensibilidade e especificidade dos testes sorológicos,
1380 reduzindo assim resultados falsos negativos e positivos, propagou-se a pesquisa de
1381 antígenos específicos em substituição ao antígeno total, usualmente utilizado em testes
1382 sorológicos. O ELISA EIE® (Biomanguinhos, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil),
1383 recomendado pelo Ministério da Saúde brasileiro como teste confirmatório para o
1384 diagnóstico da LVC, utiliza o antígeno solúvel de *Leishmania major*-like
1385 (MHOM/BR/76/JOF) em sua composição. Contudo, reações cruzadas em amostras de
1386 caninos infectados por outros patógenos com epítomos antigênicos semelhantes a *L.*
1387 *infantum*, tais como os tripanossomatídeos e a bactéria *Ehrlichia canis* já foram relatadas
1388 (Ferreira et al., 2007; Alves et al., 2012; Pereira et al., 2020).

1389 A erliquiose canina é uma hemoparasitose frequente entre os cães de área endêmica
1390 para LVC, transmitida pela picada do carrapato *Rhipicephalus sanguineus*. Esta
1391 hemoparasitose é caracterizada por manifestações clínicas (linfadenomegalia, apatia,
1392 perda de peso, glomerulonefrite, uveíte, poliartrite) e hematológicas (anemia,
1393 trombocitopenia, hipergamaglobulinemia) semelhantes à leishmaniose visceral canina
1394 (Nakaghi et al., 2008), o que dificulta a diferenciação entre ambas pelo médico
1395 veterinário, e pode levar a eutanásias despropositadas por resultados falsos positivos.

1396 Isto posto, frequentemente utilizam-se associações de técnicas diagnósticas para
1397 obtenção de um diagnóstico conclusivo para LVC. A técnica de reação em cadeia da
1398 polimerase apresenta alta sensibilidade e especificidade na identificação de cães
1399 sintomáticos e assintomáticos para LVC (De Carvalho et al., 2018). Esta técnica também
1400 pode ser utilizada para confirmação da infecção por *E. canis*, assim como técnicas
1401 sorológicas, baseadas na titulação de anticorpos (Nakaghi et al., 2008). Todavia, a
1402 realização de ELISA e/ou PCR requerem laboratórios equipados e profissionais
1403 treinados para execução das técnicas, sendo assim, consideradas laboriosas e
1404 dispendiosas (Pereira et al., 2020).

1405 Frente às considerações expostas, o teste rápido *dipstick* de Ejazi et al. (2019) possui
1406 facilidade de execução e potencial para produção em plataforma imunocromatográfica.
1407 No presente estudo, observou-se desempenho eficaz no diagnóstico de cães naturalmente
1408 infectados por *L. infantum*, destacando-se a sensibilidade em animais oligossintomáticos
1409 e a especificidade de 100% entre os cães vacinados com Leish-Tec® e infectados por *E.*
1410 *canis*. Assim, pode-se considerá-lo um grande aliado em regiões com déficit de
1411 equipamentos e laboratórios de suporte e, principalmente, em situações de suspeita de
1412 erliquiose canina como diagnóstico diferencial.

1413 Para validação de um teste sorológico, é necessário que o mesmo seja testado com
1414 amostras provenientes de regiões geográficas distintas, uma vez que a prevalência da
1415 LVC pode influenciar nos valores de sensibilidade e especificidade do teste (Mendonça
1416 et al 2017; Ramírez et al., 2019). Ressalta-se que o presente teste já foi submetido a uma
1417 avaliação multicêntrica em seis países diferentes (Brasil, Etiópia, Índia, Sri Lanka,
1418 Espanha e Nepal) para o diagnóstico de leishmaniose visceral humana e demonstrou
1419 valores de sensibilidade e especificidade variando entre 60%-100% e 79,06-100%,
1420 respectivamente (Ejazi et al., 2019). Desta maneira, o teste rápido *dipstick* possui
1421 aplicabilidade tanto no cenário da doença em seres humanos, como nos caninos, o que
1422 pode reduzir custos de produção e facilitar a distribuição do produto em regiões menos
1423 desenvolvidas.

1424
1425

DECLARAÇÃO DE ÉTICA

1426 As amostras foram coletadas entre 2015 e 2017 sob aprovação do comitê de ética da
1427 UFMS (protocolos 645/2014 e 697/2015) com consentimento dos tutores após assinatura do
1428 termo de consentimento livre esclarecido.
1429

1430 REFERÊNCIAS

1431 Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux, P, Cano J, Janin J, Den Boer M, Who
1432 LCT. (2012) Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. Plos One.
1433 7(5): e35671. doi: 10.1371/journal.pone.0035671.
1434

1435 Adler S, Theodor O. (1932). Investigations on Mediterranean Kalazar VI canine visceral
1436 leishmaniasis. Proc. Royal Soc. B: Bio. Sci. 110: 402-412. doi: 10.1098/rspb.1932.0035.
1437

1438 Alves, AS, Mouta-Confort E, Figueiredo FB, Oliveira RVC, Schubach AO, Madeira,
1439 MF. (2012). Evaluation of serological cross-reactivity between canine visceral
1440 leishmaniasis and natural infection by *Trypanosoma caninum*. Res. Vet. Sci.. 93 (3):
1441 1329-1333. doi: 10.1016/j.rvsc.2012.07.006.
1442

1443 Brasil, Ministério da Saúde. (2011) Nota Técnica Conjunta nº 01/2011-CGDT-
1444 CGLAB/DEVIT/SVS/MS. Esclarecimentos sobre substituição do protocolo diagnóstico
1445 da leishmaniose visceral canina (LVC). (Coordenação Geral de Doenças
1446 Transmissíveis/Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde
1447 Pública). Brasília. Ministério da Saúde.
1448

1449 Borges, LM, de Oliveira AG, Mateus NLF, de Oliveira EF, Arrua AEC, Infran JOM, et
1450 al. (2021). Canine visceral leishmaniasis in an area of sporadic transmission in Brazil.
1451 Vector Borne Zoonotic Dis. 21 (7): 539-545. doi: 10.1089/vbz.2020.2701
1452

1453 Cândido TC, Perri SHV, Gerzoschkwitz TO, Luzivotto MCR, Lima VMF. (2008).
1454 Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay based on crude and
1455 purified antigen of canine visceral leishmaniasis in symptomatic and oligosymptomatic
1456 dogs. Vet. Parasitol. 157 (3-4): 175-181. doi: 10.1016/j.vetpar.2008.08.010.
1457

1458 Carret C, Walas F, Carcy B, Grande N, Précigout E, Moubri K et al. (1999).
1459 *Babesia canis canis*, *Babesia canis vogeli*, *Babesia canis rossi*: differentiation of the
1460 three subspecies by a restriction length polymorphism analysis on amplified small
1461 subunit ribosomal RNA genes. J. Eukaryo. Microbiol. 46 (3): 298-303. doi:
1462 10.1111/j.1550-7408.1999.tb05128.x.
1463

1464 Da Costa-Val AP, Cavalvanti RR, Gontijo NF, Michalick SM, Alexander B, Williams
1465 P, et al. (2007). Canine visceral leishmaniasis: relationships between clinical status,
1466 humoral immune response, hematology and *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis*
1467 infectivity. Vet. J. 174 (3): 636-643. doi: 10.1016/j.tvjl.2006.11.006.
1468

1469 Dawson JE, Stallknecht DE, Howerth EW, Warner C, Biggie K, Davidson WR et al.
1470 (1994). Susceptibility of White-Tailed Deer (*Odocoileus virginianus*) to Infection with
1471 Ehrlichia chaffeensis, the Etiologic Agent of Human Ehrlichiosis. J. Clin. Microbiol. 32
1472 (11): 2725-2728. doi: 10.1128/jcm.32.11.2725-2728.1994.
1473

- 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

1581 **4 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

1582 O teste rápido *dipstick* de Ejazi et al. (2019) possui facilidade de execução e
1583 potencial para produção em plataforma imunocromatográfica, tendo sido
1584 demonstrado no presente estudo desempenho eficaz no diagnóstico de cães
1585 naturalmente infectados por *L. infantum*, destacando-se a sensibilidade em animais
1586 oligossintomáticos e assintomáticos, e a especificidade de 100% entre os cães
1587 vacinados com Leish-Tec® e infectados por *Ehrlichia canis*. Assim, pode-se
1588 considerá-lo um grande aliado em regiões com déficit de equipamentos e
1589 laboratórios de suporte e, principalmente, em situações de suspeita de erliquiose
1590 canina como diagnóstico diferencial.

1591 Com relação as proteínas quiméricas Q1 e Q5, este trabalho demonstrou a
1592 sensibilidade e especificidade superior das mesmas, quando comparadas ao
1593 extrato total bruto de *Leishmania infantum*. Destaca-se que a proteína Q5
1594 apresentou 90% de especificidade quando utilizada em um cenário de difícil
1595 diagnóstico, incluindo cães infectados com *E. canis* e animais vacinados. Além
1596 disso, Q5 pode ser um antígeno promissor para uso no diagnóstico da leishmaniose
1597 visceral humana também, como demonstrado por outros estudos.

1598 Para validação dos testes sorológicos aqui previamente estudados, são
1599 necessários mais estudos incluindo um número amostral maior de cães vacinados
1600 e infectados com outros hemoparasitas, além de amostras provenientes de regiões
1601 geográficas distintas, uma vez que a prevalência da leishmaniose visceral canina
1602 pode influenciar nos valores de sensibilidade e especificidade do teste.

1603 **5 IMPACTO ECONÔMICO, SOCIAL, TECNOLÓGICO E/OU**
1604 **INOVAÇÃO**

1605 A avaliação do desempenho de um teste diagnóstico em diferentes perfis
1606 clínicos é parte importante do processo de validação da técnica antes da
1607 recomendação da produção em larga escala e usabilidade em cenário nacional.

1608 Destaca-se que as quimeras aqui testadas são de produção nacional e maior
1609 rapidez de obtenção e pureza do antígeno do que o antígeno obtido a partir do
1610 extrato total de *Leishmania infantum*. Além disso a quimera Q5 possui potencial
1611 diagnóstico para leishmaniose visceral canina e humana, reduzindo custos de
1612 produção e facilitando a distribuição do teste pelos centros de diagnóstico do país,
1613 reduzindo problemas como escassez do teste e ausência de matéria prima para
1614 produção.

1615 Este é o primeiro estudo a avaliar o desempenho de Q1 e Q5 em animais com
1616 perfis clínicos distintos (sintomáticos, oligossintomáticos e assintomáticos),
1617 saudáveis, vacinados e infectados por *Ehrlichia canis*, de maneira a simular
1618 cenários de difícil diagnóstico, os quais são comumente encontrados pelo país.

1619 A avaliação do desempenho do teste *dipstick* indiano em amostras caninas com
1620 diferentes perfis clínicos demonstrou o potencial de utilização do teste em
1621 municípios brasileiros menores, desprovidos de instalações laboratoriais
1622 equipadas, uma vez que a técnica não necessita complexa capacitação laboratorial
1623 e emprega apenas vidrarias, micropipetas e reagentes laboratoriais, não sendo
1624 necessário aparelhos onerosos como o espectrofotômetro.

1625