

Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
Fundação Oswaldo Cruz

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS  
MESTRADO EM PESQUISA CLÍNICA EM DOENÇAS  
INFECCIOSAS

ANDREIA SILVA ALVES

**AVALIAÇÃO DA SORORREATIVIDADE CRUZADA  
ENTRE A INFECÇÃO POR *Trypanosoma caninum*  
E A LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA**

Rio de Janeiro

2012

**AVALIAÇÃO DA SORORREATIVIDADE CRUZADA  
ENTRE A INFECÇÃO POR *Trypanosoma caninum*  
E A LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA**

ANDREIA SILVA ALVES

Dissertação apresentada ao Curso de Pós Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadores: Dra. Maria de Fátima Madeira e Dra. Eliame Mouta-Confort

Rio de Janeiro

2012

ANDREIA SILVA ALVES

**AVALIAÇÃO DA SORORREATIVIDADE CRUZADA  
ENTRE A INFECÇÃO POR *Trypanosoma caninum*  
E A LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas para obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadores: Dra. Maria de Fátima Madeira  
Dra. Eliame Mouta-Confort

Aprovada em     /     /

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Mauro Célio de Almeida Marzochi (Presidente)  
Doutor em Parasitologia Aplicada  
Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas - Fiocruz

---

Prof. Dr. Valmir Laurentino Silva  
Doutor em Biologia Animal  
Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca

---

Prof. Dr. Fabiano Borges Figueiredo  
Doutor em Ciências da Saúde  
Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas

À Deus por tudo em minha vida.

À minha mãe pelo incentivo e apoio.

Ao meu marido, por todo Amor,  
compreensão e paciência.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que participaram de forma direta e indireta para a realização deste trabalho. Em especial

À minha orientadora, Maria de Fátima Madeira pela imensa dedicação e confiança para o desenvolvimento deste trabalho.

À minha coorientadora Eliame Mouta-Confort pela atenção e pelos seus aconselhamentos em sorologia.

Ao Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC/FIOCRUZ) e aos Laboratórios de Vigilância em Leishmanioses (VigiLeish) e de Parasitologia, pelo suporte material e científico para realização deste trabalho.

Aos amigos do curso de mestrado, do VigiLeish e do Laboratório de Parasitologia pelo companheirismo, pela amizade e pelos bons momentos compartilhados.

Às amigas Flávia Coelho Ribeiro e Viviane Carvalho Souza pela amizade e pelo apoio em todos os momentos.

Ao Dr. Armando de Oliveira Schubach, pela sua valiosa contribuição para a elaboração desta dissertação e do artigo originado e ainda, pela condução do curso de Pós-graduação em Pesquisa em Doenças Infecciosas e Parasitárias do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas da FIOCRUZ.

À Dra. Leonor Leon do Instituto Oswaldo Cruz (IOC - FIOCRUZ) e ao Dr. Valmir Laurentino Silva da Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca (ENSP-FIOCRUZ) pela participação nos seminários de avaliação que tanto colaboraram para a revisão da dissertação.

Às professoras Carla Lourenço Tavares de Andrade e Raquel de Vasconcellos Carvalho de Oliveira pelos ensinamentos e pela ajuda na análise estatística deste trabalho.

Aos professores do curso de Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do IPEC, pela transmissão de seus conhecimentos que contribuíram para minha formação.

Aos funcionários da Coordenação de Ensino do IPEC.

Aos médicos veterinários Dr. Renato e Dr. Luis Alberto da Clínica Veterinária Bom Pastor (Rio de Janeiro - RJ), pela atenção e colaboração.

Ao CNPq pelo suporte financeiro.

Aos cães deste trabalho e suas amostras sorológicas.

Nem tudo que se enfrenta pode ser modificado, mas nada  
pode ser modificado até que seja enfrentado.

Albert Einstein

Alves, A.S. **Avaliação da sororretividade cruzada entre a infecção por *Trypanosoma caninum* e a leishmaniose visceral canina.** Rio de Janeiro, 2012, 42f. Dissertação [Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.

## RESUMO

Os testes sorológicos constituem um importante instrumento para o diagnóstico da leishmaniose visceral (LV), sendo os inquéritos sorológicos caninos uma das medidas recomendadas pelo Ministério da Saúde brasileiro, para o controle da doença humana. *Trypanosoma caninum* é um parasita recentemente descrito em cães domésticos em diferentes áreas de LV. Considerando a importância do cão no ciclo de transmissão de *L. chagasi* e a possibilidade desse novo parasita confundir o diagnóstico para leishmaniose, este estudo objetivou investigar o status sorológico de animais infectados por *T. caninum* e avaliar a reatividade cruzada com os testes sorológicos empregados na rotina de controle da LV no Brasil. Foram analisadas 117 amostras de soro de cães classificadas em 3 grupos: grupo Tc (animais infectados por *T. caninum*), grupo Lc (infectados por *L. chagasi*) e grupo Co (controles saudáveis) - com os kits disponibilizados para a rede pública - imunofluorescência indireta (IFI-LVC), ELISA (EIE-LVC) e teste imunocromatográfico (DPP) - e com testes *in house* empregando antígenos de *T. caninum* (IFI-Tc e ELISA-Tc) e de *L. chagasi* (IFI-Lc e ELISA-Lc). Os cães infectados por *T. caninum* reagiram ao IFI-Tc e ELISA-Tc com sensibilidade de 64.1% e 94.9% e especificidade de 23.1% e 35.9%, respectivamente. Para os testes comerciais IFI-LVC, EIE-LVC e DPP, a sensibilidade foi de 100% e especificidade de 70.5%, 68% e 97.5% respectivamente. A especificidade destes testes tornou-se mais elevada quando o grupo Tc foi excluído das análises, com diferença significativa para IFI-LVC ( $\chi^2=4.36$ ,  $p=0.036$ ) e não significativa para os demais testes (EIE-LVC -  $\chi^2=2,87$ ,  $p=0,089$ ; DPP -  $\chi^2=0,05$ ,  $p=0,818$ ). Concluímos que ferramentas sorológicas possam ter um valor limitado para o diagnóstico da infecção por *T. caninum* e que a presença de animais infectados por esse parasito em áreas endêmicas de LV possa ser um fator de confusão para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina.

Palavras-Chave: 1. Leishmaniose visceral canina 2. *Trypanosoma caninum*  
3. Reação cruzada 4. Sorologia



Alves, A.S. **Evaluation of serological cross-reactivity between natural infection by *Trypanosoma caninum* and canine visceral leishmaniasis.** Rio de Janeiro, 2012, 42f. Master [Master Degree in Clinical Research in Infection Disease] – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.

## ABSTRACT

Serologic tests constitute an important tool for the diagnosis of visceral leishmaniasis (VL), being canine serologic inquiries one of the measures recommended by the Brazilian Health Ministry, to control the human disease. *Trypanosoma caninum* is a parasite recently described in domestic dogs in different endemic areas of LV. Considering the importance of the dog to the cycle of transmission of *L. chagasi* and the possibility of this new parasite to confuse the diagnosis for leishmaniasis, this study aimed to investigate the serological status of animals infected by *T. caninum* and to evaluate the cross-reactivity in serologic tests employed to the routine control of the LV in Brazil. A set of 117 serum samples of dogs divided into 3 groups had been analyzed - Tc group (animals infected by *T. caninum*), Lc group (animals infected by *L. chagasi*) and Co group (healthy controls) - with kits available for the health public services - indirect immunofluorescence test (IFI-LVC), ELISA (EIE-LVC) and immunocromatographic test (DPP) - and with in house tests using *T. caninum* (IIF-Tc and ELISA-Tc) and *L. chagasi* (IIF-Lc and ELISA-Lc) antigens. Dogs infected by *T. caninum* had reacted to IIF-Tc and ELISA-Tc with sensitivity of 64.1% and 94.9%, and specificity of 23.1% and 35.9%, respectively. For commercial tests IFI-LVC, EIE-LVC and DPP, sensitivity were of 100% and specificity of 70.5%, 68% and 97,5% respectively. The specificity of these tests had become higher when the Tc group was excluded from the analysis, with significant difference for IFI-LVC ( $\chi^2=4.36$ ,  $p=0.036$ ) and not significant for the others tests (EIE-LVC -  $\chi^2=2,87$ ,  $p=0,089$ ; DPP -  $\chi^2=0,05$ ,  $p=0,818$ ). We conclude that serologic tools can have a limited value for the diagnosis of the infection for *T. caninum* and that the presence of animals infected by this parasite in endemic areas of LV visceral canine can be a factor of confusion for the diagnosis of leishmaniasis.

Keywords: 1. Visceral canine leishmaniasis 2. *Trypanosoma caninum* 3. Cross reaction 4. Serology

## LISTA DE ABREVIações

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

Co – Cães controle saudáveis

DNA - Deoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucléico)

DPP - Dual-Path Plataform

EIE - Ensaio imunoenzimático

ELISA – *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

IFI – Imunofluorescência indireta

IHQ - Imuno-histoquímica

IPEC – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas

LF - lateral flow

Lc – *Leishmania chagasi*

LV – Leishmaniose visceral

LVC – Leishmaniose visceral canina

NNN – Meio de cultura (Novy, McNeal e Nicolle)

OMS - Organização Mundial de Saúde

PBS – Solução salina tamponada com fosfatos

PCR – *Polymerase chain reaction* (Reação em Cadeia de Polimerase)

Tc – *Trypanosoma caninum*

Vigileish – Laboratório de Vigilância em Leishmanioses

µg - Microlitro

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>1. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	4
1.2. <i>Trypanosoma caninum</i> : UMA NOVA ESPÉCIE DESCRITA EM CÃES DOMÉSTICOS .....	4
1.2. DIAGNÓSTICO E CONTROLE DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA .....	7
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	13
2.1. OBJETIVO GERAL .....	13
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	13
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	14
<b>4 CONSIDERAÇÕES GERAIS</b> .....	34
<b>5 CONCLUSÕES</b> .....	37
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	38

Ficha catalográfica elaborada pela  
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

A474

Alves, Andreia Silva.

Avaliação da sororreatividade cruzada entre a infecção por  
*Trypanosoma caninum* e a Leishmaniose visceral canina. / Andreia Silva  
Alves. – Rio de Janeiro, 2012.  
xi, 42f. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro  
Chagas, Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas,  
2012.

Bibliografia: f. 39-45

1. Leishmaniose visceral canina. 2. *Trypanosoma caninum*. 3.  
Reação cruzada. 4. Sorologia. I. Título.

CDD 616.9364

## INTRODUÇÃO

O envolvimento do cão doméstico com diferentes membros da família Trypanosomatidae tem sido objeto de estudo, devido principalmente, ao fato desse animal participar do ciclo de certas zoonoses. Nas leishmanioses, o cão tem sido encontrado naturalmente infectado em focos registrados em todo o mundo, embora sua importância encontra-se no ciclo de transmissão de espécies causadoras da leishmaniose visceral (LV). Das espécies causadoras da doença tegumentar no Brasil, o cão tem sido incriminado apenas como um eventual hospedeiro no ciclo epidemiológico de *L. braziliensis*, uma vez que seu papel como reservatório doméstico não foi ainda comprovado (REITHINGER; DAVIES, 1999; DANTAS-TORRES et al., 2010), entretanto, o leque de espécies de leishmânias dermatrópicas passíveis de infectar esse animal pode ser maior, já que a etiologia nem sempre é confirmada. No estado de São Paulo, a infecção canina por *L. amazonensis* foi registrada (TOLEZANO et al., 2007).

Diferente do que ocorre no ciclo de transmissão da leishmaniose tegumentar, onde se desconhece o potencial do cão doméstico como reservatório, na LV, tal papel já está bem definido, sendo esse animal considerado um importante reservatório. São importantes para a manutenção do ciclo de transmissão e, por essa razão, constituem um dos principais alvos nos programas de controle da doença, através da identificação e eutanásia de cães soropositivos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006), embora tal estratégia seja ainda questionada por alguns autores (COURTENAY et al., 2002; COSTA, 2011).

O diagnóstico e a prevalência da leishmaniose visceral canina (LVC) são obtidos normalmente por meio de testes sorológicos, entre eles, os testes de imunofluorescência indireta (IFI) e ensaio imunoenzimático (ELISA), ambos, empregados nos programas nacionais e estaduais de vigilância e controle da LV (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). Apesar de constituírem importante ferramenta diagnóstica, as técnicas sorológicas possuem como desvantagem a possibilidade da ocorrência de reatividade cruzada e a ausência do poder de discriminação entre as leishmanioses cutânea e visceral (VALE et al., 2009).

Em áreas de sobreposição de endemias, além de o diagnóstico ser dificultado, quando realizado pela sorologia, esta sobreposição favorece o aparecimento de infecções mistas e, no Brasil, a coinfeção natural de cães domésticos, com diferentes espécies de tripanossomatídeos tem sido registrada. Savani et al (2005) relataram a coinfeção de *Leishmania chagasi* e *Trypanosoma evansi* em um cão no estado de Mato Grosso do Sul. No município do Rio de Janeiro, Madeira et al (2006a) descreveram um caso de coinfeção por *L. braziliensis* e *L. chagasi*. Tais relatos demonstram que cães domésticos são suscetíveis a diferentes membros da família Trypanosomatidae, inclusive em coinfeções, e ressaltam a importância da adoção de ferramentas diagnósticas que possam discriminar com segurança os agentes etiológicos envolvidos, principalmente, em áreas endêmicas de sobreposição.

Os índices de soroprevalência canina são uma preocupação por parte dos órgãos de controle, já que a elevação desses índices pode estar relacionada ao aparecimento dos casos humanos de LV e instalação de focos em áreas urbanas. Nesse contexto, um fato que tem causado preocupação é o encontro de *Trypanosoma caninum* em regiões endêmicas de LV. Esse parasito foi descrito

primeiramente no município do Rio de Janeiro e identificado como uma nova espécie (MADEIRA et al., 2009). Posteriormente, foi detectado em diferentes regiões do Brasil (ALMEIDA et al., 2011).

Apesar do pouco conhecimento sobre esse parasito, a sua circulação em áreas de LV pode constituir um fato preocupante, principalmente relacionado ao contexto diagnóstico desses animais, uma vez que se utilizam ferramentas sorológicas, as quais não possuem poder discriminatório entre os diferentes membros da família Trypanosomatidae. Aspectos sobre o ciclo natural, índices de prevalência, métodos diagnósticos e ao impacto que esse parasito poderá causar em áreas onde as leishmanioses caninas ocorrem, ainda devem ser estabelecidos. Adicionalmente, pode-se citar também, que todo conhecimento adquirido acerca dos diferentes agentes etiológicos, envolvidos em uma dada situação, é essencial no âmbito da vigilância epidemiológica, principalmente para o desencadeamento de ações de controle específicas. Desse modo, este estudo visou avaliar ferramentas sorológicas, através dos testes de IFI e ELISA, para o diagnóstico da infecção por *T. caninum* e investigar a possível reatividade cruzada que ocorre entre os soros de animais infectados com este parasito e os antígenos dos testes sorológicos utilizados na rotina do diagnóstico da LVC.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. *Trypanosoma caninum*: UMA NOVA ESPÉCIE DESCRITA EM CÃES DOMESTICOS

O gênero *Trypanosoma* reúne inúmeras espécies de parasitos, alguns causadores de importantes doenças para o homem e para os animais. Recentemente uma nova espécie, denominada *Trypanosoma caninum*, foi descrita pela primeira vez no município do Rio de Janeiro (MADEIRA et al., 2009). Inicialmente, acreditou-se que esse achado pudesse ter sido ocasional, sem importância epidemiológica, no entanto, esse parasito foi encontrado em outros cães nesse mesmo município (PINTO et al., 2010, SILVA et al., 2011) e em cães de diferentes regiões do Brasil (ALMEIDA et al., 2011). Tais achados sugerem a existência de um ciclo natural desse protozoário entre cães domésticos e alertam para um possível impacto que esse fenômeno possa causar em áreas onde as leishmanioses caninas ocorrem.

Inúmeros aspectos biológicos ainda precisam ser conhecidos sobre essa nova espécie, entretanto, algumas informações já foram consolidadas: a) *T. caninum* é facilmente isolado em meio de cultura axênica apresentando todas as formas evolutivas características do gênero *Trypanosoma* (HOARE, 1972). No cultivo em meio de cultura bifásico (NNN + meio Schneider) formas epimastigotas são predominantes, mas formas tripomastigotas, esferomastigotas e formas em fases de transição são também observadas. A manutenção desse parasito em meio de



cultura foi um passo inicial e constitui condição crucial para o seu estudo; b) *T. caninum* não é capaz de infectar experimentalmente triatomíneos dos gêneros *Rhodnius* e *Triatoma*. Esse dado sugere que talvez outros artrópodes possam estar atuando como vetores, como é observado no ciclo de outras espécies de tripanossomas. Em áreas endêmicas de LV, já houve a suspeita da participação de carrapatos no ciclo de transmissão de *Leishmania chagasi* entre cães domésticos (COUTINHO et al., 2005) e c) outro aspecto importante está relacionado à morfologia desse parasito. *T. caninum* pode ser facilmente distinguido de outros tripanosomas que ocorrem em mamíferos, pelo tamanho do comprimento total do corpo e do cinetoplasto de formas tripomastigotas, embora a heterogeneidade morfológica descrita para os representantes do gênero *Trypanosoma* restrinja este parâmetro para classificação ou identificação (MADEIRA et al., 2009).

*T. caninum* parece não ser patogênico para o cão, tendo sido isolado, na maioria das vezes, de cães saudáveis (MADEIRA et al., 2009; ALMEIDA et al., 2011). Apesar dessa característica, esse parasito pode estimular o sistema imune humoral do cão, induzindo a produção de anticorpos que podem reagir especificamente e de forma cruzada com outros tripanossomatídeos nos testes sorológicos, principalmente nas leishmanioses, onde cães domésticos são rotineiramente monitorados. Essa informação tem ganhado força, a partir dos relatos de Pinto et al (2010) e Silva et al (2011) que isolaram *T. caninum* de cães sororretores eutanasiados pelos programas de controle no município do Rio de Janeiro, por suspeita de LVC, sem que leishmânia tenha sido isolada desses animais.

Um aspecto interessante desse parasito é o sítio anatômico de onde tem sido isolado, apresentando uma característica incomum e inédita para os representantes

do gênero *Trypanosoma*. Todos os isolados de *T. caninum* obtidos até o momento, foram isolados a partir do cultivo da pele íntegra de cães aparentemente saudáveis, sendo frustrantes as tentativas de isolamento por hemoculturas. Esse fato sugere que talvez esse protozoário possa habitar tecidos e vasos de circulação periférica (MADEIRA et al., 2009). O fato de *T. caninum* ter sido isolado de cães sem qualquer sinal clínico de infecção sugere uma possível adaptação desse parasito aos cães ao longo tempo, embora, isto para ser confirmado, tenha que ser estudado em detalhes. Uma hipótese para o fato de *T. caninum* não ter sido encontrado anteriormente, talvez esteja relacionado ao sítio anatômico de onde tem sido isolado, uma vez que a pele não constitui um alvo para pesquisa de parasitos do gênero *Trypanosoma*.

Atualmente, cerca de 53 isolados já foram descritos (dados em fase de publicação) demonstrando que *T. caninum* possa estar circulando em maiores proporções daquela estimada inicialmente, sendo todos obtidos de regiões endêmicas para LVC canina e isso poderá representar um problema para o controle dessa zoonose. Não se conhece os possíveis vetores, nem tampouco informações epidemiológicas desse parasito e, considerando a importância deste conhecimento, estudos devem ser incentivados, visando principalmente esclarecer aspectos relacionados ao diagnóstico e à prevalência desse parasito. Embora *T. caninum* pareça não causar qualquer alteração clínica ou dermatológica nos cães infectados, a compreensão de como este parasito está sendo mantido e transmitido sob condições naturais é de fundamental importância, destacando-se o conhecimento do real impacto que *T. caninum* possa estar causando em áreas onde as leishmanioses caninas ocorrem, uma vez que compartilham o mesmo hospedeiro.

## 2.2. DIAGNÓSTICO E CONTROLE DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

Classicamente, a LVC pode apresentar um espectro de manifestações clínicas bem variadas, condicionadas a imunocompetência individual do animal e também à virulência do parasito (COLMENARES et al., 2002). Dessa forma, o diagnóstico clínico pode ser de difícil conclusão (FERREIRA et al., 2007), podendo haver confusão com outras doenças que afetam os cães (RIBEIRO et al., 2011). Entre as manifestações mais usuais da LVC podemos citar as lesões cutâneas, descamações, eczema, em particular no espelho nasal e orelha, e pequenas úlceras rasas, localizadas mais frequentemente ao nível das orelhas, focinho, cauda e articulações. Nas fases mais adiantadas da doença, observa-se, com grande frequência, onicogribose, esplenomegalia, linfadenopatia, alopecia, dermatites, úlceras de pele, ceratoconjuntivite, coriza, anemia, apatia, diarreia, hemorragia intestinal, edema de patas e vômito, além da hiperqueratose. Na fase final da infecção ocorre, em geral, a paresia dos membros posteriores, caquexia, inanição e morte. Em alguns casos, a doença pode permanecer latente, levando até a cura espontânea (MARZOCHI et al., 1985; TAFURI et al., 2001; COLMENARES et al., 2002). A forma assintomática é predominante e tem sido relatada em proporções que podem representar cerca de 40 a 60% da população canina soropositiva (DANTAS-TORRES, 2009; QUEIROZ et al., 2009).

O diagnóstico definitivo da LV ou a comprovação da circulação do agente em áreas indenes consiste na demonstração e no isolamento do parasito. Nos cães, essa confirmação pode ser feita através de métodos parasitológicos clássicos que

inclui a identificação do parasito em lâminas coradas pelos métodos de Romanovsky ou Giemsa ou pelo isolamento do parasito em meio de cultura a partir de aspirados (nódulos linfáticos e medula óssea) e fragmentos de tecido (baço, fígado, lesões e pele) (MARZOCHI et al., 1985; GENARO et al., 1988; MADEIRA et al., 2006b). Outras metodologias, como a imuno-histoquímica (IHQ), também têm sido utilizadas, demonstrando boa sensibilidade, constituindo uma opção para o diagnóstico (MOREIRA et al., 2007).

Apesar de possuírem elevada especificidade, estes métodos são invasivos, de sensibilidade variável, de acordo com o tecido utilizado, e de difícil aplicação em inquéritos epidemiológicos em larga escala (KAR, 1995; MANCIANTI et al., 1995; SUNDAR; RAI, 2002).

Os métodos moleculares, embora de grande aplicabilidade, ainda são ferramentas que possuem limitações em determinados contextos. São técnicas que apresentam alto custo, necessitando de equipamentos e infraestrutura adequada, restringindo o seu emprego na rotina laboratorial para o diagnóstico. Atualmente existem inúmeras variações da PCR tradicional, utilizadas de acordo com o propósito da investigação. Podemos citar a utilização de inúmeros alvos com oligonucleotídeos específicos e ensaios como a PCR em tempo real, que avalia a carga parasitária no espécime clínico analisado. A PCR e suas variações contribuem de forma significativa em diversos aspectos, no entanto, destacamos a vantagem de permitir a identificação das espécies de *Leishmania*, diretamente no material clínico coletado, não havendo a necessidade de isolamento etiológico (GOMES et al., 2008).

De acordo com o manual brasileiro para o controle da LV (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006), devem ser realizados inquéritos sorológicos (amostrais ou

centários) na população canina para detecção dos casos e avaliação da soroprevalência, empregando ferramentas sorológicas de triagem como o ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) e a imunofluorescência indireta (IFI) como teste confirmatório. Esses métodos consistem na detecção de anticorpos anti-*Leishmania* sp. presentes no soro, através da reação antígeno-anticorpo. De um modo geral, as técnicas sorológicas constituem um importante instrumento para o diagnóstico humano e canino, uma vez que o agente causal estimula a resposta imune humoral, com produção de elevados títulos de IgG anti-*Leishmania*, (MARZOCHI et al., 1985). Embora esses anticorpos não representem uma resposta protetora, permitem o diagnóstico através de técnicas sorológicas por se constituírem em marcadores da infecção.

Tanto para o diagnóstico humano quanto o canino, o Ministério da Saúde disponibiliza kits que são utilizados na rede pública de atenção à saúde. Para o cão, foram desenvolvidos os kits de imunofluorescência indireta IFI-LVC (IFI-Leishmaniose visceral canina, Bio-Manguinhos/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil) e o de ensaio imunoenzimático EIE-LVC (EIE-Leishmaniose visceral canina, Bio-Manguinhos/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil).

A IFI, utilizada no diagnóstico da doença humana na década de 80 (Marzochi et al., 1985), é uma técnica de elevada especificidade, no entanto, apresenta baixa sensibilidade em cães assintomáticos para LVC (LIRA et al., 2006). Para elevar a sensibilidade da técnica, o soro sanguíneo tem substituído o eluato (sangue dessecado em papel de filtro) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). Para o critério de indicação de eutanásia, são considerados os títulos de anticorpos acima da diluição de 1:40. A técnica ainda possui como desvantagens, o fato de não ser um teste

automatizado, apresentando capacidade limitada no processamento de amostras e leituras subjetivas.

O ELISA foi introduzido para o diagnóstico das leishmanioses por Hommel et al (1978), e desde então vem sendo utilizado em inquéritos caninos, demonstrando elevada sensibilidade e especificidade (ASHFORD et al., 1993; MANCIANTI et al., 1996). Por ser uma técnica passível de automação, proporciona objetividade nas leituras, sendo possível a realização de um elevado número de amostras em um mesmo ensaio, importantes nos estudos de larga escala (DESQUESNES et al., 2001). Apesar dessas vantagens, a técnica apresenta sensibilidade reduzida no período latente da doença (MANCIANTI et al., 1995; COURTENAY et al., 2002), e o seu desempenho pode variar de acordo com o antígeno empregado.

O *Immunoblotting* é uma ferramenta muito empregada para a identificação de antígenos que são reconhecidos por anticorpos específicos. Apresenta elevada sensibilidade e especificidade e, segundo Berrahal et al (1996) e Isaza (1997), é uma alternativa para o diagnóstico da LVC, principalmente, nos casos assintomáticos ou com baixos títulos nas técnicas de IFI e ELISA (AISA et al., 1998). A técnica pode ser realizada tanto com extratos solúveis de antígenos, quanto com proteínas purificadas (GONÇALVES et al., 2002), fornecendo um leque de abordagens.

Os testes sorológicos estão sujeitos à ocorrência de reatividade cruzada. Em áreas de sobreposição de tripanossomatídios, a especificidade destes testes pode ser prejudicada, uma vez que estes parasitos compartilham determinantes antigênicos.

As técnicas sorológicas de IFI e ELISA já são consolidadas para o diagnóstico da LVC, no entanto, o conhecimento de antígenos específicos imunodominantes tem

permitido o desenvolvimento de uma segunda geração de testes para diversos agravos. Nas leishmanioses, diferentes antígenos recombinantes de *L. chagasi* (rK9, rK26 e rK39) já foram testados e avaliados quanto ao desempenho para o diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral humana (ZIJLSTRA et al., 1998) e canina (ROSATI et al., 2003). O emprego dessas moléculas em ensaios sorológicos clássicos tem influenciado a sua utilização em testes considerados de última geração e aumentado consideravelmente a sensibilidade e a especificidade (BOARINO et al., 2005), em comparação aos testes que empregam antígenos derivados de formas promastigotas, parasitos íntegros ou extratos solúveis (GONTIJO; MELO, 2004). Estudos demonstraram que o ELISA empregando antígeno rK39 pode ser utilizado para o diagnóstico da LVC (OZENSOY et al., 1998; SCALONE et al., 2002). A tecnologia permite aplicar diferentes moléculas num único ensaio, aumentando a sensibilidade do diagnóstico.

Atualmente tem-se investido no desenvolvimento de testes rápidos para o diagnóstico de inúmeros agravos, empregando antígenos recombinantes. As vantagens, em relação aos demais testes, são sensibilidade e especificidade comparáveis às do ELISA utilizando antígeno rK39, o uso de pequena quantidade de amostra biológica, o fornecimento de resultados em poucos minutos, além da praticidade e da possibilidade de armazenamento em temperatura ambiente, favorecendo sua utilização adequada para uso em campo (METTLER et al., 2005; CHAPPUIS et al, 2006).

Baseado nesse conceito, o Instituto de Biotecnológicos da Fiocruz (Biomanguinhos) tem investido nesse campo, desenvolvendo testes imunocromatográficos voltados para o diagnóstico da LVC. Inicialmente foi desenvolvido o teste denominado lateral flow (LF) cuja tecnologia está sendo

substituída pelo teste DPP (Dual-Path Platform). Trata-se de um teste rápido qualitativo que emprega os antígenos rK26 e rK39 de *L. chagasi* e que atualmente encontra-se em processo de validação (GRIMALDI Jr et al., 2012).



### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. OBJETIVO GERAL

- Investigar o status sorológico de animais infectados por *Trypanosoma caninum* e avaliar a reatividade cruzada com os testes sorológicos empregados na rotina para o diagnóstico da LVC.

#### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar e avaliar as técnicas de imunofluorescência indireta (IFI) e o ensaio imunoenzimáticos (ELISA), empregando antígenos homólogos, para o diagnóstico da infecção por *T. caninum*;
- Investigar a reatividade sorológica cruzada entre anticorpos produzidos na infecção por *T. caninum* a antígenos de *L. chagasi* e a reatividade de anticorpos produzidos na LVC a antígenos de *T. caninum*, empregando as técnicas de IFI e ELISA em ensaios *in house*;
- Investigar a reatividade sorológica cruzada entre soros de animais com a infecção por *T. caninum* e os kits comerciais empregados para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina IFI (IFI-LVC), ELISA (EIE-LVC) e o teste imunocromatográfico DPP.

#### **4. MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A seção de material e métodos empregados neste estudo, os resultados obtidos e a discussão serão apresentados no formato de artigo científico.

Título do artigo:

**Evaluation of serological cross-reactivity between canine visceral leishmaniasis and natural infection by *Trypanosoma caninum***

Alves, A. S., Mouta-Confort, E., Figueiredo, F. B., Oliveira, R.V.C., Schubach, A. O.,  
Madeira, M. F.

Periódico:

Research in Veterinary Science, submissão realizada em 12 de Janeiro de 2012.

Elsevier Editorial System(tm) for Research in Veterinary Science  
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Evaluation of serological cross-reactivity between canine visceral leishmaniasis and natural infection by *Trypanosoma caninum*

Article Type: Research Paper

Section/Category: Parasitology

Keywords: *Leishmania chagasi*; *Trypanosoma caninum*; diagnosis; cross reaction; dogs

Corresponding Author: Ms Maria de Fatima Madeira, PhD

Corresponding Author's Institution: Fundação Oswaldo Cruz

First Author: Andreia S Alves

Order of Authors: Andreia S Alves; Eliame Mouta-Confort, PhD; Fabiano B Figueiredo, PhD; Raquel Vasconcellos C Oliveira; Armando O Schubach, PhD; Maria de Fatima Madeira, PhD

Abstract: In order to evaluate if the presence of *Trypanosoma caninum* can lead to a confuse diagnosis of canine visceral leishmaniasis (CVL), we investigated the serological status of dogs infected by *T. caninum* and assessed the serological cross-reactivity with CVL. A set of 117 serum samples from dogs infected by *T. caninum*, *L. chagasi* and not infected dogs (n=39 in each group) was tested using commercial kits - indirect immunofluorescence (IFI-LVC), ELISA (EIE-LVC) and immunochromatographic test (DPP) - and in house tests with *T. caninum* (IIF-Tc and ELISA-Tc) and *L. chagasi* antigens (IIF-Lc and ELISA-Lc). IIF-Tc and ELISA-Tc presented sensitivity of 64.1% and 94.9% and specificity of 23.1% and 35.9%, respectively. The sensitivity of the IFI-LVC, EIE-LVC and DPP tests was 100% and the specificity was 70.5%, 68% and 97.5% respectively. The specificities of IFI-LVC, EIE-LVC and DPP were higher when the group Tc was excluded, with significant values for IFI-LVC ( $\chi^2=4.36$ , P-value=0.036), thus suggesting that the infection by *T. caninum* can confuse the diagnosis of CVL.

Suggested Reviewers: Moacir Paranhos Silva PhD  
paranhos@ufba.br

Reginaldo P Brazil PhD  
rpbrazil@ioc.fiocruz.br

Fatima Conceição-Silva PhD  
fconcei@ioc.fiocruz.br

1 Evaluation of serological cross-reactivity between canine visceral leishmaniasis and  
2 natural infection by *Trypanosoma caninum*

3

4 A.S. Alves<sup>a,b</sup>; E. Mouta-Confort<sup>b</sup>, F.B. Figueiredo<sup>c</sup>, R.V.C. Oliveira<sup>d</sup>, A.O. Schubach<sup>b</sup>,  
5 M.F. Madeira<sup>b\*</sup>

6

7 <sup>a</sup> *Programa de pós-graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas, Instituto*  
8 *de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil 4365,*  
9 *21040-900 Rio de Janeiro, RJ, Brasil*

10 <sup>b</sup> *Laboratório de Vigilância em Leishmanioses, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro*  
11 *Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil, 4365, 21040-900 Rio de Janeiro, RJ,*  
12 *Brasil*

13 <sup>c</sup> *Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses de Animais Domésticos,*  
14 *Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil*  
15 *4365, 21040-900 Rio de Janeiro, RJ, Brasil*

16 <sup>d</sup> *Laboratório de Epidemiologia Clínica, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas,*  
17 *Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil 4365, 21040-900 Rio de Janeiro, RJ, Brasil*

18

19 *Keywords: Leishmania chagasi, Trypanosoma caninum, diagnosis, cross reaction, dogs.*

20

21 \* Corresponding author, Tel.: +55 21 3865-9541.

22 E-mail address: [fatima.madeira@ipecc,fiocruz.br](mailto:fatima.madeira@ipecc,fiocruz.br) (M.F. Madeira)

23

24

25

26 **ABSTRACT**

27 In order to evaluate if the presence of *Trypanosoma caninum* can lead to a confuse  
28 diagnosis of canine visceral leishmaniasis (CVL), we investigated the serological status  
29 of dogs infected by *T. caninum* and assessed the serological cross-reactivity with CVL.  
30 A set of 117 serum samples from dogs infected by *T. caninum*, *L. chagasi* and not  
31 infected dogs (n=39 in each group) was tested using commercial kits - indirect  
32 immunofluorescence (IFI- LVC), ELISA (EIE-LVC) and immunochromatographic test  
33 (DPP) - and in house tests with *T. caninum* (IIF-Tc and ELISA-Tc) and *L. chagasi*  
34 antigens (IIF-Lc and ELISA-Lc). IIF-Tc and ELISA-Tc presented sensitivity of 64.1%  
35 and 94.9% and specificity of 23.1% and 35.9%, respectively. The sensitivity of the IFI-  
36 LVC, EIE-LVC and DPP tests was 100% and the specificity was 70.5%, 68% and  
37 97.5% respectively. The specificities of IFI-LVC, EIE-LVC and DPP were higher when  
38 the group Tc was excluded, with significant values for IFI-LVC ( $\chi^2=4.36$ , *P*-  
39 *value*=0.036), thus suggesting that the infection by *T. caninum* can confuse the  
40 diagnosis of CVL.

41

## 42 **1. Introduction**

43 Leishmaniasis is a globally neglected disease affecting mostly poor or vulnerable  
44 populations (WHO, 2010). In Brazil, visceral leishmaniasis (VL) is endemic with  
45 autochthonous transmission in all federal states. In the urban environment, the domestic  
46 dog acts as a reservoir of *Leishmania chagasi* (syn. *L. infantum*) the etiological agent of  
47 VL in the Americas (Ministério da Saúde, 2006). One of the control measures includes  
48 canine monitoring by serological surveys through immunoenzymatic assay (ELISA) and  
49 indirect immunofluorescence (IIF) for *Leishmania* sp. The seroreactive dogs are  
50 collected and euthanized (Ministério da Saúde, 2006). A disadvantage of the serological  
51 tests is the possibility of cross-reactions with other agents, thus in areas where other  
52 dermatropic *Leishmania* species or other trypanosomatids are also present, the serologic  
53 diagnosis must be carefully used since these agents can share antigenic determinants  
54 and lead to confusing results (Vexenat et al., 1996; Madeira et al., 2006; Silva et al.,  
55 2011).

56 DPP (Dual-Path Platform) is an immunochromatographic rapid test that provides an  
57 alternative for CVL diagnosis. It is being produced by Fiocruz (BioManguinhos - Rio  
58 de Janeiro, Brazil) and uses rK26 and rk39 recombinant agents specific for *L. chagasi*  
59 (Grimaldi et al., 2012) which is being validated to be used in the Brazilian VL control  
60 program.

61 In this context, the occurrence of *Trypanosoma caninum*, a parasite detected for the  
62 first time in dogs from Rio de Janeiro municipality (Madeira et al., 2009a; Pinto et al.,  
63 2010) and, later in different Brazilian regions is a matter of concern (Almeida et al.,  
64 2011). So far, 53 cases of natural infection by *T. caninum* have been registered in  
65 different municipalities of five states in the Southeastern and Midwestern regions,  
66 suggesting overlapping of a natural cycle of this parasite in areas of visceral

67 leishmaniasis. Although apparently *T. caninum* is not pathogenic for the dog, aspects  
68 related to its natural infection are still unknown.

69 Based on the hypothesis that dogs infected by *T. caninum* could present serological  
70 cross-reactivity in the tests used for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis, this  
71 study aims at investigating the serological status of animals infected by *T. caninum* and  
72 assess the cross-reactivity with serological tests routinely used for VL control in Brazil.

73

## 74 **2. Materials and methods**

### 75 *2.1. Design of the study*

76 The present study aims at evaluating the use of serological tests as a tool for the  
77 diagnosis of infection by *Trypanosoma caninum* and the cross reactivity with the  
78 commercial tests commonly used for canine visceral leishmaniasis diagnosis.

79

### 80 *2.2. Sample selection*

81 We studied a set of 117 serum samples from dogs. All samples were obtained  
82 during serological surveys conducted for VL control between 2008 and 2011, in  
83 different Brazilian regions and stored at -20°C at the Laboratory for Leishmaniasis  
84 Surveillance (VigiLeish/IPEC/FIOCRUZ). The clinical specimens (serum and tissue  
85 fragments) were obtained according a protocol approved by the Ethics Committee on  
86 the Use of Animals (CEUA/FIOCRUZ), under licenses P-0276/05, L-017/06 and L-  
87 038/08.

88 The samples were classified in three different groups composed by 39 samples  
89 each:

90 **Tc** Group: naturally infected dogs by *T. caninum*, from the states of Rio de Janeiro,  
91 Minas Gerais, São Paulo, Goiás and Mato Grosso. The diagnosis of this group was

92 confirmed by culture isolation of *T. caninum*, identified by the analysis of nucleotide  
93 sequences obtained through nested-PCR reactions that targeted a partial sequence of the  
94 18S rDNA gene (Almeida et al., 2011).

95

96 **Lc Group:** naturally infected dogs by *L. chagasi*, from Rio de Janeiro municipality and  
97 Minas Gerais. The diagnosis of this group was confirmed by culture isolation of  
98 *Leishmania* sp. and etiologic identification through isoenzyme technique (Madeira et  
99 al., 2009b).

100

101 **Co Group:** healthy dogs in good physical conditions used as control group. The animals  
102 in this group were from Rio de Janeiro municipality and, at that time, presented two  
103 serological tests - IIF and ELISA negative for anti-*Leishmania* sp antibodies; besides  
104 culture and molecular tests (nested-PCR, gene 18S rRNA) negative for *Leishmania* sp.  
105 and *Trypanosoma* sp. in intact skin fragments.

106

### 107 2.3. Serological tests and antigens

108 Anti-*Leishmania* and anti-*T. caninum* specific antibodies were assessed by IIF and  
109 ELISA using antigens produced in house and commercial kits manufactured by Bio-  
110 Manguinhos/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil and distributed to the public service: IFI-  
111 Leishmaniose visceral canina (IFI-LVC), EIE- Leishmaniose visceral canina (EIE-  
112 LVC) and Dual-Path Platform (DPP). Antigens of *T. caninum* (MCAN/BR/2003/R847)  
113 and *L. chagasi* (MCAN/BR/2007/R1112) the strains of which were properly  
114 characterized (Madeira et al., 2009a,b) were used in the in house tests. Both parasite  
115 samples were cultured in Schneider's medium supplemented by the addition of 10%



116 fetal bovine serum (FBS) and antibiotics (penicillin-200 UI/mL and streptomycin-200  
117 ug/mL) and processed during the stationary phase of growth.

118 The parasites for IIF were washed twice in physiological buffered solution (PBS,  
119 pH 7.2) through centrifugation and the resultant sediment was resuspended in 2mL of  
120 2% buffered formalin and stored at 4°C until the time of usage.

121 For ELISA, around 2mL of lysis buffer containing protease inhibitors (1mM  
122 iodoacetamide, 1mM phenylmethylsulfonylfluoride, 1mM phenanthroline) were added  
123 to the sediment of parasites after washing. The suspension was subjected to 40 cycles of  
124 freezing (dry ice + ethanol) and thawing (water bath at 60°C) and then sonicated  
125 (Transsonic 310-Elma®) during two hours until complete destruction of the parasites.  
126 After centrifugation (10.000 rpm/ 5 minutes/ 4°C), the sediment was discarded and the  
127 protein content of the supernatant was determined by the Folin-Lowry method (Lowry  
128 et al., 1951), separated in aliquots and stored at -20°C until the time of usage.

129

#### 130 2.4. Indirect immunofluorescence test

131 Three IIF test were used: a) IFI- LVC commercial kit; b) IIF test with *T. caninum*  
132 antigen (IIF-Tc) and c) IIF test with *L. chagasi* antigen (IIF-Lc), the reactions of which  
133 were previously standardized. The procedure with the kit followed the manufacturer's  
134 instructions and the in house tests were performed as briefly described as follows: about  
135 10 microlitres of antigen suspension were placed in slides and after drying were added  
136 of 10 microlitres of serum diluted 1:2 from 1:40 until 1:640 dilution. After incubation  
137 (37°C/30 minutes), the slides were washed in PBS (pH 7.2) and after drying, the  
138 conjugate anti-canine IgG conjugated to fluorescein isothiocyanate previously titrated,  
139 was added. A new incubation and washing were conducted as described above. Then,

140 the slides were mounted with buffered glycerol and examined using an epifluorescent  
141 microscope (BX40 - Olympus ®). Titers equal or above 1:40 were considered positive.

142

### 143 2.5. Enzyme Linked Immunosorbent Assay

144 As for IIF, we used three protocols of immunoenzymatic assay: a) kit EIE-LVC; b)  
145 ELISA with *T. caninum* antigen (ELISA-Tc) and c) ELISA with *L. chagasi* antigen  
146 (ELISA-Lc). The procedure with the kit followed the manufacturer's instructions and  
147 the in house tests were conducted as follows: 100 microlitres of 10µg/mL antigenic  
148 solution, diluted in 0.06M carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.6), were adsorbed to the  
149 wells of polystyrene plates (Imuno Maxisorp - NUNC®) and incubated overnight at  
150 4°C. Then, they were washed four times (PBS + 0.05% Tween 20), and the serum  
151 samples diluted 1:40 in 1% skim milk solution (PBS 0.01M, containing 0.05% Tween  
152 20) were placed and the plates were incubated (37°C/45 minutes). After two washings  
153 the anti-canine IgG conjugated to peroxidase previously titrated was added. The  
154 reaction was revealed using 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) and the optical  
155 density (OD) was measured in absorbance (405nm) using a microplate ELISA  
156 spectrophotometer (Genious -Tecan®). The cut-off of the EIE-LVC test was defined  
157 following the manufacturer's instructions considering the mean of the OD of the  
158 negative controls multiplied by 2. The cut-off of the in house tests was established  
159 based on the ODs and defined by the Receiver Operating Characteristic Curve (ROC  
160 Curve). The performance of these reactions was compared through the area under the  
161 curve (AUC) with its respective confidence interval of 95% using the *MedCalc*  
162 11.6.0.0 software. Samples with ODs above the cut-off were considered positive.

163

164 2.6. *Dual-Path Platform Immunochromatographic test*

165 Following the manufacturer's recommendations, 5µL of serum sample were placed  
166 in well #1 of the kit device and 2 drops of buffer (also supplied in the kit) were added.  
167 After 5 minutes, 4 drops of the same buffer were placed in well #2, and after twenty  
168 minutes, the reading was performed as recommended by the manufacturer. The results  
169 were considered positive when two lines, one in the control area and the other in the  
170 area with the sample under test were visualized. The visualization of just one line  
171 indicates a negative result.

172

173 2.7. *Data analysis*

174 The description of the IIF and DDP results was performed by the absolute and  
175 relative frequency of positives.

176 The validation parameters (sensitivity and specificity) of all the tests conducted in  
177 this study were supplied by the *MedCalc* 11.6.0.0 software. The parameters of the  
178 commercial kits (IFI-LVC, EIE-LVC and DPP) were compared considering the total  
179 number of samples and excluding the group of samples from dogs infected by *T.*  
180 *caninum*.

181 Chi-squared ( $\chi^2$ ) was used to compare specificity value of commercial tests (IFI-  
182 LVC, EIE-LVC and DPP) excluding the group of dogs infected with *Trypanosoma*  
183 *caninum*. The differences were considered statistically significant when *P*-values <0.05.

184

185 **3. Results**

186 In the test with the IFI-LVC kit we found 48.7% (n=19), 100% and 10.3% (n=4) of  
187 positive samples for the groups Tc, Lc and Co respectively, with titers of 1:40-1:320

188 for the Tc group and of 1:40-1:640 for the Lc group. Two samples of the Co group were  
189 reactive at dilution 1:40 and two at 1:80.

190 In the in house tests, initially using *T. caninum* antigens (IIF-Tc) we found 64.1%  
191 (n=25), 100% and 53.8% (n=21) of positive samples for the groups Tc, Lc and Co  
192 respectively, with titers of 1:40-1:320 for the Tc group and of 1:40-1:640 for the Lc  
193 group. The Co group presented titers of 1:40-1:320. With *L. chagasi* antigen (IIF-Lc),  
194 the Tc group presented 77% (n=30) of positive samples with titers of 1:40-1:640 and the  
195 Lc group presented 100% positivity with titers of 1:640 in about 90% of the samples. In  
196 this test, 100% of the samples of the Co group were negative.

197 The distribution of the serological titers found in each group is shown in Figure 1.

198 In the ELISA assay with the EIE-LVC kit, a cut-off value of 0.130 was obtained,  
199 and 48.7% (n=19), 100% and 15.4% (n=6) of positive samples were found for groups  
200 Tc, Lc and Co respectively. To in house test, using *T. caninum* antigen (ELISA-Tc), the  
201 cut-off obtained by the ROC curve was 0.212, with an area under the curve of 0.590 (CI  
202 95% = 0.496-0.680). With this cut-off, 94.9% (n=37), 100% and 28.2% (n=11) positive  
203 samples were found for groups Tc, Lc and Co, respectively. The cut-off established in  
204 the tests employing *L. chagasi* antigen (ELISA-Lc) was 0.282 and the area under the  
205 curve was 0.990 (0.950-0.999), which is equivalent to 12.8% (n=5) and 100% of  
206 positive samples respectively for groups Tc and Lc, and 100 % negative results for  
207 group Co. The distribution of the ODs and the cut-offs established for the different  
208 ELISA tests are shown in Figure 2.

209 When the rapid DPP test was employed, 5.1% (n=2) and 100% of positive samples  
210 were found for groups Tc and Lc, respectively, and the Co group presented 100% of  
211 negative results.

212 The validation parameters of the tests conducted in the present study are shown  
213 in Table 1.

214 No difference was found in the specificity EIE-LVC ( $x^2 = 2.87$ ,  $P$ -value = 0.089)  
215 and DPP ( $x^2 = 0.05$ ,  $P$ -value = 0.818) when Tc group was excluded, however with IFI-  
216 LVC this value was significant ( $x^2 = 4.36$ ,  $P$ -value = 0.036).

217

#### 218 **4. Discussion**

219 In Brazil, the diagnosis of canine visceral leishmaniasis (CVL) used in control  
220 programs is based on serological tests (Ministério da Saúde, 2006). The overlapping of  
221 areas where closely related etiological groups are present is a limiting aspect of the  
222 interpretation of the serological data due to possible serologic cross-reactions (Caballero  
223 et al., 2007). Descriptions of the presence of *Trypanosoma caninum* in areas endemic  
224 for CVL led us to evaluate the possibility of serological cross reactivity between those  
225 infections. Accuracy indices of the diagnostic tests may vary as a function of the group  
226 studied and the criteria adopted to establish positive and negative gold-standards (Lucey  
227 and Weina, 2008). The infection by *L. chagasi* or *T. caninum* was proved through  
228 determination of the etiological agent in all the dogs of the Lc and Tc groups,  
229 respectively, thus supporting the results.

230 When we observe the group of animals infected by *T. caninum*, we verify that at  
231 least nine animals were negative to IIF and three to ELISA, regardless of the test. This  
232 result suggest that *T. caninum* may be little immunogenic for dogs, at least in the  
233 induction of humoral immune response. In the same way, the general condition of the  
234 animal is not affected during infection by *L. braziliensis* (Dantas-Torres, 2007). *T.*  
235 *caninum* has been most frequently isolated from healthy dogs (Silva et al., 2011;

236 Almeida et al., 2011). If this hypothesis is true, the serological test would have little  
237 applicability for the diagnosis and tracking of this parasite.

238 On the other hand, the results obtained with the Co group, where 53.8% and 28.2%  
239 of the samples presented reactivity to IIF-Tc and ELISA-Tc tests respectively called our  
240 attention. This result may be related to the poor knowledge on the natural canine  
241 infection by *T. caninum* and the sensitivity and specificity of the methods used to define  
242 the Co group. This group was formed with dogs from Rio de Janeiro municipality,  
243 where the presence of *T. caninum* has been reported in different occasions (Madeira et  
244 al., 2009a, Pinto et al., 2010, Silva et al., 2011), and thus, the possibility of infection by  
245 *T. caninum* cannot be disregarded. This hypothesis is supported by the results of other  
246 tests of the Co group, mainly when *L. chagasi* antigen was employed.

247 The use of homologous antigens is considered a positive factor in the performance  
248 of diagnostic tests (Baleeiro et al., 2006). In the present study, the IIF-Tc and ELISA-Tc  
249 presented low specificity values, which reflects a poor performance of the serological  
250 methods for *T. caninum* diagnosis. A curious fact, with possible implications for CVL  
251 control actions, is that this group presented a higher frequency of reactors in IIF-Lc than  
252 in IIF-Tc.

253 The animals infected by *L. chagasi* were 100% reactive in the tests that employed  
254 homologous antigens (*L. chagasi*) or heterologous (*T. caninum*), demonstrating the  
255 serological cross-reactivity between both agents. In this group, the ELISA-Lc presented  
256 higher specificity than EIE-LVC, although the same result was not obtained for IIF-Lc.  
257 This can be explained by the nature of the assays (ELISA and IIF), which react with  
258 different antigens. The IFI-LVC and EIE-LVC tests, both routinely used for VL  
259 surveillance in Brazil presented sensitivity of 100% and specificity around 70%  
260 (Ministério da Saúde, 2006). The specificity of these tests was higher when the group of

261 animals infected by *T. caninum* was excluded from the analysis. The sensitivity and  
262 specificity indices of DPP remained high, regardless the inclusion or exclusion of the  
263 animals infected by *T. caninum*. These results support the choice of this rapid test as an  
264 alternative for CVL diagnosis (Grimaldi et al., 2012). Only two animals infected by *T.*  
265 *caninum* were seroreactive to DPP. Both dogs were from areas with VL, although the  
266 laboratory examinations did not identify mixed infection.

267 A hundred percent of the dogs infected by *L. chagasi* would be properly diagnosed  
268 by the tests currently employed by the Brazilian Health Ministry and designated for  
269 euthanasia. False negative results could represent a problem in leishmaniasis control,  
270 but they were not detected in the present study. However, considering EIE-LVC as a  
271 screening test and IFI-LVC as a confirmatory test, 23% (n=9) of the animals infected by  
272 *T. caninum*, would be erroneously diagnosed as CVL.

273 Further studies are needed for better understanding the natural infection by *T.*  
274 *caninum* in domestic dogs and determining the more adequate tools for the diagnosis  
275 and tracking of this parasite.

276

## 277 **Acknowledgments**

278 This research is part of the Master Degree's Dissertation in Clinical Research in  
279 Infectious Disease of Andreia Silva Alves in the Program of the Instituto de Pesquisa  
280 Clínica Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil.

281 This work was supported, in part, by Grants from Conselho Nacional de  
282 Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - process nº 474894/2010-0) and  
283 Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro  
284 (FAPERJ/Cientista de Nosso Estado - process nº E-26/102.321/2009). Armando

285 Schubach is investigator of Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e  
286 Tecnológico(CNPq - process nº 302060/2010-3).

287

## 288 **References**

289 Almeida, A.B.P.F., Sousa, V.R.F., Boa Sorte, E.C., Figueiredo, F.B., Paula, D.A.J.,  
290 Pimentel, M.F., Dutra, V., Madeira, M.F., 2011. Use of Parasitological Culture to  
291 detect *Leishmania (Leishmania) chagasi* in naturally infected dogs. Vector-borne  
292 and Zoonotic Disease 11, 1555-1560.

293 Baleeiro, C.O., Paranhos-Silva, M., Dos Santos, J.C., Oliveira, G.G.S., Nascimento,  
294 E.G., De carvalho, L.P., dos-Santos, W.L.C., 2006. Montenegro's skin reactions  
295 and antibodies against different *Leishmania* species in dogs from a visceral  
296 leishmaniosis endemic area. Veterinary Parasitology 139, 21-28.

297 Caballero, Z.C., Sousa, O.E., Marques, W.P., Saez-Alquezar, A., Umezawa, E.S., 2007.  
298 Evaluation of Serological tests to identify *Trypanosoma cruzi* infection in humans  
299 and determine cross-reactivity with *Trypanosoma rangeli* and *Leishmania* spp.  
300 Clinical and Vaccine Immunology 14, 1045-1049.

301 Dantas-Torres, R., 2007. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with  
302 emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia)*  
303 *braziliensis*. Veterinary Parasitology 149, 139-146.

304 Grimaldi, G., Teva, A., Ferreira, A.L., Dos Santos, C.B., Pinto, I.S., de-Azevedo, C.T.,  
305 Falqueto, A., 2012. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on  
306 Dual-Path Platform technology (DPP(®) CVL rapid test) for the serodiagnosis of  
307 canine visceral leishmaniasis. Transactions of the Royal Society of Tropical  
308 Medicine and Hygiene 106, 54-59.



309 Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement  
310 with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193, 265-75.

311 Lucey, C., Weina, P.J., 2008. Applying the STARD (Standards for Reporting of  
312 Diagnostic Accuracy) checklist to the 2007 Transfusion article 'Evaluation of a  
313 new enzyme-linked immunosorbent assay for detection of Chagas antibody in US  
314 blood donors'. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and  
315 Hygiene* 102, 155-160.

316 Madeira, M.F., Schubach, A.O, Schubach, T.M., Pereira, S.A., Figueiredo, F.B.,  
317 Baptista, C., Leal, C.A., Melo, C.X., Confort, E.M. Marzochi, M.C., 2006. Post  
318 mortem parasitological evaluation of dogs seroreactive for *Leishmania* from Rio de  
319 Janeiro, Brazil. *Veterinary Parasitology* 138, 366-370.

320 Madeira, M.F., Sousa, M.A., Barros, J.H., Figueiredo, F.B., Fagundes, A., Schubach,  
321 A., de Paula, C.C., Faissal, B.N.S., Fonseca, T.S., Thoma, H.K., Marzochi, M.C.A.,  
322 2009a. *Trypanosoma caninum* n. sp. (Protozoa: Kinetoplastida) isolated from  
323 intact skin of a domestic dog (*Canis familiaris*) captured in Rio de Janeiro, Brazil.  
324 *Parasitology* 136, 411-423.

325 Madeira, M.F., Figueiredo, F.B., Pinto, A.G.S., Nascimento, L.D., Furtado, M., Mouta-  
326 Confort, E., de Paula, C.C., Bogio, A., Gomes, M.C., Bessa, A.M., Passos, S.R.,  
327 2009b. Parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniosis: Is intact skin a  
328 good target? *Research in Veterinary Science* 87, 260-262.

329 Ministério da Saúde, 2006. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral.  
330 Brasília-DF. In: Ministério da Saúde, Brasília, Brazil, 120 pp.

331 Pinto, A.G.S., Schubach, T.M.P., Figueiredo, F.B., Fagundes, A., Barros, J.H.S., de  
332 Paula, C.C., Toma, H.K., Madeira, M.F., 2010. Isolation of *Trypanosoma caninum*  
333 in domestic dogs in Rio de Janeiro, Brazil. *Parasitology* 137, 1653-1660.

- 334 Silva, D.A., Madeira, M.F., Teixeira, A.C., Souza, C.M., Figueiredo, F.B., 2011.  
335 Laboratory tests performed on *Leishmania* seroreactive dogs euthanized by the  
336 leishmaniasis control program. *Veterinary Parasitology* 179, 257-261.
- 337 Vexenat, A.C., Santana, J.M., Teixeira, A.R., 1996. Cross-reactivity of antibodies in  
338 human infections by the kinetoplastid protozoa *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania*  
339 *chagasi* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Revista do Instituto de Medicina*  
340 *Tropical de São Paulo* 38, 177-85.
- 341 WHO, 2010 . World Health Organization. Control of the leishmaniasis: report of a  
342 meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva,  
343 22-26 March 2010. In: WHO Technical Report Series, 949.

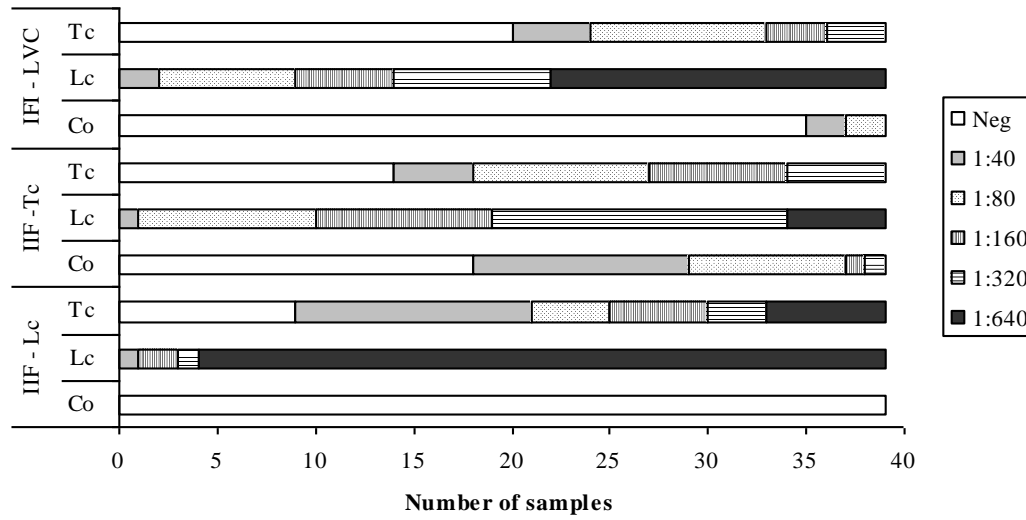
**Table 1**

Sensitivity and specificity of indirect immunofluorescence tests (IFI-LVC, IIF-Lc and IIF-Tc), immunoenzymatic assays (EIE-LVC, ELISA-Lc and ELISA-Tc) and immunochromatographic test (DPP) with sera from dogs with *Trypanosoma caninum*, *Leishmania chagasi* infection and healthy controls.

Tests	Sensitivity	Specificity	Sensitivity*	Specificity*	p-value
<b>IFI-LVC</b>	100 (91-100)	70.5 (59.1-80.3)	100 (91-100)	89.7 (75.8-97.1)	0.036
<b>IIF-Lc</b>	100 (91-100)	61.5 (49,8-72.3)	NE	NE	NE
<b>IIF-Tc</b>	64.1 (47.2-79)	23.1 (14.3-34)	NE	NE	NE
<b>EIE-LVC</b>	100 (91-100)	68 (56.4-78,1)	100 (91-100)	84.6 (69.5-94.1)	0.089
<b>ELISA-Lc</b>	100 (91-100)	93.6 (87.7-98)	NE	NE	NE
<b>ELISA-Tc</b>	94.9 (82,7-99.4)	35.9 (25.3-47.6)	NE	NE	NE
<b>DPP</b>	100 (91-100)	97.5 (91-99.7)	100 (91-100)	100 (91-100)	0.818

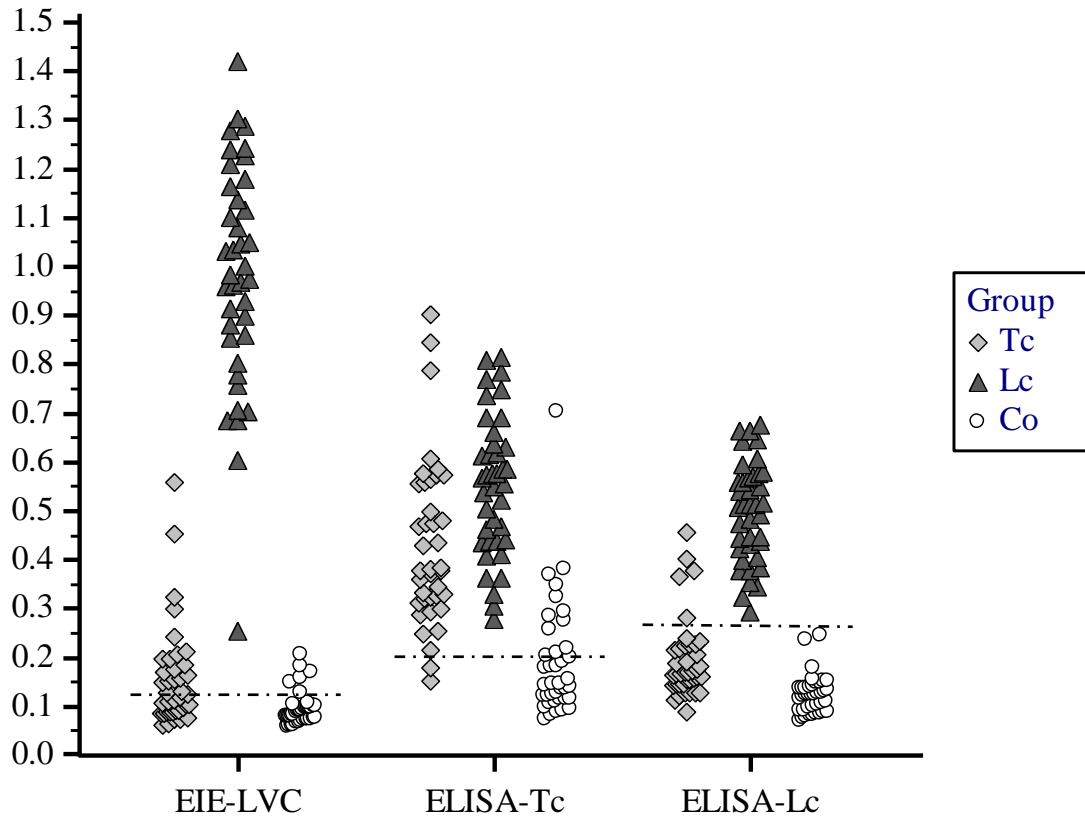
**IFI-LVC**-IFI-Leishmaniose visceral canina kit, Biomanguinhos/FIOCRUZ; **IIF-Tc**-*T. caninum* antigen in house test; **IIF-Lc**-*L. chagasi* antigen in house test; **EIE-LVC**-Leishmaniose visceral canina kit, Biomanguinhos/FIOCRUZ; **ELISA-Tc**-*T. caninum* antigen in house test; **ELISA-Lc**-*L. chagasi* antigen in house test; **DPP**-Immunocromatographic test; **NE**-not evaluated.

\*Parameters evaluated excluding the samples of the infected dogs by *T. caninum*. IC=95%.



**Fig. 1.** Distribution of the serological titers of the 117 serum samples of dogs infected by *Trypanosoma caninum* (Tc group), *Leishmania chagasi* (Lc group) and not infected control animals (Co group), obtained in Indirect Immunofluorescence tests with IFI-LVC (IFI-Leishmaniose Visceral Canina, Bio-Manguinhos/FIOCRUZ) commercial kit and with IIF-Tc (*T. caninum* antigen) and IIF-Lc (*L. chagasi* antigen) in house tests. (Neg – Negative result).

Figure 2



**Fig.2.** Distribution of optical densities (OD) of 117 serum samples obtained from dogs infected by *Trypanosoma caninum* (Tc group), *Leishmania chagasi* (Lc group) and not infected control animals (Co group) in immunoenzymatic assays: EIE-LVC (EIE-leishmaniose visceral canina kit, Bio-Manguinhos/FIOCRUZ); ELISA-Tc (*T. caninum* antigen); ELISA-Lc (*L. chagasi* antigen). A cut-off value (dotted line) was established as described in Material and methods.

## 5. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Este trabalho teve por objetivo prestar uma contribuição ao conhecimento acerca do *Trypanosoma caninum* e ao controle das leishmanioses no Brasil.

*T. caninum*, espécie recém descrita no Brasil, isolada a partir de fragmentos pele de cães por ocasião de estudos de leishmaniose em 2003 no Rio de Janeiro, foi posteriormente isolado de cães de outras regiões brasileiras, sem que alguma patologia estivesse associada à sua presença. A ocorrência desta nova espécie em áreas endêmicas de LV poderia ter implicações para o controle desta doença, na medida em que as ações de controle incluem a eliminação de cães soropositivos. Assim realizamos este estudo, procurando avaliar a resposta imune humoral específica em cães naturalmente infectados por *T. caninum*, empregando ensaios de IFI e ELISA. Buscamos identificar também reações cruzadas a antígenos de *Leishmania chagasi* produzidos e empregados em testes *in house* e a antígenos dos kits comerciais empregados no diagnóstico de LVC no Brasil. Os resultados demonstraram a existência de resposta humoral específica, porém com reatividade cruzada a antígenos de *L. chagasi* e a kits de diagnóstico da LVC, o que já era esperado pelo fato destes parasitos pertencerem à mesma família.

Considerando que as leishmanioses estão em expansão em diversas regiões brasileiras, que são consideradas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) doenças reemergentes e negligenciadas devido ao ressurgimento, com clínica específica em pacientes com HIV e ao aparecimento em novas áreas nos vários continentes, devido a fatores sócio-econômicos, esforços devem ser empregados para conter a sua propagação. O diagnóstico, preciso e rápido, é também uma

questão a ser solucionada, contribuindo assim para a identificação inequívoca dos casos em tempo hábil. Neste sentido, a contribuição deste trabalho se faz, pela identificação de mais um agente perturbador no já delicado e confuso conhecimento do diagnóstico sorológico da LV e suas reações cruzadas. O diagnóstico de cães em áreas endêmicas é um fator determinante para a eutanásia, nos programas de controle. A existência de resultados falsos positivos e a eficácia desta metodologia de controle têm sido questionadas por parte de profissionais da área de saúde. Portanto, torna-se necessário redobrar esforços com objetivo de tornar o mais preciso possível o resultado dos testes sorológicos ou identificar alternativas mais eficazes.

Um desdobramento que consideramos importante é a avaliação da reatividade sorológica cruzada por *Immunoblotting*. Essa técnica possui elevada sensibilidade e especificidade, podendo ser de grande utilidade para caracterização de antígenos que possam ser reconhecidos por soros de animais infectados. Essa abordagem fez parte do nosso estudo, mas não foi concluída por dificuldades nas etapas de padronização.

Este foi o primeiro estudo envolvendo a avaliação de resposta imune humoral na infecção natural por *T. caninum*. Outros devem ser incentivados para produzir conhecimentos relativos à biologia, às possíveis formas de transmissão, à infectividade, à patogenicidade e principalmente aos aspectos relacionados às ferramentas para o diagnóstico dessa infecção. Entretanto, o desafio maior, é conhecer o impacto que esse parasito pode estar causando em áreas onde as leishmanioses caninas ocorrem, uma vez que compartilham o mesmo hospedeiro. Os nossos resultados demonstraram que a sorologia talvez não seja o método mais apropriado para o diagnóstico e conseqüentemente para o rastreamento de *T.*

*caninum*. Apesar de conhecermos a limitação da cultura parasitológica, todos os casos descritos até então, foram encontrados através desse método durante o desenvolvimento de projetos de pesquisas para a detecção de cães com LV.

A prevalência de *T. caninum* é ainda desconhecida e este estudo contribuiu com informações que podem ser importantes nesse novo cenário epidemiológico que está sendo observado em diferentes áreas do Brasil, onde *T. caninum* e *L. chagasi* estão circulando com sobreposição de endemicidade, nos cães domésticos.



## 6. CONCLUSÕES

1. Os testes de IFI e ELISA não constituem ferramentas adequadas para o diagnóstico e discriminação da infecção por *Trypanosoma caninum*.

2. Nos ensaios *in house* verificamos que soros de animais infectados por *T. caninum* e *L. chagasi* reagiram a ambos os antígenos confirmando a reatividade sorológica cruzada entre estes agentes.

3. Os índices de especificidade dos testes comerciais encontrados para o diagnóstico da LVC (IFI-LVC, EIE-LVC e DPP) tornaram-se mais elevados quando o grupo de animais infectados por *T. caninum* foi excluído das análises, demonstrando que a presença desses animais nas áreas endêmicas de LV pode interferir nos parâmetros de validade desses testes.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aisa MJ, Castillejo S, Gallego M, Fisa R, Riera MC, Colmenares M et al. Diagnostic potencial of Western Blot analysis of sera from dogs with leishmaniasis in endemic áreas and significance of the pattern. *Am J Trop Med Hyg* 1998; 58(2):154-159.

Almeida ABPF, Sousa VRF, Boa Sorte EC, Figueiredo FB, Paula DAJ, Pimentel MFA et al. Use of Parasitological Culture to Detect *Leishmania (Leishmania) chagasi* in Naturally Infected Dogs. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2011 Dec; 11(12):1555-60.

Ashford DA, Badaro R, Eulalio C, Freire M, Miranda C, Zalis MG et al. Studies on the control of visceral leishmaniasis: validation of the Falcon assay screening test-enzyme-linked immunosorbent assay (FAST-ELISA) for field diagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 1993 Jan; 48(1):1-8.

Berrahal F, Roze CMM, Berenguer A, Escoffier K, Lamouroux D, Dunan S. Canine Leishmaniasis: Identification of asymptomatic carriers by Polymerase Chain Reaction and Immunoblotting. *Am J Trop Med Hyg* 1996; 55(3):273-277.

Boarino A, Scalone A, Gradoni L, Ferroglio E, Vitale F, Zanatta R et al. Development of recombinant chimeric antigen expressing immunodominant B epitopes of *Leishmania infantum* for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol* 2005 May; 12(5):647-53.

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

Colmenares M, Kar S, Goldsmith-Pestana K, McMahon-Pratt D. Mechanisms of pathogenesis: differences amongst *Leishmania* species. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2002 Apr; 96 Suppl 1:3-7.

Costa CH. How effective is dog culling in controlling zoonotic visceral leishmaniasis? A critical evaluation of the science, politics and ethics behind this public health policy. *Rev Soc Bras Med Trop* 2011 Mar-Apr; 44(2):232-42.

Courtenay O, Quinnell RJ, Garcez LM, Shaw JJ, Dye C. Infectiousness in a cohort of brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. *J Infect Dis* 2002 Nov 1; 186(9):1314-20.

Coutinho MTZ, Bueno LL, Sterzik A, Fujiwara RT, Botelho JR, De Maria M et al. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol* 2005; 128:149-155.

Dantas-Torres F. Canine leishmaniosis in South America. *Parasit Vectors* 2009 Mar 26; 2 Suppl 1:S1.

Dantas-Torres F, Paiva-Cavalcanti M, Figueredo LA, Melo MF, Silva FJ, Silva AL et al. Cutaneous and visceral leishmaniosis in dogs from a rural community in northeastern Brazil. *Vet Parasitol* 2010; 170:313–317.

Desquesnes M, Bengaly, Z, Millogo L, Meme Y, Sakande, H. The analysis of the cross-reactions occurring in antibody-ELISA for the detection of trypanosomes can improve identification of the parasite species involved. *Ann Trop Med Parasitol* 2001; 95(2):141-155.

Ferreira EC, De Lana M, Carneiro M, Reis AB, Paes DV, Da Silva ES et al. Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. *Vet Parasitol* 2007; 146:235-241.

Genaro O, Mayrink W, Michalick MSM, Dias M, Da Costa CA, Melo MN. Naturally occurring visceral leishmaniasis in dogs: clinical aspects. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1988; 83:43.

Gomes YM, Paiva Cavalcanti M, Lira RA, Abath FG, Alves LC. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: biotechnological advances. *Vet J* 2008; 175:45–52.

Gonçalves CCM, Reiche EMV, Abreu Filho BA, Silveira TGV, Felizardo TC, Maia KR et al. Evaluation of antigens from various *Leishmania* species in a Western Blot for diagnosis of American Tegumentary Leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 2002; 66(1):91-102.

Gontijo CMF, Melo MN. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Rev Bras Epidemiol* 2004, 7(3):338-349.

Grimaldi Jr G, Teva A, Ferreira AL, Dos Santos CB, Pinto IS, de-Azevedo CT et al. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP®) CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2012; 106:54-9.

Hoare CA. The Trypanosomes of Mammals. A Zoological Monograph. Oxford-Edinburgh (UK): Blackwell Scientific Publications; 1972.

Hommel M, Peters W, Ranque J, Quilici M, Lannotte G. The micro-ELISA technique in the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Ann Trop Med Parasitol* 1978; 72:213-218.

Isaza DM, Restrepo M, Mosca W. Immunoblot analysis of *Leishmania panamensis* antigens in sera of patients with American Cutaneous Leishmaniasis. *J Clin Microbiol* 1997; 35 (12):3043-3047.

Kar K. Serodiagnosis of Leishmaniasis. *Crit Vet Microbiol* 1995; 21:123-152.

Lira RA, Cavalcanti MP, Nakazawa M, Ferreira AG, Silva ED, Abath FG 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. *Vet Parasitol* 2006; 137:11-6.

Madeira MF, Schubach A, Schubach TM, Pacheco RS, Oliveira FS, Pereira SA et al. Mixed infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* in a naturally infected dog from Rio de Janeiro, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2006a; 100(5):442-5.

Madeira MF, Schubach AO, Schubach TM, Pereira SA, Figueiredo FB, Baptista C et al. Post mortem parasitological evaluation of dogs seroreactive for *Leishmania* from Rio de Janeiro, Brazil. *Vet Parasitol* 2006b Jun 15;138(3-4):366-70.

Madeira MF, Sousa MA, Barros JH, Figueiredo FB, Fagundes A, Schubach A et al. *Trypanosoma caninum* n. sp. (Protozoa: Kinetoplastida) isolated from intact skin of a domestic dog (*Canis familiaris*) captured in Rio de Janeiro, Brazil. *Parasitol* 2009; 136:411-423.

Mancianti F, Falcone ML, Gianneli C, Poli A. Comparison between an enzyme-linked immunosorbent assay using a detergent-soluble *Leishmania infantum* antigen and indirect immunofluorescence for the diagnosis of canine leishmaniosis. *Vet Parasitol* 1995; 59:13-21.

Mancianti FM, Pedonese F, Poli A. Evaluation of dot enzyme-linked immunosorbent assay (dot-ELISA) for the serodiagnosis of canine leishmaniasis as compared with indirect immunofluorescence assay. *Vet Parasitol* 1996; 65(1-2):1-9.

Marzochi MCA, Sabrosa PC, Toledo LM, Marzochi KBF, Tramontano NC, Filho FBR. Leishmaniose Visceral na cidade do Rio de Janeiro - Brasil. *Cad Saúde Pública* 1985; 1(1):5-17.

Mettler M, Grimm F, Capelli G, Camp H, Deplazes P. Evaluation of Enzyme-Linked Immunosorbent Assays, an Immunofluorescent-Antibody Test, and Two Rapid Tests (Immuno-chromatographic-Dipstick and Gel Tests) for Serological Diagnosis of Symptomatic and Asymptomatic *Leishmania* Infections in Dogs. *J Clin Microbiol* 2005; 43:5515-5519.

Ministério da Saúde, 2006. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Brasília-DF. In: Ministério da Saúde, Brasília, Brasil, 120 pp.

Moreira MA, Luvizotto MC, Garcia JF, Corbett CE, Laurenti MD. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. *Vet Parasitol* 2007 Apr 30; 145(3-4):245-252.

Ozensoy S, Ozbel Y, Turgay N, Alkan MZ, Gul K, Gilman-Sachs A et al. Serodiagnosis and epidemiology of visceral leishmaniasis in Turkey. *Am J Trop Med Hyg* 1998, 59:363-369.

Pinto AGS, Schubach TMP, Figueiredo FB, Fagundes A, Barros JHS, De Paula CC et al. Isolation of *Trypanosoma caninum* in domestic dogs in Rio de Janeiro, Brazil. *Parasitol* 2010; 26:1-8.

Queiroz PV, Monteiro GR, Macedo VP, Rocha MA, Batista LM, Queiroz JW et al. Canine visceral leishmaniasis in urban and rural areas of Northeast Brazil. *Res Vet Sci* 2009 Apr; 86(2):267-273.

Reithinger R, Davies CR. Is the domestic dog (*Canis familiaris*) a reservoir host of American cutaneous leishmaniasis? A critical review of the current evidence. *Am J Trop Med Hyg* 1999 Oct; 61(4):530-41.

Ribeiro FC, Schubach AO, Mouta-Confort E, Pacheco TM, Madeira MF, Abboud LC et al. Use of ELISA employing homologous and heterologous antigens for the detection of IgG and subclasses (IgG1 and IgG2) in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2011 Sep-Oct; 53(5):283-239.

Rosati S, Ortoffi M, Mannelli A, Bollo E, Gradoni L. Prokaryotic Expression and Antigenic Characterization of Three Recombinant Leishmania Antigens for Serological Diagnosis of Canine Leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol* 2003; 10(6):1153-1156.

Savani ESMM, Nunes VLB, Galati EAB, Castilho TM, Araújo FS, Ilha IMN et al. Occurrence of co-infection by *Leishmania (Leishmania) chagasi* and *Trypanosoma (Trypanozoon) evansi* in a dog in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005; 100:739–741.

Scalone A, De Luna R, Oliva G, Baldi L, Satta G, Vesco G et al. Evaluation of the Leishmania recombinant K39 antigen as a diagnostic marker for canine leishmaniasis and validation of a standardized enzyme-linked immunosorbent assay. *Vet Parasitol* 2002; 104:275-285.

Silva DA, Madeira MF, Teixeira AC, Souza CM, Figueiredo FB. Laboratory tests performed on Leishmania seroreactive dogs euthanized by the leishmaniasis control program. *Vet Parasitol* 2011;179: 257–261.

Sundar S, Rai M. Laboratory diagnosis of visceral. Leishmaniasis. Clin Diagn Lab Immunol 2002; 9:951-958.

Tafuri WL, de Oliveira MR, Melo MN, Tafuri WL. Canine visceral leishmaniosis: a remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil. Vet Parasitol 2001 Apr 2; 96(3):203-212.

Tolezano JE, Uliana SR, Taniguch HH, Araújo MF, Barbosa JA, Barbosa J et al. The first records of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in dogs (*Canis familiaris*) diagnosed clinically as having canine visceral leishmaniasis from Araçatuba County, São Paulo State, Brazil. Vet Parasitol 2007; 149(3-4):280-284.

Vale AM, Fujiwara RT, da Silva Neto AF, Miret JA, Alvarez DCC, da Silva JCF. Identification of Highly Specific and Cross-Reactive Antigens of *Leishmania* Species by Antibodies from *Leishmania (Leishmania) chagasi* Naturally Infected Dogs; Zoo Public Health 2009; 56:41–48.

Zijlstra EE, Daifalla NS, Kager PA, Khalil EAG, El-Hassan AM, Reed SG et al. RK39 enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Leishmania donovani* infection. Clin Diagn Lab Immunol 1998; 5(5):717–720.