MAHYUMI FUJIMORI

# Validação de ensaio imunoenzimático (ELISA) com antígenos recombinantes no diagnóstico sorológico da infecção canina por *Leishmania infantum*

Tese apresentada ao Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional

Orientadora: Profa. Dra. Hiro Goto

SÃO PAULO
2019

*A compaixão para com os animais é das mais nobres virtudes da natureza humana.*
***Charles Darwin***

*Nem tudo é como você quer*
*Nem tudo pode ser perfeito*
*Pode ser fácil se você*
*Ver o mundo de outro jeito*

***Não olhe pra trás***
***CAPITAL INICIAL***

*Às mulheres da minha vida, minha mãe,* ***Sayoko Suguimoto Fujimori****, minhas irmãs,* ***Mahmi Fujimori e Mary Fujimori Kamikihara*** *e minha batian,* ***Sakae Fujimori*** *"in memorian". Muito obrigada por acreditarem em mim e me ensinarem a sonhar e lutar. Com o incentivo de vocês eu sonhei e lutei e agora essa fase se encerrou graças a esse apoio. Meu eterno carinho.*

*Ao meu pai,* ***Shoichi Fujimori****, que sempre me incentivou a estudar e agarrar com dedicação todas as oportunidades.*

*À **Profa. Dra. Hiro Goto**, a quem tenho profundo respeito, por me dar a grande oportunidade de trilhar o caminho da pesquisa. Muito obrigada por ter aceitado o desafio de me orientar. "Meu primeiro grande SIM". Agradeço pelos ensinamentos, dedicação, profissionalismo e paciência.*

*À **Dra. Maria Carmen Arroyo Sanchez**, por tudo! Que me ensinou muito mais do que padronizar um teste ELISA ou fazer uma Curva ROC, ensinou que a diferença está nos mínimos detalhes. Obrigada pela paciência e por partilhar tempo e vida comigo.*

*Às amigas, **Mariane Pereira Brito**, **Edite Hatsumi Yamashiro Kanashiro** e **Fernanda Narangeira de Araújo** por me ajudarem em um dos momentos mais difíceis da minha vida. Vocês me apoiaram, dedicaram tempo e me ajudaram a encontrar a felicidade novamente. Muito obrigada por todo carinho. Amo vocês!*

*Aos colegas de laboratório, "Grupo Hiro e Angelo", **Luiz, Ruth, Berna, Luiza, Eduardo, Vinícius e Jaqueline**, muito obrigada pela companhia e boas risadas.*

*Aos profissionais, **Prof. Dr. José Angelo Lindoso, Prof. Dr. Paulo C. Cotrim, Técnica** Mussya **C. Rocha, Dra. Christiane Yumi Ozaki, Profa. Dra. Thelma S. Okay, Dra. Kelly A. Kanunfre, Dra Lídia Yamamoto, Msc. Beatriz Julieta Celeste, Dra. Lúcia Braz**, pelo auxílio no laboratório.*

*Ao **Paulo Celso Sabanae**, meu melhor amigo. Obrigada por toda paciência durante todos esses 12 anos que nos conhecemos.*

*Aos **amigos da vida**, que conheci durante o caminho e a todos os meus **familiares**. Obrigada pela boa companhia.*

*Aos **animais**, que foram fundamentais para nossas pesquisas e descobertas. Criaturas inocentes, que desconhecem o significado de doença, mas, que sofrem suas consequências. Muito obrigada! Vocês foram o motivo para eu encarar esse desafio. **"No semblante de um animal que não fala, há todo um discurso que somente um espírito sábio pode realmente entender"** (Mahatma Gandhi). Que nós possamos aprender cada dia mais para que no futuro, a Leishmaniose Visceral não traga mais dor e sofrimento!*

## AGRADECIMENTOS

*À **Profa. Dra. Hiro Goto**, minha orientadora. Com postura ética e profissional, me direcionou durante todo período do doutorado.*

*À **Dra. Maria Carmen Arroyo Sanchez**, minha coorientadora. Sempre com olhar crítico e minucioso, me ensinou analisar, pensar e buscar alternativas para melhorar o trabalho.*

*Ao **Dr. Roberto Mitsuyoshi Hiramoto**, do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo, que teve a maior paciência do mundo para atender os pedidos de uma aluna confusa. Obrigada pelos ensinamentos, apoio, colaboração e principalmente disponibilidade em auxiliar meu projeto com sua equipe técnica.*

*Ao **Prof. Dr. José Eduardo Tolezano**, do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo, pela colaboração e disponibilidade.*

*À **Profa. Dra. Valéria Régia Franco Sousa** e à **Profa. Dra. Arleana do Bom Parto Ferreira de Almeida**, da Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT), pela colaboração e ensinamentos. Graças ao que eu aprendi no período da residência, pude me interessar, aprender e pesquisar sobre a Leishmaniose Visceral Canina, o que me embasou a buscar novos horizontes.*

*À **Prof. Dra. Nazaré Fonseca de Souza**, da Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), pela colaboração com amostras de cães.*

*À **Prof. Dra. Flaviane Alves de Pinho**, da Universidade Federal da Bahia (UFBA), pelo profissionalismo e interesse em colaborar com o projeto.*

*Ao **Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares,** da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP (FMVZ-USP), pela colaboração e disposição para atender as minhas dúvidas.*

*Ao **Dr. Steven G. Reed** e ao **Dr. Malcolm Scott Duthie,** do Infectious Disease Research Institute (IDRI), por fornecerem os antígenos recombinantes, fundamentais para a minha pesquisa.*

*À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo** (FAPESP), pela bolsa de doutorado direto (Número do Processo: N°: 2015/03117-1) fundamental para que eu pudesse dedicar de forma integral à minha pesquisa e pelo Auxílio*

*Regular à Pesquisa (Número do Processo: 2015/22075-8) essencial para suporte ao meu projeto.*

*A quem aqui não citado, que contribuiu direta ou indiretamente para a finalização desta pesquisa, meus sinceros agradecimentos.*

# RESUMO

Fujimori M. Validação de ensaio imunoenzimático (ELISA) com antígenos recombinantes no diagnóstico sorológico da infecção canina por *Leishmania infantum* (Tese). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2019

O cão é o principal reservatório peridomiciliar de *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum*, agente etiológico da leishmaniose visceral (LV). Em áreas endêmicas para LV, a identificação e eutanásia de cães infectados são considerados cruciais no controle da transmissão de *L*. (*L*.) *infantum* para humanos. Atualmente, o algoritmo recomendado pelo Ministério da Saúde do Brasil consiste em triagem de cães pelo ensaio imunocromatográfico TR DPP® Leishmaniose Visceral Canina (DPP) e confirmação de casos positivos por ELISA usando antígeno de lisado total de *Leishmania major*-like (ELISA-L. *major*-like). Como a cultura de parasitos para preparo deste kit de ELISA constitui um fator limitante, o uso de antígeno recombinante (r) aparece como uma alternativa atraente. Neste estudo, avaliou-se o ensaio ELISA com os antígenos rK39, rK28, rKR95 e rK18 (IDRI, EUA) derivados de *Leishmania.* Empregando soros de 74 cães de áreas endêmicas para LV canina (CVL), com exame parasitológico positivo e de 66 cães saudáveis (negativos para DPP, ELISA *L. major*-like e DAT), coletados em uma cidade sem registro de LVC, a sensibilidade do ELISA-rK39, -rK28, –rK18 foi, respectivamente, 97%; 96%; 96% e 89% e a especificidade, 100%; 100%; 100% e 99%. Placas sensibilizadas com cada um dos antígenos mantiveram a estabilidade por até 180 dias, quando armazenadas a 4ºC e -20ºC. A avaliação da repetitividade e reprodutibilidade apresentou coeficientes de variação compatíveis com os valores aceitáveis. Para a validação do ELISA com os diferentes antígenos recombinantes, avaliaram-se 2.530 amostras de inquéritos epidemiológicos de estados endêmicos para LVC no Brasil: Pará, Mato Grosso, São Paulo e Bahia. A positividade com DPP combinada com ELISA-*L. major*-like foi 16% e do DPP combinado com ELISA-rK39 foi 17%, sugerindo a possibilidade de substituir o ELISA-*L. major*-like por ELISA baseado em antígeno recombinante. No entanto, quando ensaiadas diretamente sem triagem com DPP, a positividade do ELISA- rK39, rK28 e rKR95 foi cerca de 10% mais elevada do que com ensaios correntes em uso, respectivamente, 28%; 27% e 27%, sugerindo a detecção precoce de animais infectados. Para responder a essa hipótese, analisaram-se 15 cães (pertencentes a uma coorte de 600 cães de Bauru-SP) que pelo algoritmo recomendado pelo Ministério da Saúde do Brasil, na primeira intervenção, haviam sido considerados negativos para infecção por *Leishmania* e, que 6 meses após a avaliação inicial eram positivos. Nas amostras supostamente negativas na avaliação inicial, os testes ELISA-rK39, -rK28 e -rKR95 apresentaram, respectivamente, 67%,

80% e 60% de positividade. Esses dados sugerem uma quantidade significativa de resultados falso-negativos no algoritmo em uso. A viabilidade da aplicação deste ELISA baseado em antígeno recombinante em áreas endêmicas para LVC também foi avaliada e obteve-se concordância variando de boa a perfeita, entre os resultados obtidos em todos os laboratórios envolvidos e os do laboratório de coordenação. Com a análise global deste estudo, principalmente levando em conta a variabilidade da resposta em certas áreas do Brasil, consideramos validado o ELISA-rK39 para diagnóstico da infecção canina por *L. infantum*. Os dados apontam ainda para a necessidade de reavaliar os ensaios e o algoritmo na utilização de rotina para a detecção de cães infectados com *L. infantum*.

Descritores: Leishmaniose visceral canina, ELISA, antígenos recombinantes, inquérito epidemiológico.

**ABSTRACT**

Fujimori M. Validation of immunoenzymatic assay (ELISA) with recombinant antigens in the serological diagnosis of canine infection by *Leishmania infantum* (Thesis). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2019

The dog is the main peridomiciliar reservoir of *Leishmania (Leishmania) infantum*, etiologic agent of visceral leishmaniasis (VL). In areas endemic for VL, the identification and euthanasia of infected dogs are considered crucial in controlling transmission of *L. infantum* to humans. Currently, the algorithm recommended by the Brazilian Ministry of Health consists in screening of dogs by the immunochromatographic test TR DPP® Leishmaniose Visceral Canina (DPP) and confirmation of positive cases by ELISA using lysate antigen of *Leishmania major*-like (ELISA-*L. major*-like). As parasite culture for the preparation of this ELISA kit is a limiting factor, the use of recombinant antigen (r) appears as an attractive alternative. In this study, the ELISA with the rK39, rK28, rKR95 and rK18 antigens (IDRI, USA) derived from *Leishmania* was evaluated. Using sera from 74 dogs from endemic areas for canine LV (CVL), with positive parasitological examination and 66 healthy dogs (DPP negative, ELISA *L. major*-like and DAT), collected in a city without LVC registry, the sensitivity of the ELISA-rK39, -rK28, -rK18 was, respectively, 97%; 96%; 96% and 89% and the specificity, 100%; 100%; 100% and 99%. Plates sensitized with each antigen maintained stability for up to 180 days when stored at 4°C and -20° C. The evaluation of repeatability and reproducibility presented coefficients of variation compatible with acceptable values. For the validation of the ELISA with the different recombinant antigens, 2,530 samples from epidemiological surveys of CVL endemic states in Brazil: Pará, Mato Grosso, São Paulo and Bahia were evaluated. Positivity with DPP combined with ELISA-*L. major*-like was 16% and the DPP combined with rK39 ELISA was 17%, suggesting the possibility of replacing the ELISA-*L. major*-like ELISA based on recombinant antigen. However, when assayed directly without DPP screening, the positivity of ELISA-rK39, rK28 and rKR95 was about 10% higher than with current assays in use, respectively, 28%; 27% and 27%, suggesting the early detection of infected animals. To answer this hypothesis, we analyzed 15 dogs (from a cohort of 600 dogs from Bauru-SP) that, according to the algorithm recommended by the Brazilian Ministry of Health, in the first intervention, had been considered negative for *Leishmania* infection and, 6 months after the initial evaluation were positive. In the samples that were supposedly negative in the initial evaluation, the ELISA-rK39, -rK28 and -rKR95 tests presented, respectively, 67%, 80% and 60% of positivity. These data suggest a significant amount of false negative results in the algorithm in

use. The viability of the application of this ELISA based on recombinant antigen in areas endemic to CVL was also evaluated and agreement was obtained ranging from good to perfect, between the results obtained in all laboratories involved and those in the coordination laboratory. With the global analysis of this study, mainly considering the variability of the response in certain areas of Brazil, we consider the validation of the ELISA-rK39 for the diagnosis of canine infection by *L. infantum*. The data also point out the need to reassess the tests and the algorithm in routine use for the detection of dogs infected with *L. infantum*.

Keyword: Canine visceral leishmaniasis, ELISA, recombinant antigens, epidemiological enquiry.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1 -** Casos de leishmaniose visceral nos países com maior número de casos, Américas, 2001 -2017.....21

**Figura 2 -** Ciclo de vida de *Leishmania*.....23

**Figura 3 -** Diferentes padrões de lesões cutâneas: A) Alopecia e blefarite periocular esfoliativa; B) Lesões mucocutâneas nasais ulcerativas; C) Dermatite papular na região inguinal; D) lesões crateriformes nodulares beirando o focinho; E) Lesões eritematosas ulcerativas na superfície plantar da pata e entre coxins; F) Onicogrifose.....24

**Figura 4 -** Curva *ROC* (A, C, E, G) e valores de absorbância (B, D, F, H) dos testes ELISA-rK39, rK28, rKR95 e rK18.
Curvas *ROC* construídas a partir dos valores da *"absorbância percentual do padrão positivo*" e valores de absorbância obtidos nos testes ELISA-rK39 (A, B), ELISA-rK28 (C, D), ELISA-rKR95 (E, F) e ELISA-rK18 (G, H), na pesquisa de anticorpos IgG, ensaiando 74 amostras de cães parasitologicamente positivos para *L. infantum* e 66 de cães sadios.....47

**Figura 5 -** Curvas *ROC* (A, B, C e D) do teste ELISA-rK39, -rK28, -rKR95 e -rK18.
Curvas *ROC* obtidas a partir dos valores da *"absorbância percentual do padrão positivo"* do teste ELISA-rK39 (A), -rK28 (B), -rKR95 (C) e -rK18 (D), na pesquisa de anticorpos IgG, ensaiando 19 amostras de cães assintomáticos positivos para *L. infantum* pelos testes DPP + ELISA-*L.major*-like e DAT e 66 de cães sadios.....48

**Figura 6 -** Regressão linear para estudo da estabilidade de placas pré-sensibilizadas nos testes ELISA-rK39 (A, B), rK28 (C, D), rKR95 (E, F) e rK18 (G, H), nas temperaturas 4°C e -20°C, respectivamente.
Gráficos de regressão linear entre os valores de porcentagem da absorbância de cada amostra em relação ao padrão positivo e o tempo de armazenamento das placas, nas temperaturas de 4°C 🔵 e de -20°C ⚫, obtidos nos testes ELISA-rK39 (A, B), ELISA-rK28 (C, D), ELISA-rKR95 (E, F) e ELISA-rK18 (G, H) em comparação ao controle 🔴.
As linhas pontilhadas indicam intervalo de confiança (IC=95%).
ABS % Positivos - porcentagem da absorbância de cada amostra em relação ao padrão positivo.....50

**Figura 7 -** Curva *ROC* (A) e distribuição dos títulos (B) do teste DAT.
Curva *ROC* (A) obtida a partir dos títulos obtidos no teste de aglutinação direta (DAT), ensaiando 74 amostras de cães parasitologicamente positivos para infecção por *L. infantum* e 66 de cães sadios; distribuição dos títulos das amostras ensaiadas (B) .....51

**Figura 8 -** Positividade dos testes DAT, DPP + ELISA-*L. major*-like, ELISA-rK39, -rK28 e -rKR95 no ensaio de 2.530 amostras de diferentes localidades do Brasil.....55

**Figura 9 -** Índices de reatividade das amostras de 15 cães, nas coletas 1 e 180 dias após, empregando os testes ELISA-rK39 (A), -rK28 (B) e -rKR95 (C).
Grupo 1 – cães considerados negativos para infecção por *Leishmania* pelo algoritmo recomendado pelo Ministério da Saúde do Brasil (tempo 1) e que se tornaram positivos após 6 meses da avaliação inicial (tempo 2).....64

**Figura 10 -** Índices de reatividade das amostras de 15 cães, nas coletas 1 e 180 dias após, empregando os testes ELISA-rK39 (A), -rK28 (B) e -rKR95 (C).
Grupo 2 – cães considerados negativos para infecção por *Leishmania* pelo algoritmo recomendado pelo Ministério da Saúde do Brasil (tempo 1) e que se tornaram positivos apenas pelo DPP após 6 meses da avaliação inicial (tempo 2) .....65

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1 -** Parâmetros testados para padronização do ELISA com rK39, rK28, rKR95 e rK18.....38

**Tabela 2 -** Parâmetros escolhidos na padronização do ELISA-rK39, -rK28, -rKR95 e -rK18.....45

**Tabela 3 -** Coeficiente de variação do estudo da repetitividade e reprodutibilidade de uma mesma amostra positiva para infecção por *L. infantum*.....49

**Tabela 4 -** Resultados das 2.530 amostras de inquérito estudadas, empregando DAT, DPP + ELISA-*L. major*-like, ELISA-rK39, -rK28 e -rKR95.....53

**Tabela 5 -** Concordância entre os resultados do teste DAT e os demais testes realizados com as 2.530 amostras de inquérito.....56

**Tabela 6 -** Concordância entre os resultados do teste DPP + ELISA *L. major*-like e os demais testes realizados com as 2530 amostras de inquérito.....57

**Tabela 7 -** Concordância entre os resultados do teste ELISA-rK39 e os demais testes realizados com as 2530 amostras de inquérito.....58

**Tabela 8 -** Concordância entre os resultados do teste ELISA-rK28 e os demais testes realizados com as 2530 amostras de inquérito.....58

**Tabela 9 -**Concordância entre os resultados do laboratório de Leishmanioses da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT) e o Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (IMT) utilizando 50 amostras colhidas em Cuiabá.....59

**Tabela 10 -** Concordância entre os resultados do Instituto Adolfo Lutz (IAL) de São Paulo e o Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (IMT) utilizando 45 amostras colhidas no interior do estado de São Paulo.....60

**Tabela 11 -** Concordância entre os resultados do Instituto Adolfo Lutz (IAL) de São José do Rio Preto e o Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (IMT) utilizando 45 amostras colhidas no interior do estado de São Paulo.....61

**Tabela 12 -**Concordância entre os resultados da Universidade Federal da Bahia (UFBA) e o Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (IMT) utilizando 45 amostras colhidas na Bahia.....62

**SUMÁRIO**


**1 INTRODUÇÃO**.....21

**2 OBJETIVOS**.....32

**2.1** GERAL .....32

**2.2** ESPECÍFICOS.....32

**3 MATERIAIS E MÉTODOS**.....34

**3.1** AMOSTRAS.....34

**3.2** CARACTERÍSTICAS DAS COLETAS.....35

**3.3** ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA.....36

**3.4** TESTES SOROLÓGICOS UTILIZADOS NOS PROGRAMAS DE CONTROLE DA INFECÇÃO POR *L. infantum*.....36

**3.4.1** DPP-TR DPP® Leishmaniose Visceral Canina (Bio-Manguinhos, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil) .....36

**3.4.2** ELISA-*Leishmania major*-like- EIE Leishmaniose Visceral Canina (Bio-Manguinhos, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil) .....36

**3.5** TESTE SOROLÓGICO DISPONÍVEL NO MERCADO.....37

**3.5.1** Teste de aglutinação direta (DAT) - *Direct Agglutination Teste* (Institute of Tropical Medicine-Antwerp/Belgic) .....37

**3.6** ANTÍGENOS RECOMBINANTES.....37

**3.7** ELISA COM ANTÍGENOS RECOMBINANTES – rK39, rK28, rKR95 E rK18.....38

**3.8** CÁLCULO DO *CUT-OFF* DO TESTE ELISA.....39

**3.9** REPETITIVIDADE.....40

**3.10** REPRODUTIBILIDADE.....40

**3.11** ESTABILIDADE.....41

**3.12** VIABILIDADE DE APLICAÇÃO DO TESTE ELISA EM LABORATÓRIOS DE ÁREAS ENDÊMICAS .....41

**3.12.1** TREINAMENTO DAS EQUIPES DE LABORATÓRIOS DE ÁREAS ENDÊMICAS .....41

**3.12.2** REALIZAÇÃO DOS TESTES NOS LABORATÓRIOS DE ÁREAS ENDÊMICAS .....42

**3.13** ESTUDO DE ANIMAIS DE SEGUIMENTO.....42

**3.14** ANÁLISE ESTATÍSTICA .....43

**4** **RESULTADOS**.....45

**4.1** PADRONIZAÇÃO DE ELISA-rK39, -rK28, -rKR95 E -rK18 .....45

**4.1.1** PROTOCOLO FINAL DO ELISA-rK39, -rK28, -rKR95 E -rK18 .....45

**4.1.2** CÁLCULO DO *CUT-OFF* E AVALIAÇÃO DO ELISA-rK39, -rK28, -rKR95 E - rK18.....46

**4.1.3** AVALIAÇÃO DO ELISA-rK39, -rK28, -rKR95 E - rK18 COM AMOSTRAS DE ANIMAIS ASSINTOMÁTICOS .....48

**4.2** REPETITIVIDADE E REPRODUTIBILIDADE .....49

**4.3** ESTABILIDADE .....49

**4.4** DPP / ELISA-*L. major*-like (AMOSTRAS CARACTERIZADAS) .....51

**4.5** TESTE DE AGLUTINAÇÃO DIRETA (DAT) .....51

**4.5.1** CÁLCULO DO *CUT-OFF* E AVALIAÇÃO DO DAT .....51

**4.6** AVALIAÇÃO DA CONCORDÂNCIA ENTRE OS TESTES COM AMOSTRAS CARACTERIZADAS .....52

**4.7** ESCOLHA DO TESTE DE REFERÊNCIA PARA AMOSTRAS DE INQUÉRITO .....52

**4.8** RESULTADOS DO DAT, DPP, ELISA-*L. major*-like, ELISA-rK39, -rK28 e -rKR95 NAS AMOSTRAS DE INQUÉRITO .....52

**4.9** CONCORDÂNCIA DOS TESTES DAT, DPP + ELISA-*L. major*-like, ELISA-rK39, -rK28 E -rKR95 NAS AMOSTRAS DE INQUÉRITO.....55

**4.10** AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DE APLICAÇÃO DOS TESTES.....58

**4.11** ESTUDO DE ANIMAIS DE SEGUIMENTO .....62

**5** **DISCUSSÃO**.....68

**6** **CONCLUSÕES**.....75

**7** **REFERÊNCIAS**.....77

# INTRODUÇÃO

# 1 INTRODUÇÃO

Leishmanioses são doenças infecciosas causadas por protozoários intracelulares obrigatórios do gênero *Leishmania* que no homem determinam a doença tegumentar ou visceral. Consideradas negligenciadas, em 2017, 94% dos casos novos de leishmaniose relatados pela Organização Mundial da Saúde se concentravam em sete países: Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul e Sudão [1].

A leishmaniose visceral (LV) é forma mais grave da doença e leva a óbito mais de 95% dos indivíduos se não tratados[1]. Essa forma é causada pelas espécies *Leishmania (Leishmania) donovani* (*L.donovani*), mantida no ciclo antroponótico, na Índia, leste africano, Bangladesh e Nepal e *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* (*L. infantum*), mantida no ciclo zoonótico, na China, Ásia Central, Mediterrâneo, parte da África e na América Latina [2-4]. Nas Américas (Figura 1), a LV foi descrita em mais de 12 países, sendo que 96% dos casos reportados no período de 2001 a 2017 ocorreram no Brasil [5].

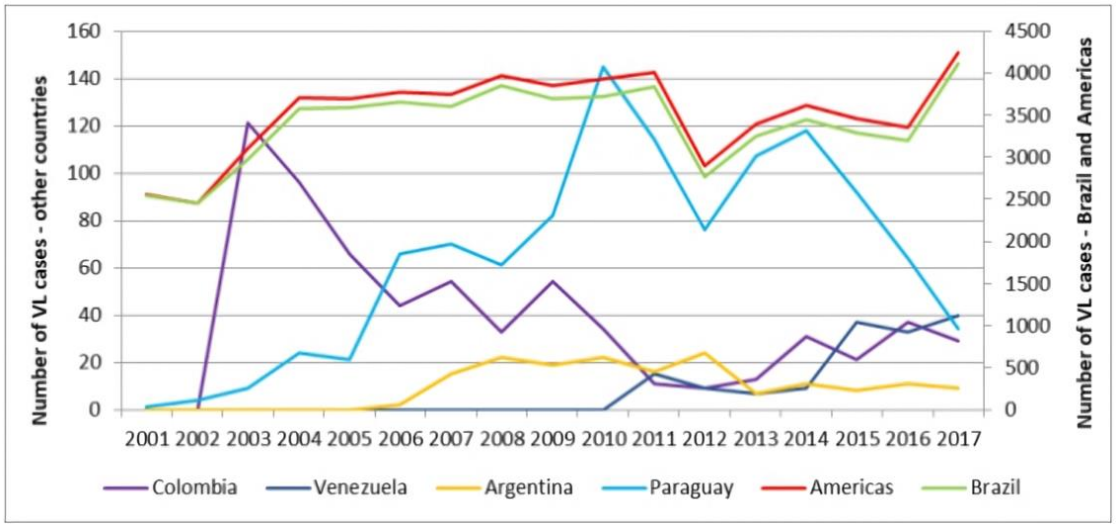


**Figura 1 -** Casos de leishmaniose visceral nos países com maior número de casos, Américas, 2001 -2017[5].

No Brasil, a LV está em franca expansão, atingindo as cinco regiões do país (22 Unidades Federadas). A região Nordeste era a que registrava maior número de

casos até 1990, no entanto, houve uma mudança no quadro epidemiológico com clara periurbanização e urbanização da LV, destacando-se surtos atualmente em áreas urbanas como Rio de Janeiro (RJ), Belo Horizonte (MG), Araçatuba (SP), Santarém (PA), Corumbá (MS), Teresina (PI), Natal (RN), São Luiz (MA), Fortaleza (CE), Camaçari (BA), Três Lagoas (MS), Campo Grande (MS) e Palmas (TO) [2]. Apesar de inúmeras tentativas de controlar a doença, no ano de 2017 houve a incidência de 4.103 casos no país, com letalidade de 8,8% no mesmo período [6].

Na transmissão da LV no Brasil, a fêmea do flebotomíneo da espécie *Lutzomyia longipalpis* (*L. longipalpis*) [7] é considerada a principal transmissora dos parasitos ao homem e animais. Em algumas regiões do país, onde *L. longipalpis* não é encontrado, *Lutzomyia cruzi* (*L. cruzi*) é considerada a espécie vetora [8-10]. O cão (*Canis familiaris*) é o principal reservatório nas áreas urbanas e periurbanas em várias regiões do mundo [11-13] e, considera-se que a infecção destes animais antecede a doença humana [14]. Outras espécies de canídeos como *Dusycion vetulus*, *Lycalopex vetulus e Cerdocyon thous* e marsupiais como *Didelphis albiventris* fazem parte do ciclo da LV no âmbito silvestre [7, 15].

Em relação ao ciclo de vida da *Leishmania* (Figura 2), a infecção do vetor ocorre quando a fêmea do flebótomo, realizando o repasto sanguíneo, ingere as amastigotas que estão no interior dos macrófagos dos animais infectados. No tubo digestório desse inseto ocorre a liberação dos parasitos que se diferenciam rapidamente em promatigotas metacíclicas, formas infectantes para o hospedeiro vertebrado. No momento em que esse inseto realiza um novo repasto sanguíneo, as promastigotas são inoculadas no novo hospedeiro e fagocitadas pelas células do sistema fagocítico mononuclear, em cujo interior dessas células se diferenciam em amastigotas. Essas formas se replicam por divisão binária até o rompimento do macrófago e assim ocorre a disseminação desses parasitos no organismo do animal vertebrado, principalmente baço, fígado, medula óssea e linfonodos [16, 17]. Os fatores relacionados com a progressão da doença no vertebrado são virulência do parasito, fatores genéticos, idade e estado nutricional, além da resposta imune inata e adaptativa do hospedeiro [18]. O ciclo de vida se completa quando um novo vetor ingere as amastigotas e transmite as promastigotas [16].

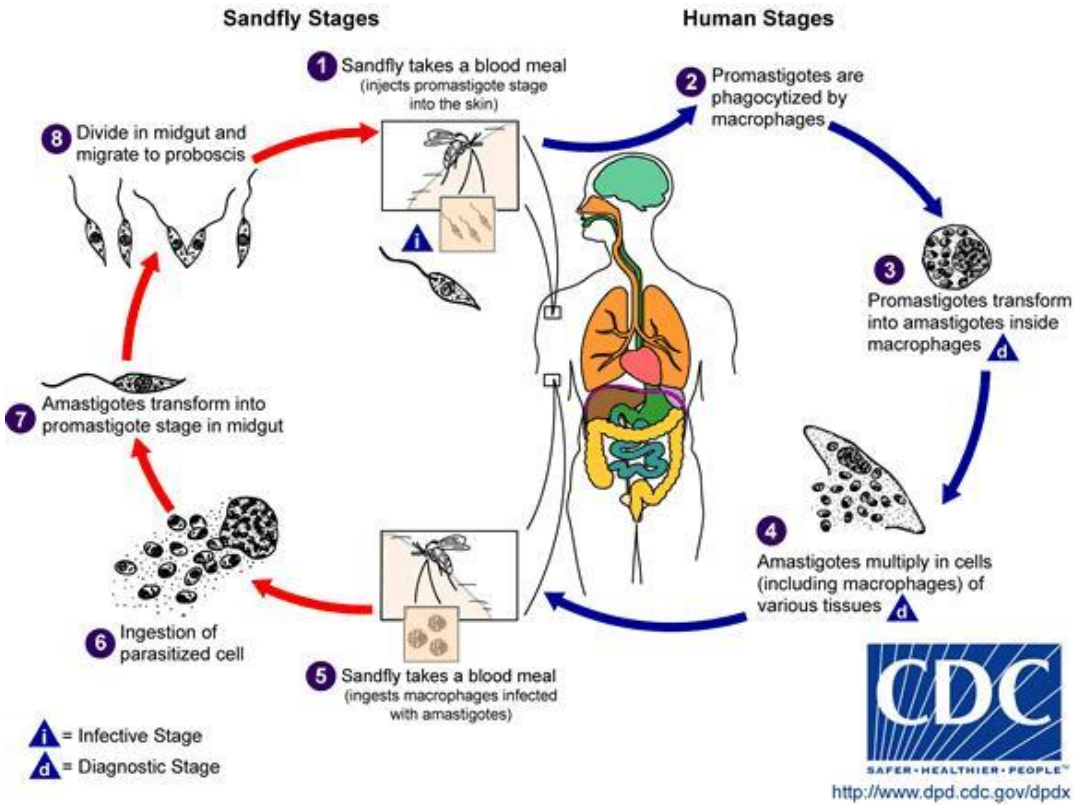


**Figura 2 -** Ciclo de vida de *Leishmania*. https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html

Os cães infectados podem apresentar-se sob três diferentes formas, de maneira similar ao que ocorre no homem: 1) forma assintomática, caracterizada por sorologia e parasitológico positivo sem manifestações clínicas, que pode evoluir para cura espontânea; 2) forma oligossintomática, caracterizada pela presença de sinais clínicos pouco definidos e não característicos de LV associada a exame parasitológico positivo e/ou sorologia positiva, porém com baixos títulos de anticorpos; 3) forma sintomática, caracterizada por quadro clínico exuberante de emagrecimento, eriçamento e queda de pelos, nódulos ou ulcerações frequentes nos bordos das orelhas, hemorragias intestinais, paralisia de membros posteriores, ceratite com cegueira e caquexia, onicogrifose, sendo que nos casos mais graves podem evoluir para a morte (Figura 2). Nesta última forma clínica, o exame parasitológico é positivo e os títulos de anticorpos circulantes são elevados [15, 19, 20].

**Figura 3 -** Diferentes padrões de lesões cutâneas na LV canina: A) Alopecia e blefarite periocular esfoliativa; B) Lesões mucocutâneas nasais ulcerativas; C) Dermatite papular na região inguinal; D) lesões crateriformes nodulares beirando o focinho; E) Lesões eritematosas ulcerativas na superfície plantar da pata e entre coxins; F) Onicogrifose [20].

Como os cães apresentam um intenso parasitismo na pele, acredita-se que isto permita uma fácil infecção do vetor constituindo-se no elo importante na manutenção da cadeia epidemiológica [21-23]. Desta forma, a identificação de cães infectados é considerada uma medida crucial no controle da transmissão da doença. Um dos pilares do programa de controle de LV é a eliminação de cães infectados e/ou doentes, sendo que para identificação dos cães infectados é recomendada a realização de inquérito amostral ou censitário, dependendo da situação epidemiológica com relação ao risco de transmissão na área a ser investigada. O inquérito sorológico amostral deve ser feito em duas situações: municípios silenciosos e receptivos e

municípios com transmissão moderada e intensa. Já o inquérito sorológico censitário deve ser realizado em 3 situações: em zona urbana de município classificado como silencioso e receptivo com população canina menor que 500 cães, em setores urbanos de municípios classificados como de transmissão moderada ou intensa ou em zona rural de municípios em qualquer uma das situações de transmissão de LV[15, 24, 25].

Uma importante ferramenta no manejo e de controle da infecção é o correto diagnóstico [19]. O diagnóstico de certeza da LV canina (LVC) é o exame parasitológico em material de aspirado de medula óssea, baço ou linfonodos, por exame direto ou por recuperação, no qual inoculam-se esses materiais de cães suspeitos em animais suscetíveis como o *hamster* ou em meio de cultura no qual se observa o crescimento de promastigotas do parasito [17]. O aspirado esplênico é considerado o melhor material para identificação de parasitos de forma direta [26]. Apesar de o exame parasitológico ser altamente específico, a sua realização em rotina de vigilância, nos inquéritos em áreas endêmicas, é impraticável pois demanda tempo para execução, é um procedimento invasivo para coleta de material, necessita de equipe técnica bem treinada e estrutura laboratorial mínima para sua realização [15].

Os cães infectados apresentam resposta humoral intensa, com produção de altos níveis de anticorpos IgG anti-*Leishmania*, dessa forma a utilização de métodos sorológicos é amplamente difundida [12]. Diferentes técnicas sorológicas são utilizadas no diagnóstico das leishmanioses: imunofluorescência indireta (IFI); teste de aglutinação direta (DAT); *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA); *Western Blotting* e imunocromatografia de fluxo lateral. Essas técnicas, excetuando a última, empregam antígeno total, parasitos íntegros ou extratos solúveis, produzidos a partir de cultura de promastigotas ou amastigotas de *Leishmania*. Os testes com esses antígenos totais têm limitação quanto à especificidade e dessa forma, complicam o seu uso em diagnóstico laboratorial [27-30]. No teste ELISA com antígeno bruto tem sido relatada reatividade cruzada com outros patógenos, tais como *Trypanosoma cruzi* [27], *Babesia canis* [31], *Trypanosoma congolense* e *T. evansi* [32, 33] e ainda reações cruzadas com *Ehrlichia canis* embora haja controvérsia na literatura [27, 31, 34, 35].

Na LVC, até recentemente, o Ministério da Saúde preconizava que o teste ELISA com antígeno total de *Leishmania major*-like (*L. major*-like) fosse utilizado

para triagem e a IFI com antígeno íntegro de *L. major*-like para confirmação nos casos positivos no ELISA- *L. major*-like [36]. Entretanto, com a expansão da LVC, tornou-se difícil o atendimento da demanda para o fornecimento de resultados em prazo curto, por dois motivos: 1) por dificuldade na realização dos testes, que dependem de uma técnica confirmatória de cunho subjetivo, isto é, que envolve a leitura de testes de IFI ao microscópio por técnico; 2) por dificuldade no fornecimento de quantidade crescente de antígeno para esse teste que depende de cultivo de parasito, um procedimento moroso e limitante.

Dentro desse contexto, o Ministério da Saúde buscou a incorporação de um teste alternativo, de execução fácil, menos subjetivo na obtenção de resultados, um teste imunocromatográfico. Incorporou-se o teste imunocromatográrico de duplo percurso, *Dual Path Platform* = DPP, que emprega a proteína recombinante k28 de *Leishmania donovani*. Após avaliação pela FIOCRUZ/RJ e publicação de Nota Técnica Conjunta Nº 01/2011 CGDT-CGLAB/DEVIT/SUS/MS, o teste imunocromatográfico TR DPP Leishmaniose Visceral Canina (Bio-Manguinhos) passou a ser o de triagem. Os casos positivos neste teste passariam por ELISA com antígeno total de *L. major*-like para a confirmação diagnóstica. Atualmente, o Plano Nacional de Controle da Leishmaniose recomenda esse algoritmo para o diagnóstico canino na rotina de inquérito [37]

Em relação ao teste ELISA, a utilização de antígeno total de leishmânia é um fator limitante pois além de necessitar de cultura de promastigotas, que pode levar a expressão de diferentes epítopos antigênicos dependendo do meio de cultura e formulações utilizados, demanda tempo de produção, equipe especializada e estrutura física altamente especificas [38-40]. Além desses fatores, outra limitação é que o antígeno bruto pode levar a reatividade cruzada com outras doenças, principalmente tripanossomatídeos. Apesar dos avanços para melhorar as metodologias de diagnóstico canino, o uso do ELISA (EIE-LVC) com extrato total distribuído nas redes apresenta desempenho bastante variável, com sensibilidade de 11.59% [41], 98.96% [42] a 100.0% [43] e especificidade de 52.25% [42], 68.0% [43] a 90.74% [41], ressaltando que para o grupo de animais assintomáticos, esses valores são ainda mais insatisfatórios.

Neste novo cenário, embora ocorra uma agilização na realização do diagnóstico da LVC, vemos possibilidade de melhora no teste de ELISA que atualmente emprega lisado total de *L. major*-like. Seria desejável que houvesse um ELISA baseado na utilização de antígeno recombinante, pois é uma proteína mais específica e a produção pode ser feita em escala industrial. Assim, propomos neste projeto avaliar a utilização dessas proteínas para diagnóstico sorológico dos cães.

Vários autores vêm pesquisando antígenos recombinantes de leishmânia mais específicos para diagnóstico sorológico da LVC: histonas H2A [44]; H3 [45]; H2B e H4 [46]; proteínas da família das cinesinas, como rK39 de *L. infantum* [47-51], rK9 e rK26 de *L. infantum* [48] e rK28 de *L. infantum* [52]*;* proteínas de choque térmico, *heat shock protein (Hsp)*, como Hsp70 [53] de *L. infantum;* proteínas CcOx e HRF de *L. infantum* [54].

A proteína recombinante k39 é uma sequência repetida de 39 aminoácidos que são altamente conservados em *L. infantum* e *L. donovani*. Essa repetição está relacionada com outra proteína maior, a cinesina, altamente expressa por amastigotas [55]. Dessa forma, a utilização desta proteína pode ser útil como método diagnóstico. O antígeno recombinante k39 em ELISA, na LV humana, detecta doença ativa e infecção assintomática [56], embora resultados variados tenham sido obtidos, com sensibilidade de 69,4%-97,6% e especificidade de 81,0%-100,0%, dependendo da região estudada [57-61]. Em indivíduos com LV e assintomáticos residentes em Bangladesh, Kurkjian, Vaz [56] obtiveram sensibilidade de 97,0% e especificidade de 98,9%, preconizando títulos mais baixos nos assintomáticos em relação aos doentes. Em cães, o ELISA com esse antígeno apresentou sensibilidade de 95% e especificidade de 100% [48].

No trabalho realizado por Mendonca, Batista [62], em cães assintomáticos o teste imunocromatográfico com o antígeno rK39 apresentou sensibilidade e especificidade de 77,0% e 71,0%, em Teresina e 77,0% e 99,0%, em Vitória. Já quando foi feita avaliação de cães sintomáticos, os valores de sensibilidade e especificidade foram bem superiores, chegando a 100,0% de especificidade, demonstrando a capacidade deste recombinante de detectar infecções subclínicas.

Em estudo multicêntrico realizado na Itália [49] o teste ELISA-rK39 apresentou sensibilidade de 97,1% em cães com parasitológico positivo, especificidade de 98,8% em cães italianos com parasitologia e IFI negativos e 99,4% quando considerados também cães dos EUA. Os autores não obtiveram reatividade cruzada com *Erlichia canis*, *Babesia gibsoni*, *Trypanosoma cruzi*, *Dirofilaria repens*, *Dirofilaria immitis*, *Dipetalonema reconditum*, *Dipylidium caninum*, *Trichuris vulpis* ou *Ancylostoma caninum*, o que representa uma grande vantagem em relação ao ELISA com antígeno com extrato total.

O antígeno rK28 foi inicialmente construído como proteína quimérica baseada na fusão de epítopos de rK9, rK26 e rK39 de *L. infantum* [52] apresentando elevada sensibilidade (99%) e especificidade (96%) em teste ELISA com cães da Itália. Recentemente, o antígeno rK28 foi produzido como poliproteína de fusão [63], a partir da síntese do gene K28, que compreende regiões haspb1 de *L. donovani* (homólogo de K26 de *L. infantum*), cinesina de *L. donovani* (homólogo de K39 de *L. infantum*) e haspb2 de *L. donovani* (homólogo de k9 de *L. infantum*). Em amostras de LV humana, o ELISA-rK28 apresentou sensibilidade de 96,8-99,6% e especificidade de 96,2-100,0% [63, 64]. Em um estudo realizado no Sudão, utilizando sangue total, o teste imunocromatográfico com o rK28 apresentou sensibilidade e especificidade respectivamente de 92,5% e 100,0% [65] e um outro trabalho no mesmo local os resultados de sensibilidade e especificidade foram 98,8% e 100,0% [66].

Em um estudo realizado em Araçatuba (SP), soros de 80 cães com sinais clínicos para doença e com teste parasitológico positivo para *L. infantum* e de 42 cães saudáveis foram selecionados e submetidos ao teste ELISA com o antígeno recombinante k28. A sensibilidade e especificidade do teste foi de 100,0%, enquanto que o teste ELISA com o antígeno rK39 os resultados foram de 96,2% e 97,6%, respectivamente. A concordância entre os dois testes foi alta [67].

O antígeno recombinante KR95 é uma proteína ligada à cinesina e foi identificada a partir de cinco sequências peptídicas de quatro pacientes infectados com *L. donovani* e sem homologia correspondente em humanos. Embora a identidade entre esse antígeno e a cinesina do *Trypanosoma cruzi* seja de 79%, não houve reatividade cruzada em teste ELISA com as amostras humanas avaliadas [68].

O antígeno recombinante rK18 foi utilizado para avaliação de sucesso de tratamento e cura em pacientes tratados e avaliados por um período de 180 dias. Os resultados obtidos demonstram que o ELISA com esta proteína pode ser utilizado para este intuito, pois as concentrações de anticorpos vão caindo com o passar dos dias de tratamento, diferentemente de outros antígenos avaliados [69].

Pelo exposto acima, consideramos que os testes ELISA com as proteínas rK39, rk28, rKR95 e rK18 são bons candidatos para uso no diagnóstico de LVC em inquéritos sorológicos em áreas endêmicas, cuja validação propomos neste estudo. Os antígenos de proteínas rK39, rk28, rKR95 e rK18 foram fornecidos pelo Instituto de Pesquisas de Doenças Infecciosas (IDRI), Seattle, Estados Unidos.

Inicialmente, para avaliar os testes ELISA-rK39 -rK28, -rKR95 e -rK18, foram analisados soros de cães parasitologicamente positivos e negativos para a determinação de sua sensibilidade e especificidade. A seguir, para a validação destes testes, foram analisadas amostras de cães colhidas em inquéritos epidemiológicos em áreas de transmissão canina, em três localidades na região sudeste, centro-oeste, nordeste e norte.

Como os exames parasitológicos não foram realizados nas amostras de inquérito canino, os soros foram submetidos ao teste de aglutinação direta de *Leishmania* (*direct agglutination test* = DAT) que apresenta uma ótima correlação com a positividade no exame parasitológico, tanto na LV humana como na canina. O DAT é um teste semiquantitativo e emprega uma suspensão de promastigotas de *L. donovani* tratadas com tripsina, 6 fixadas e coradas [70, 71]. Em uma meta-análise de 30 estudos [72] de avaliação do DAT na LV humana no sul da Ásia e leste da África, observou-se sensibilidade (IC 95%) de 94,8%, (92,7%-96,4%) e especificidade (IC 95%) de 85,9%, (72,3%-93,4%). Em estudo com pacientes da Etiópia e do Brasil, o DAT teve 100% de sensibilidade e de especificidade [73]. Na LVC na região do Mediterrâneo, o DAT atingiu sensibilidade de 100% e especificidade de 98,9% [32], enquanto que na Venezuela a sensibilidade do DAT foi de 92,59% (75,6%-99,1%), a especificidade, de 100,0% (79,4%-100,0%), o valor preditivo positivo de 100% (86,3%-100,0%) e o valor preditivo negativo de 88,89% (65,3%-98,6%) [74]. Ressalta-se que esse teste foi utilizado para confirmar o diagnóstico de LV em projeto

coordenado pela Organização Mundial de Saúde abrangendo Ásia, África e América do Sul e que avaliou vários kits de teste imunocromatográfico para LV humana [75]. Dessa forma, o DAT foi o nosso teste de referência para fins comparativos com o protocolo estabelecido pelo Ministério da Saúde e também com os testes ELISAs com os antígenos recombinantes.

O ponto de partida para o nosso projeto foi o controle de LVC no nosso meio, voltado para busca de um método sorológico, melhor tanto na eficácia diagnóstica quanto na facilidade na produção do reagente. No entanto, levando em consideração a importância da Leishmaniose Visceral causada por *L. infantum* no âmbito mundial, a utilização de um teste com melhor desempenho no diagnóstico sorológico pode se estender a outras partes do mundo, tanto nos programas de controle, quanto no diagnóstico individual visando medidas terapêuticas.

Estima-se que na Itália, Espanha, França e Portugal existam 2,5 milhões de cães infectados por *L. infantum* [76] e nesses países a aplicação da metodologia de diagnóstico tem o intuito de confirmar cães reagentes para que possam ser utilizados diferentes protocolos de tratamento, triar cães saudáveis que moram em locais endêmicos ou que estejam viajando para estes locais e selecionar cães aptos para serem doadores de sangue [20]. Diferentemente do Brasil, nos países europeus não há recomendação de eutanásia de cães infectados, sendo esta indicada apenas para animais nos estágios graves da doença, com o intuito de amenizar o sofrimento destes [4]. O método inicial recomendado é o teste sorológico (qualitativo e se necessário posteriormente o quantitativo) [20]. Dessa forma, a importância de um método sensível e específico para o diagnóstico dos animais infectados por *L. infantum* é evidente, incluindo o teste objeto do presente projeto.

Considerando a necessidade e a importância de um teste sorológico eficaz, tanto para controle de transmissão quanto para medidas terapeuticas voltadas a indivíduos, propomos no presente projeto a validação de um teste ELISA com antígeno recombinante de leishmânia para diagnóstico da infecção de cães por *L. infantum*.

# OBJETIVOS

# 2 OBJETIVOS

## 2.1 Geral

Validar teste *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), para pesquisa de anticorpos no diagnóstico da infecção por *Leishmania (L.) infantum* em cães.

## 2.2 Específicos

3 Padronizar os testes ELISA-rK39, ELISA-rK28, ELISA-rKR95 e ELISA-rK18, para pesquisa de anticorpos IgG anti-*Leishmania*, avaliando sua sensibilidade e especificidade.

4 Avaliar a estabilidade das placas pré-sensibilizadas em duas diferentes temperaturas de armazenamento (4°C e -20°C).

5 Avaliar o desempenho dos testes ELISA-rK39, -rK28, -rKR95 e rK18 para o diagnóstico de infecção por *L. infantum* em amostras de inquérito de áreas endêmicas dos estados de São Paulo, Mato Grosso, Pará e Bahia, empregando o DAT como teste de referência.

6 Validar os testes ELISA-rK39, -rK28, -rKR95 e -rK18 para o diagnóstico de infecção por *L. infantum* em substituição ao ELISA-*L. major*-like como teste confirmatório pós-teste rápido DPP em uso, ou alternativamente, como teste substituinte do teste rápido DPP em uso.

7 Avaliar a viabilidade de aplicação dos testes em laboratórios de outras localidades, onde a infecção por *L. infantum* é endêmica.

8 Avaliar se os testes ELISA com antígenos recombinantes detectam precocemente animais infectados em comparação com os testes utilizados na rotina diagnóstica de infeção por *L. infantum*, preconizados pelo Ministério da Saúde.

# MATERIAIS E MÉTODOS

# 3 MATERIAIS E MÉTODOS

## 3.1 AMOSTRAS

Nas várias etapas da pesquisa abaixo especificadas, utilizaram-se amostras provenientes do Instituto Adolfo Lutz, SP, cedidas pelo Prof. Dr. José Eduardo Tolezano e Dr. Roberto Mitsuyoshi Hiramoto; da Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT), cedidas pela Prof. Dra. Valéria Régia Franco Sousa e Prof. Dra. Arleana do Bom Parto Ferreira de Almeida; da Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), cedidas pela Prof. Dra. Nazaré Fonseca de Souza; da Universidade Federal da Bahia (UFBA), cedidas pela Prof. Dra. Flaviane Alves de Pinho; da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP (FMVZ-USP), cedidas pelo Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares.

Para o cálculo da sensibilidade, especificidade e *cut-off* do teste ELISA com os antígenos recombinantes e determinação do *cut-off* do DAT empregaram-se as seguintes amostras cedidas pelo Instituto Adolfo Lutz de São Paulo-SP, onde se realizaram o exame parasitológico, DPP e ELISA-*L. major*-like (amostras caracterizadas).

- Soros de 74 cães provenientes de áreas onde ocorre a transmissão canina de *L. infantum* e com presença local do vetor para *Leishmania* (Fernandópolis-SP, Votuporanga-SP e Santa Fé do Sul-SP). Esses animais apresentavam exame parasitológico positivo, realizado em material de medula óssea do esterno e de linfonodo poplíteo, obtido com punção aspirativa por agulha fina, fixação em lâminas e coloração em Panótico.

- Soros de 66 cães provenientes de áreas onde não ocorre a transmissão canina de *L. infantum*, com ausência local do vetor para *Leishmania* (Jundiaí-SP), não reagentes por DPP e ELISA-*L. major*-like e confirmados pelo teste DAT negativo.

Para a validação do teste ELISA com antígenos recombinantes, utilizaram-se 2.530 soros, provenientes de municípios do estado de São Paulo (Santa Fé do Sul:

N=48, Votuporanga: N=297, Adamantina: N=103, Jales: N=321 e Araçatuba: N=346); de Mato Grosso (Várzea Grande: N=521); do Pará (Colares: N=486 e Soure: N=135) e da Bahia (Buritiba: N=273).

Para avaliar se os testes estudados detectavam precocemente animais infectados, a partir de uma coorte de 600 cães de Bauru-SP, selecionaram-se amostras de 35 cães dos quais se haviam coletado amostras no tempo 1 e 180 dias de seguimento de estudo.

## 3.2 CARACTERÍSTICAS DAS COLETAS

Para os estudos de validação e de seguimento de cães, empregaram-se amostras coletadas em inquéritos sorológicos para pesquisa de infecção por *L. infantum*.

- **Santa Fé do Sul e Jales-SP**: coleta em 2015 e 2014/2015, casa a casa, em dois bairros de cada município. A prevalência canina dos municípios nos anos de 2014/2015 foi 5-10%.
- **Adamantina-SP**: coleta em 2014, em posto fixo, em conjunto com o programa de vacinação antirrábica.
- **Votuporanga-SP**: coleta em 2014/2015, em conjunto com o programa de distribuição de coleiras, em postos móveis, abrangendo todo o município. A prevalência de infecção por *L. infantum* nos anos de 2014 e 2015 foi 15% e 5%, respectivamente.
- **Araçatuba-SP**: coleta casa a casa.
- **Várzea Grande-MT**: coleta em 2012/2013, em três bairros do município, onde havia notificação de casos humanos de LV e se desconhecia a prevalência canina previamente.
- **Colares-PA**: coleta em 2013/2014, em conjunto com o projeto de castração dos animais.
- **Soure-PA**: coleta casa a casa, em bairros selecionados, a partir de dados dos números de animais vacinados nas campanhas de vacinação antirrábica.

- **Buritiba-BA**: coleta em 2017, casa a casa.
- **Bauru-SP**: coleta em 2018, casa a casa, em dois bairros, em conjunto com o programa de encoleiramento dos animais. A prevalência de infecção por *L. infantum* em 2018 foi 6%.

## 3.3 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

A coleta das amostras de material biológico dos cães seguiu os procedimentos aprovados pelo Comitê de Ética de Pesquisa da Instituição e especificamente pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA-IMT) **(PROTOCOLO N°000305A-RECEBIDO EM: 06/02/2015).** Mantiveram-se todos os cuidados necessários em relação aos aspectos éticos na conservação e utilização correta do material biológico estocado, bem como nas informações obtidas a partir dele. Garantir-se-á a preservação rigorosa do anonimato dos proprietários e animais envolvidos.

## 3.4 TESTES SOROLÓGICOS UTILIZADOS NOS PROGRAMAS DE CONTROLE DA INFECÇÃO POR *L. infantum*

### 3.4.1 DPP - TR DPP® Leishmaniose Visceral Canina (Bio-Manguinhos, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil)

O teste imunocromatográfico, utilizado pelo Programa de Controle da infecção por *L. infantum*, pela Secretaria de Saúde de São Paulo e Ministério da Saúde para triagem dos cães, foi executado segundo orientação do fornecedor.

### 3.4.2 ELISA-*L. major*-like - EIE Leishmaniose Visceral Canina (Bio-Manguinhos, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil)

O ensaio imunoenzimático, utilizado pelo Programa de Controle da infecção por *L. infantum*, pela Secretaria de Saúde de São Paulo e Ministério da Saúde para confirmação do teste DPP positivo, foi realizado segundo o manual do fornecedor. O Ministério da Saúde preconiza que apenas as amostras positivas pelo DPP devem ser

testadas pelo teste ELISA- *L. major*-like para confirmação. Entretanto, neste estudo, submeteram-se todas as amostras ao teste imunoenzimático.

## 3.5 TESTE SOROLÓGICO DISPONÍVEL NO MERCADO

### 3.5.1 **Teste de aglutinação direta (DAT) – Direct Agglutination Test** (*Institute of Tropical Medicine*-Antwerp/Belgic)

Realizado no Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo, nas amostras previamente testadas com DPP e ELISA-*L. major*-like, segundo o protocolo do fornecedor.

Para o cálculo do *cut-off do* teste de aglutinação, empregaram-se soros de 74 cães, com exame parasitológico positivo, provenientes de áreas onde ocorre a transmissão canina de *L. infantum* e presença do vetor, e soros de 66 cães, não reagentes por DPP e ELISA-*L. major*-like, provenientes de áreas onde não ocorre a transmissão canina de *L. infantum*, com ausência local do vetor.

Para a realização do DAT, diluíram-se as amostras em série (fator 2) entre 1/20 e 1/20.480 e a partir dos títulos das amostras positivas e negativas, construiu-se uma curva ROC (Característica de operação do receptor - *Receiver Operating Characteristic*), obtendo-se os valores de sensibilidade, especificidade e *cut-off* do DAT. Utilizou-se o programa GraphPad Prism 5.01.

No inquérito canino das regiões avaliadas, inicialmente realizou-se a triagem de todos os soros nas diluições 1/20, 1/40, 1/80, 1/160 e 1/320. Os soros reagentes até a diluição 1/320 foram testados novamente nas diluições 1/320, 1/640, 1/1.280, 1/2.560, 1/5.120, 1/10.240 e 1/20.480.

## 3.6 ANTÍGENOS RECOMBINANTES

Os antígenos recombinantes K39 (rK39) *L. infantum*, K28 (rK28) e KR95 (rKR95) *L. donovani* e K18 (rK18) foram fornecidos pelo Dr. Steve G. Reed e Dr.

Greg Ireton do *Infectious Disease Research Institute* (IDRI), Seattle, Estados Unidos.

## 3.7 ELISA COM ANTÍGENOS RECOMBINANTES - rK39, rK28, rKR95 e rK18

Para a padronização do teste ELISA, utilizaram-se inicialmente duas amostras positivas (parasitológico positivo) e uma negativa (parasitológico e DAT negativos). Na Tabela 1, estão os parâmetros testados empregando os diferentes antígenos recombinantes.

**Tabela 1 -** Parâmetros testados para padronização do ELISA com rK39, rK28, rKR95 e rK18.

| PARÂMETROS TESTADOS | |
|---|---|
| Placa de poliestireno | *Costar* 3690 (96 poços, meia área) |
| Concentração do antígeno | 0,5 µg/mL (rK39) e 1,0 µg/mL (rK28, rKR95 e rK18) |
| Diluente da amostra e do conjugado | Leite desnatado a 2% e 5% |
| Diluição da amostra | 1/25, 1/50 e 1/100 |
| Diluição do conjugado | 1/5.000, 1/10.000, 1/20.000, 1/30.000, 1/40.000 e 1/50.000 |
| Tempo de incubação com cromógeno | 5 min, 7 min, 10 min e 15 min |

Sensibilizaram-se placas de poliestireno *high binding* de 96 poços (meia área), (*Corning*, *Incorporated*, New York, EUA), separadamente com cada um dos antígenos (50 µL/poço), diluídos em tampão carbonato/bicarbonato 0,06M pH 9,6, na concentração 0,5 µg/mL (rK39) e 1 µg/mL (rK28, rKR95 e rK18). Após a incubação *overnight* a 4ºC, em câmara úmida, precedeu-se à lavagem das placas, três vezes com salina tamponada com fosfato ("phosphate-buffered saline" = PBS) 0,01M, pH 7,2 contendo detergente Tween 20 a 0,05% (Polyoxyethylene-sorbitan monolaurate, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) (PBS-T).

Bloquearam-se as placas 125 µL/poço de PBS-T contendo leite desnatado (Molico, Nestlé) a 5% (PBS-T-L 5%), com incubação a 37ºC por 2 horas em câmara úmida, seguida de lavagem três vezes com PBS-T.

Para a padronização, diluíram-se as amostras selecionadas para a padronização 1/25, 1/50 e 1/100 em PBS-T contendo leite desnatado 2% e 5% (PBS-T-L 2% e 5%). Após aplicação das diluições das amostras em duplicata (50 µL/poço), incubaram-se as placas a 37°C em câmara úmida, durante 30 minutos, seguindo-se a lavagem cinco vezes com PBS-T.

Testaram-se seis diluições do conjugado peroxidase anti-IgG canina produzido em cabra (A40-123P-9, Bethyl): 1/5.000, 1/10.000, 1/20.000, 1/30.000, 1/40.000 e 1/50.000 em PBS-T-L 2% e 5% (50 µL/poço). Após incubação a 37ºC em câmara úmida por 30 minutos, procedeu-se à lavagem cinco vezes com PBS-T.

Para a revelação da reação, utilizou-se o cromógeno TMB/$H_2O_2$ (Tetramelitilbenzidina/peróxido de hidrogênio) (Novex-Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) (50 µL/poço), incubando as placas 5 min, 7 min, 10 min e 15 min; para a interrupção da reação utilizou-se $H_2SO_4$ 2N (25 µL/poço). Procedeu-se à leitura das absorbâncias a 450 nm, empregando leitor de ELISA (Multikan Go-Thermo Scientific, Finland).

## 3.8 CÁLCULO DO *CUT-OFF* DO TESTE ELISA

Para o cálculo da sensibilidade, especificidade e *cut-off* do ELISA com os antígenos recombinantes, empregaram-se as mesmas 74 amostras de cães infectados por *L. infantum* e 66 amostras de animais saudáveis, utilizadas para o cálculo no DAT (item 5.1).

Para a determinação do *cut-off*, construíram-se as curvas *ROC* a partir da *"absorbância percentual do padrão positivo"* das amostras positivas e negativas, calculado dividindo a absorbância de cada amostra pela absorbância do soro padrão positivo e multiplicando por 100. Empregou-se a seguinte equação:

$$absorbância\ \%\ do\ padrão\ positivo\ = \frac{Absorbância\ da\ amostra}{Absorbância\ do\ padrão\ positivo} \times 100$$

Calculou-se o IR dividindo-se os valores da *"absorbância percentual do padrão positivo"* de cada amostra pelo valor do *cut-off*, considerando reagente IR ≥ 1. Empregou-se a seguinte equação:

$$IR = \frac{absorbância\ \%\ do\ padrão\ positivo}{cut - off}$$

Também foram construídas curvas *ROC* a partir dos valores *"absorbância percentual do padrão positivo"* de 19 amostras de soro de animais assintomáticos e reagentes nos testes DAT, DPP e ELISA-*L. major*-like e de 66 amostras de animais saudáveis.

## 3.9 REPETITIVIDADE

Ensaiaram-se, em uma mesma placa, 30 replicatas de uma mesma amostra de soro positivo e 30 replicatas de uma amostra de soro negativo. Calculou-se o coeficiente de variação (CV) para cada antígeno pela seguinte fórmula:

$$CV = \frac{desvio\ padrão\ x\ 100}{média}$$

## 3.10 REPRODUTIBILIDADE

Ensaiaram-se, por dia em uma mesma placa, 10 replicatas de uma mesma amostra de soro positivo e 10 replicatas de uma amostra de soro negativo. Repetiu-se esse ensaio em cinco dias diferentes, variando os operadores das reações. Calculou-se o coeficiente de variação (CV) para cada antígeno pela seguinte fórmula:

$$CV = \frac{desvio\ padrão\ x\ 100}{média}$$

## 3.11 ESTABILIDADE

Placas foram sensibilizadas com os antígenos rK39, rK28, rKR95 e rK18, separadamente, incubadas 18 horas à temperatura de 4°C, lavadas, bloqueadas, vedadas e armazenadas a 4ºC e a -20°C, até o momento do seu uso. Realizaram-se os testes nos dias 0, 7, 30, 90 e 180 para as placas armazenadas a 4ºC e -20ºC, com os diferentes antígenos estudados. Um dia antes de cada teste, sensibilizaram-se placas para controle dos antígenos. Para teste de cada antígeno, empregou-se uma amostra controle negativa em duplicata, uma amostra controle positiva em duplicata e um painel com 20 amostras positivas, em duplicata. Para avaliação da estabilidade das placas, os valores da porcentagem da absorbância de cada amostra em relação ao padrão positivo foram tabulados em função do tempo de armazenamento e construíram-se gráficos de regressão linear das amostras empregadas, para cada antígeno e nas temperaturas 4ºC e -20ºC. Empregou-se o software *GraphPad Prism* 5.01.

## 3.12 VIABILIDADE DE APLICAÇÃO DO TESTE ELISA EM LABORATÓRIOS DE ÁREAS ENDÊMICAS

Para esse estudo, compararam-se os resultados do teste ELISA com os antígenos recombinantes, quando realizados no laboratório do IMT e em laboratórios de outras localidades onde a leishmaniose é endêmica. A finalidade desse estudo foi garantir a funcionalidade dos testes, independentemente do local, desde que realizados em condições adequadas.

### 3.12.1 TREINAMENTO DAS EQUIPES DE LABORATÓRIOS DE ÁREAS ENDÊMICAS

O treinamento foi realizado em áreas onde há endemia para infecção por *L. infantum*, a saber, laboratório de Leishmanioses da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT), laboratório da Escola

de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal da Bahia (UFBA), Instituto Adolfo Lutz (IAL) de São Paulo e Instituto Adolfo Lutz (IAL) de São José do Rio Preto. Nesses laboratórios, treinaram-se equipes locais, com acompanhamento do protocolo padronizado de cada um dos testes com antígenos recombinantes.

### 3.12.2 REALIZAÇÃO DOS TESTES NOS LABORATÓRIOS DE ÁREAS ENDÊMICAS

Após o treinamento das equipes locais, enviaram-se reagentes e insumos para as instituições: placas sensibilizadas com os quatro antígenos recombinantes, sais para PBS pesados, leite desnatado, conjugado, cromógeno, ácido sulfúrico e amostras padrão, para serem usadas como controle positivo e controle negativo das reações.

Nesses laboratórios utilizaram-se soros de animais de municípios com transmissão canina de *L. infantum* e presença do vetor de *Leishmania*. Ensaiaram-se uma amostra controle positiva e uma amostra controle negativa, em duplicata, enviadas pelo IMT, e amostras locais, em duplicata.

Todas as amostras ensaiadas em cada laboratório foram enviadas para o IMT para que os testes fossem repetidos e seus resultados comparados com os dos testes realizados nas condições dos laboratórios das áreas endêmicas.

## 3.13 ESTUDO DE ANIMAIS DE SEGUIMENTO

Para avaliar se os testes estudados detectavam precocemente animais infectados, a partir de uma coorte de 600 cães de Bauru-SP, selecionaram-se amostras de 35 cães dos quais haviam sido coletadas amostras no tempo 1 e 180 dias de seguimento.

As amostras dessa coorte haviam sido previamente ensaiadas pelos testes DPP / ELISA-*L. major*-like, em Bauru-SP. As amostras dos 35 cães selecionados para nosso estudo foram submetidas aos testes ELISA-rK39, -rK28 e -rKR95.

## 3.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística, fixaram-se os níveis de significância dos testes empregados aceitando um erro tipo 1 de 5% ($\alpha$=0,05).

Empregaram-se os seguintes softwares:

**a) *GraphPad Prism* 5** – construção das Curvas *ROC*, cálculo de sensibilidade, especificidade, intervalos de confiança de 95% de probabilidade e construção de gráficos. Avaliação da concordância do resultado das técnicas (dois a dois) por meio do índice *kappa* e respectivo intervalo de confiança de 95% de probabilidade. Avaliação da estabilidade das placas sensibilizadas através de regressão linear de cada uma das amostras. Comparação entre os índices de reatividade das amostras frente aos antígenos recombinantes, empregando análise de variância de amostras pareadas (ANOVA), seguida do teste de comparações múltiplas de Tukey (dados paramétricos) ou pelo teste de Friedman, seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn (dados não-paramétricos).

**b) *Microsoft Office Excel* 2013** – confecção de planilhas de dados, construção de gráficos e tabelas.

**c) *Sigma Stat* 3.5** – Comparação dos métodos empregados e verificação da existência de associação marginal por meio do teste de McNemar. Comparação entre proporções através do teste qui-quadrado ou teste exato de Fisher.

# RESULTADOS

# RESULTADOS

## 4.1 PADRONIZAÇÃO DE ELISA-rK39, ELISA-rK28, ELISA-rKR95 e ELISA-rK18

Entre as diversas variáveis testadas para cada parâmetro estudado na padronização de cada um dos testes ELISA utilizando antígenos recombinantes, verificou-se que as melhores condições foram: concentração de antígeno 0,5 µg/mL (rK39) e 1,0 µg/mL (rK28, rKR95 e rK18); soro diluído 1/25 (rK18) e 1/100 (rK39, rK28 e rKR95); conjugado diluído 1/40.000 (todos os antígenos), tempo de cromógeno 5 minutos (rK39, rK28 e rKR95) e 7 minutos (rK18) (Tabela 2).

**Tabela 2 -** Parâmetros escolhidos na padronização do ELISA-rK39, -rK28, -rKR95 e -rK18.

| PARÂMETROS | rK39 | rK28 | rKR95 | rK18 |
|---|---|---|---|---|
| Concentração de antígeno | **0,5 µg/mL** | **1,0 µg/mL** | **1,0 µg/mL** | **1,0 µg/mL** |
| Volume de solução de bloqueio | **125 µL** | **125 µL** | **125 µL** | **125 µL** |
| Concentração de leite desnatado na solução de bloqueio | **5%** | **5%** | **5%** | **5%** |
| Concentração de leite desnatado no diluente de soros e conjugado | **5%** | **5%** | **5%** | **5%** |
| Diluição das amostras | **1/100** | **1/100** | **1/100** | **1/25** |
| Diluição do conjugado | **1/40.000** | **1/40.000** | **1/40.000** | **1/40.000** |
| Volume de TMB | **50 µL** | **50 µL** | **50 µL** | **50 µL** |
| Tempo de reação de TMB | **5 minutos** | **5 minutos** | **5 minutos** | **7 minutos** |
| Volume de $H_2SO_4$ (2N) | **25 µL** | **25 µL** | **25 µL** | **25 µL** |

### 4.1.1 PROTOCOLO FINAL DO ELISA-rK39, -rK28, -rKR95 e - rK18

Sensibilizar as placas (meia área) de poliestireno de 96 poços, com tratamento *high binding* (*Corning, Incorporated*, New York, EUA) com cada um dos antígenos

(50 µL/poço), diluídos em tampão carbonato/bicarbonato 0,06M pH 9,6, na concentração 0,5 µg/mL (rK39) e 1 µg/mL (rK28, rKR95 e rK18) e incubar *overnight* a 4ºC, em câmara úmida. No dia seguinte, lavar as placas 3 vezes com salina tamponada com fosfato (*phosphate-buffered saline* = PBS) 0,01M, pH 7,2 contendo detergente Tween 20 a 0,05% (Polyoxyethylene-sorbitan monolaurate, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) (PBS-T). Bloquear as placas com 125 µL/poço de PBS-T contendo leite desnatado a 5% (PBS-T-L 5%), incubá-las a 37ºC por 2 horas em câmara úmida e lavá-las 3 vezes com PBS-T. Diluir as amostras e os controles 1/25 (rK18) e 1/100 (rK39, rK28 e rKR95) em PBS-T contendo leite desnatado 5% (PBS-T-L 5%), aplicá-las nas placas em duplicata (50 µL/poço) e incubar a 37°C em câmara úmida durante 30 minutos. Após, lavar as placas 5 vezes com PBS-T. Diluir o conjugado peroxidase anti-IgG canina produzida em cabra (A40-123P-9, Bethyl) 1/40.000 em PBS-T-L 5%, aplicar (50 µL/poço) e incubar a 37ºC em câmara úmida por 30 minutos. Após, lavar as placas 5 vezes com PBS-T. Para a revelação da reação, aplicar 50 µL/poço do cromógeno TMB/$H_2O_2$ (Tetramelitilbenzidina) (Novex-Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), incubar por 5 min (rK39, rK28 e rKR95) e 7 min (rK18), ao abrigo da luz e interromper a reação com 25 µL/poço de $H_2SO_4$ 2N. Ler as absorbâncias de cada placa a 450 nm, empregando leitor de ELISA (Multikan Go-Thermo Scientific, Finland).

### 4.1.2 CÁLCULO DO *CUT-OFF* E AVALIAÇÃO DO ELISA-rK39, -rK28, -rKR95 e - rK18

A partir das curvas *ROC* (figura 4) construídas empregando os valores da *"absorbância percentual do padrão positivo*" de cada uma das 74 amostras positivas e 66 negativas, obteve-se cut-*off* 6,19 no ELISA-rK39; 13,42 no ELISA-rK28; 8,92 no ELISA-rKR95; 12,76 no ELISA-rK18. A sensibilidade dos testes ELISA-rK39, -rK28, -rKR95 e -rK18 foi 97,3%; 95,9%; 95,9% e 89,1% e a especificidade, 100,0%; 100,0%; 100,0% e 98,6%, respectivamente.

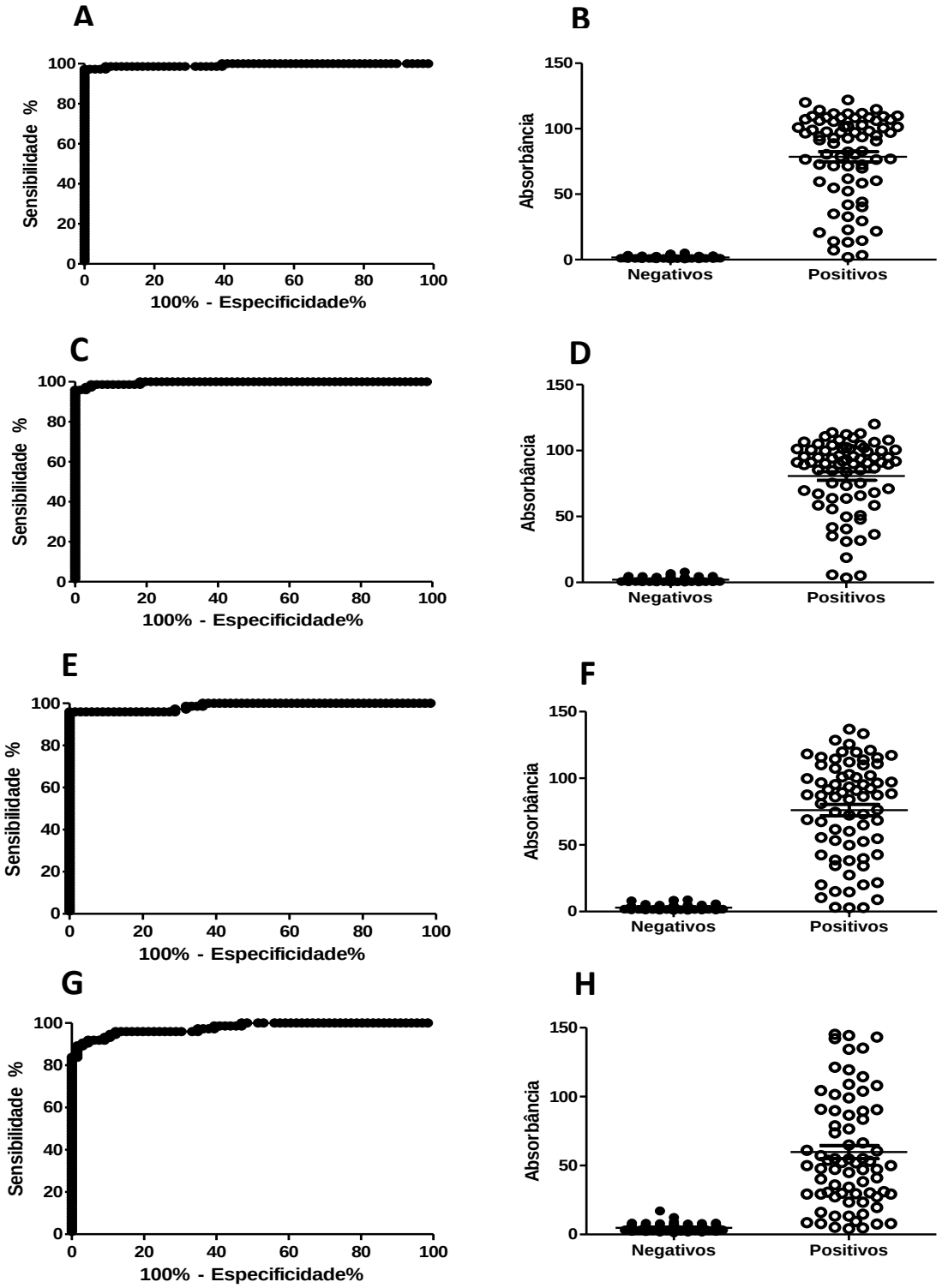


**Figura 4 –** Curva *ROC* (A, C, E, G) e valores de absorbância (B, D, F, H) dos testes ELISA-rK39, rK28, rKR95 e rK18.
Curvas *ROC* construídas a partir dos valores da *"absorbância percentual do padrão positivo*" e valores de absorbância obtidos nos testes ELISA-rK39 (A, B), ELISA-rK28 (C, D), ELISA-rKR95 (E, F) e ELISA-rK18 (G, H), na pesquisa de anticorpos IgG, ensaiando 74 amostras de cães parasitologicamente positivos para *L. infantum* e 66 de cães sadios.

### 4.1.3 AVALIAÇÃO DO ELISA-rK39, -rK28, -rKR95 e - rK18 COM AMOSTRAS DE ANIMAIS ASSINTOMÁTICOS

Analisando as curvas *ROC* (Figura 5), construídas a partir dos da *"absorbância percentual do padrão positivo"* de cada uma das 19 amostras de animais assintomáticos, positivas nos testes DAT, DPP e ELISA-*L. major*-like e 66 amostras de cães negativas, a sensibilidade dos testes ELISA-rK39, -rK28, -rKR95 e -rK18 foi, respectivamente, 94,7%; 100,0%; 90,9% e 73,6% e a especificidade, 98,4%; 96,9%; 100,0% e 96,9%.

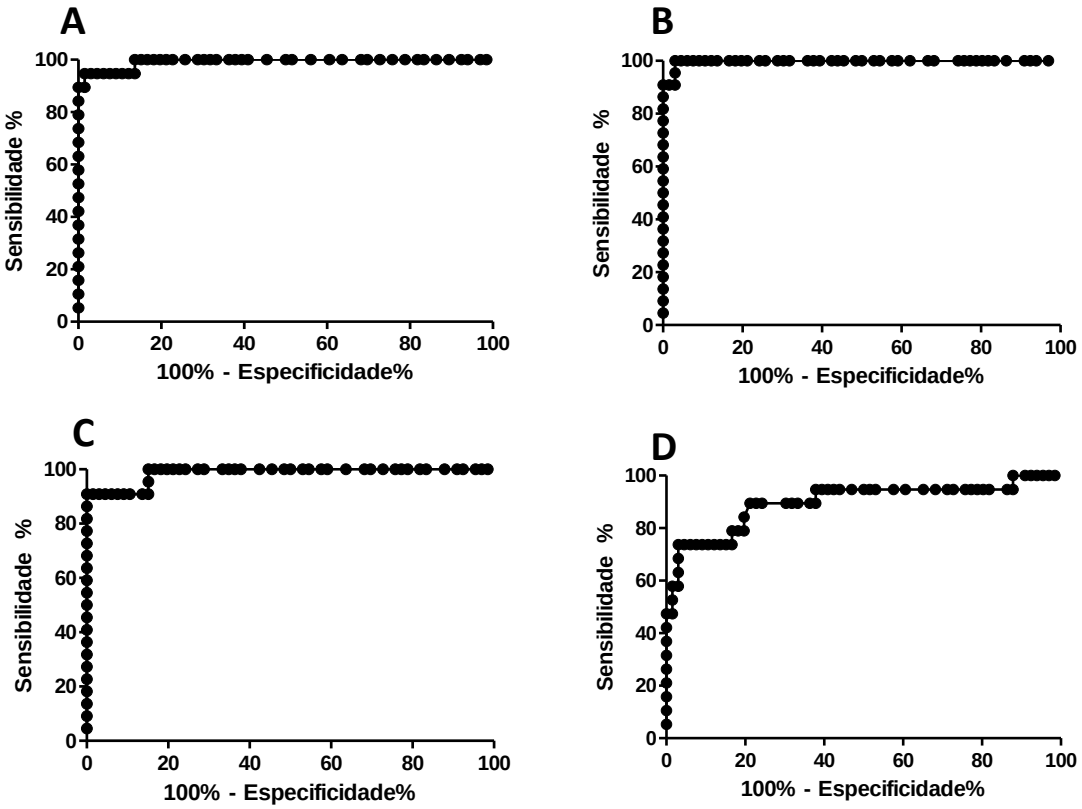


**Figura 5 -** Curvas *ROC* (A, B, C e D) do teste ELISA-rK39, -rK28, -rKR95 e -rK18. Curvas *ROC* obtidas a partir dos valores da *"absorbância percentual do padrão positivo"* do teste ELISA-rK39 (A), -rK28 (B), -rKR95 (C) e -rK18 (D), na pesquisa de anticorpos IgG, ensaiando 19 amostras de cães assintomáticos positivos para *L. infantum* pelos testes DPP + ELISA-*L.major*-like e DAT e 66 de cães sadios.

## 4.2 REPETITIVIDADE E REPRODUTIBILIDADE

A amostra positiva testada foi reagente em todas as replicatas e o coeficiente de variação dos índices de reatividade foi bem menor que 20% para repetitividade e 25% para reprodutibilidade (Meneghisse, 2007) com todos os antígenos (Tabela 3).

**Tabela 3**. Coeficiente de variação do estudo da repetitividade e reprodutibilidade de uma mesma amostra positiva para infecção por *L. infantum*.

| ELISA | rK39 | rK28 | rKR95 | rK18 |
|---|---|---|---|---|
| **Repetitividade** | 4,4% | 3,8% | 4,7% | 5,0% |
| **Reprodutibilidade** | 10,5% | 13,4% | 10,9% | 17,1% |

## 4.3 ESTABILIDADE

Na Figura 6, encontram-se gráficos de regressão linear de uma das amostras positivas testadas, empregando placas sensibilizadas com os antígenos rK39, rK28, rKR95 e rK18 e armazenadas a 4°C e -20°C, por até 180 dias (inclinação da curva da regressão linear, $p > 0,05$). Em cada gráfico observa-se que a curva de regressão linear da placa armazenada e da sensibilizada no dia anterior (controle) praticamente se sobrepõem.

Entre as 20 amostras positivas do painel, testadas com os quatro antígenos recombinantes, nenhuma apresentou diminuição significante na reatividade, até 180 dias de armazenamento (inclinação da curva da regressão linear, $p > 0,05$). O mesmo ocorreu com o soro padrão positivo e o padrão negativo.

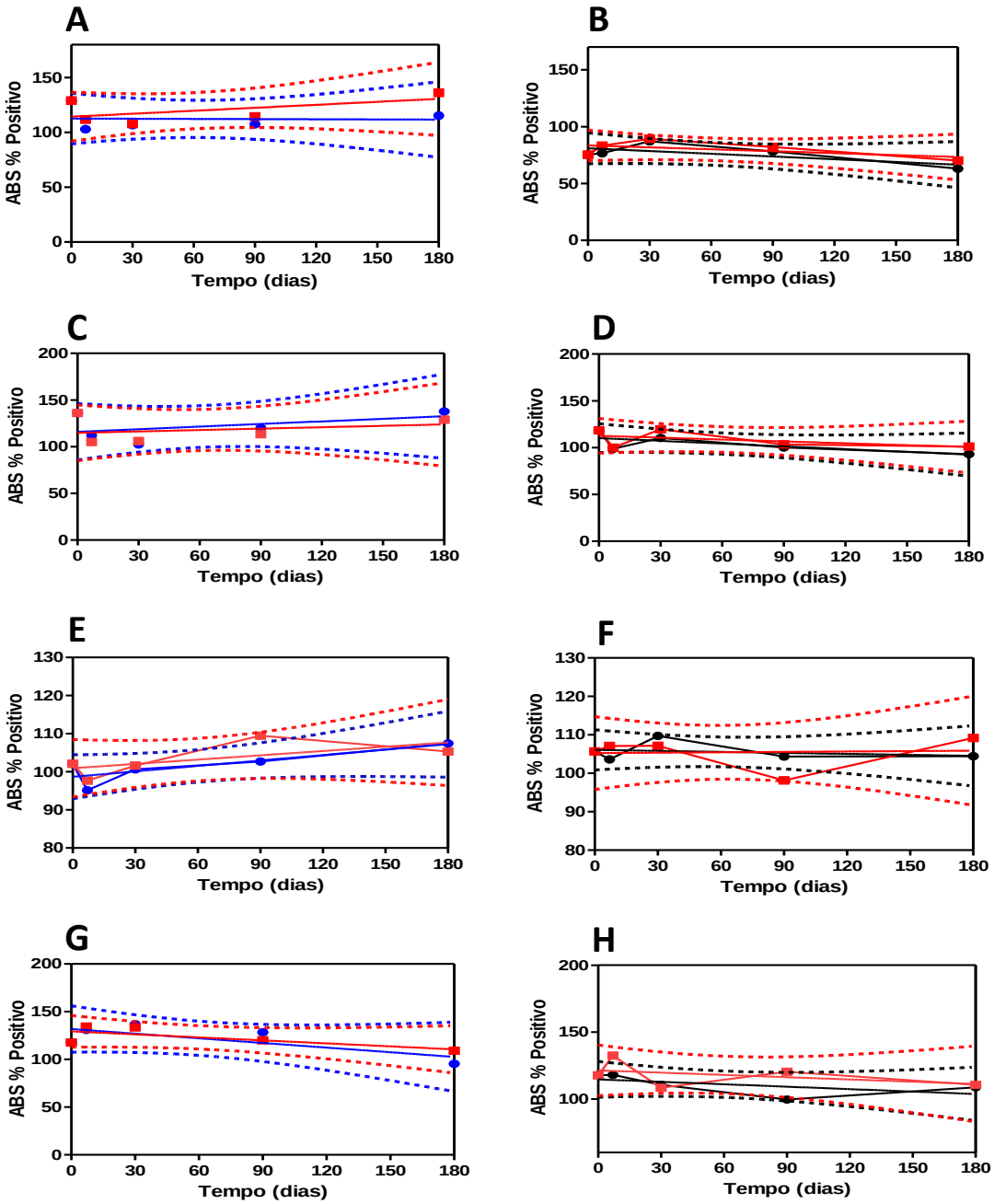


**Figura 6 –** Regressão linear para estudo da estabilidade de placas pré-sensibilizadas nos testes ELISA-rK39 (A, B), rK28 (C, D), rKR95 (E, F) e rK18 (G, H), nas temperaturas 4°C e -20°C, respectivamente.
Gráficos de regressão linear entre os valores de porcentagem da absorbância de cada amostra em relação ao padrão positivo e o tempo de armazenamento das placas, nas temperaturas de 4°C ● e de -20°C ●, obtidos nos testes ELISA-rK39 (A, B), ELISA-rK28 (C, D), ELISA-rKR95 (E, F) e ELISA-rK18 (G, H) em comparação ao controle ●).
As linhas pontilhadas indicam intervalo de confiança (IC=95%).
ABS % Positivos - porcentagem da absorbância de cada amostra em relação ao padrão positivo

## 4.4 DPP / ELISA-*L. major*-like (AMOSTRAS CARACTERIZADAS)

Empregando o algoritmo preconizado pelo Ministério da Saúde (DPP dos soros dos 74 cães com exame parasitológico positivo, seguido de ELISA-*L. major*-like das amostras reagentes pelo DPP), obteve-se 93,3% de sensibilidade. A especificidade com as 66 amostras de cães saudáveis foi de 100,0% (todas as amostras foram negativas no DPP).

## 4.5 TESTE DE AGLUTINAÇÃO DIRETA (DAT)

### 4.5.1 CÁLCULO DO *CUT-OFF* E AVALIAÇÃO DO DAT

A Figura 7 mostra a curva *ROC* construída a partir dos títulos das amostras positivas (cães com infecção por *L. infantum*) e negativas (cães saudáveis), obtendo-se sensibilidade de 97,3% e especificidade de 100,0%, para um *cut-off* de 1/640.

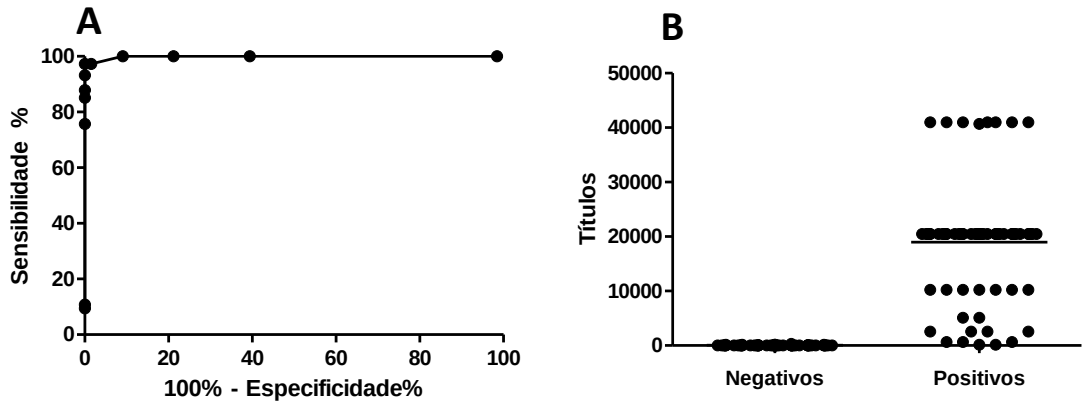


**Figura 7 –** Curva *ROC* (A) e distribuição dos títulos (B) do teste DAT.
Curva *ROC* (A) obtida a partir dos títulos obtidos no teste de aglutinação direta (DAT), ensaiando 74 amostras de cães parasitologicamente positivos para infecção por *L. infantum* e 66 de cães sadios; distribuição dos títulos das amostras ensaiadas (B).

## 4.6 AVALIAÇÃO DA CONCORDÂNCIA ENTRE OS TESTES COM AMOSTRAS CARACTERIZADAS

Utilizando-se 74 amostras de cães positivos para *L. infantum* e de 66 animais sadios, a concordância calculada pelo índice *Kappa* (k) entre os resultados dos testes (dois a dois) DPP, ELISA-*L. major*-like, DAT, ELISA-rK39, -rK28, -rKR95 e -rK18, foi muito boa (k =0,81-0,99). A única concordância perfeita (k=1,0) foi entre ELISA-rK28 e -rKR95.

## 4.7 ESCOLHA DO TESTE DE REFERÊNCIA PARA AMOSTRAS DE INQUÉRITO

Das 74 amostras de cães com parasitológico positivo, os testes DPP / ELISA-*L. major*-like (recomendados atualmente pelo Ministério da Saúde) confirmaram 69 amostras positivas (sensibilidade 93,2%), enquanto o DAT detectou 72 positivas (sensibilidade 97,3%); uma amostra não reagiu em nenhum dos testes (McNemar test, p=0,3711). Para o estudo das amostras de inquérito, utilizou-se o DAT como teste de referência para comparar com os resultados dos testes ELISA com antígenos recombinantes, já que o DAT apresentou desempenho semelhante ao do algoritmo que é preconizado na rotina de inquérito canino.

## 4.8 RESULTADOS DO DAT, DPP, ELISA-*L. major*-like, ELISA-rK39, -rK28 e -rKR95 NAS AMOSTRAS DE INQUÉRITO

Como a recomendação pelo Ministério da Saúde é triagem pelo teste DPP e confirmação com o teste ELISA-*L. major*-like, considerou-se reagente a amostra positiva nos dois testes. As análises do teste ELISA-rK18 foram feitas, no entanto, não serão apresentadas, devido ao seu desempenho. Na Tabela 4 encontram-se os resultados das 2.530 amostras de inquérito estudadas, empregando DAT, DPP + ELISA-*L. major*-like, ELISA-rK39, -rK28 e -rKR95.

**Tabela 4 -** Resultados das 2.530 amostras de inquérito estudadas, empregando DAT, DPP + ELISA-*L. major*-like, ELISA-rK39, -rK28 e -rKR95.

| Municípios | DAT | | DPP + ELISA *L. major*-like | | ELISA-rK39 | | ELISA-rK28 | | ELISA-rKR95 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | **R (%)** | **NR (%)** | **R (%)** | **NR (%)** | **R (%)** | **NR (%)** | **R (%)** | **NR (%)** | **R (%)** | **NR (%)** |
| **Adamantina (N: 103)** | 12 (11,7) | 91 (88,3) | 17 (16,5) | 86 (83,5) | 29 (28,2) | 74 (71,8) | 32 (31,1) | 71 (68,9) | 24 (23,3) | 79 (76,6) |
| **Araçatuba (N: 346)** | 178 (51,4) | 168 (48,6) | 175 (50,6) | 171 (60,7) | 200 (49,4) | 146 (42,2) | 212 (61,3) | 134 (38,7) | 188 (54,3) | 158 (45,7) |
| **Jales (N: 321)** | 90 (28,0) | 231 (72,0) | 87 (27,1) | 234 (72,9) | 118 (36,8) | 203 (63,2) | 128 (39,9) | 193 (60,1) | 127 (39,6) | 194 (60,1) |
| **Santa Fé do Sul (N: 48)** | 3 (6,3) | 45 (93,8) | 3 (6,3) | 45 (93,8) | 15 (31,3) | 33 (68,8) | 7 (14,6) | 41 (85,4) | 12 (25,0) | 36 (75,0) |
| **Votuporanga (N: 297)** | 46 (15,5) | 251 (84,5) | 39 (13,1) | 258 (86,9) | 74 (24,9) | 223 (75,1) | 75 (25,3) | 222 (74,7) | 70 (23,6) | 227 (76,4) |
| **Várzea Grande (N: 521)** | 63 (12,1) | 458 (87,9) | 36 (6,9) | 485 (93,1) | 129 (24,8) | 392 (75,2) | 82 (15,7) | 439 (84,3) | 113 (21,7) | 408 (78,3) |
| **Colares (N: 486)** | 8 (1,6) | 478 (98,4) | 1 (0,2) | 485 (99,2) | 33 (6,8) | 453 (93,2) | 25 (5,1) | 461 (94,9) | 41 (8,4) | 445 (91,6) |
| **Soure (N: 135)** | 43 (31,9) | 92 (68,1) | 22 (16,3) | 113 (83,7) | 43 (31,9) | 92 (68,1) | 42 (31,1) | 93 (68,9) | 38 (28,1) | 97 (71,9) |
| **Salvador (N: 273)** | 44 (16,1) | 229 (83,9) | 40 (14,7) | 233 (85,3) | 71 (26,0) | 202 (74,0) | 71 (26,0) | 202 (74,0) | 74 (27,1) | 199 (72,9) |
| **Total (N: 2530)** | **487 (19,2)** | 2043 (80,8) | **420 (16,6)** | 2110 (83,4) | **712 (28,1)** | 1818 (71,9) | **674 (26,6)** | 1856 (73,4) | **687 (27,1)** | 1843 (72,9) |

R – reagente, NR – não reagente, N – número de amostras

A Figura 8 apresenta as porcentagens de positividade das amostras de cada localidade estudada, empregando os testes DAT, DPP + ELISA-*L. major*-like, ELISA-rK39, -rK28 e -rKR95.

DAT apresentou positividade significativamente maior que DPP + ELISA-*L. major*-like em Várzea Grande, Colares, Soure (teste exato de Fisher, p<0,05) e no total de amostras (qui-quadrado, p=0,0156).

A positividade das amostras de inquérito foi superior nos testes ELISA com antígenos recombinantes em relação ao DAT e DPP + ELISA-*L. major*-like, no total de amostras (qui-quadrado, p<0,0001) e na maioria das localidades (teste exato de Fisher, p<0,05). As exceções foram DAT *versus* rK39 e *versus* rKR95 em Araçatuba e Soure; DAT *versus* rK28 em Santa Fé do Sul, Várzea Grande e Soure; DPP + ELISA-*L. major*-like *versus* rK39 e *versus* rKR95 em Adamantina e Araçatuba; DPP + ELISA-*L. major*-like *versus* rK28 em Santa Fé do Sul.

Comparado a ELISA-rK39, ELISA-rK28 detectou menor positividade em Várzea Grande (teste exato de Fisher, p=0,0004). Em Santa Fé do Sul, a menor positividade obtida no ELISA-rK28 não foi significante (teste exato de Fisher, p=0,0878), talvez pelo menor número de amostras estudadas nessa localidade. Se comparado a ELISA-rKR95, ELISA-rK28 apresentou menor positividade em Várzea Grande (teste exato de Fisher, p= 0,0170) e tendência a menor positividade em Colares (teste exato de Fisher, p= 0,0551). Não houve diferença entre a positividade de ELISA-rK39 e ELISA-rKR95 (teste exato de Fisher, valores de p entre 0,2711 e 0,8684).

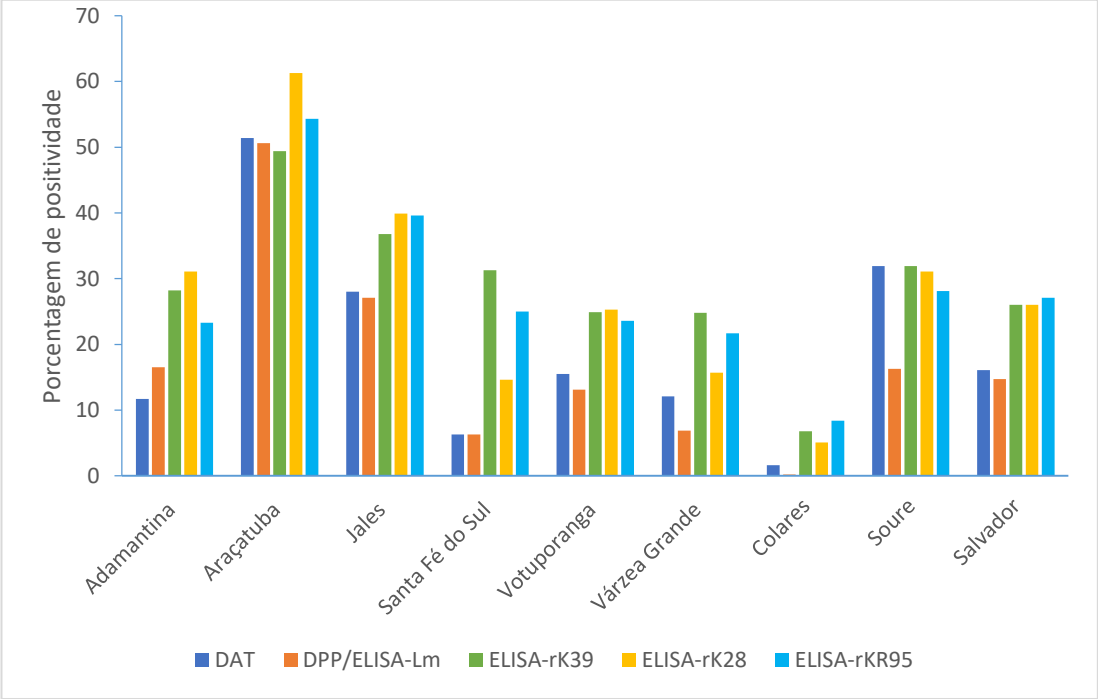


**Figura 8 -** Positividade dos testes DAT, DPP + ELISA-*L. major*-like, ELISA-rK39, -rK28 e -rKR95 no ensaio de 2.530 amostras de diferentes localidades do Brasil.

## 4.9 CONCORDÂNCIA DOS TESTES DAT, DPP + ELISA-*L. major*-like, ELISA-rK39, -rK28 e -rKR95 NAS AMOSTRAS DE INQUÉRITO

A Tabela 5 demonstra que a concordância entre o teste DAT e DPP + ELISA-*L. major*-like foi boa e entre o DAT e os testes ELISA-rK39, -rKR95 e -rK28 foi moderada. Houve diferença entre o DAT e os demais testes comparados, tendo o DAT detectado uma positividade significativamente maior que DPP + ELISA-*L. major*-like (teste de McNemar, p<0,001) e significativamente menor que o ELISA com os antígenos recombinantes (teste de McNemar, p<0,001).

**Tabela 5 -** Concordância entre os resultados do teste DAT e os demais testes realizados com as 2.530 amostras de inquérito.

| Técnicas | DAT | | | | Total | | Kappa (IC 95%) | McNemar p |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | POSITIVO | | NEGATIVO | | | | | |
| | N | (%) | N | (%) | N | (%) | | |
| **DPP + ELISA *L. major*-like** | | | | | | | | |
| Positivo | 356 | 14,1 | 64 | 2,5 | 420 | 16,6 | 0,738 (0,704-0,773) | <0,001 |
| Negativo | 131 | 5,2 | 1979 | 78,2 | 2110 | 83,4 | | |
| **Total** | 487 | 19,2 | 2043 | 80,8 | 2530 | 100,0 | | |
| **ELISA - rK39** | | | | | | | | |
| Positivo | 388 | 15,3 | 324 | 12,8 | 712 | 28,1 | 0,543 (0,505-0,580) | <0,001 |
| Negativo | 99 | 3,9 | 1719 | 67,9 | 1818 | 71,9 | | |
| **Total** | 487 | 19,2 | 2043 | 80,8 | 2530 | 100,0 | | |
| **ELISA – rK28** | | | | | | | | |
| Positivo | 396 | 15,7 | 278 | 11,0 | 674 | 26,6 | 0,591 (0,554-0,628) | <0,001 |
| Negativo | 91 | 3,6 | 1765 | 69,8 | 1856 | 73,4 | | |
| **Total** | 487 | 19,2 | 2043 | 80,8 | 2530 | 100,0 | | |
| **ELISA – rKR95** | | | | | | | | |
| Positivo | 376 | 14,9 | 311 | 12,3 | 687 | 27,2 | 0,536 (0,498-0,574) | <0,001 |
| Negativo | 111 | 4,4 | 1732 | 68,5 | 1843 | 72,8 | | |
| **Total** | 487 | 19,2 | 1843 | 72,8 | 2530 | 100,0 | | |

N – número de amostras

A Tabela 6 demonstra que a concordância entre os testes DPP + ELISA-*L. major*-like e ELISA-rK28 foi boa e com ELISA-39 e -rKR95 foi moderada. Houve diferença entre o DPP + ELISA-*L. major*-like e o ELISA com os antígenos recombinantes, que apresentou uma positividade significativamente maior (teste de McNemar, p<0,001).

**Tabela 6 -** Concordância entre os resultados do teste DPP + ELISA *L. major*-like e os demais testes realizados com as 2.530 amostras de inquérito.

| Técnicas | DPP + ELISA *L. major*-like | | | | Total | | Kappa (IC 95%) | McNemar p |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | POSITIVO | | NEGATIVO | | | | | |
| | N | (%) | N | (%) | N | (%) | | |
| **ELISA - rK39** | | | | | | | | |
| Positivo | 381 | 15,1 | 331 | 13,1 | 712 | 28,1 | 0,587 (0,551-0,623) | <0,001 |
| Negativo | 39 | 1,5 | 1779 | 70,3 | 1818 | 71,9 | | |
| **Total** | 420 | 16,6 | 2110 | 83,4 | 2530 | 100,0 | | |
| **ELISA – rK28** | | | | | | | | |
| Positivo | 394 | 15,6 | 280 | 11,1 | 674 | 26,6 | 0,648 (0,613-0,683) | <0,001 |
| Negativo | 26 | 1,0 | 1830 | 72,3 | 1856 | 73,4 | | |
| **Total** | 420 | 16,6 | 2110 | 83,4 | 2530 | 100,0 | | |
| **ELISA – rKR95** | | | | | | | | |
| Positivo | 369 | 14,6 | 318 | 12,6 | 687 | 27,2 | 0,580 (0,543-0,617) | <0,001 |
| Negativo | 51 | 2,0 | 1792 | 70,8 | 1843 | 72,8 | | |
| **Total** | 420 | 16,6 | 2110 | 83,4 | 2530 | 100,0 | | |

N – número de amostras

A tabela 7 demonstra que a concordância entre o teste ELISA-rK39 e -rK28 e -rKR95 foi boa. Não houve diferença entre a positividade do ELISA-rK39 e a dos outros dois recombinantes (teste de McNemar, p>0,05).

**Tabela 7 -** Concordância entre os resultados do teste ELISA-rK39 e os demais testes realizados com as 2.530 amostras de inquérito.

| Técnicas | ELISA – rK39 | | | | Total | | Kappa (IC 95%) | McNemar p |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | POSITIVO | | NEGATIVO | | | | | |
| | N | (%) | N | (%) | N | (%) | | |
| **ELISA – rK28** | | | | | | | | |
| Positivo | 513 | 20,3 | 161 | 6,4 | 674 | 26,6 | 0,642 (0,609-0,676) | 0,051 |
| Negativo | 199 | 7,9 | 1657 | 65,5 | 1856 | 73,4 | | |
| **Total** | 712 | 28,1 | 1818 | 71,9 | 2530 | 100,0 | | |
| **ELISA – rKR95** | | | | | | | | |
| Positivo | 513 | 20,3 | 174 | 6,9 | 687 | 27,2 | 0,632 (0,598-0,666) | 0,214 |
| Negativo | 199 | 7,9 | 1644 | 65,0 | 1873 | 74,0 | | |
| **Total** | 712 | 28,1 | 1818 | 71,9 | 2530 | 100,0 | | |

N – número de amostras

A tabela 8 demonstra que a concordância entre o teste ELISA-rK28 e -rKR95 foi boa. Não houve diferença entre a positividade do ELISA-rK28 e -rKR95 (teste de McNemar, p=0,544).

**Tabela 8 -** Concordância entre os resultados do teste ELISA-rK28 e os demais testes realizados com as 2530 amostras de inquérito.

| Técnicas | ELISA – rK28 | | | | Total | | Kappa (IC 95%) | McNemar |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | POSITIVO | | NEGATIVO | | | | | |
| | N | (%) | N | (%) | N | (%) | | p |
| **ELISA – rKR95** | | | | | | | | |
| Positivo | 485 | 19,2 | 189 | 7,5 | 674 | 26,6 | 0,607 (0,572-0,642) | 0,544 |
| Negativo | 202 | 8,0 | 1654 | 65,4 | 1856 | 73,4 | | |
| **Total** | 687 | 27,2 | 1843 | 72,8 | 2530 | 100,0 | | |

N – número de amostras

## 4.10 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DE APLICAÇÃO DOS TESTES

Nas Tabelas 9 a 12 estão as comparações entre os resultados do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo e os obtidos pelas equipes dos locais onde foi realizado o estudo de viabilidade.

A concordância entre o laboratório de Leishmanioses da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT) e o do IMT foi perfeita nos testes ELISA-rK39, -rK28 e -rKR95 e muito boa no teste ELISA-rK18 (Tabela 9).

**Tabela 9 -** Concordância entre os resultados do laboratório de Leishmanioses da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT) e o Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (IMT) utilizando 50 amostras colhidas em Cuiabá.

| | Técnicas | IMT | | | | | | Kappa |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | POSITIVO | | NEGATIVO | | Total | | |
| | | N | (%) | N | (%) | N | (%) | (IC 95%) |
| UFMT | **ELISA - rK39** | | | | | | | |
| | **POSITIVO** | 27 | (54,0) | 0 | (0,0) | 27 | (54,0) | 1,000 (1,000-1,000) |
| | **NEGATIVO** | 0 | (0,0) | 23 | (46,0) | 23 | (46,0) | |
| | **Total** | 27 | (54,0) | 23 | (46,0) | 50 | (100,0) | |
| | **ELISA – rK28** | | | | | | | |
| | **POSITIVO** | 26 | (52,0) | 0 | (0,0) | 26 | (52,0) | 1,000 (1,000-1,000) |
| | **NEGATIVO** | 0 | (0,0) | 24 | (48,0) | 24 | (48,0) | |
| | **Total** | 26 | (52,0) | 24 | (48,0) | 50 | (100,0) | |
| | **ELISA – rKR95** | | | | | | | |
| | **POSITIVO** | 25 | (50,0) | 0 | (0,0) | 25 | (50,0) | 1,000 (1,000-1,000) |
| | **NEGATIVO** | 0 | (0,0) | 25 | (50,0) | 25 | (50,0) | |
| | **Total** | 25 | (50,0) | 25 | (50,0) | 50 | (100,0) | |
| | **ELISA – Rk18** | | | | | | | |
| | **POSITIVO** | 26 | (52,0) | 1 | (2,0) | 27 | (54,0) | 0.919 (0,810-1,000) |
| | **NEGATIVO** | 1 | (2,0) | 22 | (44,0) | 23 | (46,0) | |
| | **Total** | 27 | (54,0) | 23 | (46,0) | 50 | (100,0) | |

N – número de amostras

A concordância entre o IMT e o Instituto Adolfo Lutz (IAL) de São Paulo foi perfeita nos testes ELISA-rK39, -rK28, -rKR95 e -rK18 (Tabela 10).

**Tabela 10 -** Concordância entre os resultados do Instituto Adolfo Lutz (IAL) de São Paulo e o Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (IMT) utilizando 45 amostras colhidas no interior do estado de São Paulo.

| | Técnicas | IMT | | | | Total | | Kappa (IC 95%) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | POSITIVO | | NEGATIVO | | | | |
| | | N | (%) | N | (%) | N | (%) | |
| IAL-São Paulo (SP) | **ELISA - rK39** | | | | | | | |
| | **POSITIVO** | 27 | (60,0) | 0 | (0,0) | 27 | (60,0) | 1,000 (1,000-1,000) |
| | **NEGATIVO** | 0 | (0,0) | 18 | (40,0) | 18 | (40,0) | |
| | **Total** | 27 | (60,0) | 18 | (40,0) | 45 | (100,0) | |
| | **ELISA – rK28** | | | | | | | |
| | **POSITIVO** | 27 | (60,0) | 0 | (0,0) | 27 | (60,0) | 1,000 (1,000-1,000) |
| | **NEGATIVO** | 0 | (0,0) | 18 | (40,0) | 18 | (40,0) | |
| | **Total** | 27 | (60,0) | 18 | (40,0) | 45 | (100,0) | |
| | **ELISA – rKR95** | | | | | | | |
| | **POSITIVO** | 27 | (60,0) | 0 | (0,0) | 27 | (60,0) | 1,000 (1,000-1,000) |
| | **NEGATIVO** | 0 | (0,0) | 18 | (40,0) | 18 | (40,0) | |
| | **Total** | 27 | (60,0) | 18 | (40,0) | 45 | (100,0) | |
| | **ELISA – Rk18** | | | | | | | |
| | **POSITIVO** | 26 | (57,8) | 0 | (0,0) | 26 | (57,8) | 1,000 (1,000-1,000) |
| | **NEGATIVO** | 0 | (0,0) | 19 | (42,3) | 19 | (42,3) | |
| | **Total** | 26 | (57,8) | 19 | (42,3) | 45 | (100,0) | |

N – número de amostras

A concordância entre o IMT e o Instituto Adolfo Lutz (IAL) de São José do Rio Preto foi perfeita nos testes ELISA-rK39, -rK28 e -rKR95 e muito boa no teste ELISA-rK18 (Tabela 11).

**Tabela 11 -** Concordância entre os resultados do Instituto Adolfo Lutz (IAL) de São José do Rio Preto e o Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (IMT) utilizando 45 amostras colhidas no interior do estado de São Paulo.

| | Técnicas | IMT | | | | Total | | Kappa (IC 95%) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | POSITIVO | | NEGATIVO | | | | |
| | | N | (%) | N | (%) | N | (%) | |
| IAL-São José do Rio Preto (SP) | **ELISA - rK39** | | | | | | | |
| | **POSITIVO** | 24 | (53,3) | 0 | (0,0) | 24 | (53,3) | 1,000 (1,000-1,000) |
| | **NEGATIVO** | 0 | (0,0) | 21 | (46,7) | 21 | (46,7) | |
| | **Total** | 24 | (53,3) | 0 | (46,7) | 45 | (100,0) | |
| | **ELISA – rK28** | | | | | | | |
| | **POSITIVO** | 27 | (60,0) | 0 | (0,0) | 27 | (60,0) | 1,000 (1,000-1,000) |
| | **NEGATIVO** | 0 | (0,0) | 18 | (40,0) | 18 | (40,0) | |
| | **Total** | 27 | (60,0) | 18 | (40,0) | 45 | (100,0) | |
| | **ELISA – rKR95** | | | | | | | |
| | **POSITIVO** | 27 | (60,0) | 0 | (0,0) | 27 | (60,0) | 1,000 (1,000-1,000) |
| | **NEGATIVO** | 0 | (0,0) | 18 | (40,0) | 18 | (40,0) | |
| | **Total** | 27 | (60,0) | 18 | (40,0) | 45 | (100,0) | |
| | **ELISA – Rk18** | | | | | | | |
| | **POSITIVO** | 25 | (55,6) | 3 | (6,7) | 28 | (62,3) | 0,863 (0,715-1,000) |
| | **NEGATIVO** | 0 | (0,0) | 17 | (37,7) | 17 | (37,7) | |
| | **Total** | 25 | (55,6) | 20 | (44,4) | 45 | (100,0) | |

N – número de amostras

A concordância entre o IMT e o laboratório da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal da Bahia (UFBA) foi boa nos testes ELISA-rK39, -rK28 e -rK18 (Tabela 12).

**Tabela 12 -** Concordância entre os resultados da Universidade Federal da Bahia (UFBA) e o Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (IMT) utilizando 45 amostras colhidas na Bahia.

| | Técnicas | IMT | | | | Total | | Kappa (IC 95%) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | POSITIVO | | NEGATIVO | | | | |
| | | N | (%) | N | (%) | N | (%) | |
| UFBA | **ELISA - rK39** | | | | | | | |
| | **POSITIVO** | 7 | (15,6) | 0 | (0,0) | 7 | (15,6) | 0,624 (0,364-0,884) |
| | **NEGATIVO** | 6 | (13,3) | 32 | (71,1) | 38 | (84,4) | |
| | **Total** | 13 | (28,9) | 32 | (71,1) | 45 | (100,0) | |
| | **ELISA – rK28** | | | | | | | |
| | **POSITIVO** | 9 | (20,0) | 0 | (0,0) | 9 | (20,0) | 0,624 (0,386-0,861) |
| | **NEGATIVO** | 7 | (15,6) | 29 | (64,4) | 36 | (80,0) | |
| | **Total** | 16 | (35,6) | 29 | (64,4) | 45 | (100,0) | |
| | **ELISA – rK18** | | | | | | | |
| | **POSITIVO** | 8 | (17,8) | 2 | (4,4) | 10 | (22,2) | 0,640 (0,378-0,902) |
| | **NEGATIVO** | 4 | (8,9) | 31 | (68,9) | 35 | (77,8) | |
| | **Total** | 12 | (26,7) | 33 | (73,3) | 45 | (100,0) | |

N – número de amostras

## 4.11 ESTUDO DE ANIMAIS DE SEGUIMENTO

Como nos testes ELISA utilizando antígenos recombinantes houve maior percentagem de resultados positivos comparados tanto ao DAT quanto ao algoritmo DPP + ELISA-*L. major*-like, suspeitamos a existência de resultados falso negativos com os testes utilizados atualmente na rotina. Para testar esta hipótese, recorremos a amostras de uma coorte com seguimento de animais por um período prolongado com testes sorológicos sequenciais.

Nessa coorte, considerando o resultado dos testes DPP + ELISA-*L. major*-like, nos dois tempos de coleta de intervenção, as amostras dos 30 animais selecionados foram analisadas em dois grupos, cada um com amostras de 15 cães.

No grupo 1 constavam amostras de 15 cães que no tempo 1 foram considerados negativos para infecção por *Leishmania* pelo algoritmo recomendado pelo Ministério da Saúde do Brasil e que se tornaram positivos após 6 meses da avaliação inicial (tempo 2).

No grupo 2 estavam amostras de 15 cães em que o teste DPP passou de negativo no tempo 1 para positivo no tempo 2, porém sem confirmação pelo ELISA-*L. major*-like.

As Figuras 9 e 10 mostram os gráficos dos índices de reatividade das amostras dos cães do grupo 1 e 2, obtidos empregando os testes ELISA-rK39, -rK28 e -rKR95, nos dois tempos de coleta estudados.

Entre os 15 cães considerados negativos para infecção por *Leishmania* pelo DPP + ELISA-*L. major*-like (tempo 1) e que se tornaram positivos após 6 meses da avaliação inicial (tempo 2), o ELISA com antígenos recombinantes detectou animais positivos já na primeira coleta, sendo 66,7% pelo ELISA-rK39; 80,0% pelo ELISA-rK28 e 60,0% pelo ELISA-rKR95 (qui-quadrado, p= 0,4839) (Figura 9).

Comparando o ELISA com os antígenos recombinantes, observou-se diferença significante entre os índices de reatividade das amostras testadas no tempo 1 (análise de variância de medidas repetidas, p=0,0169), com média mais elevada no ELISA-rK39 em relação ao ELISA-rKR95 (teste de comparação múltipla de Tukey, p<0,05). No tempo 2, observou-se diferença mais acentuada dos índices de reatividade das amostras entre os recombinantes (análise de variância de medidas repetidas, p=0,0003), obtendo-se média mais elevada com ELISA-rK39 em comparação a ELISA-rKR95 e ELISA-rK28 (teste de comparação múltipla de Tukey, p<0,05).

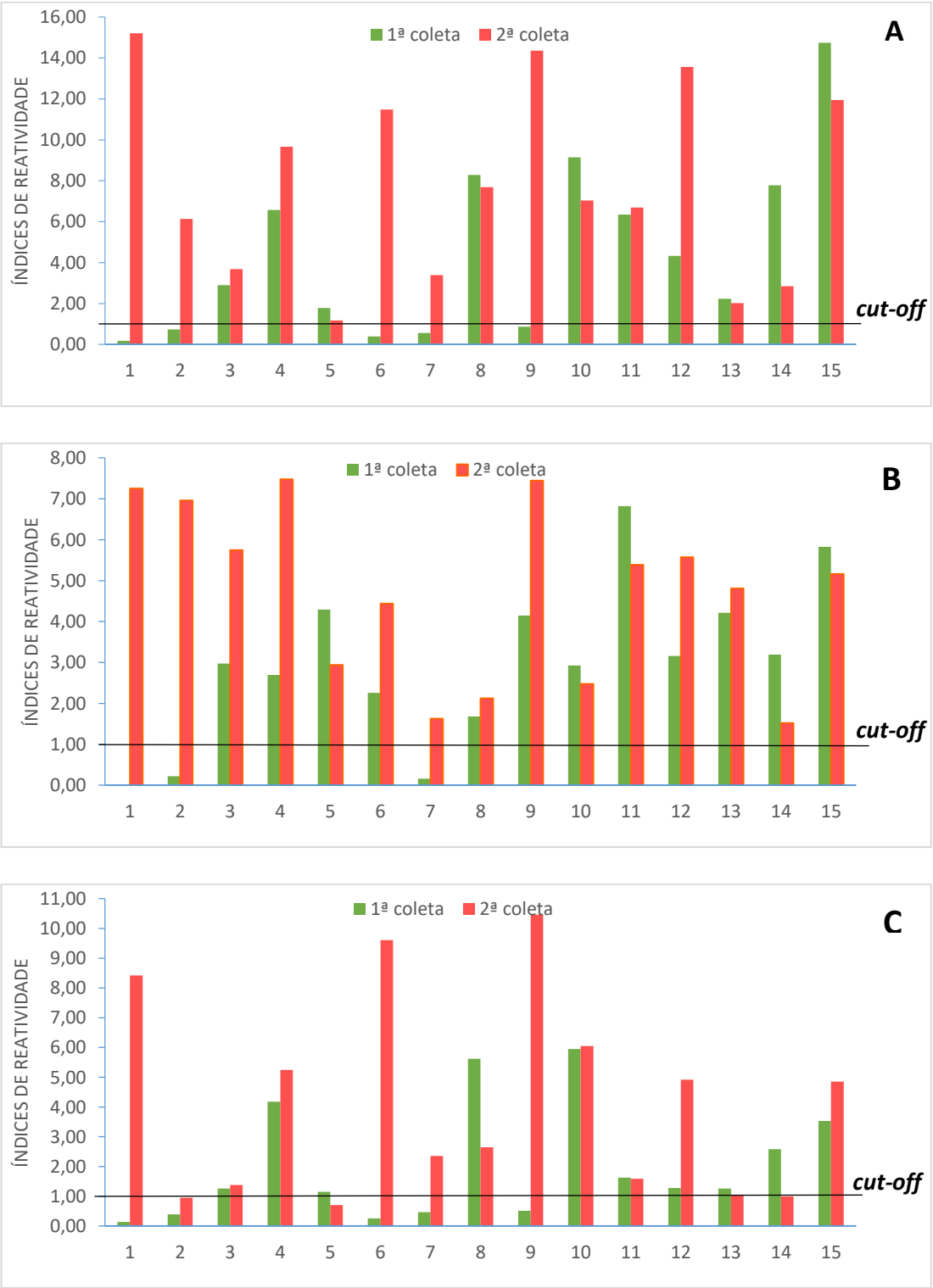


**Figura 9 -** Índices de reatividade das amostras de 15 cães, nas coletas 1 e 180 dias após, empregando os testes ELISA-rK39 (A), -rK28 (B) e -rKR95 (C). Grupo 1 – cães considerados negativos para infecção por *Leishmania* pelo algoritmo recomendado pelo Ministério da Saúde do Brasil (tempo 1) e que se tornaram positivos após 6 meses da avaliação inicial (tempo 2).

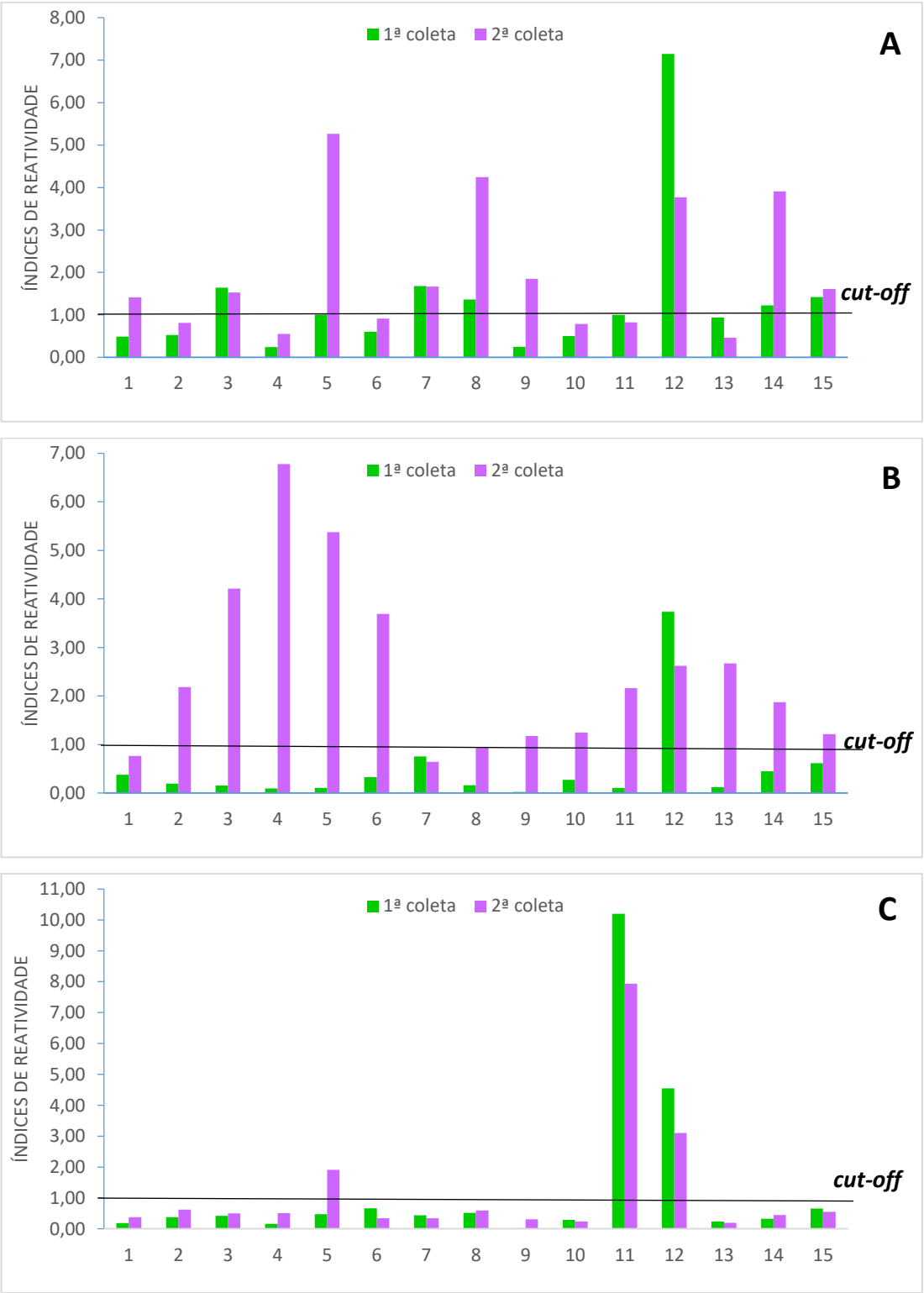


**Figura 10 -** Índices de reatividade das amostras de 15 cães, nas coletas 1 e 180 dias após, empregando os testes ELISA-rK39 (A), -rK28 (B) e -rKR95 (C). Grupo 2 – cães considerados negativos para infecção por *Leishmania* pelo algoritmo recomendado pelo Ministério da Saúde do Brasil (tempo 1) e que se tornaram positivos apenas pelo DPP após 6 meses da avaliação inicial (tempo 2).

Entre os 15 cães em que o teste DPP passou de negativo no tempo 1 para positivo no tempo 2, porém sem confirmação pelo ELISA-*L. major*-like, ELISA-rK39 detectou 47,0% de animais positivos já na primeira coleta. Apenas um animal foi reagente pelo ELISA-rK28 e dois pelo ELISA-rKR95 (qui-quadrado, p= 0,0057) (Figura 10).

Na segunda coleta (tempo 2), em que o ELISA-*L. major*-like não confirmou o DPP positivo, 60,0% dos cães foram positivos pelo ELISA-rK39; 80,0% pelo ELISA-rK28 e 20,0% pelo ELISA-rKR95 (qui-quadrado, p=0,0036). Observaram-se índices de reatividade menores pelo ELISA-rKR95, comparando-se com ELISA-rK39 e ELISA-rK28 (teste de Friedman, p= 0,0007; teste de comparação múltipla de Dunn, p<0,05).

# DISCUSSÃO

# 5 DISCUSSÃO

Levando em consideração a importância do cão como peça fundamental na epidemiologia da Leishmaniose Visceral, na transmissão da espécie *L. infantum* ao cão e ao homem, algoritmos de diagnóstico da infecção são propostos para esta espécie animal. No Brasil, o algoritmo pressupõe triagem por teste imunocromatográfico DPP seguido de confirmação de casos positivos por ELISA-*L. major*-like, este preparado a partir de lisado bruto do parasito. Este método de diagnóstico atual na rotina apresenta variações de desempenho e limitação pelo uso do extrato bruto de *L. major*-like, dependendo do crescimento *in vitro* do parasito. Neste cenário, propomos a validação do teste ELISA com o uso de antígenos recombinantes na busca de maior eficiência no diagnóstico aliada à melhoria na produção de insumo para esse procedimento.

Neste estudo, avaliamos quatro diferentes antígenos recombinantes, rK39, rK28, rKR95 e rK18, que foram ensaiados em ELISA, com um painel de soros de cães negativos de área não endêmica e parasitologicamente positivos, provenientes de áreas endêmicas para doença. Obtivemos excelentes resultados no teste ELISA, chegando a sensibilidade de 97,3% e especificidade de 100% no rK39. Os resultados das proteínas recombinantes k28 e kR95 também foram satisfatórios, chegando próximos aos valores de sensibilidade e especificidade do k39.

Embora os antígenos testados apresentassem bom desempenho (alta sensibilidade e especificidade para infecção por leishmânia), os testes iniciais com o antígeno rK18 indicaram menor capacidade de reagir com soros de cães infectados, em relação aos demais antígenos testados sugerindo não ser um bom candidato a antígeno para ELISA nos programas de controle de transmissão. Por outro lado, um estudo realizado por Vallur, Hailu [69] mostrou que os níveis de anticorpos contra rK18 em pacientes humanos caem após o início do tratamento, sugerindo seu uso como potencial marcador de sucesso de tratamento. Consequentemente, estudos com esse antígeno recombinante voltados para sua utilização como marcador de eficiência de tratamento seria de interesse, principalmente na Europa, onde os animais são

submetidos a diferentes protocolos terapêuticos.

Em áreas endêmicas, entre 60% a 80% dos cães não apresentam manifestação clínica [77] e o diagnóstico nesse grupo de animais apresenta desempenho insatisfatório, com queda na sensibilidade nos testes sorológicos. Os cães mesmo assintomáticos são importante fonte de parasitos para os vetores e dessa forma, há necessidade de melhoria nas metodologias de diagnóstico [78-80]. Realizamos uma avaliação de sensibilidade e especificidade com cães assintomáticos de áreas endêmicas do interior do estado de São Paulo e cães saudáveis de Jundiaí-SP, onde não ocorre a transmissão do parasito. A acurácia dos ELISAs com os recombinantes K39, K28, KR95 e K18 foi respectivamente 97,6%, 97,6%, 97,6% e 91,8%. Esses resultados mostram que há detecção de anticorpos contra *L. infantum* em cães sem sinais clínicos, ponto fundamental para o diagnóstico, já que nesse grupo estudos prévios mostravam menor sensibilidade.

Para avaliação da variabilidade dos testes, realizamos os ensaios de repetitividade e reprodutibilidade. Com os resultados das densidades ópticas de cada ensaio, realizamos o cálculo do coeficiente de variação da repetitividade dos testes ELISA-rK39, -rK28, -rKR95 e -rK18 que foi respectivamente, 4,4%; 3,8%; 4,7% e 5,0% e da reprodutibilidade, 10,5%; 13,4%; 10,9% e 17,1%, indicando que não há variação dos resultados independentemente do operador que executará o ensaio ou do local onde a amostra será aplicada na placa. Avaliamos também a estabilidade das placas pré-sensibilizas e armazenadas a -20°C e 4°C. Observamos que não há instabilidade proteica nas duas temperaturas avaliadas até 180 dias após a sensibilização das placas, que foi o período estudado. Este é um ponto positivo para os testes com antígenos recombinantes em relação ao kit distribuído pelo Ministério da Saúde que apresenta validade de apenas 120 dias. Nesta avaliação, a estabilidade na temperatura de 4°C é outro ponto positivo pois facilitaria o transporte de kits para outras localidades, além de possibilitar, nessa temperatura, o transporte dos demais reagentes, sem necessidade de acondicionamento separado e específico para as mesmas. O kit atual fornecido pelo Ministério, necessita de dois armazenamentos diferentes para transporte e manutenção em laboratório, que é -20°C para as placas sensibilizadas, conjugado e controles e 2-8°C para os demais reagentes, implicando em custos adicionais.

Para garantir a funcionalidade dos ELISAs em outros laboratórios, realizamos a avaliação da viabilidade de aplicação dos testes em laboratórios de áreas endêmicas para LVC e para isso, contamos com a parceria de instituições colaboradoras que realizaram os ensaios. Os resultados da análise de concordância foram de bons a perfeito e dessa forma, concluímos que os testes padronizados no IMT podem ser seguramente realizados por outros laboratórios, desde que submetidos a condições adequadas. Essa parte do projeto foi fundamental para garantirmos o bom funcionamento dos ELISAs *in house*, pois os testes não funcionam adequadamente apenas no laboratório onde houve a padronização e sim, em todos os outros onde os ensaios foram realizados.

Como a finalidade do teste é a sua utilização em inquéritos sorológicos em áreas endêmicas para LV, em continuidade à validação dos ELISAs, realizamos ensaios com 2.530 amostras de inquérito canino, provenientes de quatro estados brasileiros, onde há endemia de LVC. Submetemos as mesmas amostras aos testes recomendados pelo Ministério da Saúde, DPP e ELISA-*L. major*-like que foram analisados em conjunto, e ao DAT, que foi considerado nosso teste de referência. O teste que apresentou maior reatividade foi o ELISA-rK39, com 28,1%, seguido pelo ELISA-rKR95, 27,1% e ELISA-rK28, 26,6%. Acreditamos que os testes com esses antígenos recombinantes detectem animais com infecções subclínicas, por isso o percentual de reatividade superior. Avaliamos em conjunto DPP + ELISA-*L. major*-like e a reatividade das amostras foi 16,6%, já quando avaliamos DPP + ELISA-rK39, a reatividade foi de 17,4%, similar, tendendo a maior. Nas duas avaliações, tanto no DPP + ELISA-*L. major*-like quanto no DPP + ELISA-rK39, as concordâncias com o teste DAT, teste de referência, foram boas. Como a produção do antígeno total é um fator limitante para produção de kits de diagnóstico para demanda nacional, a utilização de antígenos recombinantes para os kits de ELISA surge como possibilidade concreta para substituição do ELISA-*L. major*-like.

Analisando o desempenho dos diferentes testes em localidade diferentes de coleta de amostras, separadamente, observou-se que, nos municípios de Colares (PA), Soure (PA) e Várzea Grande (MT), os testes do protocolo recomendado Ministério da Saúde apresentaram resultados bem inferiores aos testes baseados em antígenos recombinantes, levando-nos a acreditar na possibilidade de uma

variabilidade intraespecífica de *L. infantum* nessas localidades como explicação do desempenho insatisfatório nesses ensaios. Os testes com a utilização de antígenos recombinantes K39, K28 e KR95 apresentaram desempenho bom e similar na análise global, considerando a amostragem total, mas análise focada em localidades diferentes, revelou variabilidade do rK28 e rKR95, enquanto o rK39 apresentou um bom desempenho independentemente da região estudada, sendo um bom teste para inquérito no país. Além disso, o antígeno recombinante K39 é baseada na sequência de *L. infantum*, espécie causadora da doença visceral no Brasil.

O trabalho realizado por Scalone, De Luna [49] demonstrou que o antígeno recombinante k39 em ELISA não apresentou reatividade cruzada com outras doenças que acometem a espécie canina. Dessa forma, esses resultados reforçam nossa ideia de que os antígenos recombinantes sejam altamente específicos e não detectem outras doenças. Em outro trabalho, realizado por Vallur, Reinhart [68], houve avaliação do rKR95 em ELISA e apesar da identidade da proteína ser de 79% com *Tripanosoma cruzi*, não houve nenhuma reatividade cruzada com os soros de pacientes humanos testados.

Um dado que sobressaltou na análise das amostras de inquérito foi a maior positividade dos ELISAs com antígenos recombinantes, quase 10% superior ao resultado obtido com o algoritmo estabelecido pelo Ministério da Saúde. Esse dado sugeriu a ocorrência de um número importante de diagnósticos falso-negativos que, eventualmente, poderiam ser detectados com os testes com antígenos recombinantes. Para testar essa possibilidade, realizamos uma outra avaliação onde foram selecionados, de uma coorte de 600 cães, 15 animais que eram negativos nos testes DPP (tempo 1) e que ficaram positivos nos testes DPP e ELISA-*L. major*-like, 6 meses após ao primeiro teste (tempo 2). O intuito foi verificar se os testes com antígenos recombinantes eram capazes de detectar os cães infectados, mas com testes negativos pelo algoritmo preconizado pelo Ministério da Saúde. Embora o número de amostras tenha sido reduzido (n = 15), os resultados foram contundentes. Considerando o ELISA-rk39 como teste de escolha, em torno de 67% de animais considerados negativos pelo DPP + ELISA-*L. major*-like na primeira coleta revelaram-se positivos com ELISA-rk39. Nas amostras que eram negativos no DPP inicialmente e que positivaram no DPP na segunda coleta, mas sem confirmação por

ELISA-*L. major*-like, portanto negativos pelos critérios atuais, 47% foram positivos pelo ELISA-rk39. Os resultados mostram que os ELISAs com recombinantes detectam infecções mais precocemente que os testes DPP e ELISA-*L. major*-like. Esses resultados reforçam a baixa eficiência desse algoritmo empregado em inquérito canino A implicação do uso de um teste mais eficiente seria a remoção mais precoce de animais infectados, não revelados pelos testes atuais de rotina.

Neste estudo, validamos teste ELISA com antígenos recombinantes de *Leishmania*, sugerindo-se o antígeno rK39 para diagnóstico de leishmaniose visceral canina. Este teste configura-se como eficiente, superior em desempenho aos testes utilizados atualmente, inicialmente na substituição do teste ELISA-*L. major*-like, utilizado como teste confirmatório no programa de controle da transmissão de LV. No entanto, a sua utilização como teste único de triagem e confirmatório configura-se como uma possibilidade concreta, havendo necessidade de sua avaliação dentro da dinâmica de programas de controle de transmissão, na realização dos inquéritos sorológicos em áreas endêmicas de LV.

Com todos os resultados apresentados no trabalho, reforçamos que há necessidade de mudança no protocolo estabelecido no diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina pelo Ministério da Saúde, pois os cães infectados por *L. infantum* estão sendo subdiagnosticados e subnotificados com consequente manutenção desses cães participando do ciclo da doença por tempo maior, o que implica em maior risco para a população humana e canina e consequente disseminação da doença [81].

Acreditamos que o teste imunocromatográfico na rotina no campo é o ideal, pois é de rápida e fácil execução. No entanto, em rotina de inquérito no qual as amostras são coletadas e enviadas para laboratório para serem processadas, o teste ELISA com antígeno recombinante entra como método diagnóstico confiável, pois permite a realização de várias amostras em uma mesma placa. Inicialmente, o ELISA-rK39 pode ser uma boa alternativa como teste confirmatório pós-DPP, em substituição ao ELISA-*L. major*-like, mas os dados sugerem ser um bom método, ao mesmo tempo de triagem e confirmatório para rotina em inquérito, no qual amostras colhidas vão diretamente aos laboratórios centrais para serem processadas.

O projeto foi preconizado focando a realidade do Brasil, voltado no controle da transmissão, focando o cão como reservatório da *L. infantum*. No entanto, um teste sensível e específico é também importante para o diagnóstico isolado de cães infectados, atendidos em clínicas veterinárias para conduta terapêutica. É uma realidade no Brasil com a aprovação do tratamento da LV canina pelo Ministério da Agricultura com a utilização de Miltefosina (Nota Técnica Conjunta n° 001/2016 MAPA/MS). Também, é uma realidade em vários países da Europa, onde há LVC por *L. infantum*. Assim, o ELISA-rk39 aqui validado poderia ser recomendado não apenas no Brasil, mas nas áreas onde há transmissão de *L. infantum*.

# CONCLUSÕES

# 6 CONCLUSÕES

1. Foi validado teste ELISA com antígeno rK39 para a pesquisas de anticorpos IgG no diagnóstico da infecção por *L. infantum* em cães;

2. ELISA-rK39 apresentou excelente desempenho diagnóstico com elevada sensibilidade em cães infectados (sintomáticos e assintomáticos) e elevada especificidade em cães sadios;

3. Em amostras de inquéritos caninos, ELISA-rK39 apresentou um bom desempenho independentemente da região estudada, sendo um bom teste para inquérito no país;

4. ELISA-rK39 detectou cães infectados precocemente em relação aos testes preconizados pelo Ministério da Saúde;

5. De um modo global, ELISA-rK39 foi eficiente, superior em desempenho aos testes utilizados atualmente;

6. Em inquéritos sorológicos do programa de controle da transmissão de LV, ELISA-rK39 pode ser sugerido como - Teste confirmatório, pós DPP positivo, em substituição do teste ELISA-*L. major–like* ou - Teste único de triagem e confirmatório, após avaliação dentro da dinâmica de programas de controle de transmissão;

7. ELISA-rK39 pode ser empregado no diagnóstico isolado de cães infectados, like na primeira coleta revelaram-se positivos com ELISA-rk39. Nas amostras que eram negativos no DPP

# REFERÊNCIAS

# 7 REFERÊNCIAS


1. WHO. Leishmaniasis. Epidemiological situation.Geneva, [Internet]. [cited 2019 May 10]. Avalible from: https://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/

2. Lindoso JAL, Goto H. Leishmaniose Visceral. In: Antonio Carlos Lopes. (Org.). Tratado de Clínica Médica. 2 ed. São Paulo: Editora Roca Ltda. 2009; v. III: 4107-13.

3. van Griensven J, Diro E. Visceral leishmaniasis. Infectious disease clinics of North America. 2012 Jun;26(2):309-22.

4. Alvar J, Velez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. PloS one. 2012;7(5):e35671.

5. OPAS. LEISHMANIOSES. Informe Epidemiológico das Américas. In: OPAS/OMS OP-ADS-, editor. 2019.

6. Brasil. Ministério da Saúde. Casos confirmados de leishmaniose visceral, Brasil, grandes regiões e unidades federadas. 1990 a 2017 [Internet]. [cited 2019 May 10]. Avaliable from: http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/ novembro /12/LV-Casos.pdf

7. Lainson R, JJ. S. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters W, Killick-Kendrick R, editors. The leishmaniasis in biology and medicine.1987. 1-120 p.

8. dos Santos SO, Arias J, Ribeiro AA, de Paiva Hoffmann M, de Freitas RA, Malacco MA. Incrimination of Lutzomyia cruzi as a vector of American visceral leishmaniasis. Medical and veterinary entomology. 1998 Jul;12(3):315-7.

9. Missawa NA, Lima GBM. Distribuição espacial de Lutzomyia longipalpis (Lutz & Neiva, 1912) e Lutzomyia cruzi (Mangabeira, 1938) no estado de Mato Grosso. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2006;39:337-40.

10. Missawa NA, Veloso MAE, Maciel GBML, Michalsky ÉM, Dias ES. Evidência de transmissão de leishmaniose visceral por Lutzomyia cruzi no município de Jaciara, Estado de Mato Grosso, Brasil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2011;44:76-8.

11. Dantas-Torres F, Solano-Gallego L, Baneth G, Ribeiro VM, de Paiva-Cavalcanti M, Otranto D. Canine leishmaniosis in the Old and New Worlds:

unveiled similarities and differences. Trends in parasitology. 2012 Dec;28(12):531-8.

12. Alvar J, Canavate C, Molina R, Moreno J, Nieto J. Canine leishmaniasis. Advances in parasitology. 2004;57:1-88.

13. Laurenti MD, Rossi CN, da Matta VL, Tomokane TY, Corbett CE, Secundino NF, et al. Asymptomatic dogs are highly competent to transmit Leishmania (Leishmania) infantum chagasi to the natural vector. Veterinary parasitology. 2013 Sep 23;196(3-4):296-300.

14. Oliveira-Neto MP, Pirmez C, Rangel E, Schubach A, Grimaldi Junior G. An outbreak of American cutaneous leishmaniasis (Leishmania braziliensis braziliensis) in a periurban area of Rio de Janeiro city, Brazil: clinical and epidemiological studies. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. 1988 Oct-Dec;83(4):427-35.

15. Brasil. Ministério da Saúde. Manual de Vigilância e controle da Leishmaniose Visceral. Brasília. 2014. p. 122.

16. Bates PA. Transmission of Leishmania metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. International journal for parasitology. 2007 Aug;37(10):1097-106.

17. Tafuri WL, de Oliveira MR, Melo MN, Tafuri WL. Canine visceral leishmaniosis: a remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil. Veterinary parasitology. 2001 Apr 2;96(3):203-12.

18. Badaro R, Jones TC, Carvalho EM, Sampaio D, Reed SG, Barral A, et al. New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. J Infect Dis. 1986 Dec;154(6):1003-11.

19. Maia C, Campino L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. Veterinary parasitology. 2008 Dec 20;158(4):274-87.

20. Solano-Gallego L, Miro G, Koutinas A, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, et al. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. Parasit Vectors. 2011 May 20;4:86.

21. Vercosa BL, Lemos CM, Mendonca IL, Silva SM, de Carvalho SM, Goto H, et al. Transmission potential, skin inflammatory response, and parasitism of symptomatic and asymptomatic dogs with visceral leishmaniasis. BMC veterinary research. 2008 Nov 6;4:45.

22. Travi BL, Tabares CJ, Cadena H, Ferro C, Osorio Y. Canine visceral leishmaniasis in Colombia: relationship between clinical and parasitologic

status and infectivity for sand flies. The American journal of tropical medicine and hygiene. 2001 Mar-Apr;64(3-4):119-24.

23. Dietze R, Barros GB, Teixeira L, Harris J, Michelson K, Falqueto A, et al. Effect of eliminating seropositive canines on the transmission of visceral leishmaniasis in Brazil. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 1997 Nov;25(5):1240-2.

24. Savani ES, Schimonsky Bv B, Camargo MC, D'Auria S R. [Surveillance of American visceral leishmaniasis in dogs from a non-endemic area, Brazil]. Revista de saude publica. 2003 Apr;37(2):260-2.

25. Camargo-Neves VLF. Aspectos epidemiológicos e avaliação das medidas de controle da leishmaniose visceral americana no Estado de São Paulo, Brasil [Doctoral Dissertation]: São Paulo: Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo; 2004.

26. Barrouin-Melo SM, Larangeira DF, Trigo J, Aguiar PH, dos-Santos WL, Pontes-de-Carvalho L. Comparison between splenic and lymph node aspirations as sampling methods for the parasitological detection of Leishmania chagasi infection in dogs. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. 2004 Mar;99(2):195-7.

27. Zanette MF, Lima VM, Laurenti MD, Rossi CN, Vides JP, Vieira RF, et al. Serological cross-reactivity of Trypanosoma cruzi, Ehrlichia canis, Toxoplasma gondii, Neospora caninum and Babesia canis to Leishmania infantum chagasi tests in dogs. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2014 Jan-Feb;47(1):105-7.

28. Sundar S, Rai M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. Clinical and diagnostic laboratory immunology. 2002 Sep;9(5):951-8.

29. Celeste BJ, Guimaraes CS, Corrales EM. Peroxidase antibody test for mucocutaneous leishmaniasis serology. Performance indexes and comparison with a fluorescent antibody test. Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo. 1988 Nov-Dec;30(6):411-4.

30. Badaro R, Reed SG, Barral A, Orge G, Jones TC. Evaluation of the micro enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for antibodies in American visceral leishmaniasis: antigen selection for detection of infection-specific responses. The American journal of tropical medicine and hygiene. 1986 Jan;35(1):72-8.

31. Mancianti F, Pedonese F, Poli A. Evaluation of dot enzyme-linked immunosorbent assay (dot-ELISA) for the serodiagnosis of canine leishmaniosis as compared with indirect immunofluorescence assay. Veterinary parasitology. 1996 Oct 15;65(1-2):1-9.

32. el Harith A, Slappendel RJ, Reiter I, van Knapen F, de Korte P, Huigen E, et al. Application of a direct agglutination test for detection of specific anti-Leishmania antibodies in the canine reservoir. Journal of clinical microbiology. 1989 Oct;27(10):2252-7.

33. Vercammen F, Berkvens D, Le Ray D, Jacquet D, Vervoort T. Development of a slide ELISA for canine leishmaniasis and comparison with four serological tests. The Veterinary record. 1997 Sep 27;141(13):328-30.

34. Guillen Llera JL, Lopez Garcia ML, Martin Reinoso E, De Vivar Gonzalez R. Differential serological testing by simultaneous indirect immunofluorescent antibody test in canine leishmaniosis and ehrlichiosis. Veterinary parasitology. 2002 Nov 11;109(3-4):185-90.

35. Woody BJ, Hoskins JD. Ehrlichial diseases of dogs. The Veterinary clinics of North America Small animal practice. 1991 Jan;21(1):75-98.

36. Peixoto HM, de Oliveira MR, Romero GA. Serological diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil: systematic review and meta-analysis. Tropical medicine & international health : TM & IH. 2015 Mar;20(3):334-52.

37. Grimaldi G, Jr., Teva A, Ferreira AL, dos Santos CB, Pinto I, de-Azevedo CT, et al. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP(R) CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 2012 Jan;106(1):54-9.

38. Somanna A, Mundodi V, Gedamu L. In vitro cultivation and characterization of Leishmania chagasi amastigote-like forms. Acta tropica. 2002 Jul;83(1):37-42.

39. Rodrigues Ide A, da Silva BA, dos Santos AL, Vermelho AB, Alviano CS, Dutra PM, et al. A new experimental culture medium for cultivation of Leishmania amazonensis: its efficacy for the continuous in vitro growth and differentiation of infective promastigote forms. Parasitol Res. 2010 Apr;106(5):1249-52.

40. Muniaraj M. Paradoxical drug sensitivity of Leishmania donovani promastigotes: an in vitro study by Agar elution and 96 well plate methods. The Journal of communicable diseases. 2007 Dec;39(4):255-6.

41. Teixeira AIP, Silva DM, Vital T, Nitz N, de Carvalho BC, Hecht M, et al. Improving the reference standard for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis: a challenge for current and future tests. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. 2019 Jan 31;114:e180452.

42. Dhom-Lemos L, Viana AG, Cunha JLR, Cardoso MS, Mendes TAO, Pinheiro GRG, et al. Leishmania infantum recombinant kinesin degenerated derived repeat (rKDDR): A novel potential antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. PloS one. 2019;14(1):e0211719.

43. Alves AS, Mouta-Confort E, Figueiredo FB, Oliveira RV, Schubach AO, Madeira MF. Evaluation of serological cross-reactivity between canine visceral leishmaniasis and natural infection by Trypanosoma caninum. Research in veterinary science. 2012 Dec;93(3):1329-33.

44. Soto M, Requena JM, Quijada L, Garcia M, Guzman F, Patarroyo ME, et al. Mapping of the linear antigenic determinants from the Leishmania infantum histone H2A recognized by sera from dogs with leishmaniasis. Immunology letters. 1995 Dec;48(3):209-14.

45. Soto M, Requena JM, Quijada L, Gomez LC, Guzman F, Patarroyo ME, et al. Characterization of the antigenic determinants of the Leishmania infantum histone H3 recognized by antibodies elicited during canine visceral leishmaniasis. Clinical and experimental immunology. 1996 Dec;106(3):454-61.

46. Soto M, Requena JM, Quijada L, Perez MJ, Nieto CG, Guzman F, et al. Antigenicity of the Leishmania infantum histones H2B and H4 during canine viscerocutaneous leishmaniasis. Clinical and experimental immunology. 1999 Feb;115(2):342-9.

47. Quinnell RJ, Carson C, Reithinger R, Garcez LM, Courtenay O. Evaluation of rK39 rapid diagnostic tests for canine visceral leishmaniasis: longitudinal study and meta-analysis. PLoS neglected tropical diseases. 2013;7(1):e1992.

48. Rosati S, Ortoffi M, Profiti M, Mannelli A, Mignone W, Bollo E, et al. Prokaryotic expression and antigenic characterization of three recombinant Leishmania antigens for serological diagnosis of canine leishmaniasis. Clinical and diagnostic laboratory immunology. 2003 Nov;10(6):1153-6.

49. Scalone A, De Luna R, Oliva G, Baldi L, Satta G, Vesco G, et al. Evaluation of the Leishmania recombinant K39 antigen as a diagnostic marker for canine leishmaniasis and validation of a standardized enzyme-linked immunosorbent assay. Veterinary parasitology. 2002 Apr 2;104(4):275-85.

50. Silva DT, Starke-Buzetti WA, Alves-Martin MF, Paixao Mdos S, Tenorio Mda S, Lopes ML. Comparative evaluation of several methods for Canine Visceral Leishmaniasis diagnosis. Revista brasileira de parasitologia veterinaria = Brazilian journal of veterinary parasitology : Orgao Oficial do Colegio Brasileiro de Parasitologia Veterinaria. 2014 Apr-Jun;23(2):179-86.

51. Lemos EM, Laurenti MD, Moreira MA, Reis AB, Giunchetti RC, Raychaudhuri S, et al. Canine visceral leishmaniasis: performance of a rapid diagnostic test (Kalazar Detect) in dogs with and without signs of the disease. Acta tropica. 2008 Aug;107(2):205-7.

52. Boarino A, Scalone A, Gradoni L, Ferroglio E, Vitale F, Zanatta R, et al. Development of recombinant chimeric antigen expressing immunodominant B epitopes of Leishmania infantum for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. Clinical and diagnostic laboratory immunology. 2005 May;12(5):647-53.

53. Quijada L, Requena JM, Soto M, Gomez LC, Guzman F, Patarroyo ME, et al. Mapping of the linear antigenic determinants of the Leishmania infantum hsp70 recognized by leishmaniasis sera. Immunology letters. 1996 Sep;52(2-3):73-9.

54. Coelho EA, Costa LE, Lage DP, Martins VT, Garde E, de Jesus Pereira NC, et al. Evaluation of two recombinant Leishmania proteins identified by an immunoproteomic approach as tools for the serodiagnosis of canine visceral and human tegumentary leishmaniasis. Veterinary parasitology. 2016 Jan 15;215:63-71.

55. Burns JM, Jr., Shreffler WG, Benson DR, Ghalib HW, Badaro R, Reed SG. Molecular characterization of a kinesin-related antigen of Leishmania chagasi that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1993 Jan 15;90(2):775-9.

56. Kurkjian KM, Vaz LE, Haque R, Cetre-Sossah C, Akhter S, Roy S, et al. Application of an improved method for the recombinant k 39 enzyme-linked immunosorbent assay to detect visceral leishmaniasis disease and infection in Bangladesh. Clinical and diagnostic laboratory immunology. 2005 Dec;12(12):1410-5.

57. Romero HD, Silva Lde A, Silva-Vergara ML, Rodrigues V, Costa RT, Guimaraes SF, et al. Comparative study of serologic tests for the diagnosis of asymptomatic visceral leishmaniasis in an endemic area. The American journal of tropical medicine and hygiene. 2009 Jul;81(1):27-33.

58. Pedras MJ, de Gouvea Viana L, de Oliveira EJ, Rabello A. Comparative evaluation of direct agglutination test, rK39 and soluble antigen ELISA and IFAT for the diagnosis of visceral leishmaniasis. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2008 Feb;102(2):172-8.

59. Maia Z, Lirio M, Mistro S, Mendes CM, Mehta SR, Badaro R. Comparative study of rK39 Leishmania antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis:

systematic review with meta-analysis. PLoS neglected tropical diseases. 2012 Jan;6(1):e1484.

60. Maalej IA, Chenik M, Louzir H, Ben Salah A, Bahloul C, Amri F, et al. Comparative evaluation of ELISAs based on ten recombinant or purified Leishmania antigens for the serodiagnosis of Mediterranean visceral leishmaniasis. Am J Trop Med Hyg. 2003 Mar;68(3):312-20.

61. Lakhal S, Mekki S, Ben-Abda I, Mousli M, Amri F, Aoun K, et al. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay based on crude Leishmania histone proteins for serodiagnosis of human infantile visceral leishmaniasis. Clinical and vaccine immunology : CVI. 2012 Sep;19(9):1487-91.

62. Mendonca IL, Batista JF, Schallig H, Cruz M, Alonso DP, Ribolla PEM, et al. The performance of serological tests for Leishmania infantum infection screening in dogs depends on the prevalence of the disease. Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo. 2017 Jun 1;59:e39.

63. Pattabhi S, Whittle J, Mohamath R, El-Safi S, Moulton GG, Guderian JA, et al. Design, development and evaluation of rK28-based point-of-care tests for improving rapid diagnosis of visceral leishmaniasis. PLoS neglected tropical diseases. 2010 Sep 14;4(9).

64. Vaish M, Bhatia A, Reed SG, Chakravarty J, Sundar S. Evaluation of rK28 antigen for serodiagnosis of visceral Leishmaniasis in India. Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2012 Jan;18(1):81-5.

65. Mukhtar M, Abdoun A, Ahmed AE, Ghalib H, Reed SG, Boelaert M, et al. Diagnostic accuracy of rK28-based immunochromatographic rapid diagnostic tests for visceral leishmaniasis: a prospective clinical cohort study in Sudan. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 2015;109(9):594-600.

66. Mukhtar M, Ali SS, Boshara SA, Albertini A, Monnerat S, Bessell P, et al. Sensitive and less invasive confirmatory diagnosis of visceral leishmaniasis in Sudan using loop-mediated isothermal amplification (LAMP). PLoS neglected tropical diseases. 2018;12(2):e0006264.

67. Venturin GL, Bragato JP, Silva KL, de Lima VM. Recombinant K28 antigen in ELISA in the diagnosis of canine visceral leishmaniosis. Parasite immunology. 2015 Dec;37(12):670-3.

68. Vallur AC, Reinhart C, Mohamath R, Goto Y, Ghosh P, Mondal D, et al. Accurate Serodetection of Asymptomatic Leishmania donovani Infection by Use of Defined Antigens. Journal of clinical microbiology. 2016 Apr;54(4):1025-30.

69. Vallur AC, Hailu A, Mondal D, Reinhart C, Wondimu H, Tutterrow Y, et al. Specific antibody responses as indicators of treatment efficacy for visceral leishmaniasis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2015 Apr;34(4):679-86.

70. Allain DS, Kagan IG. A direct agglutination test for leishmaniasis. The American journal of tropical medicine and hygiene. 1975 Mar;24(2):232-6.

71. el Harith A, Kolk AH, Leeuwenburg J, Muigai R, Huigen E, Jelsma T, et al. Improvement of a direct agglutination test for field studies of visceral leishmaniasis. Journal of clinical microbiology. 1988 Jul;26(7):1321-5.

72. Chappuis F, Rijal S, Soto A, Menten J, Boelaert M. A meta-analysis of the diagnostic performance of the direct agglutination test and rK39 dipstick for visceral leishmaniasis. BMJ (Clinical research ed). 2006 Oct 7;333(7571):723.

73. Schallig HD, Canto-Cavalheiro M, da Silva ES. Evaluation of the direct agglutination test and the rK39 dipstick test for the sero-diagnosis of visceral leishmaniasis. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. 2002 Oct;97(7):1015-8.

74. Teran-Angel G, Schallig H, Zerpa O, Rodriguez V, Ulrich M, Cabrera M. The direct agglutination test as an alternative method for the diagnosis of canine and human visceral leishmaniasis. Biomedica : revista del Instituto Nacional de Salud. 2007 Sep;27(3):447-53.

75. Cunningham J, Hasker E, Das P, El Safi S, Goto H, Mondal D, et al. A global comparative evaluation of commercial immunochromatographic rapid diagnostic tests for visceral leishmaniasis. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 2012 Nov 15;55(10):1312-9.

76. Moreno J, Alvar J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. Trends in parasitology. 2002 Sep;18(9):399-405.

77. de Queiroz NM, de Assis J, Oliveira TM, Machado RZ, Nunes CM, Starke-Buzetti WA. [Canine visceral leishmaniasis diagnosis by immunohistochemistry and PCR in skin tissues in association with IFAT and ELISA-test]. Revista brasileira de parasitologia veterinaria = Brazilian journal of veterinary parasitology : Orgao Oficial do Colegio Brasileiro de Parasitologia Veterinaria. 2010 Jan-Mar;19(1):32-8.

78. Travi BL, Cordeiro-da-Silva A, Dantas-Torres F, Miro G. Canine visceral leishmaniasis: Diagnosis and management of the reservoir living among us. PLoS neglected tropical diseases. 2018 Jan;12(1):e0006082.

79. Borja LS, Sousa OMF, Solca MDS, Bastos LA, Bordoni M, Magalhaes JT, et al. Parasite load in the blood and skin of dogs naturally infected by Leishmania infantum is correlated with their capacity to infect sand fly vectors. Veterinary parasitology. 2016 Oct 15;229:110-7.

80. Abranches P, Campino L, Santos-Gomes GM. [Canine leishmaniasis. New concepts of epidemiology and immunopathology: their impact in the control of human visceral leishmaniasis]. Acta Med Port. 1998 Oct;11(10):871-5.

81. Lopes EG, Seva AP, Ferreira F, Nunes CM, Keid LB, Hiramoto RM, et al. Serological and molecular diagnostic tests for canine visceral leishmaniasis in Brazilian endemic area: one out of five seronegative dogs are infected. Epidemiol Infect. 2017 Sep;145(12):2436-44.