



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

INSTITUTO GONÇALO MONIZ

**Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa**

MESTRADO ACADÊMICO

MATHEUS SILVA DE JESUS

**DETECÇÃO PRECOCE E PERSISTÊNCIA DE RESULTADOS POSITIVOS DE UM
ELISA UTILIZANDO A PROTEÍNA RLCI5 NO DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE
VISCERAL CANINA EM UMA COORTE DE CÃES INFECTADOS**

**SALVADOR - BAHIA
2021**

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

INSTITUTO GONÇALO MONIZ

**Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa**

MATHEUS SILVA DE JESUS

**DETECÇÃO PRECOCE E PERSISTÊNCIA DE RESULTADOS POSITIVOS DE UM
ELISA UTILIZANDO A PROTEÍNA RLCI5 NO DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE
VISCERAL CANINA EM UMA COORTE DE CÃES INFECTADOS**

Orientadora: Dr.^a Deborah Bittencourt Mothé Fraga

Co-orientadora: Dr.^a Rita de Cássia Pontello Rampazzo

Dissertação de mestrado apresentada
ao curso de Biotecnologia em Saúde e
Medicina Investigativa, Fundação Oswaldo
Cruz, como requisito para obtenção do
título de Mestre em Ciências.

**SALVADOR - BAHIA
2021**

“DETECÇÃO PRECOCE E PERSISTÊNCIA DE RESULTADOS POSITIVOS DE UM ELISA UTILIZANDO A PROTEÍNA RLC15 NO DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA EM UMA COORTE DE CÃES INFECTADOS”.

MATHEUS SILVA DE JESUS

FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 19 de fevereiro de 2021.

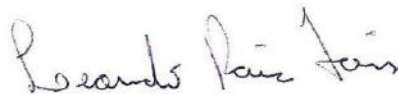
COMISSÃO EXAMINADORA



Dra. Carina Carvalho dos Santos
Professora Adjunta A
UFBA



Dr. Geraldo Gileno de Sá Oliveira
Pesquisador
IGM/FIOCRUZ



Dr. Leonardo Paiva Farias
Pesquisador
IGM/FIOCRUZ

FONTES DE FINANCIAMENTO

Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior – Brasil (CAPES)-

Código de Financiamento 001

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia – FAPESB

JESUS, Matheus Silva de. Detecção precoce e persistência de resultados positivos de um Elisa utilizando a proteína rLci5 no diagnóstico da Leishmaniose Visceral em uma coorte de cães infectados. 47 fl. II. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2021.

RESUMO

INTRODUÇÃO: A leishmaniose visceral (LV) é uma doença zoonótica, causada por protozoários, na qual os cães são os principais reservatórios urbanos. Medidas de controle e tratamento de animais infectados são essenciais para reduzir os casos de LV. A detecção precoce e acurada de cães infectados com *Leishmania infantum* pode estar limitando o sucesso do controle da LV. Com o objetivo de aprimorar o sorodiagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC), objetivamos avaliar a precocidade de uma proteína recombinante (rLci5) em um ensaio imunoabsorvente (ELISA) na detecção de cães infectados. Adicionalmente, avaliamos a persistência dos resultados positivos obtidos pelo ELISA rLci5 em cães acompanhados quando comparados a outros testes diagnósticos usuais de LVC, sorológicos (DPP-LVC, EIE-LVC), cultura e teste molecular (qPCR) ao longo do tempo de infecção desses animais. **MÉTODOS:** Amostras de soro de 48 cães infectados com *L. infantum* provenientes de uma coorte foram avaliadas para LVC usando diferentes testes diagnósticos (qPCR, EIE-LVC, DPP-LVC e cultura), seus resultados foram comparados com a detecção do ELISA rLci5 para determinar qual desses testes foi capaz de diagnosticar a infecção por *L. infantum* precocemente. Além disso, ao longo do tempo comparamos os resultados para LVC de cada cão, usando os mesmos testes diagnósticos durante a coorte para avaliar a persistência dos resultados positivos. **RESULTADOS:** O ELISA rLci5 apresentou taxas mais altas de resultados positivos em pontos temporais iniciais em comparação com os outros testes diagnósticos empregados no estudo de coorte, até 24 meses antes da detecção por outros testes. A positividade para o ELISA rLci5 foi de 52,1% (25/48) no início do estudo, enquanto qPCR foi de 35,4% (17/48), DPP-LVC 27,1% (13/48), EIE-LVC 22,9% (11/48) e cultura apenas 4,2 % (2/48). Em pelo menos um dos pontos de tempo do estudo de coorte de 24 meses, o ELISA rLci5 foi positivo em 100% (48/48) dos cães, contra 83% (40/48) para qPCR, 75% (36/48) para DPP-LVC, 65% (31/48) para EIE-LVC e 31% (15/48) para cultura. Investigando sinais clínicos em associação com positividade de teste diagnóstico, o ELISA rLci5 detectou LVC em 62,9% (95/151) das avaliações clínicas com uma escores de 0–3, 64,3% (45/70) com escores entre 4 e 7, e 73,7% (14/19) com escores > 7, proporcionando maiores taxas de positividade do que todos os outros métodos avaliados. Além disso, o rLci5 ELISA apresentou a maior persistência com relação à positividade do teste: 45,8% dos cães avaliados. **CONCLUSÃO:** Quatro testes diagnósticos para LVC foram comparados ao ELISA rLci5, que apresentou diagnóstico de infecção mais precoce e maior persistência de resultados positivos. Portanto, o uso de rLci5 em ensaios ELISA pode melhorar o desempenho do diagnóstico da LVC, diagnosticando cães infectados mais cedo que outros testes diagnósticos e tendo detecção persistente ao longo do curso da infecção.

Palavras-chave: Imunodiagnóstico; Proteína recombinante; Leishmaniose Visceral Canina.

JESUS, Matheus Silva de. Early detection and persistent positivity to anti-Leishmania antibodies by a recombinant protein-based ELISA in naturally infected dogs in Brazil. 47 fl. II. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2021.

ABSTRACT

BACKGROUND: Visceral leishmaniasis (VL) is a zoonotic disease in which dogs are the main urban parasite reservoirs. Control measures and treatment of infected animals are essential to reduce VL cases. Early and accurate detection of *Leishmania infantum* infected dogs is limiting the success of VL control. In order to improve the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis (CVL), we aimed to evaluate the precocity of a recombinant protein (rLci5) in an immunosorbent assay (ELISA) in the detection of infected dogs. Additionally, we evaluated the persistence of the positive results obtained by rLci5 ELISA in dogs followed-up when compared to other usual CVL diagnostic tests, such as DPP-LVC, EIE-LVC, culture, and qPCR over time. **METHODS:** Serum samples from 48 *L. infantum* infected-dogs from a cohort study were evaluated for CVL using different diagnostic tests (qPCR, EIE-LVC, DPP-LVC, and splenic culture), and their results were compared to rLci5 ELISA detection to determine which one of these tests is able to diagnose *L. infantum* infection precociously. Also, we compared CVL results for each dog, using the same diagnostic test during the cohort to evaluate the persistence of the positive results. **RESULTS:** rLci5 ELISA presented higher rates of positive results at early time points compared to the other diagnostic tests employed in the cohort study, as early as 24 months prior to detection by other tests. rLci5 ELISA positivity was 52.1% (25/48) at baseline, while qPCR was 35.4% (17/48), DPP-LVC 27.1% (13/48), EIE-LVC 22.9% (11/48) and culture only 4.2% (2/48). In at least one of the time points of the 24-month cohort study, rLci5 ELISA was positive in 100% (48/48) of the dogs, versus 83% (40/48) for qPCR, 75% (36/48) for DPP-LVC, 65% (31/48) for EIE-LVC and 31% (15/48) for culture. Investigating clinical signs in association with diagnostic test positivity, rLci5 ELISA successfully detected CVL in 62.9% (95/151) of the clinical evaluations with a score of 0–3, 64.3% (45/70) with scores between 4 and 7, and 73.7% (14/19) with scores > 7, providing higher rates of positivity than all other methods evaluated. Moreover, rLci5 ELISA presented the greatest persistence with respect to test positivity: 45.8% of the dogs evaluated. **CONCLUSION:** Four CVL diagnostic tests were compared to rLci5 ELISA, which presented an earlier infection diagnosis and more persistence of positive results. Therefore, the use of rLci5 in ELISA assays can improve CVL diagnosis performance by diagnosing infected dogs earlier than other diagnostic tests and having persistent detection throughout the course of the infection.

Key words: Early diagnosis, Recombinant protein, Canine visceral Leishmaniasis

ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Promastigotas coradas - 100 x sob lentes de imersão em óleo.....	166
Figura 2 - Macrófagos infectados marcados com coloração de Giemsa contendo amastigotas 100 x sob lentes de imersão em óleo.....	167
Figura 3 – Positividade precoce para o ELISA rLci5 em comparação com outros testes de diagnóstico durante o estudo de coorte de 24 meses.....	31
Figura 4 – Frequência de positividade do teste diagnóstico por ELISA rLci5 em comparação com outros métodos diagnósticos..	32
Figura 5 – Frequência de positividade do teste diagnóstico em associação com o escore clínico geral.....	33
Figura 6 – Persistência de positividade para o ELISA rLci5 em comparação com outros testes diagnósticos durante o estudo de coorte de 24 meses.....	33

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Frequência de positividade em diferentes testes de diagnóstico durante o estudo de coorte de 24 meses	31
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DO	Densidade óptica
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPP	Plataforma de percurso duplo (<i>Dual Path Platform</i>)
EIE-LVC	Ensaio imunoenzimático para leishmaniose visceral canina desenvolvido por Biomanguinhos
ELISA	Ensaio imunoenzimático em fase sólida (<i>Enzyme Linked Immuno Absorbent Assay</i>)
IFAT	<i>Indirect fluorescent antibody test</i>
IgG	Imunoglobulina da classe G
IGM	Instituto Gonçalo Moniz
LV	Leishmaniose visceral
LVC	Leishmaniose visceral canina
MAPIA	Ensaio imunocromatográfico com múltiplos antígenos impressos (<i>Multi-antigen print immunoassay</i>)
MS	Ministério da Saúde
PCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>Polymerase chain reaction</i>)
qPCR	PCR em tempo real ou quantitativo (<i>Real time or quantitative PCR</i>)
RDT	Teste diagnóstico rápido (<i>Rapid diagnostic test</i>)
RIFI	Reação Imunofluorescência Indireta
WHO	Organização mundial de saúde (<i>World Health Organization</i>)

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	12
2.	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	ETIOLOGIA E EPIDEMIOLOGIA DAS LEISHMANIOSES	16
2.2	MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	18
2.3	DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA	19
2.3.1	Diagnóstico sorológico	20
2.3.2	Diagnóstico parasitológico	22
2.3.3	Diagnóstico molecular	23
3.	JUSTIFICATIVA	25
4.	OBJETIVOS	27
4.1	OBJETIVO GERAL	27
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
5.	ARTIGO	28
6.	DISCUSSÃO	37
7.	CONCLUSÃO	39
8.	REFERÊNCIAS	41

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos que me permitiram a elaboração desse trabalho, seja de forma direta ou indireta. Agradeço imensamente por todo o auxílio e dedicação;

Agradeço a minha orientadora, Dra Deborah Bittencourt Mothé Fraga, por toda a confiança depositada em mim e por toda orientação que me foi dada para que esse trabalho um dia pudesse existir. Agradeço de coração;

Meu muito obrigado também a minha co-orientadora Dra Rita Rampazzo, por todos os ensinamentos e pela paciência em ter lecionado sobre grande parte das técnicas laboratoriais que hoje realizo com afinco;

Agradeço também a Dra Claudia Brodsky por todo financiamento e confiança em nosso projeto. Muito obrigado;

Obrigado a minha família: Mãe, Avó, Pai e irmãos. Amo todos vocês. Agradeço também a Diego Chaves, que tanto me ajudou e me deu suporte emocional para a elaboração desse trabalho final;

Obrigado aos colegas do LaLPHE, principalmente ao grupo cão, por todos os ensinamentos, ajuda e experiências no laboratório;

Ao PGBSMI;

A FAPESB pela bolsa de iniciação científica e de mestrado que me ajudou na realização deste projeto;

À equipe da Biblioteca de Ciências Biomédicas Eurydice Pires de Sant'Anna (IGM), em especial à Ana Maria Fiscina Vaz Sampaio, pela revisão e pelo apoio nas correções na dissertação.

À Fiocruz, IGM e Bio-Manguinhos pela infraestrutura física e pessoal que possibilitaram a execução dos experimentos deste trabalho.

1. INTRODUÇÃO

O protozoário *Leishmania infantum* é o principal agente etiológico da leishmaniose visceral (LV) no Brasil, uma zoonose comum em países tropicais (MORENO; ALVAR, 2002). A transmissão da leishmaniose ocorre através da picada de insetos flebotomíneos fêmeas infectadas com o protozoário e a principal espécie responsável pela transmissão de *L. infantum* no Brasil é *Lutzomyia longipalpis* (NJOROGÉ et al., 2021). Portadores da LV podem desenvolver sinais clínicos como febre prolongada, anemia, perda de peso, fraqueza, hepatomegalia e esplenomegalia (MAIA; CAMPINO, 2018)

O principal reservatório urbano de *L. infantum* são cães (*Canis lupus familiaris*), e estes animais possuem um papel importante na transmissão e manutenção da LV, na qual os seres humanos são acidentalmente infectados (BRASIL, 2014; DANTAS-TORRES; BRITO; BRANDÃO-FILHO, 2006). A leishmaniose visceral canina é um grave problema de saúde pública (ANVERSA et al., 2018). É sabido que os casos caninos de leishmaniose frequentemente precedem casos humanos (FRAGA et al., 2016). Em áreas endêmicas para leishmaniose visceral, cães infectados, porém clinicamente saudáveis podem ser uma fonte de infecção para vetores flebotomíneos. O controle dos animais infectados e dos insetos vetores contribui positivamente para diminuição da taxa de transmissão para seres humanos (MARCONDES; DAY, 2019).

Um diagnóstico precoce e efetivo é essencial para o estabelecimento de medidas de controle da doença (MARLAIS et al., 2018; RODRIGUES et al., 2019). Dentre os métodos disponíveis, o diagnóstico sorológico é um dos mais utilizados por conta do custo baixo por reação, facilidade de utilização a campo, rapidez, e, quando utilizado com os antígenos apropriados, pode apresentar elevados níveis de sensibilidade e especificidade (GEORGIADOU; MAKARITSIS; DALEKOS, 2016).

Proteínas recombinantes têm sido utilizadas como antígenos para melhorar o desempenho do diagnóstico sorológico, tais proteínas são geralmente identificadas a partir de técnicas de proteômica e bioinformática (RODRIGUES et al., 2019). Usando a proteína recombinante rLiHyg e comparando a outra proteína recombinante (rA2), e o extrato solúvel de antígenos *Leishmania* (SLA), Machado e colaboradores (2020) mostraram resultados significativos no diagnóstico de LV em humanos e cães. Os resultados apresentaram valores de sensibilidade de 100%; 57,29% e 48,57% quando utilizados rLiHyG, rA2 e SLA, respectivamente, enquanto os valores de especificidade foram de 100%; 81,43% e 88,57%, respectivamente. Adicionalmente, Santos e colaboradores (2019) descobriram que a proteína beta do fator de alongamento 1 de *L. infantum* em sua versão recombinante (rEF1b) demonstrou valores de sensibilidade e especificidade de 100%, com AUC de 1,0 já para SLA, os valores foram 44,4% e 80,0% no diagnóstico de leishmaniose visceral canina (LVC) em cães com e sem sinais clínicos. Em humanos, a rEF1b apresentou valores de sensibilidade e especificidade de 100% e AUC de 1,0; ao usar SLA, os valores foram 76,7% e 66,7%, respectivamente, com AUC de 0,78. Os autores também sugeriram o uso da proteína recombinante como um marcador prognóstico, uma vez que os níveis de anticorpos diminuíram após o tratamento em humanos. Apesar dos resultados promissores os artigos diferem do critério de seleção utilizado em nosso estudo, cultura (considerado padrão ouro) e/ou PCR em tempo real. É sabido que ao usar um padrão de referência para técnicas diagnósticas que não é o padrão ouro pode produzir enviesamento do resultado (CHIKERE et al., 2019).

Previamente, um conjunto de 12 antígenos recombinantes foi selecionado para avaliação no diagnóstico da LVC e LV humana. Esses antígenos foram selecionados a partir de bibliotecas de cDNA ou genômica de *L. infantum*, utilizando amostras

humanas ou de cães (TEIXEIRA et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2011). A partir destes resultados, os 12 antígenos identificados foram submetidos a nova seleção utilizando um painel mais amplo de soros com a técnica de triagem *Multi-antigen print immunoassay* (MAPIA) (DE OLIVEIRA et al., 2015). Dos 12 antígenos identificados, seis antígenos com resultados promissores no MAPIA foram avaliados em um protótipo multi-antígenos no formato *dual path platform* (DPP) para o sorodiagnóstico da LVC. Estes antígenos foram impregnados individualmente em membranas de nitrocelulose e testados contra soros de cães com cultura positiva. Na plataforma DPP, o protótipo com a combinação de rLci1, rLci2, rLci8, rLci12 e rLci5 obteve 91% de sensibilidade e 100% de especificidade. Em outro estudo conduzido avaliando os seis antígenos examinados no MAPIA em formato ELISA frente a amostras de soro de cães infectados por *L. infantum* ou controles negativos, a rLci5 foi a única proteína a apresentar desempenho estatisticamente superior ao desempenho apresentado pelo teste imunoenzimático (EIE-LVC) preconizado pelo Ministério da Saúde do Brasil (MS). A proteína recombinante apresentou 96% (IC 95%; 85-99%) vs. 83% (IC 95%; 69-92%) de sensibilidade para cães com sinais clínicos, 71% (IC 95%; 49-97%) vs. 54% (IC 95%; 33-74%) para cães sem sinais clínicos e 94% (IC 95%; 83-99%) vs. 88% (IC 95%; 76-95%) de especificidade. Assim, a proteína rLci5 foi selecionada para compor um ensaio imunoenzimático (ELISA) que mostrou desempenho superior em comparação com o teste confirmatório da LVC preconizado pelo MS. Comparando o desempenho do protocolo de diagnóstico de LVC atualmente recomendado pelo MS, usando DPP-LVC como teste de triagem e EIE-LVC como teste confirmatório, com um protocolo modificado, substituindo EIE-LVC por um elisa utilizando a proteína recombinante rLci5 (ELISA rLci5). O protocolo com rLci5 ELISA apresentou maior

sensibilidade, especificidade semelhante e maior reprodutibilidade (BORJA et al., 2018).

Porém, além da acurácia diagnóstica, também é importante avaliar a capacidade de detectar anticorpos precocemente no curso da infecção, bem como a persistência nos cães infectados, permitindo um diagnóstico acurado em diferentes fases da infecção ou da doença.

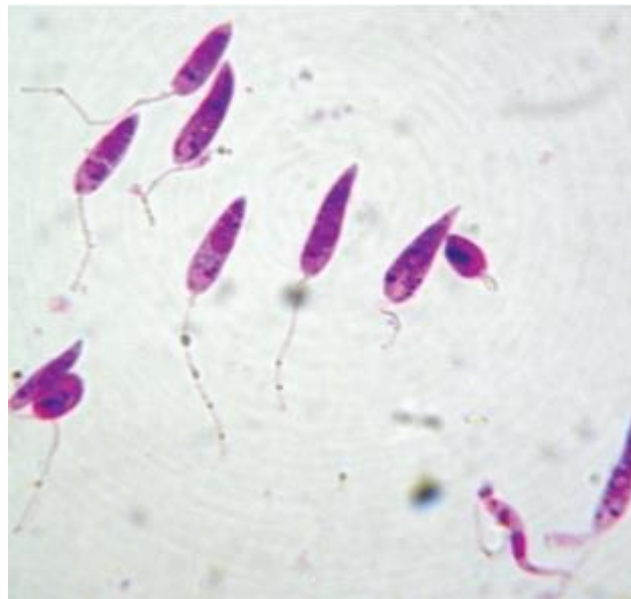
Um estudo prospectivo de dois anos foi realizado em uma área endêmica para leishmaniose visceral canina. Os cães foram avaliados em intervalos de 6 meses, por dois anos, para determinar infecção, manifestações clínicas, perfil imunológico e exposição a flebotomíneos. Os cães foram considerados positivos para CVL no estudo de coorte se (i) apresentassem resultado positivo em ambos os testes sorológicos (EIE-LVC e DPP-LVC) (ii); foi possível detectar *L. infantum* em cultura (iii); O DNA de *L. infantum* foi detectado por qPCR, em um dos três tecidos amostrados (sangue, pele e aspirado esplênico) (Solcà 2021). Todos os cães incluídos neste estudo apresentaram pelo menos um resultado positivo de CVL, e todos foram considerados positivos para CVL ao final da coorte. No entanto, durante o acompanhamento, os resultados nos diferentes testes diagnósticos empregados variaram a cada momento (SOLCÀ et al., 2021).

Assim, no presente estudo, a detecção precoce e a persistência de anticorpos anti-rLci5, utilizando o ELISA como plataforma diagnóstica, foram avaliadas e comparadas aos resultados de outros testes diagnósticos no curso da infecção natural por *L. infantum* em amostras de cães acompanhados por 24 meses em um estudo de coorte, no qual a infecção natural foi monitorada em uma área endêmica para LVC.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ETIOLOGIA E EPIDEMIOLOGIA DAS LEISHMANIOSES

As leishmanioses são um grupo de doenças tropicais negligenciadas, distribuídas mundialmente e encontradas em 89 países (ARENAS et al., 2017). Essas doenças são causadas por mais de 20 espécies diferentes de protozoário. Estas espécies, pertencentes ao gênero *Leishmania* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae), são os organismos causadores das leishmanioses tegumentar e visceral (WHO, 2010). Estes protozoários unicelulares e parasitas são transmitidos através da picada de insetos flebotomíneos fêmeas infectados (NJOROGÉ et al., 2021).

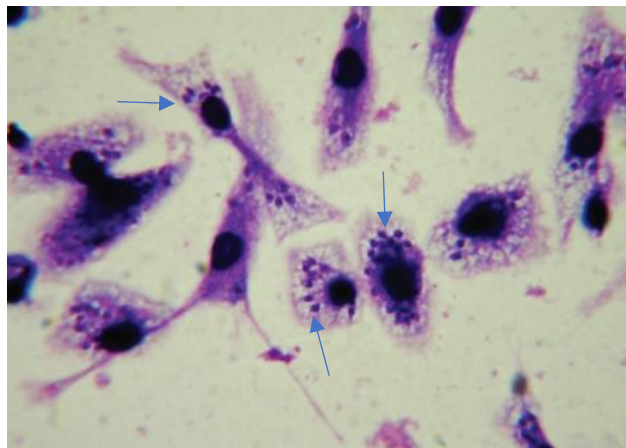


FONTE: (GUPTA; NISHI, 2011)

Figura 1- Promastigotas coradas - 100 x sob lentes de imersão em óleo.

Formas infecciosas do parasita, promastigotas metacíclicos com um flagelo longo livre (Figura 1), se desenvolvem no intestino de vetores flebotomíneos competentes, que as inoculam na pele de mamíferos através da picada. Em seguida, são ingeridos por células do sistema fagocitário mononuclear e se transformam em

formas amastigotas arredondadas flagelo restrito a bolsa flagelar, então, podem se multiplicar nos fagolisossomos de macrófagos recrutados (Figura 2) (SCORZA; CARVALHO; WILSON, 2017)



FONTE: (GUPTA; NISHI, 2011)

Figura 5 - Macrófagos infectados marcados com coloração de Giemsa contendo amastigotas (100 x sob lentes de imersão em óleo).

As leishmanioses continuam a ser um grande problema de saúde em 4 regiões ecoepidemiológicas do mundo: Américas, Leste da África, Norte da África, Oeste da Ásia e Sudeste Asiático, (WHO, 2020). Estima-se que, globalmente, existem cerca de 1,5–2 milhões de novos casos e 70.000 mortes a cada ano (ARENAS et al., 2017). Estima-se que anualmente, cerca de 1 milhão de pessoas desenvolvem LT, principalmente na Bolívia, Brasil, Colômbia, Peru, Argélia, Tunísia, Arábia Saudita, Síria, Irã, Afeganistão e Paquistão (MARTÍNEZ et al., 2018).

A LV é causada pelo complexo *Leishmania donovani*, sendo a espécie *L. donovani* encontrada no leste da África e no subcontinente indiano, enquanto que a espécie *Leishmania infantum* está presente na Europa, Norte da África e Américas (WHO, 2020). No Brasil, várias evidências indicam que os cães domésticos são os principais reservatórios da LV causada por *L. infantum* em áreas urbanas, contribuindo

para o ciclo de manutenção da doença (FRAGA et al., 2016; MAIA; CAMPINO, 2018; MORENO; ALVAR, 2002). O Ministério da Saúde (MS) preconiza como medida de controle da leishmaniose o diagnóstico rápido e a eutanásia ou tratamento dos cães soropositivos nas áreas endêmicas. O risco de infecção canina está bastante associado a ambientes rurais ou peri-urbanos onde são comuns residências com quintais com árvores, galinhas, fezes de animais, cães e/ou gatos (RODRIGUES et al., 2020). No entanto, apesar das tentativas de controle, a leishmaniose visceral (LV) tornou-se um grande desafio para os programas de vigilância e controle de doenças no Brasil (MORAIS et al., 2020).

2.2 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

Existem 4 formas principais da doença: a leishmaniose visceral (LV, também conhecida como febre kalazar), a leishmaniose dérmica pós-kala-azar (LDPK), a leishmaniose cutânea (LC), e a leishmaniose mucocutânea (LMC) (WHO, 2020). Embora a forma cutânea da doença seja a forma mais prevalente, a leishmaniose visceral é a que exhibe maior gravidade, podendo levar a morte quando não é realizado o tratamento específico (WHO, 2020). As diferenças nas manifestações clínicas da leishmaniose são explicadas, em parte, pela espécie de organismo que causa a infecção (SCHRIEFER; WILSON; CARVALHO, 2008).

Em humanos, o período de incubação da LV tipicamente varia entre 2 a 6 meses, mas pode levar semanas ou até mesmo anos. Os portadores apresentam febre de início insidioso, perda de peso e hepatoesplenomegalia que persiste por meses. Sendo a esplenomegalia proeminente na maioria dos casos de leishmaniose visceral. A doença é progressiva e uma infecção sintomática não tratada é geralmente fatal (BARRETT; CROFT, 2012).

O quadro canino é similar ao quadro humano, os parasitas proliferam onde quer que haja células do sistema fagocitário mononuclear, com maior frequência em macrófagos. Os parasitas são mais abundantes no baço e no fígado e, conseqüentemente, a infecção leva ao aumento de ambos os órgãos (ALVAR et al., 2004). São sinais clínicos comuns em cães com LVC: lesões cutâneas, linfadenomegalia generalizada, perda de peso progressiva, atrofia muscular, intolerância ao exercício, diminuição do apetite, letargia, esplenomegalia, poliúria e polidipsia, lesões oculares, epistaxe, onicogribose, claudicação, vômitos e diarreia (SOLANO-GALLEGO et al., 2009). Além dos sinais clínicos inespecíficos, o que dificulta o diagnóstico, alguns cães também não desenvolvem sinais claros da leishmaniose visceral canina, favorecendo o subdiagnóstico e permitindo a manutenção da doença nas áreas endêmicas (MAIA; CAMPINO, 2018).

2.3 DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

Para o diagnóstico da LVC deve-se considerar a associação dos dados clínicos, laboratoriais e epidemiológicos utilizando ferramentas de diferentes complexidades (BRASIL, 2014). O MS publicou a Nota Técnica conjunta no. 01, em dezembro de 2011, recomendando a substituição do protocolo diagnóstico da leishmaniose visceral canina até então utilizado. O teste imunocromatográfico rápido utilizando a proteína recombinante rK28 passou a ser o método de triagem a ser utilizado no Brasil, seguido pelo ELISA (EIE-LVC Bio-Manguinhos, Fiocruz, Brasil) como teste confirmatório da infecção. Porém, estudos na literatura avaliando o desempenho do ELISA (EIE-LVC Bio-Manguinhos) demonstraram baixa sensibilidade variando entre 64,5% e 72% (LIRA et al., 2006; FARIA et al., 2011) ou baixa especificidade: 77.8% (LAURENTI et

al., 2014) do teste, colocando sobre análise o uso desse teste diagnóstico como teste confirmatório para LVC. Com intuito de melhorar as medidas de controle da LV, a produção de novos testes diagnósticos e a identificação de novos antígenos recombinantes podem contribuir para o aumento da acurácia do diagnóstico da LVC.

2.3.1 Diagnóstico sorológico

Existem diversos testes que podem ser aplicados para o diagnóstico sorológico da LVC e que variam de acordo com o tipo de antígeno utilizado na técnica: extrato bruto, proteínas isoladas, recombinantes ou quiméricas. Além disso, fatores como a seleção das amostras utilizadas no estudo e o tipo de teste utilizado: ELISA, Dual *plath platform* (DPP), Reação Imunofluorescência Indireta (RIFI), *Indirect fluorescent antibody test* (IFAT), interferem diretamente nos níveis de sensibilidade e especificidade de cada um (BORJA et al., 2016).

Um dos métodos mais comuns para o diagnóstico sorológico da LVC é o EIE com a utilização de extrato bruto como antígeno no processo de sensibilização. O baixo custo, a reprodutibilidade e os bons níveis de sensibilidade tornam sua utilização viável no diagnóstico da LVC: especificidade e sensibilidade podendo alcançar entre 80 a 100% e 84 a 95%, respectivamente. Porém, uma desvantagem desta técnica é o nível considerável de reatividade cruzada (SAKKAS; GARTZONIKA; LEVIDIOTOU, 2016). Diversos estudos relataram a frequente reatividade cruzada de preparações com extrato bruto de *Leishmania* contra *Trypanosoma cruzi* e *Babesia sp.* (DO ROSÁRIO et al., 2005; MENEZES-SOUZA et al., 2014; SUNDAR S, 2002; TOLEDO-MACHADO et al., 2015)

Na última década, testes que empregam proteínas recombinantes têm sido aplicados para o diagnóstico da leishmaniose com o intuito de melhorar seu

desempenho e diminuir a reatividade cruzada. A proteína rk39 (QUINNELL et al., 2013) e a rk28 (FRAGA et al., 2016) são exemplos de antígenos recombinantes dessa categoria utilizados no diagnóstico da leishmaniose visceral humana e canina respectivamente. No estudo de Quinnell et al. (2013) a sensibilidade combinada de rK39 e dos testes diagnósticos rápidos (RDTs) foi de 86,7% (IC 95%: 76,9–92,8%) para detectar a doença clínica e 59,3% (37,9–77,6%) para detectar infecção. A especificidade combinada foi de 98,7% (89,5–99,9%). Quanto a proteína quimérica rk28, utilizada no teste DPP preconizado pelo MS, avaliada por Fraga et al. (2016), foram reportados 89% de sensibilidade e 94% de especificidade quando comparados a análise de classe latente como padrão ouro.

Outros testes sorológicos que empregam antígenos recombinantes foram descritos utilizando proteínas como a CSA, K26 e A2 que foram testadas através do ELISA para produção de novos métodos diagnósticos. Dentre estas proteínas, os seguintes resultados foram observados: para CSA a sensibilidade foi de 88% para cães sintomáticos e apenas 30% para assintomáticos, com especificidade de 87%; para K26 foi detectada sensibilidade de 94% em cães sintomáticos e 66% para cães assintomáticos, com especificidade de 90%; já A2 a sensibilidade foi de 70% para cães sintomáticos e 88% em cães assintomáticos, com especificidade de 96% (PORROZZI et al., 2007).

Devido a alta variabilidade na produção de anticorpos observada na resposta humoral de cães infectados, sugere-se que um diagnóstico eficaz seja baseado no uso de uma mistura de antígenos recombinantes e/ou no uso de antígenos quiméricos contendo epítomos de diversas proteínas recombinantes (SOTO et al., 1998). No estudo de Soto et al. (1998), a proteína quimérica recombinante PQ apresentou sensibilidade entre 79-96%, com especificidade de até 100%.

Uma outra abordagem recente é a utilização de peptídeos sintéticos, mais simples de produzir e capazes de reduzir significativamente a reatividade cruzada dos ensaios sorológicos (MACHADO et al., 2020; RODRIGUES et al., 2019; SALLES et al., 2019) : MACHADO et al. (2020) demonstraram que a combinação de 3 epítomos sintéticos conseguiu atingir níveis de 100% de sensibilidade e até 97% de especificidade. Já Rodrigues et al. (2019), obtiveram 98% de sensibilidade e 100% de especificidade ao utilizar o peptídeo sintético baseado na sequência linear da proteína proibitina de *L. infantum*.

2.3.2 Diagnóstico parasitológico

Os métodos parasitológicos são considerados o padrão ouro na confirmação da leishmaniose visceral e são extremamente importantes para os estudos eco-epidemiológicos (THAKUR; JOSHI; KAUR, 2020). Porém, os métodos disponíveis são aqueles que precisam de amostras obtidas através de técnicas consideradas invasivas, sendo necessária a punção de órgãos do paciente, por exemplo: baço ou medula óssea (SUNDAR S, 2002). Apesar de serem descritas como amostras com coletas invasivas, estas são consideradas as amostras com maior sensibilidade (SOLCÀ et al., 2014). Os métodos parasitológicos são os mais específicos por permitirem a observação direta do parasito e a confirmação da infecção. A especificidade desses testes pode chegar a 100%, já a sensibilidade é variável, uma vez que a distribuição dos patógenos no tecido examinado não é homogênea, podendo variar dependendo do local da punção (BAGUES et al., 2018; FARIA; ANDRADE, 2012).

Apesar de ser considerado o padrão ouro para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina, a cultura parasitológica é raramente utilizada na rotina devido à demora em seu resultado e baixa sensibilidade (SOLCÀ et al., 2012). No entanto, a cultura é bastante utilizada para outros fins, principalmente na pesquisa, para extração de material genético, diferenciação entre espécies e avaliação de novas drogas (SUNDAR S, 2002). As formas promastigotas podem ser isoladas e cultivadas no meio sólido Novy-MacNeal-Ni-colle (NNN) contendo 20-30% de sangue de coelho ou meio de cultura de insetos Schneider líquido (SINGH, 2006).

Para observação direta do parasita, também são utilizadas amostras de aspirado esplênico, aspirados de linfonodo, de medula óssea e de fígado, e camada leucocitária de sangue periférico diretamente em lâminas. Apesar da sensibilidade variável é possível observar a presença de amastigotas e macrófagos corados com corante Giemsa (SAKKAS; GARTZONIKA; LEVIDIOTOU, 2016). Quanto aos esfregaços podem ser corados com hematoxilina eosina (HE) ou imunoperoxidase.

2.3.3 Diagnóstico molecular

A aplicação de reação em cadeia da polimerase (PCR) ao diagnóstico de leishmaniose contribuiu para o desenvolvimento de abordagens sensíveis e específicas (MOREIRA et al., 2007). A PCR se baseia na amplificação de parte do material genético presente no DNA genômico do parasito, o qual pode ser extraído a partir de amostras clínicas, incluindo sangue, biópsias de pele, nódulos linfáticos, medula óssea e baço (PEREIRA et al., 2016). Em sua forma convencional, a PCR tem como característica a necessidade de processamento do produto da reação através

da realização de uma eletroforese em gel de agarose e posterior visualização de seus resultados com corantes específicos.

Outra abordagem da PCR é a reação em tempo real (qPCR) que vem sendo bastante utilizada para identificação de diferentes espécies de *Leishmania*, variando em especificidade e sensibilidade de acordo com o gene-alvo utilizado, além do poder de quantificação conferido por essa metodologia (GALLUZZI et al., 2018; RAMPAZZO et al., 2017; SOLCÀ et al., 2012). Vários estudos encontrados na literatura relatam que, dentre os possíveis gene-alvos a serem utilizados na qPCR, o DNA do cinetoplasto de *Leishmania* apresentou maior sensibilidade na detecção de animais infectados (MAIA; CAMPINO, 2008; MARCELINO et al., 2020; MIRÓ et al., 2008). Em 2010, Paiva-Cavalcanti et al. (2010), utilizando amostras de sangue periférico de 15 cães que foram positivos para LV, a sensibilidade da qPCR foi de 100%. Em outro estudo, Rampazzo et al. (2017) conseguiram obter níveis de 100% de especificidade e 100% de especificidade com amostras de pele de 42 cães infectados e 40 não infectados por *L. infantum* utilizando qPCR.

3. JUSTIFICATIVA

A Leishmaniose Visceral Canina é um grave problema de saúde pública no Brasil. O cão é considerado o principal reservatório urbano da doença (ALVAR et al., 2004). Para o controle da LVC é preconizada a identificação dos animais infectados para utilização de medidas profiláticas (BRASIL, 2014).

Os métodos sorológicos já são bem conhecidos e amplamente utilizados em todo o mundo. A popularidade destes testes está diretamente ligada ao seu baixo custo por reação, níveis satisfatórios de sensibilidade e especificidade, e facilidade de uso fora do laboratório quando consideramos os testes rápidos (SAKKAS; GARTZONIKA; LEVIDIOTOU, 2016). Os testes preconizados pelo Ministério da Saúde são o DPP-LVC como diagnóstico de triagem e o EIE-LVC como diagnóstico confirmatório, mas também estão disponíveis em laboratórios outros métodos e kits diagnósticos. Apesar da grande gama de métodos diagnósticos, boa parte desses métodos falha na prática clínica, não identificando, em sua maioria animais sem ou com poucos sinais clínicos da LVC (DANTAS-TORRES; BRITO; BRANDÃO-FILHO, 2006; SOLANO-GALLEGO et al., 2009).

A proteína recombinante rLci5 é estudada por nosso grupo há alguns anos, e já foi demonstrado um alto nível de sensibilidade e especificidade para LVC, com alta sensibilidade no que se refere a identificação de animais sem sinais clínicos aparentes da infecção (BORJA et al., 2018). É de suma importância para o controle da LVC um diagnóstico preciso, capaz de identificar esses animais sem sinais clínicos (MOREIRA et al., 2007). Ademais, estudos apontam que um diagnóstico precoce também é essencial na diminuição dos níveis de transmissão da doença (FARIA et al., 2015; KUMAR; PANDEY; SAMANT, 2020; MAIA; CAMPINO, 2018). O animal detectado precocemente tem menos chances de se tornar um reservatório nos ambientes

urbanos e rurais, uma vez que o cão pode ser tratado e/ou o tutor poderá utilizar de ferramentas profiláticas contra o mosquito vetor, a exemplo do encoleiramento com deltametrina (QUINNELL; COURTENAY, 2009). É premente o desenvolvimento de uma ferramenta capaz de identificar precocemente os cães infectados por *L. infantum* em áreas endêmicas.

É descrito na literatura que os resultados de um determinado diagnóstico podem variar conforme o desenvolvimento da doença. As reações bioquímicas decorrentes da infecção variam em consonância com a progressão da doença (ZWAAN; SINGH, 2015). Esses fatores, entre outros, podem resultar em diferentes resultados para um animal, positivo para LVC, quando avaliado ao longo do curso da infecção, podendo gerar resultados falsos negativos. Boas estratégias diagnósticas, são mais robustas, e geralmente possuem uma estabilidade maior nos resultados obtidos mesmo com as variações características da doença. Até o presente momento, nenhum estudo havia sido feito para avaliar a permanência dos resultados obtidos de animais com LVC ao longo de diferentes períodos de tempo.

Para o controle efetivo da leishmaniose visceral em áreas endêmicas é necessário o desenvolvimento de um teste diagnóstico sensível, capaz de identificar cães de maneira precoce e que obtenha resultados consistentes e persistentes durante o curso da infecção do animal. Ao aumentar a detecção de cães infectados por *Leishmania infantum*, permitindo seu tratamento e/ou encoleiramento, pode-se reduzir em altos níveis a transmissão da leishmaniose visceral canina. A diminuição da transmissão auxiliará na redução dos casos tanto em cães quanto em pacientes humanos.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a capacidade de detecção precoce e a persistência de resultados positivos de um ELISA para Leishmaniose visceral canina utilizando uma proteína recombinante quando comparado a outros métodos diagnósticos durante o acompanhamento por 24 meses de cães de uma área endêmica.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar a frequência de resultados positivos para LVC obtidos para cada cão a cada 6 meses durante o estudo de coorte utilizando diferentes métodos diagnósticos.
2. Avaliar a detecção precoce de anticorpos anti-leishmaniose usando o a proteína rLci5 em uma coorte de cães positivos para leishmaniose visceral canina acompanhados por 24 meses.
3. Comparar a precocidade da detecção da LVC por ELISA rLci5 com EIE-LVC, DPP-LVC, cultura de aspirado esplênico e qPCR em cães acompanhados por 24 meses.
4. Avaliar e comparar a persistência dos resultados positivos obtidos pelos diversos métodos diagnósticos utilizados em relação a positividade dos animais avaliados com ELISA utilizando rLci5 durante o período da coorte canina.

5. ARTIGO

de Jesus et al. *Parasites Vectors* (2021) 14:398
<https://doi.org/10.1186/s13071-021-04895-z>

Parasites & Vectors

RESEARCH

Open Access



Early detection and persistent positivity of anti-*Leishmania* antibodies using a recombinant protein-based ELISA in naturally infected dogs in Brazil

Matheus Silva de Jesus¹, João Victor Andrade Cruz¹, Livia Brito Coelho¹, Lairton Souza Borja¹, Edmilson Domingos da Silva², Manuela da Silva Solcà^{1,3}, Claudia Ida Brodskyn^{1,4} and Deborah Bittencourt Mothé Fraga^{1,3,5*}

Abstract

Background: Visceral leishmaniasis (VL) is a zoonotic disease caused by *Leishmania infantum*, for which dogs constitute the main urban parasite reservoir. Control measures and the treatment of canine visceral leishmaniasis (CVL) are essential to reduce VL cases. Early and accurate detection of *L. infantum*-infected dogs is crucial to the success of VL control. To improve the serological detection of *L. infantum*-exposed dogs, we evaluated the early diagnosis capacity of a recombinant protein (rLci5) in an immunosorbent assay (ELISA) to detect naturally infected dogs. Additionally, we evaluated the persistence of the positive results obtained by rLci5 ELISA in comparison to other conventional diagnostic test methods.

Methods: Serum samples obtained from 48 *L. infantum*-infected dogs involved in a cohort study were evaluated using different diagnostic methods (qPCR, EIE-LVC, DPP-LVC and splenic culture). The results were compared to rLci5 ELISA to determine its capacity to diagnose *L. infantum* infection at earlier infection time points. The persistence of positive diagnostic test results was also compared for each dog evaluated.

Results: rLci5 ELISA presented higher rates of positive results at early time points compared to the other diagnostic tests employed in the cohort study, as early as 24 months prior to detection by other tests. rLci5 ELISA positivity was 52.1% (25/48) at baseline, while qPCR was 35.4% (17/48), DPP-LVC 27.1% (13/48), EIE-LVC 22.9% (11/48) and culture only 4.2% (2/48). In at least one of the time points of the 24-month cohort study, rLci5 ELISA was positive in 100% (48/48) of the dogs, versus 83% (40/48) for qPCR, 75% (36/48) for DPP-LVC, 65% (31/48) for EIE-LVC and 31% (15/48) for culture. Investigating clinical signs in association with diagnostic test positivity, rLci5 ELISA successfully detected CVL in 62.9% (95/151) of the clinical evaluations with a score of 0–3, 64.3% (45/70) with scores between 4 and 7, and 73.7% (14/19) with scores > 7, providing higher rates of positivity than all other methods evaluated. Moreover, rLci5 ELISA presented the greatest persistence with respect to test positivity: 45.8% of the dogs evaluated.

Conclusion: Four diagnostic tests were compared to rLci5 ELISA, which presented earlier infection diagnosis and a greater persistence of positive test results. Accordingly, the use of the rLci5 ELISA can improve CVL diagnostic

*Correspondence: deborah.fraga@fiocruz.br

¹ Instituto Gonçalo Moniz-Fundação Oswaldo Cruz, Rua Waldemar Falcão
 121, Bahia, Salvador, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2021. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

performance by detecting infected dogs sooner than other testing methods, with enhanced persistence of positive results over the course of the infection.

Keywords: Early diagnosis, Canine leishmaniasis, rLci5, Diagnostic persistence

Background

The protozoan parasite *Leishmania infantum* is the main etiological agent of human visceral leishmaniasis (VL) in Brazil, an endemic zoonosis commonly found in tropical countries [1]. According to the Brazilian Ministry of Health, ~ 3500 cases are registered annually throughout the country [2]. In Brazil, the sand fly *Lutzomyia longipalpis* is the main vector of *L. infantum* [3]. Patients with VL may develop clinical signs including prolonged fever, anemia, weight loss, weakness, hepatomegaly and splenomegaly [4].

Dogs are the main urban reservoirs of *L. infantum*, which may play an important role in the transmission and maintenance of VL, resulting in the accidental infection of humans [4, 5]. Early and effective diagnosis is essential to establishing efficient control measures [6, 7]. Among the available diagnostic methods, serological assays offer several advantages including low cost, feasibility in field settings and rapid test results, as well as adequate parameters of sensitivity and specificity when appropriate antigens are employed [8].

Recombinant proteins, which have been used as antigens to improve immunodiagnostic performance, can be identified using proteomics and bioinformatics technology [7]. Machado et al. [9] demonstrated significant diagnostic results using recombinant proteins and synthetic peptides, with very high sensitivity and specificity for diagnosing VL in humans and dogs. In addition, Santos et al. [10] found that *L. infantum* elongation factor-1 beta protein and its recombinant version both offered high sensitivity and specificity for the detection of anti-*Leishmania* antibodies in asymptomatic and symptomatic dogs. These same proteins may also be useful as prognostic markers in human sera, since they are able to detect reductions in antibody levels following treatment in humans [10].

Our group previously identified recombinant antigens for use in canine visceral leishmaniasis (CVL) serodiagnosis [11, 12]. Among these antigens, the recombinant protein rLci5 demonstrated promising results when used in an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), offering 87% sensitivity and 94% specificity, as well as 90% diagnostic accuracy [13]. However, in addition to accuracy, it is also important to assess the ability of diagnostic assays to detect antibodies at early times of infection, as well as to evaluate the persistence of these antibodies in infected dogs, which allows clinicians to perform

diagnosis in different phases of infection or stages of disease.

Thus, the present study aimed to evaluate the diagnostic capability of rLci5 ELISA at early stages of natural infection by *L. infantum* in dogs, as well as investigate this protein's ability to detect persistent infection over a 24-month follow-up period, and then compare the obtained results to those produced by other available diagnostic tests. Canine samples from a cohort study in which natural infection was monitored for 2 years in an endemic area [14] were used for evaluation purposes.

Methods

Serum samples and CVL diagnosis

Serum samples were obtained from 48 dogs involved in a prospective 2-year cohort study conducted in Camaçari, Bahia, an area where VL and CVL are endemic [14]. This cohort was followed between February 2014 and November 2017. Dogs were visited at baseline and then revisited at 6-month intervals for testing and evaluation of clinical signs associated with CVL, resulting in a total of five assessments during follow-up. During the cohort study, dogs were tested by an ELISA (EIE-LVC, Bio-Manguinhos, Fiocruz, Brazil), an immunochromatographic assay (DPP-LVC, Bio-Manguinhos, Fiocruz, Brazil), qPCR and cultures of splenic aspirate samples were performed. The following clinical parameters related to CVL were assessed at each time point: nutritional status; mucosa color; periocular dermatitis; ear crusting; ear ulceration; muzzle depigmentation; muzzle hyperkeratosis; muzzle lesions; spleen size; onychogryphosis; alopecia; seborrheic dermatitis; lymphadenomegaly [15]. Scores were assigned in accordance with the presence and intensity of each parameter. A total clinical score was then calculated for each dog at each time point by summing the scores of all parameters. This composite score ranged from 0 to 24 points [15]. All 48 dogs studied herein presented positivity to at least one of the four diagnostic methods previously employed at all evaluated time points during the cohort study.

rLci5 ELISA and other diagnostic tests

All serum samples previously obtained from the original cohort study were subsequently assessed using rLci5 ELISA as previously described by Borja et al. [13]. Other diagnostic tests were originally employed during the cohort study, including EIE-LVC and DPP-LVC, which

were performed in accordance with manufacturer's specifications. qPCR and cultures of splenic aspirate samples were assessed as described by Rampazzo et al. [16] and Barrouin-Melo et al. [17], respectively. All diagnostic assays were carried out under blinded conditions, that is, investigators interpreted the diagnostic test results obtained from each technique without knowing the other test results for each sample under consideration.

Evaluation of rLci5 ELISA test performance

Comparisons among diagnostic tests and association with clinical score

The results from parasitological, molecular and serological diagnostic testing performed at each time point, for all 48 dogs, were entered in a database created in Excel (Additional file 1: Table S1) and compared statistically (see below).

Clinical scores were assessed for all 48 dogs during the cohort study at each of the five time points. These observations were stratified into three categories: clinical scores in the ranges of 0–3, 4–7, and >7 (Additional file 1: Table S1). Each of these clinical score categories were evaluated with regard to positivity on each of the five different diagnostic methods.

Early positivity

Positivity was initially assigned in each dog by detection of positive results on one or more of four previously employed diagnostic methods (DPP-LVC, EIE-LVC, culture or qPCR). At five time points throughout the follow-up period, dogs were evaluated at no longer than 6-month intervals. The frequencies of the first positive detection were calculated for each diagnostic method at each follow-up period. To assess whether rLci5 ELISA was capable of detecting positivity prior to the other four diagnostic methods, each dog's previous diagnostic test results were compared to those obtained from the in-house antigen ELISA. Early detection was considered when rLci5 ELISA demonstrated positivity at least 6 months before positivity was detected using another method. Positivity frequencies were calculated for a given animal using positive and negative results obtained using each test method.

Persistence of positivity on diagnostic tests

The persistence of diagnostic test positivity was evaluated when a given diagnostic test returned positive results for at least two consecutive time points following the initial diagnosis (i.e., over a consecutive 18-month follow-up period consisting of three evaluation time points). Considering the entire 24-month cohort study follow-up period, 18 months corresponded to 75% of the evaluation period.

Statistical analyses

Frequencies of diagnostic results were calculated using the STATA 12.0 (StataCorp LP, Texas, USA) software program. The unpaired *t*-test was used to compare the average diagnostic test positivity versus the average rLci5 ELISA positivity. The chi-square test was used to compare numbers of positive dogs detected by rLci5 ELISA with those detected by the other diagnostic tests evaluated during the follow-up period.

Positivity on rLci5 ELISA was compared to the other four diagnostic methods using McNemar's test in accordance with the three different clinical score categories. The persistence of each diagnostic test was calculated, expressed as frequency and then compared to the other methods using McNemar's test.

All statistical analyses were performed using GraphPad software, and results were considered significant when $P < 0.05$.

Results

Frequency of diagnostic test positivity

All 48 dogs included were classified as positive by one of the four diagnostic methods originally employed at the final time point of the cohort study. Of these, 100% tested positive on rLci5 ELISA at least one time point, while 83% (40/48) were positive by qPCR, 75% (36/48) on DPP-LVC, 65% (31/48) on EIE-LVC and 31% (15/48) by culture.

Variable positivity was observed in accordance with each diagnostic test evaluated (Table 1). Parasite cultures presented the lowest rate of positivity, resulting in an average 10% detection rate over the five time points evaluated in the cohort study. qPCR detected an average of 30% of dogs as positive, while DPP-LVC and EIE-LVC averaged 34% and 38%, respectively. rLci5 ELISA detected significantly higher numbers of positive dogs throughout the study, ranging from 46 to 81%, with an average 64% positive detection rate over five evaluation time points (Table 1).

Early positivity using rLci5 ELISA compared to other diagnostic tests

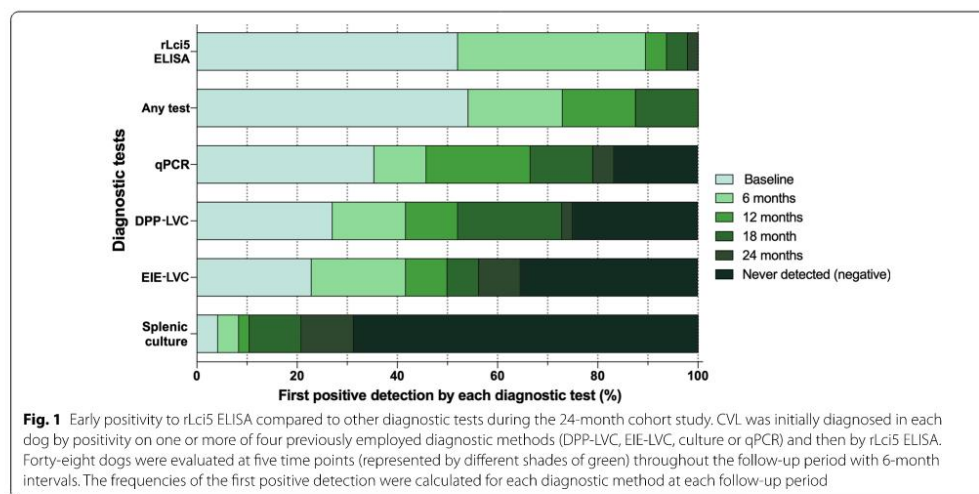
rLci5 ELISA presented higher rates of positivity at early time points compared to the other diagnostic tests employed in the cohort study, as early as 24 months prior to detection by other tests. Our analysis of positive detection revealed first positivity by rLci5 ELISA in most dogs at earlier time points compared to other diagnostic methods (Fig. 1). rLci5 ELISA was positive in 52.1% of the dogs (25/48) at baseline, while qPCR detected 35.4% (17/48), DPP_LVC 27.1% (13/48), EIE-LVC 22.9% (11/48) and culture showed just 4.2% (2/48) positivity (Fig. 1).

Table 1 Frequency of positivity on different diagnostic tests during the 24-month cohort study

Test	Positive result frequency					Average positivity over 24 months (%)	Average positivity versus average rLci5 ELISA positivity (P value)**
	Baseline	6 months	12 months	18 months	24 months		
Culture	2/48 (4%)	3/48 (6%)	2/48 (4%)	9/48 (19%)	7/46 ^a (15%)	10	< 0.0001
qPCR	17/48 (35%)	9/48 (19%)	17/48 (35%)	20/48 (42%)	9/48 (19%)	30	0.0034
DPP-LVC	13/48 (27%)	16/48 (33%)	14/48 (29%)	23/48 (48%)	15/48 (31%)	34	0.0045
EIE-LVC	11/48 (23%)	19/48 (40%)	19/48 (40%)	20/48 (42%)	22/48 (46%)	38	0.0105
rLci5 ELISA	25/48 (52%)	39/48 (81%)	31/48 (65%)	22/48 (46%)	37/48 (77%)	64	–

^a Two samples were discarded due to contamination at 24 months

** Unpaired t-test



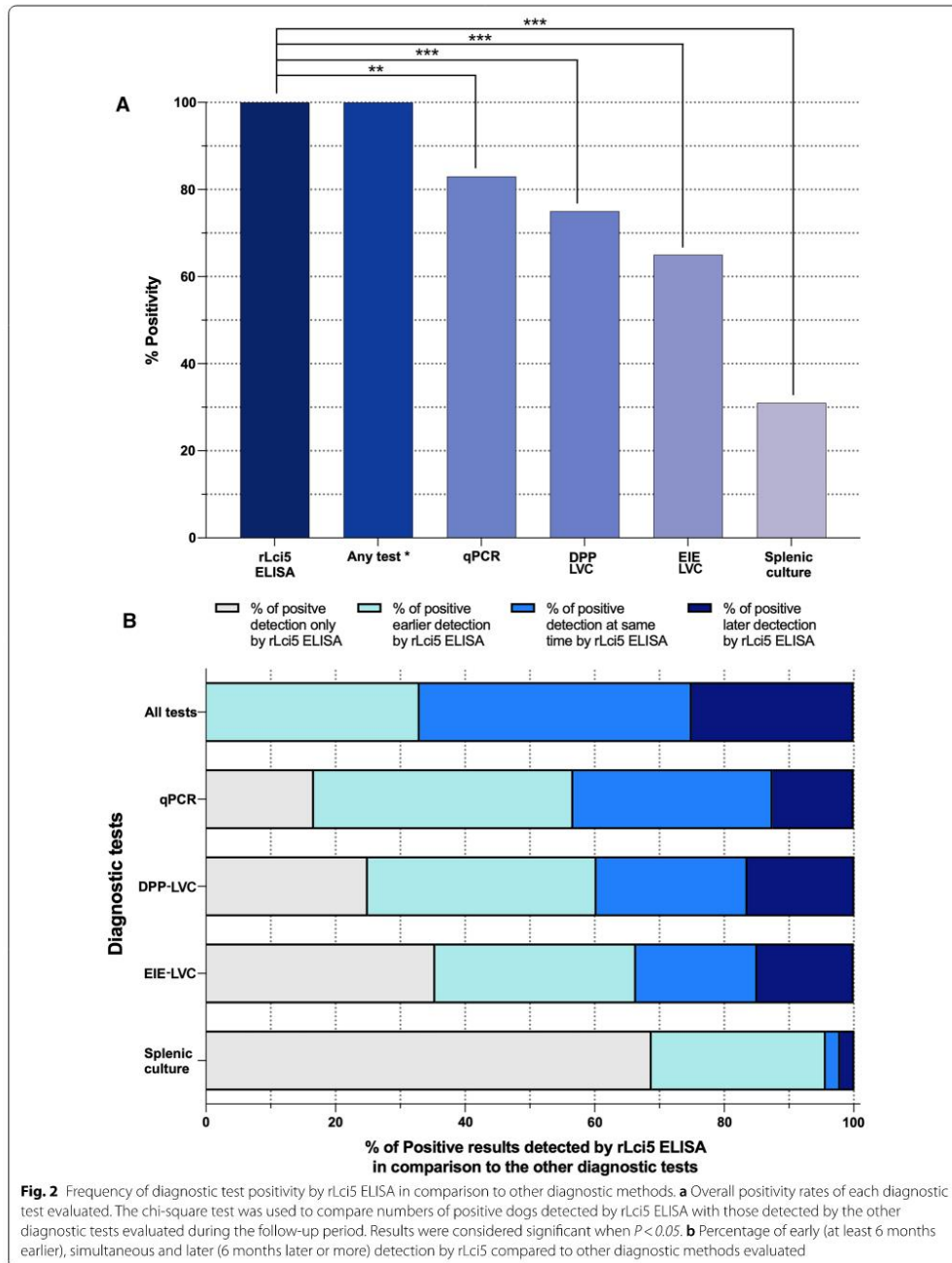
With respect to positivity in each of the 48 dogs with CVL, rLci5 ELISA demonstrated positivity in 100% (48/48) of the dogs in at least one of the time points of the cohort study, while qPCR detected 83% (40/48), DPP-LVC 75% (36/48) and EIE LVC 65% (31/48), and culture presented an overall positivity in 31% (15/48) of the animals (Fig. 2a). Moreover, rLci5 ELISA detected positive results earlier than the other diagnostic tests, in 86% (13/15) of the dogs detected by culture, and in almost 50% of the dogs detected by EIE-LVC, DPP-LVC or qPCR (Fig. 2b).

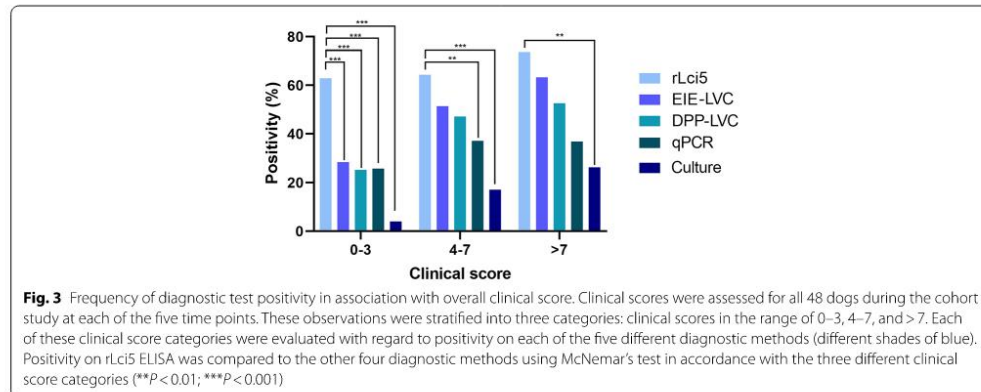
Associations between clinical scores and diagnostic methods results

With respect to all evaluations ($n=240$) conducted in the 48 animals during the 24-month cohort study, 62.9% (151/240) were classified as clinical score 0–3, 29.1%

(70/240) as clinical score 4–7, and 7.9% (19/240) as clinical score > 7.

rLci5 ELISA successfully detected positivity in 62.9% (95/151) of the evaluations classified as clinical score 0–3, 64.3% (45/70) as clinical score 4–7, and 73.7% (14/19) as clinical score > 7. Correspondingly, EIE-LVC detected 28.5% (43/151) of the evaluations classified as clinical score 0–3, 51.4% (36/70) as clinical score 4–7, and 63.2% (12/19) as clinical score > 7. DPP-LVC detected 25.2% (38/151) of the evaluations classified as clinical score 0–3, 47.1% (33/70) as clinical score 4–7, and 52.6% (10/19) as clinical score > 7 (Fig. 3). qPCR detected in 25.8% (39/151) of the evaluations classified as clinical score 0–3; 37.1% (26/70) as clinical score 4–7, and 36.8% (7/19) as clinical score > 7. Lastly, parasitological culture detected 4% (6/149) of the evaluations classified as clinical score 0–3, 17.1% (12/70) as clinical score 4–7, and 26.3% (5/19) as clinical score > 7 (Fig. 3). Overall, rLci5





ELISA presented significantly higher detection rates in animals classified with a clinical score of 0–3 compared to the other diagnostic tests evaluated (** $P < 0.001$). For the dogs with clinical scores ranging from 4 to 7, rLci5 ELISA presented significantly higher detection rates than culture (** $P < 0.001$) or qPCR (** $P < 0.01$). Finally, in dogs with clinical scores > 7, rLci5 ELISA only demonstrated significantly higher rates of detection than culture (** $P < 0.01$).

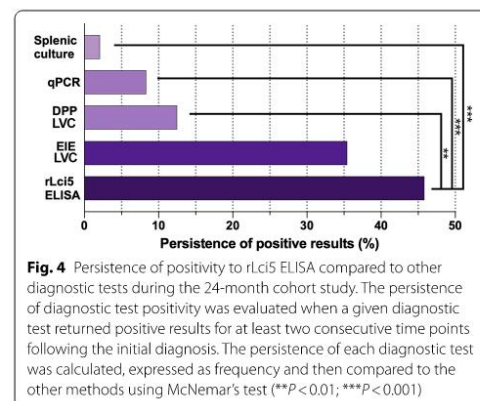
Persistence of positivity on different diagnostic tests

rLci5 ELISA was found to consistently present significantly greater persistent positivity compared to the other diagnostic tests evaluated ($P < 0.01$), with the exception of EIE-LVC. The highest rate of persistence with respect to positivity was identified for rLci5 ELISA (45.8% of the dogs followed up), while EIE-LVC presented a 35.4% rate of persistence compared to DPP-LVC, with 12.5% persistence. Parasitological and molecular methods demonstrated the lowest rates of persistence: 8.3% for qPCR and 2.1% for culture (Fig. 4).

Discussion

Many factors can influence the accuracy of disease diagnosis. The evolution of a given disease may vary, and it is expected that after infection, biochemical and physiological reactions take place, yet often without evident symptoms. Each disease presents a different course of evolution over time, with variability in signs, symptoms and outcomes [18].

Veterinarians experience difficulty in the assessment of CVL diagnosis due to the non-specificity of clinical signs, which can be confounded with other diseases, such as ehrlichiosis and babesiosis [10]. Moreover, animals considered resistant to CVL may never present any signs



characteristic of disease, even over prolonged periods of monitoring [19].

The obtainment of early, rapid and efficient diagnoses is essential to proper clinical treatment and effective control of *Leishmania* transmission, as control is highly dependent on the accurate diagnosis of infected reservoirs [20]. While qPCR could be considered the most efficient method of CVL diagnosis, since it presents elevated sensitivity and specificity, this method can be expensive, and accuracy is highly dependent on sample source [18, 21, 22]. Different samples from bone marrow and lymph node have been used extensively, but spleen aspirate collection, although an invasive method, provides the most accurate detection of infection using qPCR [23]. Culture, considered the gold standard for CVL diagnosis, lacks sensitivity, and is very time-consuming [23]. Alternatively, serological methods are less expensive and more

16. Rampazzo RDCP, Solcà MDS, Santos LCS, Pereira LDN, Guedes JCO, Veras PST, et al. A ready-to-use duplex qPCR to detect *Leishmania infantum* DNA in naturally infected dogs. *Vet Parasitol.* 2017;246:100–7.
17. Barrouin-Melo SM, Larangeira DF, de Andrade Filho FA, Trigo J, Juliao FS, Franke CR, et al. Can spleen aspirations be safely used for the parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniasis? A study on asymptomatic and polysymptomatic animals. *Vet J.* 2006;171:331–9.
18. Travi BL, Tabares CJ, Cadena H, Ferro C, Osorio Y. Canine visceral leishmaniasis in Colombia: relationship between clinical and parasitological status and infectivity for sand flies. *Am J Trop Med Hyg.* 2001;64:119–24.
19. Reis AB, Martins-Filho OA, Teixeira-Carvalho A, Giunchetti RC, Carneiro CM, Mayrink W, et al. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol.* 2009;128:87–95.
20. Kumar A, Pandey SC, Samant M. A spotlight on the diagnostic methods of a fatal disease visceral leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 2020;42:e12727.
21. da Solcà MS, Guedes CES, Nascimento EG, de Oliveira GGS, dos Santos WLC, Fraga DBM, et al. Qualitative and quantitative polymerase chain reaction (PCR) for detection of *Leishmania* in spleen samples from naturally infected dogs. *Vet Parasitol.* 2012;184:133–40.
22. Maia C, Ramada J, Cristóvão JM, Gonçalves L, Campino L. Diagnosis of canine leishmaniasis: conventional and molecular techniques using different tissues. *Vet J.* 2009;179:142–4.
23. Solcà MS, Bastos LA, Guedes CES, Bordoni M, Borja LS, Larangeira DF, et al. Evaluating the accuracy of molecular diagnostic testing for canine visceral leishmaniasis using latent class analysis. *PLoS ONE.* 2014;9:e103635.
24. Laurenti MD, de Santana LMV, Tomokane TY, De Lucca HRL, Aschar M, Souza CSF, et al. Comparative evaluation of the DPP® CVL rapid test for canine serodiagnosis in area of visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol.* 2014;205:444–540.
25. Teixeira AIP, Silva DM, Vital T, Nitz N, DeCarvalho BC, Hecht M, et al. Improving the reference standard for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis: a challenge for current and future tests. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2019;114:180452.
26. Faria AR, de Castro VL, Coura-Vital W, Reis AB, Damasceno LM, Gazzinelli RT, et al. Novel recombinant multi-epitope proteins for the diagnosis of asymptomatic *Leishmania infantum*-infected dogs. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015;9:e3429.
27. Fraga DBM, Pacheco LV, Borja LS, Tuy da PGSE, Bastos LA, Solcà da MS, et al. The rapid test based on *Leishmania infantum* chimeric rK28 protein improves the diagnosis of canine visceral leishmaniasis by reducing the detection of false-positive dogs. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10:e0004333.
28. Maia C, Campino L. Biomarkers associated with *Leishmania infantum* exposure, infection, and disease in dogs. *Front Cell Infect Microbiol.* 2018;8:302.
29. Bagues NCT, de Pinheiro CGM, Bastos LA, Fraga DBM, Veras PST, Pontes-de-Carvalho LC, et al. Parasitic load and histological aspects in different regions of the spleen of dogs with visceral leishmaniasis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2018;56:14–9.
30. 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 Negl Trop Dis.* 2013;7:e1992.
31. Quinnell RJ, Courtenay O, Garcez LM, Kaye PM, Shaw MA, Dye C, et al. IgG subclass responses in a longitudinal study of canine visceral leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol.* 2003;91:161–8.
32. Nunes CM, de Lima VMF, de Melo GD, de Paula HB, Pereira MEG, Tronco CMT, et al. Testes sorológicos, parasitológicos e moleculares para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina em estudo longitudinal. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2015;24:402–9.
33. Duarte I, de Silva MF, Malvestiti AA, de Machado BAR, Lazzarini R. Evaluation of the permanence of skin sensitization to allergens in patients with allergic contact dermatitis. *An Bras Dermatol.* 2012;87:831–7.
34. Aaron SD, Vandemheen KL, FitzGerald JM, Ainslie M, Gupta S, Lemièrre C, et al. Reevaluation of diagnosis in adults with physician-diagnosed asthma. *JAMA J Am Med Assoc.* 2017;317:269–79.
35. Mcdonagh JE, Walker DJ. Incidence of rheumatoid arthritis in a 10-year follow-up study of extended pedigree multicase families. *Rheumatology.* 1994;33:826–31.
36. Zwaan L, Singh H. The challenges in defining and measuring diagnostic error. *Diagnosis.* 2015;2:97–103.
37. Manna L, Reale S, Vitale F, Gravino AE. Evidence for a relationship between *Leishmania* load and clinical manifestations. *Res Vet Sci.* 2009;87:76–8.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



time-efficient. Although the Brazilian Ministry of Health recommends both DPP-LVC and EIE-LVC to assess *L. infantum* infection in dogs, such tests have demonstrated poor results compared to other methods. In a study performed by Laurenti et al. [24], DPP-LVC showed a sensitivity of 90.6% and specificity of 95.1% and presented 44% cross-reactivity with the sera of dogs with babesiosis. EIE-LVC showed a good sensitivity (90.6%), but very low specificity (77.8%) due to the high cross-reactivity with the sera from the animals harboring other pathogens [24]. More recently, Teixeira et al. [25] evaluated both DPP-LVC and EIE-LVC based on the use of asymptomatic reference standard samples previously confirmed by parasitological and molecular techniques. Their study detected sensitivity and specificity for DPP-LVC and EIE-LVC of 21.7% and 92.6%, and 11.6% and 90.7%, respectively [25]. Thus, in an effort to improve the accuracy of CVL diagnosis in Brazil, the implementation of more reliable test methods is recommended [26, 27].

Recombinant protein rLci5 previously demonstrated promise in CVL serodiagnosis, showing high sensitivity and specificity [13]. The present study confirmed the accuracy of rLci5 ELISA in CVL serodiagnosis, as this test presented the highest detection rate among the diagnostic tests evaluated. Moreover, rLci5 ELISA was observed to detect positive results earlier when compared to the methods currently recommended by the Brazilian Ministry of Health (DPP-LVC, EIE-LVC), as well as qPCR and culture. The early detection capability of rLci5 ELISA represents a promising finding, as the adoption of diagnostic methods capable of detecting the presence of anti-*Leishmania* antibodies shortly after the onset of infection are well-suited to control transmission [28]. Accordingly, rLci5 ELISA warrants consideration by health authorities to improve the control of CVL transmission, and could make a valuable contribution together with other control measures to preclude the spread of this disease.

qPCR demonstrated the highest positive rate among the tests evaluated (except for rLci5). However, its performance was highly variable among the time points evaluated (Fig. 4). qPCR is a very sensitive technique, but its results strongly depend on the samples and tissues used. Even using splenic tissue samples, which was shown to be one of the best tissues to measure parasite load in dogs [16, 23], it has already been demonstrated that the region of the spleen where the samples were obtained can influence the positivity of qPCR [29]. Recently our group showed that in the same dog followed in a cohort study, there was significant variation in positivity and parasite load measured by qPCR at different points evaluated [14].

As expected, the positivity rates of all five diagnostic tests evaluated in this study increased in accordance with

the severity of clinical manifestations. However, rLci5 ELISA offered favorable detection rates among even those dogs with lower clinical scores (Fig. 3), as demonstrated previously [13], which reinforces the superiority of rLci5 ELISA alone in comparison to other test methods. The ability of rLci5 ELISA to test positive earlier than other methods could be explained by reactivity to the humoral response in dogs, even when clinical signs are not readily apparent. It is therefore possible that while parasite load may not be high enough to be detected by qPCR or culture, it could be sufficient to stimulate a humoral response that is detectable by rLci5 ELISA.

The obtainment of persistent results throughout the course of infection confers robustness to diagnosis and reduces the risk of false-positive and false-negative results depending on the time of analysis. rLci5 ELISA showed a significantly higher persistence of positivity during the follow-up period compared to other diagnostic tests evaluated. While the literature contains longitudinal studies evaluating CVL diagnostic methods, none have attempted to assess the persistence of positive results in a longitudinal manner [30–32]. Importantly, other studies have evaluated the persistence of diagnostic test results in diseases other than leishmaniasis, such as allergic contact dermatitis, asthma and rheumatoid arthritis [33–35].

Diagnostic test results can vary over time, likely due to a range of physiological processes associated with disease that affect the host [36]. Titers of antibodies can be low or high at different stages of disease [36], and parasites may not be detectable in culture due to low parasite burden [37]; moreover, the detection of parasite DNA can vary among tissue types under PCR testing [23, 29]. Our findings demonstrate considerable variation in the diagnostic results produced by culture and qPCR over time compared to serological testing. Studies have shown that the persistence of antibodies for a considerable period of time may favor CVL diagnosis using serological methods [31]. On the other hand, parasite load is highly dependent on the type of sample used, the presence of PCR inhibitors and natural variations throughout the course of infection that are dependent on an animal's individual immune response. Further studies may serve to clarify the relationship between the persistence of diagnostic test results and specific pathological processes occurring within the host.

Conclusion

rLci5 ELISA demonstrated a capability to achieve earlier positivity, with higher persistence of positive results than DPP-LVC, qPCR or culture. The persistence of positivity in the same animals throughout the study period revealed this diagnostic test's consistency and reliability. In sum,

rLci5 ELISA was shown to be an important tool for CVL diagnosis, providing stable results over time and fewer false-negative results along the course of natural infection. We recommend that health authorities consider the use of rLci5 in ELISA to improve the performance of CVL diagnosis.

Abbreviations

DNA: Deoxyribonucleic acid; DPP: Dual Path Platform; EIE: Immunoenzymatic assay; ELISA: Enzyme linked immunosorbent assay; IGM: Gonçalves Moniz Institute; VL: Visceral leishmaniasis; CVL: Canine visceral leishmaniasis; PCR: Polymerase chain reaction; qPCR: Real-time or quantitative PCR; WHO: World Health Organization.

Supplementary Information

The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04895-z>.

Additional file 1: Table S1. Diagnostic results and clinical classification for 48 dogs at each time point of the study.

Acknowledgements

We thank the Foundation for Research Support of the State of Bahia (FAPESB) for the scholarship provided to MSJ, the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) for the scholarship offered to JVAC, and the Postgraduate Program in Biotechnology in Health and Investigative Medicine for support. We thank Amaro Silva for assistance with fieldwork and Isabele Nascimento Chagas Coelho for technical and logistical support. We are grateful to Andris K. Walter for critical analysis, English language revision and manuscript copyediting assistance.

Authors' contributions

Conceived and designed the experiments: MSJ, DBMF and CIB. Performed the experiments: MSJ, JVAC, LBC, LSB and MSS. Analyzed the data: MSJ, JVAC, MSS and DBMF. Contributed reagents/materials/analysis tools: DBMF, CIB and EDS. Wrote the paper: MSJ, JVAC, MSS, CIB and DBMF. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

This work was funded by the Foundation for Research Support of the State of Bahia (Grants JCB0010/2013, SUS0036/2013 and PET0024/2013) and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior—Brasil (CAPES)—Finance Code 001. The funders had no role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Availability of data and materials

All data generated or analyzed during this study are included in this published article and its supplementary information file (Additional file 1: Table S1).

Declarations

Ethics approval and consent to participate

The local institutional review board approved this study for animal experimentation (IGM-FIOCRUZ, protocol no. 007/2013).

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author details

¹Instituto Gonçalo Moniz-Fundação Oswaldo Cruz, Rua Waldemar Falcão 121, Bahia, Salvador, Brazil. ²Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos,

Bio-Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. ³Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia-Universidade Federal da Bahia, Av. Adhemar de Barros 500, Bahia, Salvador, Brazil. ⁴Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia-Investigação em Imunologia/INCT-III, São Paulo, São Paulo, Brazil. ⁵Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Doenças Tropicais/INCT-DT, Bahia, Salvador, Brazil.

Received: 25 January 2021 Accepted: 24 July 2021

Published online: 12 August 2021

References

- Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS ONE*. 2012;7:e35671.
- Daniilo CM, Daniilo CG. Canine and human leishmaniasis: disease progression to Brazilian urbanized areas. *Int J Trop Dis*. 2019;2:023.
- World Health Organization (WHO). Leishmaniasis situation and trends. https://www.who.int/gho/neglected_diseases/leishmaniasis/en/. Accessed 30 Jun 2021.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Manual de vigilância, prevenção e controle de zoonoses: normas técnicas e operacionais. Brasília: Ministério da Saúde; 2016. <https://pesquisa.bvsalud.org/bvsmis/resource/pt/mis-38935>. Accessed 30 Jun 2021.
- Dantas-Torres F, de Brito MEF, Brandão-Filho SP. Seroepidemiological survey on canine leishmaniasis among dogs from an urban area of Brazil. *Vet Parasitol*. 2006;140:54–60.
- Marlais T, Bhattacharyya T, Singh OP, Mertens P, Gilman Q, Thunissen C, et al. Visceral leishmaniasis IgG1 rapid monitoring of cure vs. relapse, and potential for diagnosis of post kala-azar dermal leishmaniasis. *Front Cell Infect Microbiol*. 2018;8:427.
- Rodrigues MR, Santos LMO, Miyazaki CK, Martins VT, Ludolf FR, Kursancew AC, et al. Immunodiagnosis of human and canine visceral leishmaniasis using recombinant *Leishmania infantum* prohibitin protein and a synthetic peptide containing its conformational B-cell epitope. *J Immunol Methods*. 2019;474:112641.
- Georgiadou SP, Makaritis KP, Dalekos GN. Leishmaniasis revisited: current aspects on epidemiology, diagnosis and treatment. *J Transl Int Med*. 2015;3:43–50.
- Machado AS, Ramos FF, Santos TTO, Costa LE, Ludolf F, Lage DP, et al. A new *Leishmania* hypothetical protein can be used for accurate serodiagnosis of canine and human visceral leishmaniasis and as a potential prognostic marker for human disease. *Exp Parasitol*. 2020;216:107941.
- Santos TTO, Cardoso MS, Machado AS, Siqueira WF, Ramos FF, Oliveirada-Silva JA, et al. Recombinant *Leishmania* eukaryotic elongation factor-1 beta protein: a potential diagnostic antigen to detect tegumentary and visceral leishmaniasis in dogs and humans. *Microb Pathog*. 2019;137:103783.
- Oliveira GG, Magalhães FB, Teixeira MC, Pereira AM, Pinheiro CG, Santos LR, et al. Characterization of novel *Leishmania infantum* recombinant proteins encoded by genes from five families with distinct capacities for serodiagnosis of canine and human visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*. 2011;85:1025–34.
- de Oliveira IQ, Silva RA, Sucupira MV, da Silva ED, Reis AB, Grimaldi G Jr, et al. Multi-antigen print immunoassay (MAPIA)-based evaluation of novel recombinant *Leishmania infantum* antigens for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Parasit Vectors*. 2015;8:45.
- Borja LS, Coelho LB, de Jesus MS, de Queiroz ATL, Celedon PAF, Zachin NIT, et al. High accuracy of an ELISA test based in a flagella antigen of *Leishmania* in serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis with potential to improve the control measures in Brazil—a Phase II study. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018;12:e0006871.
- Solcà da MS, Arruda MR, Leite BMM, Mota TF, Rebouças MF, Jesus de MS, et al. Immune response dynamics and *Lutzomyia longipalpis* exposure characterize a biosignature of visceral leishmaniasis susceptibility in a canine cohort. *PLoS Negl Trop Dis*. 2021;15:e0009137.
- Solcà MS, Andrade BB, Abbehusen MMC, Teixeira CR, Khouri R, Valenzuela JG, et al. Circulating biomarkers of immune activation, oxidative stress and inflammation characterize severe canine visceral leishmaniasis. *Sci Rep*. 2016;6:32619.

6. DISCUSSÃO

Muitos fatores influenciam o diagnóstico correto de uma enfermidade. A evolução da doença é variável e espera-se que, após a infecção, ocorram reações bioquímicas e fisiológicas, ainda que não sejam apresentados sintomas. Cada doença tem diferentes processos de evolução ao longo do tempo: sinais, sintomas e prognósticos (TRAVI et al., 2001).

Médicos veterinários podem ter dificuldade em avaliar a LVC uma vez que os sinais clínicos para esta doença são inespecíficos e podem ser confundidos com sinais de outras doenças, como erliquiose e babesiose (SANTOS et al., 2019). Além disso, os animais classificados como resistentes à LVC podem não mostrar qualquer sinal da doença por períodos mais prolongados (REIS et al., 2009).

Um diagnóstico precoce, rápido e eficiente é necessário para o correto tratamento clínico e controle da transmissão da *Leishmania*. (KUMAR; PANDEY; SAMANT, 2020). A cultura é considerada o padrão ouro para diagnosticar LVC, mas carece de sensibilidade e consome muito tempo para apresentação do resultado (SOLCÀ et al., 2014). A técnica de qPCR pode ser o método mais eficiente para diagnosticar CVL por apresentar alta sensibilidade e especificidade, mas este método é caro e, para ser preciso, requer amostras com métodos de coleta invasivos (MAIA et al., 2009; SOLCÀ et al., 2012). Portanto, os métodos sorológicos são menos caros e mais eficientes em termos de tempo. O Ministério da Saúde do Brasil recomenda DPP-LVC e EIE-LVC para avaliar a infecção por *L. infantum* em cães (MONTEIRO et al., 2019). Porém esses testes demonstraram resultados pouco satisfatórios em comparação com outros métodos; portanto, para melhorar o diagnóstico de LVC no

Brasil, testes mais confiáveis devem ser implementados (FARIA et al., 2015; FRAGA et al., 2016)

A proteína recombinante rLci5 já havia mostrado resultados promissores no diagnóstico de LVC, apresentando alta sensibilidade e especificidade (BORJA et al., 2018). No presente estudo, o rLci5 ELISA confirmou um desempenho preciso no diagnóstico de LVC, apresentando a maior taxa de detecção entre os testes diagnósticos avaliados. Além disso, rLci5 ELISA detectou a LVC mais cedo em comparação com os métodos recomendados pelo Ministério da Saúde (DPP-LVC, EIE-LVC), qPCR e cultura. De fato, empregando rLci5 ELISA, podemos detectar a positividade da LVC quatro meses antes dos outros testes sorológicos. A capacidade de detecção precoce do rLci5 ELISA é promissora, pois um método diagnóstico capaz de detectar a infecção em um curto período após o início da infecção é bem adequado para controlar a sua transmissão (MAIA; CAMPINO, 2018). Sendo assim, o rLci5 ELISA é ideal para otimizar o controle da transmissão de LVC, contribuindo para o tratamento precoce e outras medidas de controle que impedirão a propagação da doença.

Resultados persistentes ao longo do curso da infecção conferem robustez ao diagnóstico, reduzindo os riscos de ocorrência de resultados falso-positivos e falso-negativos dependendo do período de realização do exame. Alguns estudos avaliaram a persistência de testes diagnósticos para outras doenças, como dermatite alérgica de contato, asma e artrite reumatóide (AARON et al., 2017; DUARTE et al., 2012; MCDONAGH; WALKER, 1994).

rLci5 ELISA mostrou diferença significativa na persistência de resultados positivos durante o acompanhamento dos cães infectados em comparação com outros testes diagnósticos. Existem estudos longitudinais avaliando métodos diagnósticos de

LVC na literatura, mas nenhum avaliando a persistência de resultados positivos ao longo do tempo (NUNES et al., 2015; QUINNELL et al., 2003, Solcà et al. 2021).

Nosso estudo demonstrou que os resultados dos testes diagnósticos variam ao longo do tempo, provavelmente devido a diferentes processos fisiológicos da doença dentro do hospedeiro. O título de anticorpos pode ser baixo ou alto em diferentes estágios da doença (ZWAAN; SINGH, 2015), parasitas podem não ser detectados em cultura devido à baixa carga parasitária (MANNA et al., 2009), e mesmo a detecção de DNA do parasita pode variar entre os tecidos quando testada por PCR (BAGUES et al., 2018; SOLCÀ et al., 2014). Nossos resultados mostraram uma variação mais considerável nos resultados de cultura e qPCR ao longo do tempo do que nos testes sorológicos.

Já foi demonstrado que os anticorpos persistem por um período de tempo considerável, favorecendo o diagnóstico de LVC (QUINNELL et al., 2003). Por outro lado, a carga parasitária depende da amostra utilizada, da presença de inibidores da PCR e da variação natural ao longo da infecção em função da resposta imune do animal. Novos estudos podem esclarecer a relação entre a persistência dos resultados dos testes e os processos fisiológicos que ocorrem dentro do hospedeiro.

7. CONCLUSÃO

O ELISA rLci5 apresentou um diagnóstico de CVL mais precoce e mais persistência de resultados positivos do que DPP-LVC, qPCR e cultura. A persistência de resultados positivos no mesmo animal ao longo do período de estudo, 24 meses, mostra o quão consistente e confiável é este teste diagnóstico. Essa característica é importante, apresentando boa estabilidade e menos resultados falso-negativos

dependendo do momento da coleta da amostra. Portanto, o uso de rLci5 em ensaios de ELISA pode melhorar o desempenho do diagnóstico de CVL.

REFERÊNCIAS

- AARON, S. D. *et al.* Reevaluation of diagnosis in adults with physician-diagnosed asthma. **JAMA - Journal of the American Medical Association**. **Anais**, v. 317 n. 3, p. 269-279, 2017.
- ALVAR, J. *et al.* Canine leishmaniasis. **Advances in Parasitology**, v. 57, n. 4, p. 1–88, 2004.
- ANVERSA, L. S. *et al.* Human leishmaniasis in Brazil: A general review. **Revista da Associacao Medica Brasileira**, v. 64, n. 3, p. 281–289, 2018.
- ARENAS, R. *et al.* Leishmaniasis: A review. **F1000Research**, v. 6, n. May, p. 1–15, 2017.
- BAGUES, N. C. T. *et al.* Parasitic load and histological aspects in different regions of the spleen of dogs with visceral leishmaniasis. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 56, p. 14-19, 2018.
- BARRETT, M. P.; CROFT, S. L. Management of trypanosomiasis and leishmaniasis. **British Medical Bulletin**, v. 104, n. 1, p. 175–196, 2012.
- BORJA, L. S. *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**, v. 229, p. 110–117, 2016.
- BORJA, L. S. *et al.* High accuracy of an ELISA test based in a flagella antigen of *Leishmania* in serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis with potential to improve the control measures in Brazil – A Phase II study. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 3, p. 1-14 2018.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Brasília, Ministério da Saúde, 2014.
- CHIKERE, C. M. U. *et al.* Diagnostic test evaluation methodology: A systematic review of methods employed to evaluate diagnostic tests in the absence of gold standard - An update. **PLoS ONE**, v. 14, n. 10, p. 1–25, 2019.
- DANTAS-TORRES, F.; BRITO, M. E. F. DE; BRANDÃO-FILHO, S. P. Seroepidemiological survey on canine leishmaniasis among dogs from an urban area of Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 140, n. 1-2, p. 54-60, 2006.
- DE OLIVEIRA, I. Q. *et al.* Multi-antigen print immunoassay (MAPIA)-based evaluation of novel recombinant *Leishmania infantum* antigens for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Parasit Vectors**, v. 8, p. 45, 2015.
- DO ROSÁRIO, E. Y. *et al.* Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay using crude *Leishmania* and recombinant antigens as a diagnostic marker for canine visceral leishmaniasis. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 2, p. 197–203, 2005.

- DUARTE, I. *et al.* Evaluation of the permanence of skin sensitization to allergens in patients with allergic contact dermatitis. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 87, n. 6, p. 831–837, 2012.
- FARIA, A. R. *et al.* Novel Recombinant Multiepitope Proteins for the Diagnosis of Asymptomatic *Leishmania infantum*-Infected Dogs. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 1, p. 13–16, 2015.
- FARIA, A. R.; ANDRADE, H. M. DE. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina: grandes avanços tecnológicos e baixa aplicação prática. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 3, n. 2, p. 47–57, 2012.
- FRAGA, D. B. M. *et al.* The Rapid Test Based on *Leishmania infantum* Chimeric rK28 Protein Improves the Diagnosis of Canine Visceral Leishmaniasis by Reducing the Detection of False-Positive Dogs. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 1, p. 1–11, 2016.
- GALLUZZI, L. *et al.* Real-time PCR applications for diagnosis of leishmaniasis. **Parasites and Vectors**, v. 11, n. 1, p. 1–13, 2018.
- GEORGIADOU, S. P.; MAKARITSIS, K. P.; DALEKOS, G. N. Leishmaniasis revisited: Current aspects on epidemiology, diagnosis and treatment. **Journal of Translational Internal Medicine**, 2016.
- GUPTA, S.; NISHI. Visceral leishmaniasis: Experimental models for drug discovery. **Indian Journal of Medical Research**, v. 133, n. 1, p. 27–39, 2011.
- KUMAR, A.; PANDEY, S. C.; SAMANT, M. **A spotlight on the diagnostic methods of a fatal disease Visceral Leishmaniasis** **Parasite Immunology**, v. 42 n.10, p. 1-38, 2020.
- LAURENTI, M. D. *et al.* Comparative evaluation of the DPP® CVL rapid test for canine serodiagnosis in area of visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 205, n. 3–4, p. 444–450, 2014.
- LIRA, R. A. *et al.* Canine visceral leishmaniosis: A comparative analysis of the EIE-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos and the IFI-leishmaniose- visceral-canina-Bio-Manguinhos kits. **Veterinary Parasitology**, v. 137, n. 1–2, p. 11–16, 2006.
- MACHADO, A. S. *et al.* A new *Leishmania* hypothetical protein can be used for accurate serodiagnosis of canine and human visceral leishmaniasis and as a potential prognostic marker for human disease. **Experimental Parasitology**, v. 216, p. 1-9, 2020.
- MAIA, C. *et al.* Diagnosis of canine leishmaniasis: conventional and molecular techniques using different tissues. **Veterinary Journal**, v. 179, n. 1, p. 142–4, 2009.
- MAIA, C.; CAMPINO, L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. **Veterinary Parasitology**, v. 158, n. 4, p. 274–287, 2008.
- MAIA, C.; CAMPINO, L. **Biomarkers Associated with *Leishmania infantum* Exposure, Infection, and Disease in Dogs** **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v.8, n. 302, p. 1-18, 2018.

MANNA, L. *et al.* Evidence for a relationship between *Leishmania* load and clinical manifestations. **Research in veterinary science**, v. 87, n. 1, p. 76–8, ago. 2009.

MARCELINO, A. P. *et al.* Comparative PCR-based diagnosis for the detection of *Leishmania infantum* in naturally infected dogs. **Acta Tropica**, v. 207, april, p. 105495, 2020.

MARCONDES, M.; DAY, M. J. Current status and management of canine leishmaniasis in Latin America. **Research in Veterinary Science**, v. 123, n. January, p. 261–272, 2019.

MARLAIS, T. *et al.* Visceral Leishmaniasis IgG1 Rapid Monitoring of Cure vs. Relapse, and Potential for Diagnosis of Post Kala-Azar Dermal Leishmaniasis. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 8, p. 427, 2018.

MARTÍNEZ, D. Y. *et al.* Tegumentary leishmaniasis and coinfections other than HIV. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 3, p. 1–20, 2018.

MCDONAGH, J. E.; WALKER, D. J. Incidence of rheumatoid arthritis in a 10-year follow-up study of extended pedigree multicase families. **Rheumatology**, v. 33, n. 9, p. 826-31, 1994.

MENEZES-SOUZA, D. *et al.* Mapping B-cell epitopes for the peroxidoxin of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and its potential for the clinical diagnosis of tegumentary and visceral leishmaniasis. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, 2014.

MIRÓ, G. *et al.* Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. **Trends in Parasitology**, v. 24, n. 8, p. 371–377, 2008.

MONTEIRO, F. M. *et al.* Canine visceral leishmaniasis: Detection of *Leishmania* spp. genome in peripheral blood of seropositive dogs by real-time polymerase chain reaction (rt-PCR). **Microbial Pathogenesis**, v. 126, p. 263–268, 2019.

MORAIS, M. H. F. *et al.* Visceral leishmaniasis control actions: Epidemiological indicators for its effectiveness evaluation in a Brazilian urban area. **Cadernos de Saude Publica**, v. 36, n. 6, 2020.

MOREIRA, M. A. B. *et al.* Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. **Veterinary Parasitology**, v. 145, n. 3–4, p. 245–252, 2007.

MORENO, J.; ALVAR, J. Canine leishmaniasis: Epidemiological risk and the experimental model. **Trends in Parasitology**, v. 18, n. 9, p. 399–405, 2002.

NJOROGE, M. M. *et al.* Evaluating putative repellent ‘ push ’ and attractive ‘ pull ’ components for manipulating the odour orientation of host - seeking malaria vectors in the peri - domestic space. **Parasites & Vectors**, p. 1–21, 2021.

NUNES, C. M. *et al.* Testes sorológicos, parasitológicos e moleculares para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina em estudo longitudinal. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria**, v. 24, n. 4, p. 402–409, 2015.

- OLIVEIRA, G. G. *et al.* Characterization of novel *Leishmania infantum* recombinant proteins encoded by genes from five families with distinct capacities for serodiagnosis of canine and human visceral leishmaniasis. **Am J Trop Med Hyg**, v. 85, n. 6, p. 1025–1034, 2011.
- PAIVA-CAVALCANTI, M.; REGIS-DA-SILVA, C.; GOMES, Y. Comparison of real-time PCR and conventional PCR for detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* infection: a mini-review. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 16, n. 4, p. 537–542, 2010.
- PEREIRA, V. F. *et al.* Detection of canine visceral leishmaniasis by conjunctival swab PCR. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, n. 1, p. 104–106, 2016.
- PORROZZI, R. *et al.* Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays based on crude and recombinant leishmanial antigens for serodiagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania infantum* visceral infections in dogs. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 14, n. 5, p. 544–548, 2007.
- QUINNELL, R. J. *et al.* IgG subclass responses in a longitudinal study of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 91, n. 3–4, p. 161–168, 2003.
- QUINNELL, R. J. *et al.* Evaluation of rK39 Rapid Diagnostic Tests for Canine Visceral Leishmaniasis: Longitudinal Study and Meta-Analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 1, 2013.
- QUINNELL, R. J.; COURTENAY, O. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. **Parasitology**, v. 136, n. 14, p. 1915–1934, 2009.
- RAMPAZZO, R. D. C. P. *et al.* A ready-to-use duplex qPCR to detect *Leishmania infantum* DNA in naturally infected dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 246, 2017.
- REIS, A. B. *et al.* Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 128, n. 1–3, p. 87–95, 2009.
- RODRIGUES, M. R. *et al.* Immunodiagnosis of human and canine visceral leishmaniasis using recombinant *Leishmania infantum* Prohibitin protein and a synthetic peptide containing its conformational B-cell epitope. **Journal of Immunological Methods**, v. 474, n. 112641, p. 1–24, 2019.
- RODRIGUES, T. F. *et al.* Spatial and seroepidemiology of canine visceral leishmaniasis in an endemic southeast Brazilian area. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 53, n. March, p. 1–7, 2020.
- SAKKAS, H.; GARTZONIKA, C.; LEVIDIOTOU, S. Laboratory diagnosis of human Visceral Leishmaniasis. **Journal of Vector Borne Diseases**, v. 53, n. 1, p. 8–16, 2016.
- SALLES, B. C. S. *et al.* Potential application of small myristoylated protein-3 evaluated as recombinant antigen and a synthetic peptide containing its linear B-cell epitope for the serodiagnosis of canine visceral and human tegumentary leishmaniasis. **Immunobiology**, v. 224, n. 1, p. 163–171, 2019.

SANTOS, T. T. O. *et al.* Recombinant *Leishmania* eukaryotic elongation factor-1 beta protein: A potential diagnostic antigen to detect tegumentary and visceral leishmaniasis in dogs and humans. **Microbial Pathogenesis**, v. 137, 2019.

SCHRIEFER, A.; WILSON, M. E.; CARVALHO, E. M. Recent developments leading toward a paradigm switch in the diagnostic and therapeutic approach to human leishmaniasis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 21, n. 5, p. 483–488, 2008.

SCORZA, B. M.; CARVALHO, E. M.; WILSON, M. E. Cutaneous manifestations of human and murine leishmaniasis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 6, 2017.

SINGH, S. New developments in diagnosis of leishmaniasis. **Indian J Med Res**, v. 123, p. 311–330, 2006.

SOLANO-GALLEGO, L. *et al.* Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 165, n. 1–2, p. 1–18, 2009.

SOLCÀ, M. DA S. *et al.* Qualitative and quantitative polymerase chain reaction (PCR) for detection of *Leishmania* in spleen samples from naturally infected dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 184, n. 2–4, p. 133–140, 2012.

SOLCÀ, M. DA S. *et al.* Immune response dynamics and *Lutzomyia longipalpis* exposure characterize a biosignature of visceral leishmaniasis susceptibility in a canine cohort. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 2, p. 1–22, 2021.

SOLCÀ, M. S. *et al.* Evaluating the accuracy of molecular diagnostic testing for canine visceral leishmaniasis using latent class analysis. **PLoS ONE**, v. 9, n. 7, p. e103635, 2014.

SOTO, M. *et al.* Multicomponent chimeric antigen for serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 1, p. 58–63, 1998.

SUNDAR S, R. M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol.* **Clinical And Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 9, n. 9, p. 951–8, 2002.

TEIXEIRA, M. C. A. *et al.* A strategy for identifying serodiagnostically relevant antigens of *Leishmania* or other pathogens in genetic libraries. **Biologicals**, v. 35, n. 1, p. 51–54, 2007.

THAKUR, S.; JOSHI, J.; KAUR, S. Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of parasitological, immunological and molecular methods. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 44, n. 2, p. 253–272, 2020.

TOLEDO-MACHADO, C. M. *et al.* Immunodiagnosis of canine visceral leishmaniasis using mimotope peptides selected from phage displayed combinatorial libraries. **BioMed Research International**, v. 2015, n. Cvl, 2015.

TRAVI, B. L. *et al.* Canine visceral leishmaniasis in Colombia: relationship between clinical and parasitologic status and infectivity for sand flies. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 64, n. 3–4, p. 119–124, 2001.

WHO. Global leishmaniasis surveillance, 2017–2018, and first report on 5 additional indicators. **Weekly epidemiological record**, v. 95, n. 25, p. 265–280, 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Control of the leishmaniasis. **World Health Organization technical report series**, n. 949, p. 22–26, 2010.

ZWAAN, L.; SINGH, H. The challenges in defining and measuring diagnostic error. **Diagnosis**, v. 2, n. 2, p. 97–103, 2015.