

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

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo – Bibliotecário Carlos José Quinteiro, CRB-8 5538

Fujimori, Mahyumi

Validação do ensaio imunoenzimático (ELISA) com antígenos recombinantes no diagnóstico sorológico da infecção canina por *Leishmania infantum* / Mahyumi Fujimori. – São Paulo, 2019.

Tese (Doutorado) – Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional

Orientadora: Hiro Goto

Descritores: 1. LEISHMANIOSE VISCERAL. 2. CÃES. 3. INQUÉRITOS EPIDEMIOLÓGICOS. 4. DIAGNÓSTICO. 5. ELISA. 6. ANTÍGENOS.

USP/IMTSP/BIB-10/2019.

*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 memoriam”. 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, Dra. Christiane Yumi Ozaki, Prof. Dr. Paulo C. Cotrim, Técnica Mussya C. Rocha, 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 4°C e -20°C. 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.

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 saudáveis;
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

1. WHO. Leishmaniasis. Epidemiological situation. Geneva, [Internet]. [cited 2019 May 10]. Available 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]. Available 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 leishmaniasis: 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 leishmaniasis. *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, Lorangeira 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 leishmaniasis 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.