



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

HEMILLY RAYANNE FERREIRA DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE NOVAS PROTEÍNAS QUIMÉRICAS
RECOMBINANTES BASEADAS EM EPÍTOPOS IMUNOGÊNICOS PARA O
DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA E HUMANA**

Recife
2023

HEMILLY RAYANNE FERREIRA DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE NOVAS PROTEÍNAS QUIMÉRICAS
RECOMBINANTES BASEADAS EM EPÍTOPOS IMUNOGÊNICOS PARA O
DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA E HUMANA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Doutora em Genética.

Área de concentração: Biologia Molecular.

Orientador: Dr. Osvaldo Pompilio de Melo Neto

Coorientador: Dr. Wagner José Tenório dos Santos

Recife

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

Silva, Hemilly Rayanne Ferreira da

Desenvolvimento e avaliação de novas proteínas quiméricas recombinantes baseadas em epítomos imunogênicos para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina e humana / Hemilly Rayanne Ferreira da Silva– 2023.

139 f. : il., fig., tab.

Orientador: Osvaldo Pompílio de Melo Neto

Coorientador: Wagner José Tenório dos Santos

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Genética, Recife, 2023.

Inclui referências, apêndices e anexo.

1. Leishmaniose visceral 2. Proteínas 3. Diagnóstico I. Melo Neto, Osvaldo Pompílio de (orient.) II. Santos, José Tenório dos Santos (coorient.) III. Título

616.9364

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2023 -203

HEMILLY RAYANNE FERREIRA DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE NOVAS PROTEÍNAS QUIMÉRICAS
RECOMBINANTES BASEADAS EM EPÍTOPOS IMUNOGÊNICOS PARA O
DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA E HUMANA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Doutora em Genética.

Aprovada em: 12/07/2023

BANCA EXAMINADORA

Dr. Osvaldo Pompilio de Melo Neto
Instituto Aggeu Magalhães/ Fiocruz PE

Dr^a. Isabelle Freire de Tabosa Viana
Instituto Aggeu Magalhães/ Fiocruz PE

Dr^a. Jaqueline de Azevêdo Silva
Universidade Federal de Pernambuco- UFPE

Dr^a. Zulma Maria de Medeiros
Instituto Aggeu Magalhães/ Fiocruz PE

Dr^a. Virginia Maria Barros de Lorena
Instituto Aggeu Magalhães/ Fiocruz PE

Agradeço primeiramente a Deus, o que seria de mim sem os cuidados Dele. Aos meus pais, pelo amor e suporte incondicional e a minha irmã, que sempre acreditou em mim.

AGRADECIMENTOS

Hoje, finalizo mais uma etapa importante da minha vida. E lembro-me que o início desse momento se deu em 2011, quando ingressei na vida acadêmica e ao ver a nova atmosfera que me foi apresentada, decidi encarar esse caminho como um projeto de vida. Por isso, ao finalizar este trabalho, reporto-me neste espaço a todos que foram essenciais para finalização desse ciclo.

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me dado condições de lutar e alcançar os objetivos pretendidos. É Nele que sempre encontro refúgio, respostas nos momentos de tribulação e conforto nas horas difíceis. A Ele, portanto, minha gratidão e adoração eterna;

Aos meus pais, Antônio José da Silva Filho e Mirian Ferreira da Silva (*in memoriam*) e a minha irmã por tudo que vocês me ensinaram e por todo amor que sempre recebi. Tudo que sou, devo a vocês. Sem vocês eu não teria conhecido: a garra, a força, a determinação e a intrepidez de almejar e alçar altos voos. Amo vocês demais;

Às minhas avós Rita Felix da Silva (84 anos) e Severina Maria da Silva (88 anos), por serem meus maiores exemplos de força e superação. A toda minha família, agradeço imensamente por tudo;

Em especial, agradeço a minha tia e mãe do coração Verônica Sena, por todo amor que sempre me deu e por tudo que já vivemos. A Irmã Maria e Tia Denise por não cessarem de orar por mim e pelo meu futuro. Amo muito vocês;

À minha amiga e irmã Bárbara Nazly. Tudo começou na graduação como duplas na prova de química, e seguiu pela iniciação, mestrado, doutorado, e pelos altos e baixos da vida. Não tenho condições de enumerar tudo que vivemos, mas tenho como resumir que somos prova do cuidado de Deus. Te Amo demais;

À minha amiga Allana Pereira, que foi o melhor presente que recebi ao chegar na Fiocruz-PE. Minha parceira de ELISA, de conversas e de muitas risadas. Te Amo demais;

Ao meu orientador, Dr. Osvaldo Pompilio, meus sinceros agradecimentos. Além de ser um profissional admirável, de uma grande inteligência, carrega consigo uma

simplicidade notável. Agradeço pelos ensinamentos, conselhos, paciência e compreensão que me fizeram crescer;

Ao meu coorientador, Dr. Wagner Tenório, agradeço pela confiança e pelos ensinamentos prestados;

Aos meus colegas do Grupo BioMolTrip, pelo convívio divertido, pelo espírito de equipe e pelo auxílio nos momentos em que precisei. Vocês são profissionais incríveis;

A Carol Pereira e a equipe de técnicos do departamento de microbiologia da Fiocruz-PE, pela competência e eficiência nos serviços prestados;

Ao Dr. Christian Reis, pelo compromisso com todos que fazem o departamento de Microbiologia do IAM/ Fiocruz-PE e eficiência nos serviços prestados, além da parceria nas pesquisas;

Ao grupo de pesquisa comandado pela Dra. Valéria e Dra. Zulma, pela parceria firmada e oportunidades futuras;

A todos os departamentos da Fiocruz pelo qual precisei realizar experimentos;

Aos órgãos de fomento Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico em Saúde (Fiotec), pelo financiamento do projeto e bolsas de pesquisa.

RESUMO

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença grave e o diagnóstico precoce é fundamental para o tratamento adequado. No entanto, a falta de métodos eficientes e de baixo custo tem sido um desafio tanto para a doença humana quanto para o cão, seu principal reservatório. Atualmente, os testes sorológicos que utilizam antígenos recombinantes têm a vantagem de combinar sensibilidade e especificidade, além de serem relativamente fáceis de serem realizados. A utilização de um único antígeno para o diagnóstico da leishmaniose visceral tanto em humanos como em cães poderia reduzir os custos de produção e distribuição dos testes, facilitando e possibilitando um tratamento mais rápido. O objetivo deste estudo foi desenvolver e avaliar um novo antígeno quimérico recombinante (Q8), baseado em uma proteína quimérica previamente desenvolvida (Q5), mais adição de fragmentos de duas outras proteínas antigênicas, Lci5 e Lci13 da *Leishmania infantum*. O primeiro conjunto de dados do estudo demonstraram que a Q5 necessita de melhorias adicionais em sua sequência, indicando uma sensibilidade inferior (62%) com os soros caninos assintomáticos positivos para LV. Em um segundo momento, o potencial diagnóstico da Q8 foi avaliado em comparação com a sua variante Q8SX2 e Q5, utilizando soros de cães e indivíduos portadores de leishmaniose visceral. A Q8 mostrou níveis de sensibilidade superiores à Q8SX2 e Q5 no diagnóstico da LV em cães e humanos, apresentando 96,3% e 97,3%, enquanto a Q8SX2 apresentou 93,5% e 96%, e a Q5, 87% e 82,6%, respectivamente. Ainda, a Q8 foi capaz de identificar cães assintomáticos (93,7%) sem apresentar resultados falsos positivos e sem reatividade cruzada com leishmaniose tegumentar. Além disso, a Q8 demonstrou resultados satisfatórios no ensaio de ELISA usando proteína A, tanto para humanos como para cães. Portanto, esse novo antígeno apresenta potencial para o diagnóstico de cães e humanos afetados com LV, podendo ser uma alternativa viável aos ensaios atualmente recomendados no Brasil.

Palavras-chave: Leishmaniose Visceral; Diagnóstico; Proteína Quimérica Recombinante; ELISA.

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis (VL) is a serious disease and early diagnosis is essential for adequate treatment. However, the lack of efficient and low-cost methods has been a challenge for both the human disease and the dog, its main reservoir. Currently, serological tests that use recombinant antigens are considered the best option for diagnosing VL. These tests have the advantage of combining sensitivity and specificity, in addition to being relatively easy to perform. The use of a single antigen for the diagnosis of Visceral Leishmaniasis in both humans and dogs could reduce the costs of producing and distributing tests, facilitating and enabling faster treatment. The objective of this study was to develop and evaluate a new recombinant chimeric antigen (Q8), based on a previously developed chimeric protein (Q5), plus the addition of fragments of two other antigenic proteins, Lci5 and Lci13 from *L. infantum*. The first set of data from the study demonstrated that Q5 requires further improvements in its sequence, indicating a lower sensitivity (62%) with VL-positive asymptomatic canine sera. The diagnostic potential of Q8 was evaluated in comparison with its variant Q8SX2 and Q5, using sera from dogs and individuals with visceral leishmaniasis. Q8 showed higher sensitivity levels than Q8SX2 and Q5 in diagnosing VL in dogs and humans, presenting 96.3% and 97.3%, while Q8SX2 presented 93.5% and 96%, and Q5, 87% and 82.6%, respectively. Furthermore, Q8 was able to identify asymptomatic dogs, 93.7%, without presenting false positive results and without cross-reactivity with cutaneous leishmaniasis. Furthermore, Q8 demonstrated satisfactory results in the ELISA assay using protein A for both humans and dogs. Therefore, this new antigen has potential for the diagnosis of dogs and humans affected with VL, and could be a viable alternative to the tests currently recommended in Brazil.

Keywords: Visceral Leishmaniasis; Diagnosis; Recombinant Chimeric Protein; ELISA.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

TESE

Figura 1 -	Ciclo de vida da <i>Leishmania</i> spp. nas Américas.	20
Figura 2 -	Dados epidemiológicos sobre a Leishmaniose Visceral no Brasil.	24
Figura 3 -	Interação entre as respostas Th1 e Th2 frente a infecção por <i>Leishmania infantum</i> .	27
Figura 4 -	Marcadores de resistência e suscetibilidade na Leishmaniose Visceral Canina.	28
Figura 5 -	Fluxograma do diagnóstico da Leishmaniose visceral humana na atenção primária.	33

ARTIGO I - Potencial diagnóstico para detecção da leishmaniose visceral canina em um ensaio de ELISA baseado na proteína quimérica recombinante Q5. Uma avaliação comparativa em larga escala usando soros de cães positivos na Plataforma de duplo percurso (DPP)

Figura 1 -	Fluxograma detalhando o número de amostras testadas em cada teste.	54
Figura 2 -	Avaliação da Q5-8M recombinante com um grande conjunto de soros de cães positivos para LV.	58
Figura 3 -	Avaliação comparativa de um segundo lote da proteína quimérica Q5.	61
Figura 4 -	Avaliação da proteína recombinante Lci13 para diagnóstico de LVC.	63

ARTIGO II - Desempenho aprimorado no teste de ELISA de uma nova proteína quimérica recombinante (Q8) baseada em epítomos imunogênicos de proteínas da *Leishmania infantum* com potencial para o sorodiagnóstico da leishmaniose visceral canina e humana

Figura 1 -	Avaliação dos domínios antigênicos e representação esquemática do gene quimérico Q5.	86
Figura 2 -	Fluxograma mostrando as etapas realizadas para predição dos epítomos com as proteínas Lci5 e Lci13.	88
Figura 3 -	Avaliação dos domínios antigênicos e representação esquemática do novo gene quimérico.	90
Figura 4 -	Gel SDS-PAGE mostrando a expressão da Q8 e sua variante Q8 SX2 produzidas.	91
Figura 5A -	Gráfico da purificação por afinidade da proteína Q8 em uma coluna de níquel no aparelho Akta e gel SDS-PAGE mostrando a expressão da Q8.	92
Figura 5B -	Gráfico da purificação por afinidade da proteína Q8SX2 em uma coluna de níquel no aparelho Akta e gel SDS-PAGE mostrando a expressão da Q8.	92
Figura 6 -	Ensaio sorológico empregando os antígenos quiméricos recombinantes.	94
Figura 7 -	Desempenho diagnóstico dos antígenos quiméricos recombinantes no ELISA.	96
Figura 8 -	Ensaio sorológico empregando os antígenos quiméricos recombinantes.	98
Figura 9 -	Desempenho diagnóstico dos antígenos quiméricos recombinantes no ELISA.	100
Figura 10 -	Avaliação da reatividade cruzada empregando os antígenos quiméricos recombinantes.	102
Figura 11 -	Ensaio sorológico com a Q8 usando diferentes conjugados.	103
Figura 12 -	Diagrama de correlação das amostras de soros com Proteína A e conjugado anti- IgG no ELISA.	104

LISTA DE TABELAS

TESE

- Tabela 1 - Testes sorológicos utilizados para diagnóstico da LVH. 34
- Tabela 2 - Testes sorológicos utilizados para diagnóstico da LVC. 35
- Tabela 3 - Perfil de especificidade e sensibilidade do teste ELISA para LVC 36 considerando o tipo de antígeno empregado, de acordo com a literatura pesquisada.

ARTIGO I - Potencial diagnóstico para detecção da leishmaniose visceral canina em um ensaio de ELISA baseado na proteína quimérica recombinante Q5. Uma avaliação comparativa em larga escala usando soros de cães positivos na Plataforma de duplo percurso (DPP)

- Tabela 1 - Distribuição das características clínicas e ambientais dos animais 57 cujos soros foram aqui avaliados.
- Tabela 2 - Avaliação da sensibilidade, especificidade, acurácia e índice 58 kappa do teste LVC Q5, com a proteína quimérica Q5, em comparação com o EIE-LVC, e avaliando todo o conjunto de soros positivos no DPP avaliados e apenas aqueles dos grupos sintomáticos e assintomáticos.
- Tabela 3 - Comparação dos ELISAs Q5 (8M), Q5 (2M) e EIE-LVC, 61 mostrando o número de amostras positivas e negativas derivadas de cada teste.

ARTIGO II - Desempenho aprimorado no teste de ELISA de uma nova proteína quimérica recombinante (Q8) baseada em epítomos imunogênicos de proteínas da *Leishmania infantum* com potencial para o sorodiagnóstico da leishmaniose visceral canina e humana

- Tabela 1 - Amostras de soro canino usadas nesse estudo. 95
- Tabela 2 - Amostras de soro humano usadas neste estudo. 99

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Aids	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i> - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
CF	Citometria de fluxo
DAT	<i>Direct Agglutination Test</i> - Teste de Aglutinação direta
DPP	<i>Dual Path Plataform</i> - Plataforma de duplo percurso
ELISA	<i>Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay</i> - Ensaio imunoenzimático indireto
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i> - Vírus da Imunodeficiência Humana
HLA	<i>Human Leucocyte Antigen</i> - Antígeno leucocitário humano
IFI	Imunofluorescência indireta
IFN	Interferon
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
iNOS	Óxido Nítrico Sintase Induzida
IPTG	Isopropil-tio- β -D-galactopiranosídeo
kDa	KiloDalton
LB	Luria Bertani
LMW	<i>Low molecular weight marker</i> – Marcador de baixo peso molecular
LV	Leishmaniose Visceral
LVC	Leishmaniose Visceral Canina
LVH	Leishmaniose Visceral Humana
LM	Leishmaniose Mucocutânea

LT	Leishmaniose Tegumentar ou Cutânea
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i> - Complexo de Histocompatibilidade
OMS	Organização Mundial da Saúde
ON	Óxido nítrico
OPD	Orthophenilenediamino
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cell</i> - Célula mononuclear do sangue periférico
PBS	Tampão Fosfato Salino
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> - Reação em cadeia da polimerase
RDT	<i>Rapid Diagnostic Test</i> - Teste de Diagnóstico rápido
Rpm	Rotações por minuto
ROC	<i>Relative Operating Characteristics Curve</i> - Características operacionais relativas
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate- Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i> Dodecil sulfato de sódio- Eletroforese em gel de poliacrilamida
Th1	Linfócito T Auxiliar tipo 1
Th2	Linfócito T Auxiliar tipo 2
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i> - Fator de Necrose Tumoral
Treg	T reguladoras

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrometro
µM	Micromolar
g	Gramma
H	Hora
Kb	Kilobase
KDa	Kilodalton
L	Litro
Mg	Miligrana
Mg ²⁺	Íons de magnésio
Min	Minutos
mL	Mililitro
mM	Milimolar
ng	Nanograma
Nº	Número
°C	Graus Celsius
pH	Potencial hidrogeniônico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REFERÊNCIAL TEÓRICO	19
2.1 A LEISHMANIOSE VISCERAL- ASPECTO GERAIS.....	19
2.2 EPIDEMIOLOGIA.....	21
2.2.1 Epidemiologia da Leishmaniose Visceral no Brasil	22
2.3 IMUNOPATOGENESE DA LEISHMANIOSE VISCERAL	25
2.4 DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL.....	28
2.4.1 Diagnóstico parasitológico	29
2.4.2 Diagnóstico molecular	30
2.4.3 Diagnóstico imunológico	31
2.4.4 Métodos de diagnóstico recomendados para LVH no Brasil	32
2.4.5 Métodos de diagnóstico recomendados para LVC no Brasil	34
2.5 PROTEÍNAS RECOMBINANTES UTILIZADAS NO IMUNODIAGNÓSTICO DA LV.....	37
2.6 FUNDAMENTO PARA O PRESENTE TRABALHO	40
2 HIPOTESE	42
3 OBJETIVOS	43
3.1 OBJETIVO GERAL	43
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
4 ARTIGO I	44
5 ARTIGO 2	72
6 DISCUSSÃO GERAL	122

7 CONCLUSÕES	126
REFERÊNCIAS.....	127
APÊNDICES	138
ANEXOS	139
ANEXO I.....	139

1 INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Visceral (LV) é a forma mais grave dentre as leishmanioses e aquela considerada potencialmente fatal, se não propriamente diagnosticada e tratada. No Brasil, a LV é uma zoonose causada pelo parasita *Leishmania infantum*, tendo os cães domésticos como principais reservatórios em áreas urbanas (BRASIL, 2022). A ausência de um diagnóstico eficiente e confiável para LV é um dos principais desafios para o seu monitoramento e controle. Embora avanços promissores tenham sido alcançados com a pesquisa de antígenos recombinantes de *Leishmania* testados como ferramentas para melhoria no diagnóstico da LV, os métodos atualmente disponíveis baseiam-se principalmente no exame direto dos tecidos para identificação da presença do parasita, um procedimento altamente invasivo (FARAHMAND; NAHREVANIAN, 2016).

Entre os métodos diagnósticos disponíveis para a LV, os ensaios sorológicos oferecem várias vantagens, incluindo baixo custo, facilidade de manuseio, alta rapidez e ausência de robustos equipamentos. Dos testes sorológicos utilizados atualmente, o ensaio imunoenzimático indireto (ELISA) e o teste de diagnóstico rápido (RDT) se destacam por apresentarem eficiência quando se utilizam antígenos recombinantes e podem ser facilmente adaptados para uso com diversos antígenos, permitindo assim infinitas possibilidades de combinações. Os ensaios de ELISA e RDT utilizando antígenos quiméricos, contendo múltiplos epítomos, têm apresentado resultados promissores no diagnóstico da LV (TRAVI et al., 2018; BRAZ et al., 2020).

Em trabalhos que precederam este estudo, foram identificados antígenos de *Leishmania* com potencial para melhorar o diagnóstico sorológico de cães e humanos com LV (OLIVEIRA et al., 2011; MAGALHÃES et al., 2017). Utilizando ferramentas de desenho *in silico* de genes, de síntese química e de expressão de proteínas recombinantes, uma proteína quimérica recombinante foi então desenvolvida (Q5), baseada em três dos antígenos de melhor desempenho para o diagnóstico da LV humana ou canina (Lci2, Lci3 e Lci12). Resultados preliminares obtidos com a Q5 no ELISA mostraram bons níveis de sensibilidade, em humanos (82%) e cães (100%), com 100% de especificidade em comparação com controles

saudáveis (SANTOS et al., 2020). O presente trabalho se iniciou com uma nova avaliação da Q5 no ELISA, usando um número maior de soros caninos. Em comparação com testes recomendados no Brasil, os resultados confirmaram um desempenho equivalente no ELISA para animais sintomáticos (92%), porém, não tão eficiente em cães assintomáticos (62%) (PAZ et al., 2023).

Buscando aumentar a sensibilidade e especificidade dos testes sorológicos para LV, surgiu a ideia do desenvolvimento de uma nova proteína quimérica, denominada Q8, com potencial ainda maior para o diagnóstico da LV canina e humana. A proteína Q8 é composta por fragmentos da proteína quimérica Q5, mas com modificações em sua sequência e adição de sequências de dois novos antígenos, Lci5 e Lci13, escolhidos estrategicamente para aumentar a capacidade de detecção da doença (MAGALHÃES et al., 2017; BORJA et al., 2018). Os resultados sugerem que a Q8 é capaz de detectar a doença em cães e humanos, com valores de sensibilidade ainda melhores do que a sua precedente (Q5), e uma especificidade de 100%. A Q8 identificou (100%) dos cães sintomáticos testados, (93,75%) dos assintomáticos e (97,3%) de humanos com LV. Além disso, a Q8 no ensaio de ELISA realizado com a proteína A foi capaz de identificar satisfatoriamente os soros tanto de cães assintomáticos (92,8%) quanto de humanos (100%) com LV. Isso sugere que a utilização da proteína A, um único conjugado, pode ser uma opção viável para detecção da doença em ambos os grupos.

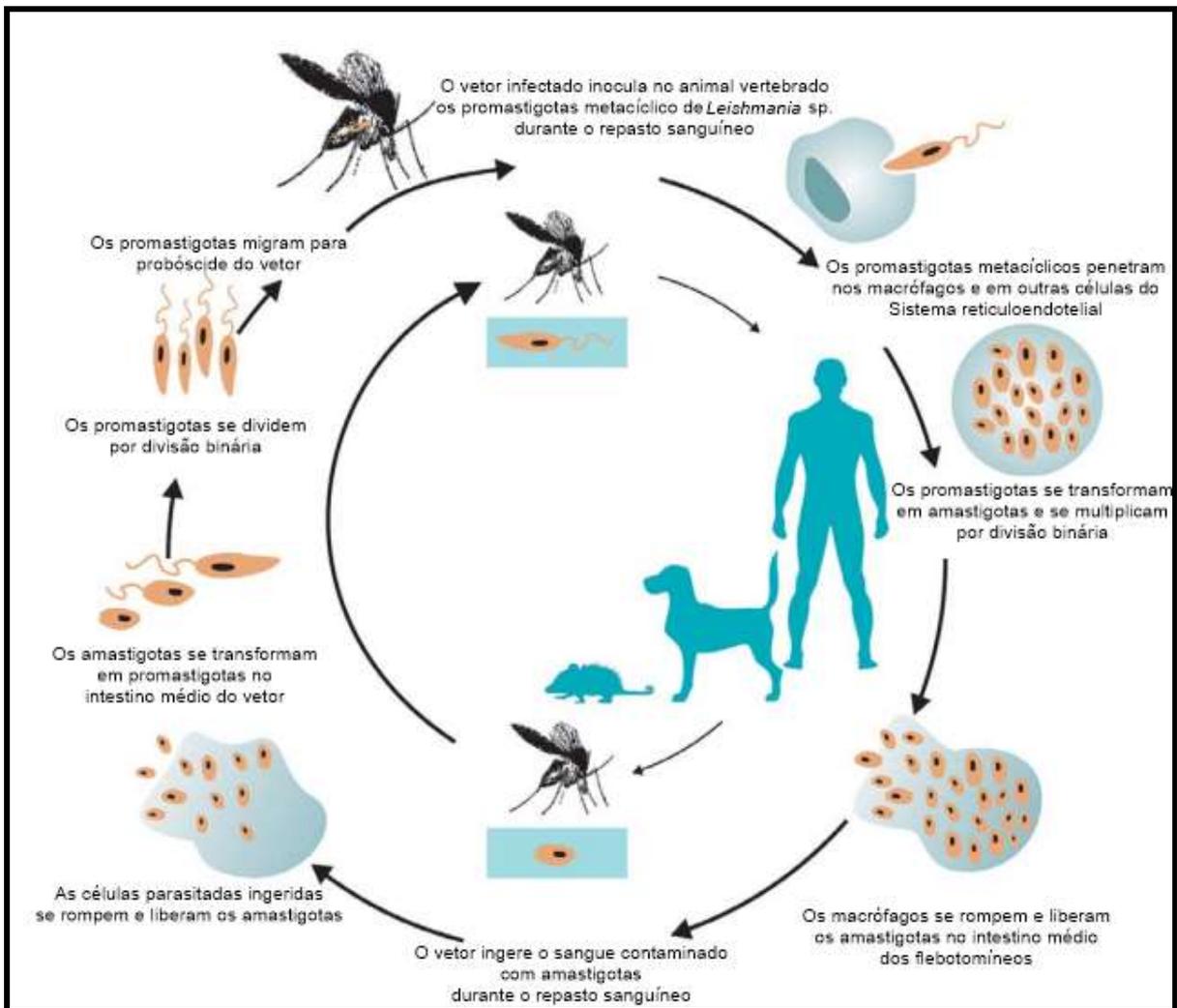
2 REFERÊNCIAL TEÓRICO

2.1 A LEISHMANIOSE VISCERAL- ASPECTO GERAIS

As leishmanioses, nas suas formas tegumentar e visceral, foram identificadas como doenças de alta prioridade pela Organização Mundial da Saúde (OMS), pela sua alta incidência em populações menos favorecidas. No caso da sua forma mais grave, a leishmaniose visceral (LV), o agente causador é a *Leishmania infantum*, um protozoário pertencente ao complexo *L. donovani* da ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae (BANETH et al. 2008; WHO, 2010). A transmissão da LV, e de outras leishmanioses, ocorre através da picada de fêmeas de flebotomíneos, insetos dípteros pertencente aos gêneros *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo (Américas). Estes insetos, de 2 a 3 milímetros de comprimento, são encontrados em todas as regiões intertropicais e temperadas do mundo. A fêmea do flebotomíneo é o único vetor responsável pela transmissão da grande maioria das leishmanioses. Fêmeas infectadas com o parasita tendem a sondar várias vezes o mesmo hospedeiro, um método adaptativo que aumenta a transmissão (READY, 2013; PACE, 2014).

Duas formas morfológicas, principais, são identificadas no ciclo de vida digenético da *Leishmania*: promastigota - flagelada, extracelular, de 15 a 20 µm de comprimento e encontrada no flebotomíneo; e amastigota - não flagelada, intracelular obrigatória, de 3 a 5 µm de comprimento e encontrada em células da linhagem monócito-macrófago do hospedeiro mamífero (Figura 1). A transmissão zoonótica ocorre em ciclos domésticos, nos quais o cão é o principal reservatório (HOMMEL, 1999; BATES, 2008; PACE, 2014).

FIGURA 1 - Ciclo de vida da *Leishmania* spp. nas Américas.



Fonte: Adaptado de OPAS, 2019.

As leishmanioses que afetam o homem podem ter padrões de transmissão zoonótico ou antroponótico. As formas zoonóticas predominam, como consequência da ampla gama de hospedeiros que são fonte de alimentos para os flebotomíneos vetores, incluindo canídeos, roedores, marsupiais. Algumas espécies de vetor, entretanto, alimentam-se principalmente de humanos. As leishmanioses provocadas pelas *Leishmania donovani* e *Leishmania tropica* tem um caráter maior antroponótico, embora haja alguma evidência de que existam reservatórios animais para ambas as espécies na África e na Ásia (MAROLI et al., 2013; STEVERDING, 2017).

A maioria dos indivíduos e animais infectados pelas diferentes espécies de *Leishmania* não desenvolve sintomas. Quando presente, entretanto, a doença pode

seguir para três formas clínicas distintas em humanos: cutânea ou tegumentar, mucocutânea e visceral. Já em animais são observadas apenas as formas cutânea e/ou visceral (IKEDA-GARCIA et al., 2010). A forma mais grave é a leishmaniose visceral (LV), provocada no continente americano pela *Leishmania infantum* e onde o cão (*Canis familiaris*) serve como principal reservatório doméstico, apresentando um espectro clínico diversificado. Embora o cão seja o hospedeiro vertebrado mais importante e o principal reservatório da LV humana, várias espécies de mamíferos silvestres são suscetíveis a infecção por *L. infantum* (SOUZA et al., 2014; GONÇALVES et al., 2019).

Devido ao crescente número de casos de leishmanioses nos últimos anos em todo o mundo, dois fatores são descritos por contribuírem para a sua disseminação para áreas não endêmicas: a globalização e as mudanças climáticas (SHAW, 2007). Historicamente, a situação epidemiológica das leishmanioses, bem como a distribuição das espécies de *Leishmania*, varia, em países com diferentes características geográficas, socioeconômicas, ambientais e ecológicas. Uma vez estabelecida em uma nova área, a doença torna-se endêmica e seu controle tem se mostrado bastante desafiador (HAKKOUR et al., 2020).

2.2 EPIDEMIOLOGIA

As leishmanioses continuam a se espalhar por todo o mundo e, em janeiro de 2020, o Programa Global de Leishmaniose da OMS declarou 56 países como endêmicos para LV (WHO, 2021). Hoje, mais de 1 bilhão de pessoas vivem em áreas endêmicas para doença e estima-se que de 50.000 a 90.000 mil novos casos ocorram anualmente em todo mundo. Apesar disso, apenas 25 a 45% dos casos são notificados à OMS. Mesmo com os avanços científicos, o diagnóstico preciso da LV continua ainda sendo um desafio. Estima-se que 12 milhões de pessoas estejam atualmente infectadas e cerca de 2 milhões de infecções ocorram a cada ano (WHO, 2022).

Devido à proximidade da Europa com o Oriente Médio, Norte da África, Ásia Central e Turquia, estas regiões têm sido consideradas fontes de disseminação da LV humana (LVH) para países da Europa, e em todos os territórios onde ocorre a LV

humana observa-se a presença da LV canina (LVC) (AGAYEV et al., 2020). Nos países do sul da Europa, a soroprevalência da LVC atinge níveis altos, podendo ser considerada endêmica em quase todo o território da Espanha (MARTÍN-SÁNCHEZ et al., 2020). Uma pesquisa realizada na Itália entre 2016 e 2019, com 660 cavalos aparentemente saudáveis, detectou uma predominância de *L. infantum* em 13,9% nas populações equinas investigadas, destacando a necessidade de novos estudos para esclarecer o papel desses hospedeiros na epidemiologia da LV na Itália (GAZZONIS et al., 2020).

Em outros países da Europa, como Portugal e França as pesquisas epidemiológicas mostraram padrões variados. Em Portugal, a LVH é hipoendêmica, apresentando uma taxa de incidência de 0,1 casos por 100.000 habitantes em 2017. Por outro lado, a LVC é considerada uma preocupação veterinária relevante e está presente em todo país com distribuição heterogênea. Em janeiro de 2021, foi realizado um estudo transversal com 1860 cães e observada uma soroprevalência para infecção por *Leishmania* de 12,5% (ALMEIDA et al., 2022). Na França, o Ministério da Saúde francês apoiou a criação do Centro Nacional de Referência para Leishmanioses (NRCL) em 1998 em Montpellier. Mesmo assim, em 2021, foi confirmado a crescente incidência e expansão geográfica da LVC na França, despertando intervenções preventivas nas políticas de saúde pública e veterinária (LE RUTTE et al., 2021).

A LVC foi identificada nos Estados Unidos- EUA na década de 1980, e desde então, foram descritos vários relatos de transmissão vertical. Em 2021, aconteceu o primeiro relato de leishmaniose canina no norte da Califórnia (ALONSO et al., 2021), mas a infecção canina por *L. infantum* já foi documentada em 28 estados, a maioria dos quais na parte leste do país. Mesmo assim, na maior parte dos EUA, as leishmanioses são consideradas raras, diferente de outras partes das Américas (PETERSEN, 2009).

2.2.1 Epidemiologia da Leishmaniose Visceral no Brasil

Em 1913, foi descrito o primeiro caso de LV em material de necrópsia de um paciente oriundo de Boa Esperança, Mato Grosso. Em 1934, 41 casos positivos para

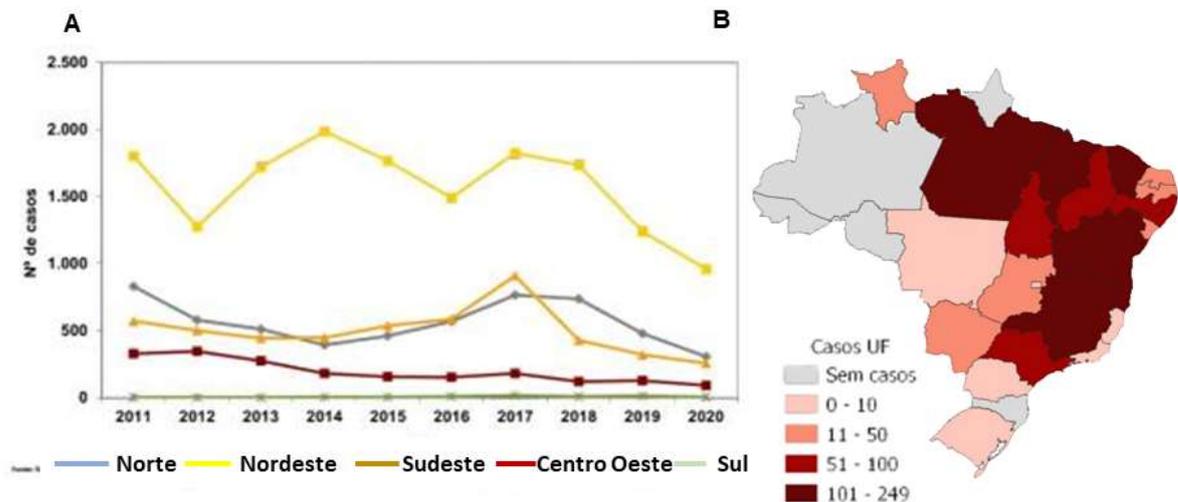
Leishmania foram identificados em lâminas de viscerotomias praticadas *post-mortem*, em indivíduos oriundos das Regiões Norte e Nordeste, com suspeita de febre amarela (PENAA et al., 1943; ALENCAR et al., 1991). Desde então, a transmissão da doença vem sendo descrita em vários municípios brasileiros, apresentando mudanças no padrão de transmissão, inicialmente apresentando um caráter rural e mais recentemente se expandindo para centros urbanos. Na atualidade, a LV está descrita em pelo menos 12 países no continente americano e 90% dos casos registrados na América Latina ocorrem no Brasil (WHO, 2022). É importante ressaltar que, a subnotificação é um desafio para a compreensão dos fatores relacionados a propagação da LV, incluindo o atraso na procura por atendimento de saúde e o atraso ou falha no diagnóstico da doença (MACHADO et al., 2023).

Segundo o Ministério da Saúde, em 31 anos de notificação (1990-2021), os casos confirmados de LV somaram 97.230 casos, sendo a Região Nordeste a mais endêmica para doença, seguida da Região Norte. A maior taxa de letalidade de LV foi entre os anos 2016 e 2020, e aproximadamente 48,8% dos casos fatais ocorreram na Região Nordeste. A doença é mais prevalente em adultos com faixa etária de 35 a 49 anos. Entre os casos registrados em 2021 (n= 419), o sexo masculino foi o mais afetado (n= 326) (BRASIL, 2022). É importante ressaltar que a doença afeta principalmente pessoas vulneráveis, com mais de 80% dos indivíduos vivendo abaixo do limiar de pobreza, cuja fonte de renda é a agricultura e/ou pecuária (SUNDAR; SINGH, 2018).

Os dados epidemiológicos dos últimos anos revelam a urbanização da LV, com as Regiões Nordeste, Norte, Sudeste, Centro Oeste e Sul classificadas em ordem decrescente de incidência (Figura 2). No estado do Ceará, considerado endêmico para LVH, observou-se surtos da doença em 147 municípios focos de transmissão, classificando-se como área de alto risco de propagação da LV e tendo se destacado no cenário nacional como área de interesse para estudos epidemiológicos (CAVALCANTI et al., 2022). Assim como outros estados da Região Nordeste, a LV é historicamente endêmica no estado de Pernambuco. De acordo com dados obtidos da Coordenação de Zoonoses da Secretaria de Vigilância em Saúde do Estado de Pernambuco (SUS, 2020), foram identificados 1.410 casos de

LV entre 2007 e 2018, com média de 128 casos por ano e incidência média de 1,28/100 mil pessoas.

FIGURA 2 - Dados epidemiológicos sobre a Leishmaniose Visceral no Brasil. A: mostrando que a região Nordeste é a mais acometida com a doença. B: mostrando a distribuição da LV nos estados no ano de 2020.



Fonte: SVS/MS, 2021.

Estudos prévios demonstraram que a presença do vetor e a infecção canina precedem os casos humanos, justificando a necessidade de identificação dos cães infectados (SILVA et al., 2021). Pesquisas em diferentes áreas endêmicas no Brasil, relataram a prevalência da doença em cães com incidência variando entre 11,2 e 19,6%. Nos últimos anos, cerca de dois milhões de cães foram triados e mais de 160.000 cães soropositivos foram abatidos, mas a incidência de LV humana não foi reduzida a um nível aceitável (REIS et al., 2009; DANTAS-TORRES et al., 2020).

A principal estratégia adotada para conter a LV é a controversa eutanásia de cães com sorologia confirmatória para LVC. Há uma alta prevalência de cães assintomáticos nas regiões endêmicas, favorecendo a disseminação de *L. infantum* na população canina e tornando a detecção precoce desses portadores assintomáticos crucial para a redução do número de casos (MORALES-YUSTE; MARTÍN-SÁNCHEZ; CORPAS-LOPEZ, 2022). Em geral, a prevalência de LVC varia muito em diferentes regiões do Brasil. Em particular, no interior do estado de

Pernambuco, o município de Petrolina, é considerado um importante foco de incidência de cães com LV (PIMENTEL et al., 2015).

Em áreas endêmicas, o papel dos felinos como hospedeiro para LV deve ser avaliado e pode ser importante, considerando que alguns estudos demonstraram que os gatos podem abrigar o parasita sem manifestações clínicas e que os vetores podem se infectar alimentando-se desses animais infectados, mesmo na ausência de sinais clínicos (AFONSO et al., 2012; CHATZIS et al., 2014; ROCHA et al., 2019). A prevalência de *L. infantum* em gatos varia de 7% a 30% em diferentes estudos no mundo, incluindo Brasil e países europeus (ASFARAM; FAKHAR; TESHNIZI, 2019). A predominância estimada de leishmaniose felina (FeL) no Brasil é de 8%, sendo *L. infantum* a espécie mais prevalente. No entanto, infecções por *Leishmania braziliensis* e *Leishmania amazonenses* também foram relatados (COSTA-VAL et al., 2020; NASCIMENTO et al., 2022).

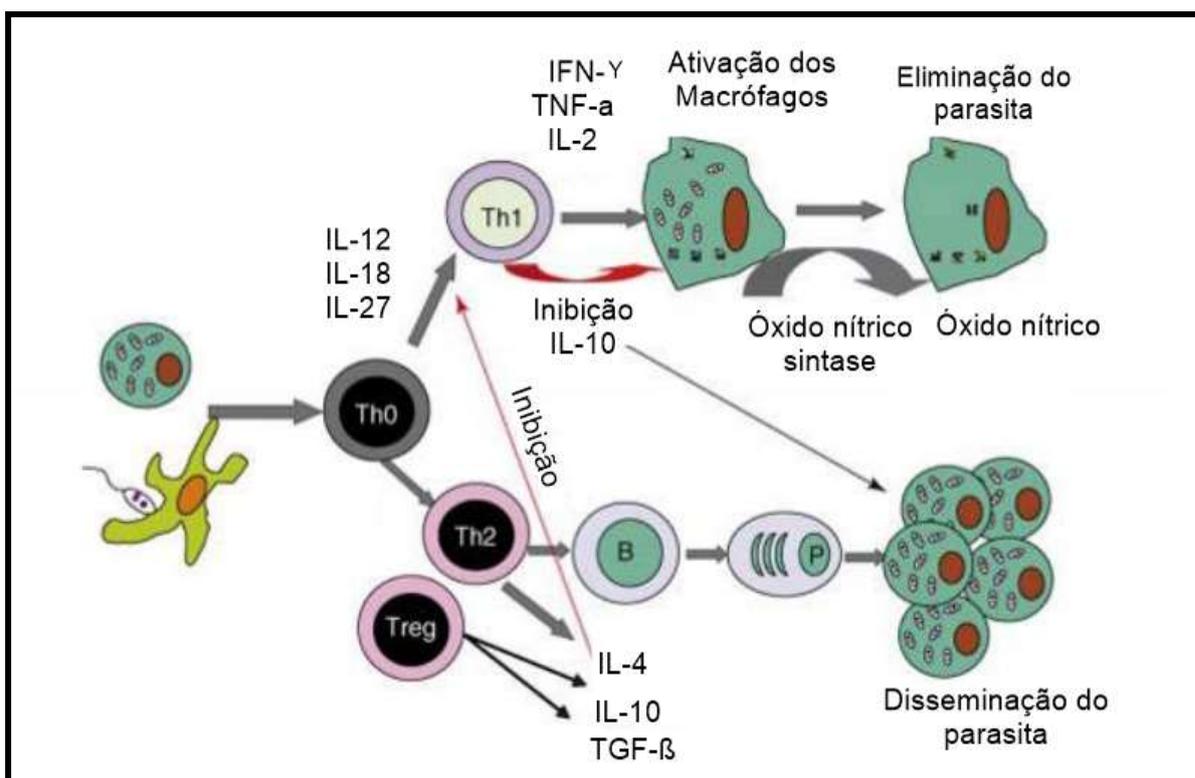
2.3 IMUNOPATOGENESE DA LEISHMANIOSE VISCERAL

A inoculação de formas promastigotas metacíclicas, as formas infectantes de diferentes espécies de *Leishmania*, na derme do hospedeiro, através da picada do vetor flebotomíneo, promove o estabelecimento e disseminação da infecção (DOS SANTOS MEIRA; GEDAMU, 2019). Estas formas metacíclicas são engolfadas pelos macrófagos e posteriormente se diferenciam em amastigotas e se multiplicam dentro dos fagolisossomos. Os neutrófilos e macrófagos servem como reservatórios para *Leishmania* e têm papéis importantes na capacidade do sistema imunológico de destruir ou levar ao avanço da doença. Para sobreviver o parasita precisa evitar a ativação de macrófagos e reconhecimento por células T (NYLÉN; GAUTAM, 2010; TOEPP; PETERSEN, 2020). Durante a defesa inata, uma das principais células associadas a atividade anti-*Leishmania* são os macrófagos, via metabolismo de óxido nítrico (NO). Os macrófagos são ativados pelo Fator de Necrose Tumoral (TNF) e Interferon-gama (iFN- γ) por meio da expressão da enzima Óxido Nítrico Sintase Induzida (iNOS). Essa enzima promove o aumento da produção de NO e

espécies reativas de oxigênio em macrófagos, resultando na morte do parasito (HOLZMULLER; BRAS-GONÇALVES; LEMESRE, 2006; NYLÉN; GAUTAM, 2010).

A resposta imune adaptativa envolve células B, responsáveis pela produção de anticorpos específicos, e células T que reconhecem antígenos peptídicos. A resposta da célula T é mediada por células T citotóxica CD8⁺, que reconhecem peptídeos apresentados por moléculas do complexo principal de histocompatibilidade de classe I (MHC I) na superfície celular ou células T CD4⁺ que reconhecem peptídeos ou antígenos fagocitados, então apresentados a moléculas de MCH II (SINGH; SUNDAR, 2014). A infecção por *Leishmania* resulta em interações complexas entre a resposta imune do hospedeiro e o parasita. Os indivíduos assintomáticos têm sua resposta imune caracterizada por uma resposta de células T contra a *Leishmania*. Já os indivíduos acometidos pela LV, com sintomas clínicos, apresentam comprometimento da produção de IL-2, IFN- γ e IL-12, por meio de células T específicas. Também apresentam elevação de mediadores anti-inflamatórios como a IL-10, que auxiliam na multiplicação do parasito e podem interferir no controle da infecção (Figura 3) (MAIA; CAMPINO, 2011; RODRIGUES et al., 2016). A progressão da doença está então associada ao papel das citocinas ligadas à resposta imune do tipo Th2 na resposta imune humoral, como por exemplo: interleucina-4 (IL-4), interleucina-5 (IL-5), interleucina-10 (IL-10), interleucina-13 (IL-13) e o fator de transformação do crescimento beta (TGF- β) (SOLANO-GALLEGO et al., 2016). Em cães, entretanto, a IL-10, importante citocina reguladora, parece desempenhar um papel muito menos relevante na supressão da imunidade celular na LVC em comparação com a doença em humanos (PAPADOGIANNAKIS; KOUTINAS, 2015).

FIGURA 3 - Interação entre as respostas Th1 e Th2 frente a infecção por *Leishmania infantum*.



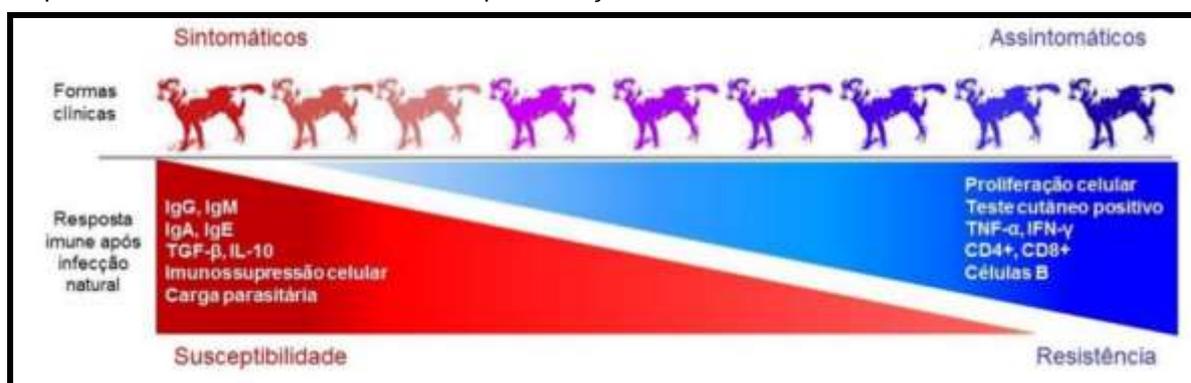
Fonte: Adaptado de Guia de Bolso Leishmaniose Visceral, Comissão Nacional de Saúde Pública Veterinária– 1. ed., – Brasília - DF: CFMV, 2020.

A persistência do patógeno em estabelecer a infecção crônica envolve ainda células T reguladoras (Treg), $CD4^+$ e $CD25^+$ que suprimem a imunidade do hospedeiro (Campanelli et al. 2006). Rodrigues et al. 2009, confirmaram a presença e expansão de células T $CD4^+$, $CD25^+$, $CD103^+$ expressando o gene *Foxp 3* em locais com infecção por *L. infantum*. Os achados deste estudo sugerem que os parasitas podem estar usando a função Treg ao seu favor, promovendo assim sua própria sobrevivência dentro do hospedeiro, suprimindo a imunidade do hospedeiro e controlando respostas imunes efetoras excessivas (RODRIGUES et al., 2009).

O papel protetor de Th17 nos casos de leishmaniose visceral foi evidenciado pela primeira vez, a partir da queda na produção desta citocina em culturas de células mononucleares do sangue periférico (PBMC, do inglês *peripheral blood mononuclear cell*) de indivíduos infectados. Após cura e acompanhamento longitudinal destes indivíduos, suas PBMCs induziram fortemente a produção de IL-17 e IL-23, o que sugere que a IL-17 está associada à eliminação do parasita (PITTA et al., 2009; KHATONIER et al., 2021).

A ausência de uma resposta adequada das células T para controlar o parasita leva ao aparecimento de sintomas clínicos e progressão da doença, como descrito acima. Os cães sintomáticos apresentam infiltrados inflamatórios dérmicos com alto parasitismo e uma resposta imune mista nos tecidos cutâneos (MENEZES-SOUZA et al., 2011). Um acúmulo predominante de IL-10 e uma alta expressão do TGF- β foi observada em animais com alto parasitismo (LAGE et al., 2007). Os animais que permanecem assintomáticos, apresentam um baixo parasitismo, e um aumento na expressão de IFN- γ por células T específicas de *Leishmania*. Estudos revelaram uma predominância IFN- γ na ativação de macrófagos em colaboração com o TNF- α , atuando na estimulação da atividade leishmanicida para controlar a disseminação do parasita (MANNA et al., 2006). Na figura 4, estão descritos os principais biomarcadores de resistência e susceptibilidade na leishmaniose canina.

FIGURA 4 - Marcadores de resistência e susceptibilidade na Leishmaniose Visceral Canina. A suscetibilidade e resistência ao desenvolvimento da Leishmaniose Visceral Canina dependem da resposta imune desencadeada no cão após infecção natural.



Fonte: Adaptado de Reis et al., 2010.

2.4 DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL

A leishmaniose visceral, também conhecida como calazar, afeta órgãos internos como o baço e o fígado, além da medula óssea. As características clínicas da LV podem simular uma variedade de outras infecções, e o aparecimento de uma diversidade de manifestações clínicas é necessário para um diagnóstico clínico preciso. A doença deve ser suspeitada quando o indivíduo apresentar: febre (94%),

aumento do baço (75%) e pancitopenia (85%). Nos cães é uma patologia sistêmica severa, apresentando sinais e sintomas persistentes que incluem fadiga, fraqueza, alopecia, lesões cutâneas, principalmente descamações e eczema, apatia, diarreia, e na fase final, caquexia e morte (MURRAY et al., 2005; SAFAVI; ESHAGHI; HAJIHASSANI, 2021).

A classificação segundo os sinais clínicos apresentados nesses animais, de acordo com MANCIANTI et al., 1988, pode ser verificada conforme demonstrado a seguir:

- Cães assintomáticos = ausência de sinais clínicos sugestivos da infecção por *Leishmania*;
- Cães oligossintomáticos = presença de adenopatia linfóide, pequena perda de peso e pelo opaco;
- Cães sintomáticos = todos ou alguns sinais mais comuns da doença como as alterações cutâneas (alopecia, eczema furfuráceo, úlceras, hiperqueratose), onicogribose, emagrecimento, ceratoconjuntivite e paresia dos membros inferiores.

Uma variedade de métodos tem sido usada no diagnóstico da LV, cada um com diferentes aplicações e sensibilidades. O diagnóstico específico pode ser realizado por meio de técnicas parasitológicas, moleculares e sorológicas, embora o diagnóstico definitivo ainda se apoie em métodos parasitológicos. A importância de um diagnóstico preciso se faz necessário para orientar qual tipo de tratamento será realizado e é o primeiro passo para controle da disseminação da LV (SAFAVI; ESHAGHI; HAJIHASSANI, 2021).

2.4.1 Diagnóstico parasitológico

O padrão-ouro para o diagnóstico da LV continua sendo a demonstração da forma amastigota do parasita por meio de cultura ou microscopia de tecido aspirado do baço, medula óssea ou linfonodos. A técnica é específica pois é capaz de detectar a carga parasitária e fornece indicação mais clara sobre a infecção, contudo, a sensibilidade da técnica depende da amostra utilizada, sendo maior para

baço (93-99%) do que aspirados de medula óssea (53-86%) ou linfonodos (53-65%) (BANGERT et al., 2018). Entretanto, a ausência de parasitas na amostra de tecido ainda não indica necessariamente ausência de infecção. Um agravante é o procedimento de aspiração esplênica ser invasivo, e acarretar o risco de hemorragia interna fatal. Além disso, os resultados dependem da habilidade e conhecimento técnico do profissional durante execução da técnica, qualidade das lâminas e dos reagentes preparados, que muitas vezes não estão disponíveis (SAFAVI; ESHAGHI; HAJIHASSANI, 2021; MORALES-YUSTE; MARTÍN-SÁNCHEZ; CORPAS-LOPEZ, 2022).

2.4.2 Diagnóstico molecular

Métodos moleculares têm sido utilizados para o diagnóstico das leishmanioses desde a década de 80 (LOPES; WIRTH, 1986). Uma das técnicas mais sensíveis e específicas para o diagnóstico da infecção por *Leishmania* é a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR, do inglês, *polymerase chain reaction*) que amplifica o DNA do parasita utilizando testes comerciais que podem ser lidos visualmente sem equipamentos sofisticados (ALAM et al., 2013). O Ministério da Saúde do Brasil não recomenda as técnicas moleculares para o diagnóstico da LV, manifestando a necessidade de padronização dos ensaios de PCR e uniformidade entre os protocolos utilizados. Além disso, a sensibilidade da técnica depende da amostra biológica usada e da qualidade dos iniciadores para amplificar a sequência alvo (SCHALLIG; OSKAM, 2002; SUNDAR; SINGH, 2018).

O desenvolvimento de uma nova técnica que amplifica rapidamente o DNA alvo sob condições isotérmicas mediada por loop (LAMP, do inglês, *Loop-mediated isothermal amplification*), trouxe novas perspectivas para o diagnóstico molecular das doenças infecciosas. Até o presente momento, contudo, poucos protocolos de LAMP para o diagnóstico da leishmaniose estão descritos na literatura e não há testes comerciais disponíveis para identificação e confirmação de casos humanos e caninos com suspeita de LV (NOTOMI et al., 2000; SRIVIDYA et al., 2012; (NZELU; KATO; PETERS, 2019).

2.4.3 Diagnóstico imunológico

Os métodos imunológicos usados no diagnóstico da LV são baseados na identificação de anticorpos contra antígenos de *Leishmania* em amostras de soro de indivíduos e animais infectados. Atualmente, as principais técnicas utilizadas para o imunodiagnóstico são a Imunofluorescência Indireta (IFI Leishmaniose Humana Fiocruz), o Teste de Aglutinação Direta (DAT, do inglês “*direct agglutination test*”), o Ensaio Imunoenzimático (ELISA, do inglês “*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*”) e o Teste Rápido Imunocromatográfico de Fluxo Lateral (TR) (TRAVI et al., 2018). Em geral, essas técnicas têm a vantagem de serem minimamente invasivas e podem ser realizadas em grande número. O IFI, entretanto, requer um microscópio de fluorescência e é demorado, enquanto que o DAT tem apresentado problemas na padronização e controle na qualidade do antígeno. Já o ELISA utiliza como base extratos do parasita ou proteínas recombinantes, e tem como diferencial, a possibilidade de permitir a avaliação de combinações de múltiplos antígenos, podendo aumentar assim a sensibilidade e especificidade do método. No caso dos TRs, uma grande vantagem é que requerem quantidades mínimas de sangue periférico (até 10 µL), não apresentam necessidade de equipamentos especiais, são simples de realizar e ler, rápidos e com resultados disponíveis em 10 minutos (BRAZ et al., 2020b; MORALES-YUSTE; MARTÍN-SÁNCHEZ; CORPAS-LOPEZ, 2022).

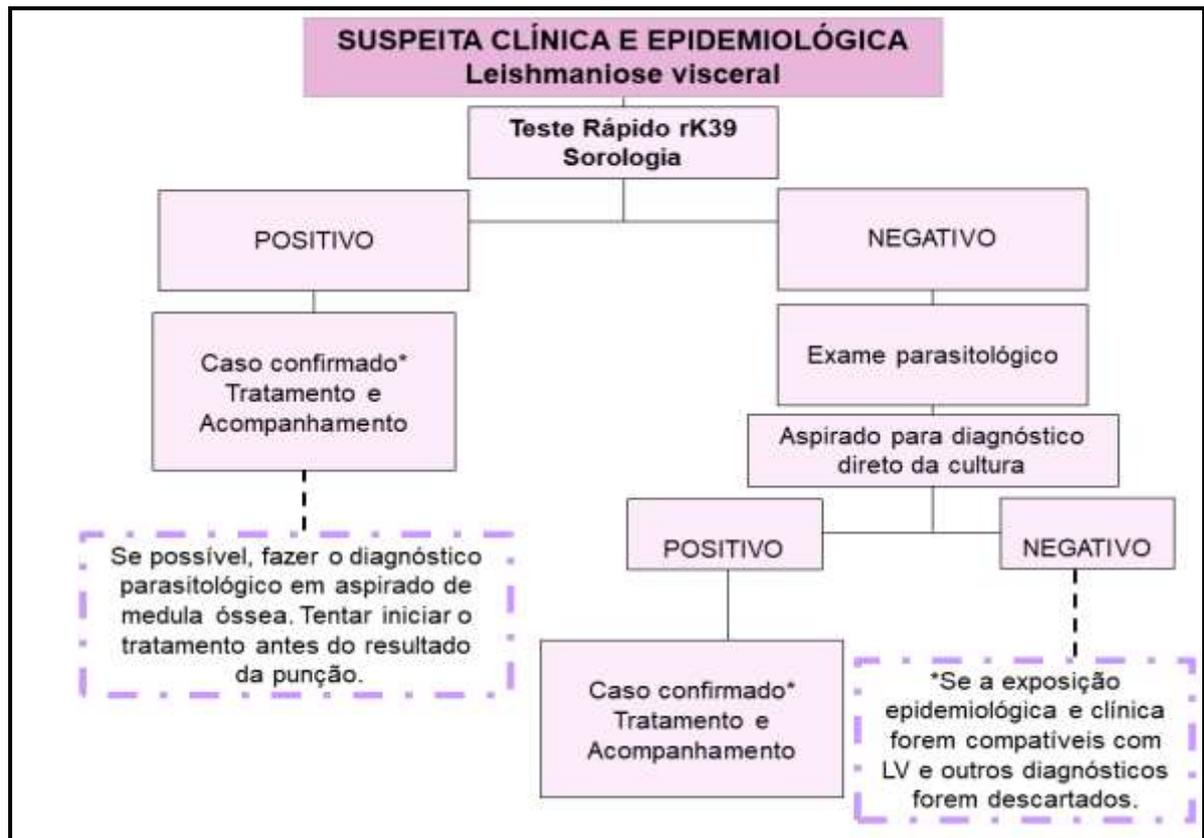
Uma das desvantagens de vários dos ensaios sorológicos disponíveis atualmente, IFI, DAT, e ELISA, é que usam antígenos brutos do parasita ou o próprio parasita na forma promastigota completo. Sua produção depende assim do crescimento do parasita em grande quantidade e de forma padronizada, para se evitar problemas de reprodutibilidade dos resultados. Além disso, apresentam alta reatividade cruzada com outras espécies de *Leishmania*, e até mesmo com espécies filogeneticamente distantes de tripanosomatídeos (PEREIRA et al., 2020). O desenvolvimento de antígenos recombinantes de *Leishmania* para diagnóstico sorológico surgiu então como uma alternativa eficaz, porque a produção de tal

antígeno acontece independentemente do crescimento do parasita, e pode ser mais padronizada e uniforme (CELESTE et al., 2014).

2.4.4 Métodos de diagnóstico recomendados para LVH no Brasil

O diagnóstico definitivo da LVH, baseia-se na identificação de anticorpos específicos anti-*Leishmania* por métodos imunológicos, ou através da detecção do parasita em material biológico por pesquisa direta, reação em cadeia da polimerase ou cultura. Os fatores a considerar para escolha do método ideal são a invasividade do método e a avaliação de indicadores clínicos no atendimento de indivíduos com leishmaniose (OPAS, 2019). Como os testes parasitológicos são bem invasivos e requerem instalações médicas e laboratoriais bem equipadas, a sorologia é o exame de eleição na Atenção Primária à Saúde para o diagnóstico laboratorial da LVH, sendo o teste rápido da rK39 o mais comumente usado em diferentes regiões. Ainda assim, nem sempre é possível diagnosticar todos os casos na Atenção Primária (Figura 5) (CLOOTS et al., 2022).

Figura 5 - Fluxograma do diagnóstico da Leishmaniose visceral humana na atenção primária.



Fonte: Adaptado de OPAS, 2019.

Recentemente, observa-se no Brasil uma redução progressiva do uso do exame parasitológico, embora o percentual desse exame invasivo foi de aproximadamente 34% dos casos de LV em 2017 (FREIRE et al., 2020). O Sistema Único de Saúde tem disponibilizado o IFI, utilizando antígeno bruto de *L. infantum*, e os RDT rK39, produzidos por Bio-Manguinhos/ Fiocruz. Ao mesmo tempo, vários outros testes comerciais baseados em ensaios de ELISA e IFI são registrados na ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária - responsável pela regulamentação e comercialização de testes diagnósticos) e são amplamente utilizados, principalmente no setor privado de saúde (BRASIL, 2018).

Na tabela 1 podemos observar os resultados de sensibilidade, especificidade, vantagens e desvantagens de cada teste utilizado para o diagnóstico da LVH.

Tabela 1 - Testes sorológicos utilizados para diagnóstico da LVH.

Teste	Antígeno	Sensibilidade	Especificidade	Limitações	Referência
DAT	Lisado bruto da <i>Leishmania</i> na forma promastigota	90–99%	88,6–98,1%	Discrepância nos resultados de rotina; Reação cruzada com outras parasitoses.	Pedras et al. 2008
IFI	Fixado da <i>Leishmania</i>	96%	98%	Equipamento especializado e profissional treinado; Reação cruzada com outras parasitoses	Pereira et al. 2020
ELISA (rK39)	rK39	94%-100%	81 - 96%	Sensibilidade variável; Diferença entre regiões.	Van Griensven and Diro 2019b
RDT (rK39)	rK39	88–94%	91–100%	Sensibilidade variável; Diferença entre regiões.	Boelaert et al. 2014
RDT (rK28)	rK28	91,0%	98,7%	Sensibilidade variável; Diferença entre regiões	Lauricella et al. 2016

Fonte: A autora (2023).

2.4.5 Métodos de diagnóstico recomendados para LVC no Brasil

O diagnóstico clínico da LVC é complexo de ser determinado devido à grande porcentagem de cães assintomáticos ou oligossintomáticos existentes. Até 2011, o Ministério da Saúde do Brasil orientava que antes da eutanásia de cães infectados, esses deveriam ser sorologicamente positivos tanto no ensaio imunoenzimático ELISA (EIE-LVC-Bio-Manguinhos) quanto no teste de imunofluorescência (IFI-LVC-Bio-Manguinhos) (Tabela 2). Todavia, ambas as metodologias empregam antígenos totais de *Leishmania major*, e apresentam variação na sensibilidade dos testes. Além de serem técnicas demoradas exigem dificuldades na sua execução, padronização e interpretação, podendo levar a uma má compreensão dos resultados, além de apresentar baixa especificidade, de ~70% (LAURENTI et al., 2014; DE SOUZA et al., 2020).

Tabela 2 - Testes sorológicos utilizados para diagnóstico da LVC.

Teste	Antígeno	Sensibilidade	Especificidade	Limitações	Referência
EIE-LVC Bio-Manguinhos	Antígenos solúveis da <i>Leishmania</i> no estágio promastigota	90,6%	77,8%	Aparelhos adequados; Depende do antígeno.	LAURENTI et al., 2014
TR DPP	rk28	90,6%	95,1%	Baixa sensibilidade com assintomáticos	LAURENTI et al., 2014
Alere™ Teste comercial	rK28	73,6%	97,8%	Falta de dados nas diferentes regiões do Brasil	RIBEIRO et al., 2019
FASTest LEISH® Teste comercial	Antígenos recombinantes; partículas de ouro coloidal	100%	99,1%	Falta de dados nas diferentes regiões do Brasil	VILLANUEVA-SAZ et al., 2019
Kalazar Detect™ Rapid Test Teste comercial	rK39	79,6%	95,7%	Falta de dados nas diferentes regiões do Brasil	RIBEIRO et al., 2019
MegaFLUO LEISH test® Teste comercial	Extrato bruto de <i>L. infantum</i> e <i>L. tropica</i>	92,4%	99,1%	Falta de dados nas diferentes regiões do Brasil	VILLANUEVA-SAZ et al., 2019
SNAP® (IDEXX Laboratories) Teste comercial	Antígenos purificados de promastigotas de <i>L. infantum</i>	96,3%	100%	Falta de dados nas diferentes regiões do Brasil	DE SOUZA et al., 2019

Fonte: A autora (2023).

Em dezembro de 2011, as orientações do Ministério da Saúde para o diagnóstico da LVC foram alteradas, indicando o uso da plataforma de duplo percurso (TR-DPP-Bio-Manguinhos) como teste de triagem, seguido pelo teste de ELISA Leishmaniose Canina (EIE-LVC) para confirmação. O TR-DPP é um ensaio imunocromatográfico rápido qualitativo, que utiliza a proteína K28 como antígeno (PATTABHI et al., 2010; LAURENTI et al., 2014). Os resultados descritos na literatura indicam que é improvável que o DPP LVC seja sensível o suficiente para detectar caninos assintomáticos com *L. infantum*, mas é eficaz para confirmar casos clinicamente suspeitos devido à sua alta sensibilidade e especificidade em cães sintomáticos (TEODORO DA COSTA et al., 2003; GRIMALDI et al., 2012).

Embora tenham sido identificados vários estudos que avaliaram as técnicas sorológicas utilizando diferentes antígenos, observa-se a falta de um teste diagnóstico preciso e reprodutível. Apesar de os testes atuais apresentarem alta sensibilidade em cães sintomáticos, eles não apresentam dados consistentes em cães assintomáticos. Lamentavelmente, a falta de um teste padrão de referência confiável, leva a eutanásia de cães infectados, o que não implica na diminuição da incidência da LVC (PEIXOTO; DE OLIVEIRA; ROMERO, 2015; SIQUEIRA et al., 2023).

Na tabela 3, observa-se a sensibilidade variável nos ensaios de ELISA a depender do antígeno utilizado.

Tabela 3 - Perfil de especificidade e sensibilidade do teste ELISA para LVC considerando o tipo de antígeno empregado, de acordo com a literatura pesquisada.

Antígeno	Cães Sintomáticos	Cães Assintomáticos	Referência
Lisado bruto de forma promastigota <i>L. infantum</i>	87,8% sensibilidade 100% especificidade	95% sensibilidade 100% especificidade	SIQUEIRA et al., 2023
rK39	100% de sensibilidade 94% especificidade	79% sensibilidade 94% especificidade	SIQUEIRA et al., 2023
rK39	100% de sensibilidade 95,7% especificidade	93,7% sensibilidade 100% especificidade	ROSÁRIO et al., 2005
rK26	100% de sensibilidade 94% especificidade	76% sensibilidade 94% especificidade	SIQUEIRA et al., 2023
rK26	100% de sensibilidade 100% especificidade	98% sensibilidade 96% especificidade	ROSÁRIO et al., 2005

Fonte: A autora (2023).

2.5 PROTEÍNAS RECOMBINANTES UTILIZADAS NO IMUNODIAGNÓSTICO DA LV

Em 1998, o antígeno recombinante rK39 foi utilizado pela primeira vez em plataforma de imunocromatografia utilizada para o diagnóstico da LV, comumente referida como RDT (*Rapid Diagnosis Tests*). O nome do antígeno deriva de uma repetição de 39 aminoácidos presente ao longo da sua sequência proteica, de uma proteína semelhante à kinesina do complexo *Leishmania donovani* (BERN et al., 2000). Esta proteína é altamente conservada nas espécies de *Leishmania*, e o rK39 tem sido amplamente utilizado para diagnóstico da LV na África, Índia, Sudão, Américas e Brasil, com sensibilidade a princípio variando de 95 a 100%. Contudo, variações na sensibilidade e especificidade foram descritas no ELISA aplicado à LV humana quando utilizado em diferentes regiões do mundo. Estudos na África Oriental mostraram uma sensibilidade inferior a 85% e especificidade de 91% (com amostras de pessoas que não tinham a doença). Já no subcontinente indiano foi observado uma sensibilidade de 97% e especificidade de 90% (SINGH; SUNDAR, 2014; BOELAERT et al., 2014). Na Europa, por sua vez, o desempenho dos testes sorológicos usando rK39 como teste de triagem, tem apresentado sensibilidade e especificidade de 60% e 96,5%, respectivamente, evidenciando a deficiência desse antígeno recombinante para ser usado como teste de triagem no diagnóstico da LV (VARANI et al., 2017).

Recentemente, foi realizado no Brasil, um estudo avaliando o desempenho do rK39 no RDT e no ELISA utilizando soros humanos da cidade de Natal, estado do Rio Grande do Norte, Nordeste do Brasil. Foi observado uma sensibilidade abaixo de 90% para ambos os testes, confirmando a eficiência duvidosa do antígeno rK39 quando comparado o seu desempenho regional com outras regiões brasileiras. Uma maior precisão desse antígeno, foi observada para a detecção de cães com LV, com sensibilidade de 90 a 100%. O rK39 foi menos específico e menos sensível para detectar infecções assintomáticas, contudo, com o teste apresentando especificidade abaixo do ideal (menor que 80%) (VARANI et al., 2017; SANCHEZ et al., 2020; MEDEIROS et al., 2021).

Outros antígenos recombinantes de *L. infantum* e *L. donovani* foram avaliados com potencial promissor para o sorodiagnóstico da LV. A K95 é uma proteína também derivada da kinesina e que apresentou um bom desempenho no ELISA, com alta sensibilidade (95,6%) e especificidade (97,8%), quando testada com amostras de indivíduos suspeitos para LV em diferentes regiões do Brasil (FUJIMORI et al., 2023). Em um outro estudo no Brasil, três proteínas (rFc, rC9 e rA2) foram selecionadas a partir de análises proteômicas e genômicas e utilizadas para determinar sua sensibilidade e especificidade no ELISA e RDT. Dos três antígenos, o rA2 foi o que apresentou melhor desempenho para o diagnóstico da LVH (91,5% de sensibilidade e 87% de especificidade) e LVC (96,3% de sensibilidade e 90% de especificidade) no ELISA. No RDT, o rA2 também apresentou o melhor desempenho para o diagnóstico de LVH (sensibilidade de 92,3% e especificidade de 88,0%) e LVC (87% de sensibilidade e 100% de especificidade) e teve alta concordância com o ELISA-rK39. Embora os testes tenham apresentado bom desempenho, foi observado uma baixa especificidade com os parâmetros utilizados, justificando a necessidade de otimizações adicionais (DOS SANTOS et al., 2019).

Assim como descrito, a utilização de proteínas recombinantes multiepítopos tem melhorado os parâmetros de sensibilidade e especificidade dos testes sorológicos, e um grande número de antígenos recombinantes têm se mostrado competente para o diagnóstico da LV. Ainda assim, esses testes falharam em detectar precocemente indivíduos com suspeita da doença em diferentes regiões do mundo e cães assintomáticos que apresentam níveis baixos ou ausentes de anticorpos, mesmo que combinados em uma molécula quimérica (FARAHMAND; NAHREVANIAN, 2016b; DOS SANTOS et al., 2019). Por isso, há uma busca contínua por novos antígenos de *Leishmania* que possam ser usados no desenvolvimento de proteínas quiméricas com alta eficácia em diagnosticar ao mesmo tempo humanos e cães com LV e que forneçam resultados confiáveis para o sorodiagnóstico da doença (ALGHAMDI et al., 2022).

Mais recentemente, a construção de proteínas quiméricas recombinantes que contém múltiplos peptídeos exibiu características promissoras para o diagnóstico por ELISA da LV. Nesse sentido, a proteína quimérica denominada de K28, gerado pela fusão dos antígenos rK9, rK26 e rK39 de *L. infantum* foi avaliada no ELISA em 252

casos de LV confirmados parasitologicamente na Índia, apresentando alta sensibilidade (99,6%), comparável ao do ELISA com a rK39 (99,6%), e especificidade de 100%, utilizando amostras de indivíduos saudáveis de regiões não endêmicas (VAISH et al., 2012). Na América Latina, testes imunoenzimáticos desenvolvidos com rK28 para o diagnóstico de LVC mostraram sensibilidade de 91,0% no ELISA quantitativo e especificidade de 98,7% (LAURICELLA et al., 2016). No entanto, a sensibilidade relatada para plataforma de duplo percurso (DPP, do inglês, *Dual Path Platform*) com o antígeno rK28 foi entre 47% e 92% para os casos de LVC assintomáticos (LAURENTI et al., 2014). Novo estudo recente no Brasil utilizou 74 amostras de cães sintomáticos para LV e 66 amostras de cães saudáveis para avaliar comparativamente os antígenos rK28 e rK39 no ELISA. A conclusão foi que o rK39 apresentou melhor sensibilidade (97,3%) em comparação com o rK28 (95,9%), com 100% de especificidade, sugerindo que o antígeno rK39 parece ainda ser uma boa alternativa para o diagnóstico da LVC (FUJIMORI et al., 2023).

Avanços tecnológicos, tem permitido a utilização de ferramentas confiáveis de predição de epítomos capazes de identificar proteínas imunogênicas com potencial para reconhecer anticorpos específicos em soros de humanos e cães com suspeitas de LV (SAHA; RAGHAVA, 2006; ALGHAMDI et al., 2022). Em outro estudo recente, epítomos selecionados dessa forma foram incluídos em duas proteínas quiméricas recombinantes multiepítomos PQ10 e PQ20 que foram capazes de detectar a LV canina no ELISA (FARIA et al., 2017). Baseado nesse achado, um outro estudo foi desenvolvido com o objetivo de otimizar tais proteínas. O desempenho no ELISA variou, com sensibilidade de 93% e especificidade de 80 a 96,6% (com soros de cães não infectados), para ambas as proteínas. A proteína de melhor desempenho, contudo, a PQ10, apresentou reatividade cruzada com cães infectados com outras parasitoses, embora esses antígenos tenham apresentado sensibilidade superior ao teste DPP LVC recomendando pelo Ministério da Saúde (FONSECA et al., 2019). A avaliação da proteína quimérica PQ10 na detecção precocemente da LVH também foi realizada. Foram observados valores de 84% e 82% de sensibilidade e especificidade (utilizando amostras de indivíduos saudáveis), respectivamente e a PQ10 foi capaz de detectar 92% de humanos infectados assintomáticos. Entretanto foi identificada reação cruzada com amostras de indivíduos positivos para

toxoplasmose, sífilis, infecção por malária, infecção por citomegalovírus, tuberculose, sarampo e himenolepíase (JAMEIE et al., 2021).

2.6 FUNDAMENTO PARA O PRESENTE TRABALHO

Em um primeiro estudo que precedeu o presente trabalho, e em busca de proteínas recombinantes passíveis de uso como alternativas para o diagnóstico sorológico da LV, cinco antígenos (Lci1, Lci2, Lci3, Lci4 e Lci5) potencialmente relevantes para o diagnóstico da LV foram identificados por meio de triagem de biblioteca de cDNA de expressão de *L. infantum*. Fragmentos destes antígenos foram expressos em modelo bacteriano e avaliados no ELISA contra soros de diferentes populações humanas e caninas com LV. As sensibilidades e especificidades para estes antígenos variaram, respectivamente, de ~36 a ~97% na detecção de LV humana e de ~67 a 100% na detecção da LV canina. O antígeno recombinante que apresentou melhor desempenho para sorodiagnóstico da doença humana por ELISA foi então o Lci2, enquanto que o antígeno Lci4 apresentou o melhor desempenho para o sorodiagnóstico da LV em cães (TEIXEIRA et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2011).

Em um trabalho posterior, foi expandido o painel de antígenos disponíveis para o diagnóstico da LV por meio de outra triagem, agora de uma biblioteca de expressão genômica. As proteínas foram identificadas e seus produtos proteicos nomeados como Lci6, Lci7, Lci8, Lci9, Lci10, Lci11 e Lci12. Vários destes foram então avaliados para o diagnóstico da LV humana e canina, com a sensibilidade por ELISA variando entre ~49 e ~91%. Em geral, esses antígenos tiveram um desempenho com os soros caninos melhor do que o observado para as amostras humanas. Outro antígeno recombinante identificado independentemente, a Lci13 (CAMPOS et al., 2008), foi incluído no mesmo estudo para fins comparativos e apresentou o melhor desempenho, com ~97% de sensibilidade e ~98% de especificidade quando avaliada com soros de cães. O mesmo estudo avaliou misturas de vários antígenos onde foi possível obter níveis mais elevados de

sensibilidade tanto para soros de cães quanto de humanos (MAGALHÃES et al., 2017b).

A partir dos trabalhos precursores citados, partiu-se então para o desenvolvimento de uma nova proteína quimérica recombinante (Q5) baseada na junção de fragmentos de três proteínas promissoras para o diagnóstico sorológico da LV humana (Lci2) e canina (Lci3 e Lci12). Em ensaios de ELISA a proteína Q5 mostrou 82% de sensibilidade para soros humanos (n=50), e 99% de sensibilidade com soros de cães (n=39). Os resultados com soros de pacientes com leishmaniose tegumentar mostraram uma única reação inespecífica entre os 50 soros testados (2%), confirmando a especificidade da Q5 para o diagnóstico de LV e seu potencial para baixa reação cruzada com outras doenças (MAGALHÃES et al., 2017b).

Mesmo com os resultados promissores da Q5, o estudo de Santos et al., (2020) utilizou um conjunto limitado de soros de indivíduos e cães infectados com *L. infantum*. Assim, realizou-se uma nova avaliação da Q5 no ELISA usando um número maior de soros caninos com o diagnóstico prévio para LV no teste DPP e seu desempenho foi comparado com o EIE-LVC. Os resultados mostraram que a Q5 necessita de melhorias adicionais em sua sequência. Este estudo compõe o capítulo I desta Tese.

Com base nesses estudos anteriores, projetamos uma nova proteína quimérica recombinante (Q8) contendo parte dos epítomos da Q5, mais adição de fragmentos de duas outras proteínas antigênicas da *L. infantum*, a já mencionada Lci13 e também a Lci5, que demonstrou ser boa candidata para o diagnóstico da LVC em estudo independente (BORJA et al., 2018b). Aqui, relatamos então a produção de um novo antígeno quimérico recombinante de fácil produção e com tecnologia nacional, que apresentou resultados satisfatórios nos ensaios de ELISA utilizando soros de cães e de indivíduos de áreas endêmicas brasileiras com diagnóstico laboratorial confirmado para LV. Os resultados mostram que a Q8 é um antígeno confiável e eficiente para ser usado no diagnóstico da LV canina e humana. Este estudo compõe o capítulo II desta Tese.

2 HIPOTESE

Proteínas quiméricas recombinantes construídas com epítomos antigênicos de proteínas do parasita, apresentam potencial para serem usadas como novos antígenos aplicáveis no diagnóstico imunológico da leishmaniose visceral humana e/ou canina.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e avaliar novas proteínas quiméricas capazes de detectar anticorpos específicos anti-*Leishmania* em humano e cães infectados com *Leishmania infantum* e avaliar seu potencial no diagnóstico da leishmaniose visceral.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar a acurácia diagnóstica da Q5 por ELISA ampliando o número de soros caninos com LV;
2. Comparar o desempenho do ELISA baseado na Q5 com o teste EIE-LVC usando soros de cães positivos para LV com base no teste rápido DPP;
3. Identificar *in silico* peptídeos de proteínas antigênicas de *L. infantum* para utilização no diagnóstico sorológico da LV;
4. Construir *in silico* um novo gene sintético (Q8) derivado daquele codificante da Q5;
5. Produzir a Q8 e uma variante, Q8SX2, em sistema de expressão heteróloga;
6. Avaliar de forma comparativa por ELISA as proteínas Q5, Q8 e Q8SX2, usando amostras positivas com LV de soros de cães e humanos.

4 ARTIGO I



Potencial diagnóstico para detecção da leishmaniose visceral canina em um ensaio de ELISA baseado na proteína quimérica recombinante Q5. Uma avaliação comparativa em larga escala usando soros de cães positivos na Plataforma de duplo percurso (DPP)

Artigo anexo na página seguinte. Versão em inglês aceita para publicação no periódico Veterinary Sciences.

ID: vetsci-2570024

A doutoranda e co-autora desse artigo foi responsável pelos experimentos de produção do segundo lote da proteína quimérica Q5, purificada sob condições de desnaturação mais leves, bem como outra proteína recombinante (Lci13), ambas utilizadas nos ensaios de ELISA com soros caninos suspeitos para LV. O potencial da Q5 no ELISA foi reavaliado usando um grande número de soros de cães positivos para LV (n=405) com um diagnóstico prévio no DPP, e seu desempenho comparando com o teste EIE-LVC, buscando investigar resultados falso positivos e/ou falsos negativos. Um segundo ensaio de ELISA foi realizado com a proteína recombinante Lci13, com um total de 119 soros positivos no DPP, mas apresentando resultados previamente negativos no ELISA Q5 e EIE-LVC. Os parâmetros de sensibilidade, especificidade e precisão ideais foram estabelecidos usando a análise

da Curva ROC. Em síntese, os resultados do ELISA com todos os soros testados mostraram níveis semelhantes de sensibilidade (67-68%) tanto para Q5 quanto para o EIE-LVC. Uma sensibilidade superior de (92%) foi observada com os cães sintomáticos (n=48). Em contrapartida, foi visto uma sensibilidade de 62% e 58% para Q5 e EIE-LVC com os soros de cães assintomáticos (n=117). Uma segunda seleção desses soros foi realizada para novas análises no ELISA com a Q5 e Lci13, purificadas sob condições mais brandas. Ao final, foi observado uma reatividade baixa da Q5 e do EIE-LVC com amostras de cães assintomáticos, confirmando a necessidade do desenvolvimento de outras proteínas quiméricas recombinantes, que consigam identificar esse grupo de cães sem sinais clínicos, para serem investigadas como possíveis alternativas aos métodos de diagnóstico de LVC atualmente utilizados.

Potencial diagnóstico para detecção da leishmaniose visceral canina em um ensaio de ELISA baseado na proteína quimérica recombinante Q5. Uma avaliação comparativa em larga escala usando soros de cães positivos na Plataforma de duplo percurso (DPP)

Larissa Ferreira de Araújo Paz^{1¶}, Adalúcia da Silva^{2¶}, Hemilly Rayanne Ferreira da Silva², Milena Paiva-Cavalcanti², Valéria Marçal Felix de Lima³, Maria Rosário Oliveira da Cunha Beltrão¹, Maria Beatriz Araújo Silva¹, Osvaldo Pompílio de Melo Neto^{2&}, Zulma Maria Medeiros^{1,2&}, Wagner José Tenório dos Santos^{2&*}.

¶Larissa Ferreira de Araújo Paz e Adalúcia da Silva contribuíram iguais para o trabalho &Osvaldo Pompílio de Melo Neto, Zulma Maria Medeiros e Wagner José Tenório dos Santos contribuíram iguais para o trabalho

¹Universidade de Pernambuco, Recife, Brasil;

²Instituto Aggeu Magalhães – Fiocruz, Recife, Pernambuco, Brasil;

³Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, São Paulo, Brasil;

*Correspondente: wagner.tenorio@bio.fiocruz.br

E-mail

LFAP: larissafaraujopaz@hotmail.com

AS: adaluciasilva9@gmail.com

HRFS: hemillyrayanne@hotmail.com

MPC: milena.cavalcanti@fiocruz.br

VMFL: valeria.lima@unesp.br

MROCB: rosariobeltrao@gmail.com

MBAS: silvamba@yahoo.com.br

OPMN: osvaldo.pompilio@fiocruz.br

ZMM: zulma.medeiros@fiocruz.br

WTJS: wagner.tenorio@bio.fiocruz.br

Abstrato

Resumo simples

Este estudo teve como objetivo comparar o verdadeiro potencial diagnóstico da proteína quimérica recombinante Q5 em um ensaio ELISA utilizando um grande número de soros de cães com suspeita de LVC. Soros de cães com diagnóstico positivo de LVC com base no teste rápido DPP (n = 406) e amostras negativas de cães saudáveis (n = 46) foram utilizados para testes ELISA utilizando o Q5 recombinante. No geral, foram observados níveis semelhantes de sensibilidade mais baixa (67-68%) tanto para o teste EIE-LVC comercial como para o ELISA Q5 quando todos os soros avaliados foram considerados, mas foi observada uma sensibilidade muito maior (92%) para as amostras de cães sintomáticos. Em contraste, foram observados muitos resultados negativos para os soros positivos para DPP de cães assintomáticos ou daqueles sem informação clínica disponível. Os resultados revelam uma incidência maior do que o esperado de prováveis resultados falso-positivos para DPP, reforçando a necessidade de outras proteínas recombinantes, como a quimérica Q5, serem investigadas como possíveis alternativas aos métodos de diagnóstico de LVC atualmente utilizados.

Resumo

Os cães são considerados o principal reservatório doméstico da leishmaniose visceral humana, uma doença grave causada pelo parasita *Leishmania infantum*. O diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina (LVC) é fundamental para o controle da doença, com diversos métodos disponíveis atualmente. Dentre os testes sorológicos, o teste rápido DPP e o EIE-LVC, mais utilizados no Brasil, estão associados a sensibilidade e especificidade variáveis. A investigação com novas proteínas recombinantes pode, portanto, melhorar o diagnóstico de LVC, tal como o ELISA com a proteína quimérica recombinante Q5 pode, portanto, melhorar o diagnóstico de LVC. Este estudo teve como objetivo avaliar o verdadeiro potencial diagnóstico de Q5 em um ensaio ELISA utilizando um grande número de soros suspeitos de LVC (406) com diagnóstico prévio positivo baseado no teste rápido DPP. Os soros dos cães positivos para DPP, também avaliados com o teste EIE-LVC, foram comparados com soros de cães saudáveis (n = 46) e utilizados para testes ELISA utilizando o Q5 recombinante. Os dados resultantes, bem como a correlação com os sinais clínicos e as características ambientais dos animais foram analisados utilizando MedCalc e GraphPad Prism 8.0. No geral, foram observados níveis semelhantes de sensibilidade mais baixa (67- 68%) tanto para o teste EIE-LVC comercial como para o ELISA Q5 quando todos os soros avaliados foram considerados, mas foi observada uma sensibilidade muito maior (92%) para as amostras de amostras sintomáticas. apenas cães. Em contraste, foram observados muitos resultados negativos para os soros positivos no DPP de cães assintomáticos ou sem informação clínica disponível. Uma seleção desses soros foi testada novamente em novos ensaios ELISA utilizando um segundo lote do Q5

recombinante, purificado em condições desnaturantes mais brandas, além de outra proteína recombinante (Lci13). Os resultados revelam uma incidência maior do que o esperado de prováveis resultados falso-positivos para DPP, reforçando a necessidade de outras proteínas recombinantes, como a quimérica Q5, serem investigadas como possíveis alternativas aos métodos de diagnóstico de LVC atualmente utilizados.

Palavras-chave: *Leishmania infantum*; leishmaniose visceral canina; Teste DPP

1. Introdução

Os cães domésticos são considerados o principal reservatório da leishmaniose visceral (LV), tendo papel fundamental nas áreas urbanas para a transmissão humana da *Leishmania infantum*, protozoário parasita responsável pela maioria dos casos da doença na América Latina e no sul da Europa. Na verdade, a prevalência positiva na população canina pode atingir até 80% em áreas altamente endêmicas, com vários estudos sugerindo que existe uma sobreposição entre locais com incidência de casos humanos e alta soroprevalência canina [1–3]. O número de cães infectados com *L. infantum* na América do Sul é estimado em milhões, com maior evidência de crescimento da doença no Brasil, Argentina e Paraguai [4]. Em áreas endêmicas de LV causada por *L. infantum*, como o Brasil, os cães infectados são caracterizados por um grande acúmulo de parasitas. A detecção rápida e eficiente da infecção em animais com e sem sinais clínicos é, portanto, essencial para controlar a propagação da doença para outros cães e humanos, sendo a alta taxa de animais assintomáticos uma complicação significativa [5,6].

Vários métodos são considerados para o diagnóstico de LV, sendo que tanto os testes parasitológicos quanto os moleculares apresentam limitações operacionais para a leishmaniose visceral canina (LVC). Muitas técnicas sorológicas estão comercialmente disponíveis e em uso, mas muitas delas são baseadas em preparações complexas de proteínas nativas derivadas do parasita, limitando a especificidade e sensibilidade dos testes e facilitando resultados falso-positivos, devido a reações cruzadas com antígenos de outros patógenos, como *Babesia* e *Ehrlichia*. Ao mesmo tempo, uma maior incidência de casos falso-negativos pode favorecer a propagação da doença através de diagnósticos errados, limitando a identificação de animais assintomáticos [5–8].

O diagnóstico sorológico oficial da LVC no Brasil utiliza o teste rápido DPP (Dual Path Platform), que consiste em um dispositivo impregnado com o antígeno recombinante rK28, uma quimera que combina três antígenos de *L. infantum* (K9, K26 e K39) [9,10]. Outro teste recomendado é o EIE-LVC, um ensaio ELISA baseado em antígenos solúveis de formas promastigotas de *Leishmania major* [11]. Um estudo utilizando esses dois testes sorológicos, (DPP e EIE-LVC), revelou que apenas 67,2% das amostras positivas com base em PCR em tempo real (*Polymerase Chain Reaction*) foram positivas tanto em DPP quanto em EIE [12]. Outro estudo que avaliou o teste DPP, mas com soros de animais positivos para LVC confirmados por cultura ou PCR, também encontrou valores baixos de sensibilidade (74%) e especificidade (94%), embora ainda superiores aos observados para o teste DPP e o teste confirmatório (EIE-LVC), com sensibilidade de 67% e especificidade de 87% [7]. A coinfeção com patógenos como *Babesia sp.* e *Ehrlichia sp.* em cães de áreas urbanas endêmicas ou não endêmicas para LVC

demonstrou interferir no diagnóstico sorológico utilizando testes ELISA, IFAT (teste de imunofluorescência de anticorpos) e DPP [13].

Limitações diagnósticas em animais assintomáticos e reações cruzadas com outras infecções causadas por tripanossomatídeos estimularam a busca por novos antígenos recombinantes. Diferentes estudos têm sido realizados com o objetivo de melhorar a qualidade de antígenos recombinantes individuais ou combinações de antígenos aplicados ao diagnóstico de LVC [14]. Nosso grupo identificou anteriormente o Lci13 recombinante, um fragmento da proteína mitocondrial de choque térmico de 70 kDa de *L. infantum* [15], como potencialmente eficaz para o diagnóstico de LVC (97% de sensibilidade), mas não para o diagnóstico da doença humana. [16]. Uma segunda proteína recombinante avaliada por nosso grupo, a proteína quimérica Q5, foi projetada para unir fragmentos derivados de antígenos recombinantes de *L. infantum* previamente considerados eficientes para as formas humana ou canina da doença (Lci2, Lci3 e Lci12). Resultados preliminares com um conjunto limitado de 39 soros de cães infectados, com diagnóstico parasitológico e/ou molecular positivo, mostraram sensibilidade de 99% para Q5, com especificidade de 100% definida após teste de 15 soros de animais saudáveis [17]. Dados os resultados promissores com a Q5, o presente estudo foi realizado com o objetivo de melhor avaliar o desempenho do Q5 em um ensaio ELISA desenhado para o sorodiagnóstico de LVC em cães, utilizando um conjunto muito maior de soros caninos (de cães sintomáticos e assintomáticos) previamente avaliados. com os dois exames atualmente prescritos para diagnóstico de LVC no Brasil, DPP e EIE-LVC. Os soros positivos para DPP com resultados negativos para o ELISA Q5 e/ou EIE-LVC foram posteriormente testados com um segundo ensaio ELISA

baseado em Q5, bem como ainda outro ELISA baseado numa proteína recombinante diferente, Lci13. As análises comparativas confirmam desempenhos equivalentes tanto para Q5 ELISA como para EIE-LVC apenas para animais sintomáticos, revelando ao mesmo tempo um grande número de soros positivos para DPP com resultados negativos consistentes para todos os ensaios ELISA testados, principalmente de cães assintomáticos ou de animais sem sintomas clínicos.

2. Materiais e Métodos

2.1. Soros Caninos e Considerações Éticas

Os soros caninos aqui analisados foram fornecidos pela Vigilância Epidemiológica de LVC do sistema público de saúde ou pelo Ministério da Saúde do Brasil (responsável pela realização de testes confirmatórios de LV) do estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil. As informações sobre as condições epidemiológicas e clínicas relatadas foram coletadas no momento do registro dos cães positivos para LV. Todos os soros considerados suspeitos para LVC, com base no resultado positivo do teste rápido DPP ($n = 406$), eram procedentes de Pernambuco. Soros de cães saudáveis ($n = 48$) foram utilizados como controles negativos, sendo 30 do Estado de São Paulo (área não endêmica) e 18 do Estado de Pernambuco (área endêmica), todos com resultados negativos para LVC observados usando o teste DPP, bem como um ensaio de PCR descrito anteriormente [18]. A pesquisa teve início após avaliação e aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais CEUA/UPE sob registro nº 03/2020.

2.2. Expressão e Purificação de Proteínas

A expressão e purificação da Q5 recombinante utilizada para o primeiro conjunto de ensaios no ELISA (lote de ureia 8M) foi realizada conforme descrito anteriormente [17], utilizando o gene Q5 clonado na expressão pRSET (Invitrogen, Waltham, MA, EUA) transformado em *Escherichia coli* Rosetta™ 2 DE3 (de Novagen, Darmstadt, Alemanha). A construção da Q5 recombinante e aquela que codifica o antígeno Lci13, que também foi clonado no plasmídeo pRESTa [16], foram então utilizadas em um segundo procedimento de purificação para produzir os lotes de ureia 2M. Estes usaram células bacterianas de culturas de um litro que foram colhidas e ressuspensas em 20 mL de tampão A (Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 300 mM, imidazol 20 mM, ureia 2 M, 2-Mercaptoetanol 10 mM) e lisado com cinco pulsos de ultrassom a 4 °C. Os sobrenadantes solúveis, após centrifugação a 20.000 x g durante 30 min a 4 °C, foram então carregados numa coluna His-Trap HP de 5 mL num sistema AKTA Pure (Cytivia, Marlborough, MA, EUA) equilibrado com tampão A. As proteínas foram eluídas com um gradiente de duas etapas em um gradiente linear de 10 volumes de coluna (CV) de 0% a 10% de tampão B (tampão A + imidazole 500 mM), seguido por um gradiente linear de 20 CV de 10% a 100% de tampão B. As eluições foram carregadas em SDS-PAGE a 15% seguida de coloração com Coomassie para confirmar a carga e a qualidade da proteína [1].

2.3. Testes de diagnóstico e ELISA

Os testes DPP e EIE-LVC, ambos produzidos em Bio-Manguinhos (Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil) para diagnóstico da LVC, foram utilizados conforme recomendação do fabricante. Para os ensaios de ELISA com os recombinantes Q5 e

Lci13, foram realizados essencialmente conforme descrito anteriormente [17], utilizando 600 ng por poço das proteínas recombinantes. Para os ensaios, os poços foram incubados com os soros caninos em diluições de 1:900 (para Q5) ou 1:200 (para Lci13), utilizando como segundo anticorpo o IgG de cabra anti-cão conjugado com peroxidase (diluído 1:10.000) da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA), nº de catálogo A6792 (Q5 2M e Lci13) e diluído 1:1.200, da Jackson Immuno Research 304-005-003 para Q5 8M). Para os ensaios ELISA com proteínas recombinantes, os soros foram utilizados em triplicatas. As diluições dos soros foram definidas utilizando uma curva de padronização variando de 1:100 a 1:900. Para avaliar o desempenho clínico do ensaio, a Q5 foi avaliada em amostras clínicas retrospectivas para comparar a sua capacidade diagnóstica com métodos de referência. Um total de 454 soros foram testados com DPP, com todos os soros positivos para DPP também testados posteriormente com o ensaio EIE-LVC. A Figura 1 detalha o número de amostras testadas com cada um dos ensaios ELISA avaliados aqui.

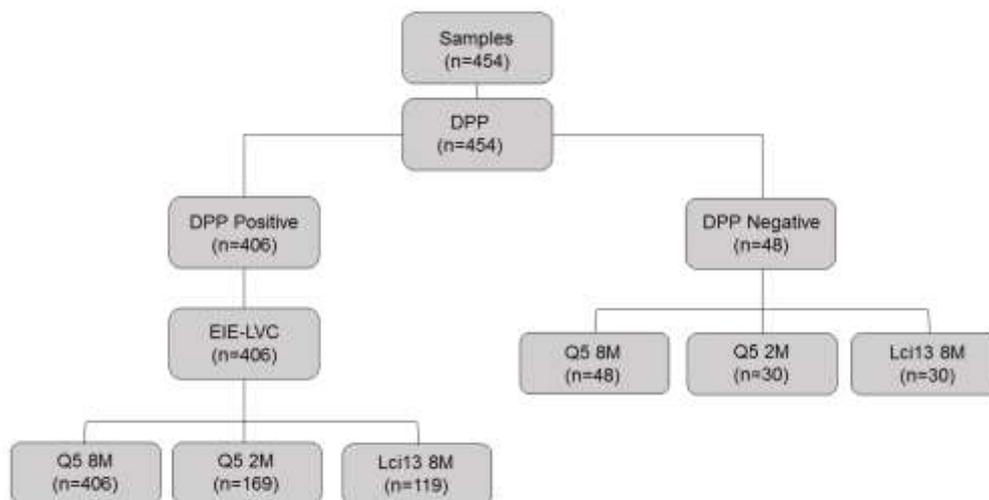


Figura 1. Fluxograma detalhando o número de amostras testadas em cada teste. Amostras positivas triadas com DPP foram testadas com EIE-LVC para confirmar o diagnóstico de LVC. Amostras de

animais saudáveis e negativos para DPP foram utilizadas como controle negativo e posteriormente testadas com um ensaio lab-on-chip para avaliar a metodologia diagnóstica.

2.4 Coleção de dados

Após a entrevista com o dono do animal, foi realizado exame físico do cão e coletado sangue venoso periférico do cão. As amostras foram armazenadas, processadas e analisadas no próprio município (exame físico e teste rápido DPP), e os demais diagnósticos foram realizados na Fiocruz Pernambuco.

2.5. Análise estatística

Os dados foram tabulados no Microsoft Excel 2013 e os parâmetros de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo, acurácia e intervalo de confiança foram estimados no site MedCalc. Gráficos de dispersão, curva ROC, Índice Kappa e AUC foram gerados usando GraphPad Prism 8.0.2. A avaliação da concordância entre os testes foi realizada por meio da estatística kappa, sendo os resultados interpretados da seguinte forma: valores ≤ 0 indicaram ausência de concordância; 0,01–0,20 significou nenhuma ou ligeira concordância; 0,21–0,40, regular; 0,41–0,60, moderado; 0,61–0,80, substancial; e com 0,81–1,00 indicando concordância quase perfeita. O ponto de corte para os ensaios ELISA foi determinado calculando a média dos valores derivados dos soros negativos mais duas vezes o desvio padrão.

3. Resultados

3.1. Características Ambientais e Clínicas da População do Estudo

Para avaliar adequadamente a proteína recombinante Q5 em larga escala, montamos um conjunto substancial de soros caninos usando cães de uma área endêmica para LVC com suspeita de diagnóstico para a doença confirmada usando o ensaio DPP recomendado (n = 406). Os animais cujos soros foram avaliados aqui consistiam predominantemente de cães domésticos (60,1%), em sua maioria machos (52,7%), e os cães geralmente tinham um ano de idade ou mais (67,5%), (69%) e sabidamente tiveram algum tipo de contato com humanos (69%). Quanto às condições de abrigo, 24% foram classificados como intra-residenciais (encontrados dentro dos domicílios), 70% como peri-residenciais (abrigados em área igual ou inferior a 100 m de uma residência) e 51% como extra-residenciais. - Residência (abrigada num raio superior a 100 m de uma residência). Os soros de animais assintomáticos representaram 28,8% dos testados, sendo 11,8% dos soros provenientes de animais sintomáticos; havia e não havia informação clínica disponível para os demais cães (59,4%). Considerando apenas os cães sintomáticos, os principais sintomas foram onicogribose (47,9%), dermatite generalizada (72,9%), e perda de peso (45,8%). A Tabela 1 resume todos os dados clínicos e ambientais disponíveis para os cães positivos para DPP incluídos na nossa análise.

Tabela 1. Distribuição das características clínicas e ambientais dos animais cujos soros foram aqui avaliados.

N = 406		Caractérisicas	N (%)
Origem do animal		Domiciliar	244 (60.1)
		Semi- domiciliar	4 (1.0)
		Comunidade	63 (15.5)
		Errante	6 (1.5)
		NI	89 (21.9)
Sexo		Feminino	176 (43.3)
		Masculino	214 (52.7)
		NI	16 (3.9)
Idade		Até 12 meses	21 (5.2)
		Um ano de idade ou mais	274 (67.5)
		NI	111 (27.3)
Contato humano		Sim	280 (69.0)
		Não	2 (0.5)
		NI	124 (30.5)
Tipo de abrigo *		Intra- residente	100 (24.6)
		Extra- residente	51 (12.6)
		Peri- residente	70 (17.2)
		NI	185 (45.6)
Sintomas		Assintomático	117 (28.8)
		Sintomático	48 (11.8)
		NI	241 (59.4)
Caractérisicas clínicas		Dermatite generalizada	35 (72.91)
		Onicogribose	23 (47.91)
		Perda de peso	22 (45.83)
		Perda de cabelo	13 (27.08)
		Ceratoconjuntivite	7 (14.58)

* [19]. NI: Nenhuma informação disponível.

3.2. Avaliação em larga escala do Q5 recombinante para o diagnóstico de LVC

Para avaliar a eficiência da Q5 para o diagnóstico da LVC com o maior conjunto de soros positivos para DPP, ensaios ELISA foram configurados conforme descrito anteriormente [17], usando a proteína recombinante purificada na presença de ureia 8M (Q5-8M). Quando considerado todo o conjunto de soros testados, o desempenho do ELISA Q5 foi inferior ao esperado, com sensibilidade geral de 68%

e especificidade de 94% (Figura 2A). No entanto, quando o desempenho da Q5-8M foi avaliado apenas com soros de cães com características clínicas definidas, sintomáticas ou assintomáticas, os soros dos cães sintomáticos foram identificados com uma sensibilidade substancialmente maior (92%) do que os soros dos cães sintomáticos. soros assintomáticos (62%). Curvas ROC foram então geradas para esses vários grupos de soros (Figura 2B), e todos apresentaram valores de AUC próximos a 1,0 (0,852, 0,951 e 0,835, respectivamente, para os grupos Total, sintomático e assintomático, com $p < 0,0001$). Os valores de sensibilidade, especificidade e precisão para os grupos de soros avaliados também são apresentados na Tabela 2.

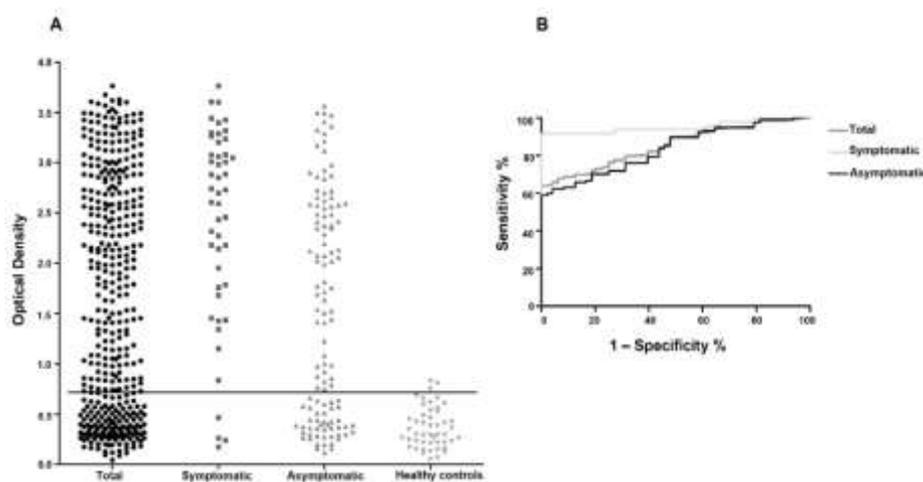


Figura 2. Avaliação da Q5-8M recombinante com um grande conjunto de soros de cães positivos para LV. (A) Resultados de ELISA com a Q5 recombinante utilizando os 406 soros positivos no DPP, bem como dos grupos sintomáticos (48 soros), assintomáticos (117 soros) e controle saudável (48 soros). (B) Curvas ROC para os três grupos positivos para DPP geradas com os resultados mostrados em (A).

Tabela 2. Avaliação da sensibilidade, especificidade, acurácia e índice kappa do teste LVC Q5, com a proteína quimérica Q5, em comparação com o EIE-LVC, e avaliando todo o conjunto de soros positivos no DPP avaliados e apenas aqueles dos grupos sintomáticos e assintomáticos.

ELISA	Sensibilidade % (n = 406)	Sintomático (n = 48)	Assintomático (n = 117)	Especificidade % (n = 48)	Acurácia%	Kappa
Q5-8M	68 (63–72)	92 (80–98)	62 (53–71)	94 (83–99)	71 (66–75)	0.48 (0.38–0.60)
EIE-LVC	67 (61–72)	92 (80–98)	58 (50–68)	Not assayed	Not assayed	0.48 (0.40–0.60)

Todos os resultados foram calculados com intervalo de confiança (IC) de 95%.

3.3. Comparação entre EIE-LVC e Q5

De acordo com o protocolo padrão para diagnóstico de LVC atual no Brasil, todos os soros caninos positivos pelo ensaio DPP também foram testados com o ensaio EIE-LVC antes de serem utilizados nos experimentos aqui descritos. Para melhor avaliar o desempenho da Q5-8M, optamos, portanto, por comparar diretamente os resultados do ensaio ELISA com aqueles derivados do teste EIE-LVC. Os resultados, também resumidos na Tabela 2, mostram uma sensibilidade global de 67% quando todos os soros positivos para DPP são considerados, mas com sensibilidades de 92% e 58%, respectivamente, para os soros de cães sintomáticos e assintomáticos. A especificidade não foi determinada para EIE-LVC, uma vez que este ensaio foi aplicado apenas em soros previamente testados com DPP, e nenhum deles incluiu amostras de animais controle saudáveis. Calculamos então a concordância entre os dois testes e entre ambos os ensaios e os resultados determinados com DPP. Valores idênticos foram observados tanto para Q5 quanto para EIE-LVC (0,48 para ambos), indicando concordância moderada através do índice kappa. Em contraste, foi observada uma maior concordância entre o ELISA Q5-8M e o EIE-LVC (0,65), indicando uma concordância substancial entre estes dois ensaios ELISA. A concordância limitada observada entre os ensaios ELISA e DPP levou-nos a investigar mais detalhadamente os resultados positivos e negativos observados para cada teste com cada soro. No geral, considerando todo o conjunto de soros positivos para DPP (n = 406), 272 soros foram identificados como positivos para LVC e 134 como negativos para o teste EIE-LVC, enquanto 275 foram positivos e houve 131 negativos para o ELISA Q5-8M. Notavelmente, 101 soros foram negativos para ambos os ensaios, apesar de terem um resultado positivo anterior de

DPP. Apenas três deles eram de cães com sintomas associados à LVC, contrastando com 38 soros de cães assintomáticos e 60 de animais sem informação clínica disponível.

3.4. Avaliação comparativa de diferentes ensaios ELISA baseados em Q5

O grande número de soros positivos para o ensaio DPP e negativos para o ELISA Q5 pode refletir uma menor eficiência da proteína recombinante Q5 na identificação de animais assintomáticos ou com níveis mais baixos de anticorpos. Raciocinamos que um fator contribuinte poderia ser as condições de purificação utilizadas para a produção de Q5, altamente desnaturante na presença de ureia 8 M, uma condição originalmente escolhida para melhorar a solubilização da proteína recombinante e maximizar o rendimento durante a purificação.

Para considerar isso, optamos por avaliar um novo lote de Q5 recombinante, que foi preparado usando um novo protocolo de purificação sob condições desnaturantes mais suaves (uréia 2 M - Q5-2M), e avaliar uma seleção de soros positivos para DPP que foram principalmente negativo para EIE-LVC e ELISA Q5-8M anterior. A Figura 3A compara o rendimento de purificação de ambos os protocolos utilizados para a purificação Q5 usando SDS-PAGE, com ambos os protocolos levando a purificações eficientes de proteínas, mas com um rendimento mais elevado para a purificação de ureia 2M. Montamos então um novo ensaio ELISA com a proteína Q5-2M, optando por alterar também o anticorpo secundário utilizado no ensaio, novamente com o objetivo de verificar se outras chances poderiam melhorar a sensibilidade. Devido às limitações na disponibilidade de soro, o novo ELISA Q5-2M foi então avaliado com uma seleção de soros positivos para

DPP que incluíam principalmente aqueles que eram negativos tanto para EIE-LVC como para o ELISA Q5-8M anterior. Um total de 169 soros positivos para DPP, em sua maioria de animais assintomáticos ou sem informações disponíveis sobre sintomas clínicos, foram selecionados para a nova avaliação, sendo que 126 deles tiveram resultado negativo no primeiro experimento ELISA Q5-8M (os resultados estão resumidos na Tabela 3). Ao todo, 43 soros foram positivos com o novo ensaio, com apenas 23 coincidindo, com resultado positivo anterior para o ELISA Q5-8M. Um total de 109 soros permaneceram negativos em ambos os ensaios; no entanto, apenas 88 também foram negativos no teste EIE-LVC, incluindo 85 soros de animais assintomáticos ou sem sintomatologia disponível.

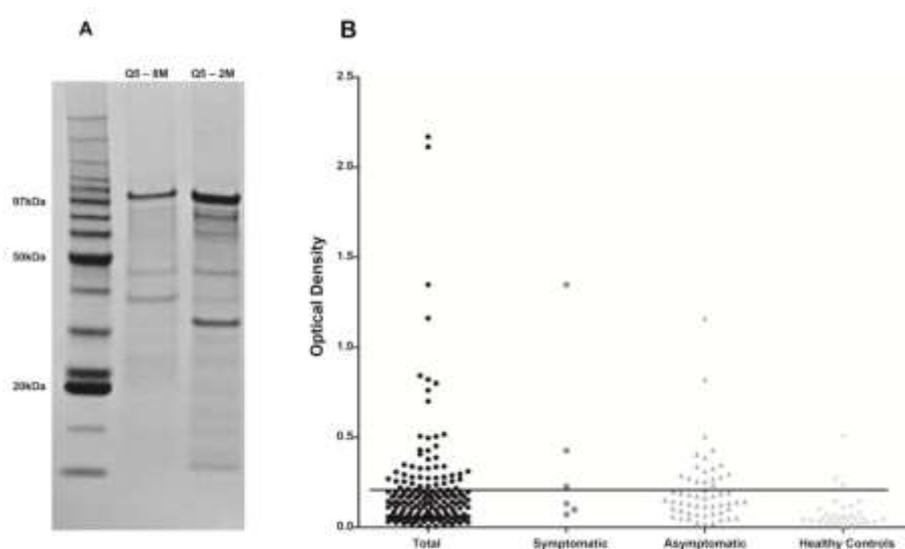


Figura 3. Avaliação comparativa de um segundo lote da proteína quimérica Q5. (A) Gel SDS-PAGE mostrando as diferentes purificações proteicas de Q5 usando ureia 8M e 2M. (B) Resultados de ELISA com o Q5 recombinante purificado com ureia 2M e testado com 169 soros positivos para DPP (total), sintomáticos e assintomáticos, bem como 30 soros de controle (animais saudáveis).

Tabela 3. Comparação dos ELISAs Q5 (8M), Q5 (2M) e EIE-LVC, mostrando o número de amostras positivas e negativas derivadas de cada teste.

	Q5 (8M) Positivo	Q5 (8M) Negativo	Q5 (2M) Positivo	Q5 (2M) Negativo
EIE-LVC positivo	4	7	4	21
EIE-LVC negativo	19	13	13	88
Total	23	20	17	109

Q5 (8M) e Q5 (2M) – Os testes ELISA foram realizados com a proteína recombinante Q5 purificada utilizando ureia 8 molar e 2 molar, respectivamente.

3.5 Avaliação da Proteína Recombinante Lci13.

Como o número de resultados negativos para os soros positivos no DPP permanecer substancial mesmo após o segundo ELISA Q5, também consideramos avaliar uma seleção de soros negativos com outro ensaio ELISA. Para este segundo ensaio, escolhemos a proteína recombinante Lci13, anteriormente demonstrada com excelente desempenho para diagnóstico de LVC [16]. Lci13 é baseado em um fragmento da proteína de choque térmico mitocondrial HSP70 de *L. infantum* [15] e não compartilha elementos em comum com os antígenos recombinantes que são a base para os ensaios DPP e Q5 ELISA. Avaliamos então um total de 119 soros positivos para DPP usando o ELISA Lci13, com 85 deles apresentando resultados negativos anteriores tanto para os ensaios Q5 ELISA quanto para o EIE-LVC (os resultados estão resumidos na Figura 4 e na Tabela S1). Foram observados resultados negativos para 101 dos soros testados. Dos 18 soros positivos restantes, nove também foram positivos com o novo ELISA Q5 e seis com ambos os conjuntos de testes baseados em Q5. Ao todo, 76 soros positivos para DPP produziram resultados negativos para todos os testes aqui avaliados. A maioria destes (73) eram de cães assintomáticos ou de animais sem informações sobre seus sintomas clínicos, mas constituíram ~18% de todos os soros positivos para DPP utilizados nesta investigação. Um único soro de um animal de controle saudável, da área endêmica, também foi considerado positivo em todos os três ensaios ELISA testados aqui.

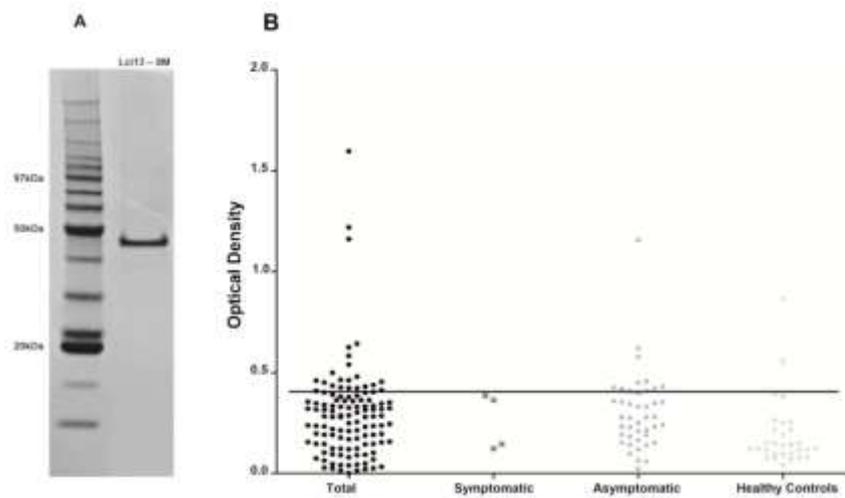


Figura 4. Avaliação da proteína recombinante Lci13 para diagnóstico de LVC. (A) Gel SDS-PAGE mostrando o Lci13 recombinante purificado utilizado para os ensaios ELISA. (B) Resultados de ELISA com os 119 soros DPP positivos (Total), sintomáticos e assintomáticos selecionados, bem como os 30 soros de controle (controles saudáveis).

4. Discussão

O imunoenensaio cromatográfico rápido de dupla via (DPP) é baseado no antígeno rK28, que é uma proteína de antígeno quimérico recombinante derivada da fusão de fragmentos dos antígenos K39 e haspb1 de *L. donovani* com toda a sequência haspb2 [10]. O DPP foi descrito como eficaz para o diagnóstico de LVC e atualmente é recomendado pelo Ministério da Saúde do Brasil para ser utilizado como primeiro ensaio para identificação de LVC, sendo o ELISA EIE-LVC utilizado para fins confirmatórios. Optamos aqui por seguir as atuais diretrizes brasileiras e, assim, utilizamos os critérios de positividade do DPP para a seleção dos soros a serem utilizados neste estudo. O DPP, no entanto, foi recentemente utilizado para investigar a incidência de LVC através de inquéritos sorológicos, nos quais foi encontrada uma eficiência abaixo do ideal com animais assintomáticos [20–22].

Outras limitações do DPP em relação à detecção de LVC em cães assintomáticos foram associadas a uma incidência maior do que o esperado de resultados falso-negativos [7] ou resultados falso-negativos e falso-positivos [12]. Nossos resultados revelaram ainda uma incidência possivelmente relevante de resultados falso-positivos associados a este teste, especialmente considerando o cenário de grande escala, um achado que deve ser considerado em avaliações futuras para a realização de diferentes testes diagnósticos.

Tanto rK28 quanto Q5 são proteínas quiméricas derivadas da fusão de fragmentos de três antígenos de *Leishmania*, sendo os antígenos rK39 e Lci2, encontrados, respectivamente, dentro de rK28 e Q5, sendo ambos derivados do mesmo antígeno nativo de *Leishmania*, uma cinesina do tipo N-cinesina [9,23]. Desempenhos semelhantes para rK28 e Q5 poderiam ser esperados considerando suas características comuns, mas este não foi o caso aqui, com um grande número de soros positivos para DPP de animais assintomáticos e aqueles sem sintomatologia conhecida tendo resultados negativos com o Q5 ELISA. Uma associação entre sinais clínicos e positividade pode ser devida à soroconversão, principalmente porque cães sintomáticos apresentam níveis mais elevados de anti-*Leishmania spp.* anticorpos [8].

Os testes sorológicos podem, portanto, ser menos eficientes na detecção de infecções por LV em cães assintomáticos [24,25]. De facto, foi demonstrado que alguns antígenos recombinantes podem ter uma eficácia melhor do que outros na confirmação do diagnóstico de LVC em soros de cães assintomáticos [22], e esta possibilidade também foi levantada por nós para explicar estas diferenças nos casos em que Q5 era ineficiente para diagnóstico dos animais assintomáticos. No entanto, os resultados do teste EIE-LVC estiveram em grande parte de acordo com os

observados para o ELISA Q5. O teste EIE-LVC é baseado em uma mistura complexa de múltiplos antígenos [11], o que seria mais consistente com um maior grau de positividade do que qualquer teste feito com proteínas recombinantes individuais. Estes resultados são apoiados por um relatório anterior, com um número reduzido de soros avaliados, onde o número de soros positivos para DPP também foi substancialmente maior do que aqueles observados com outros ensaios usando misturas antigênicas complexas, EIE-LVC e IFAT [13].

Um terceiro ensaio ELISA testado aqui, utilizando o Lci13 recombinante, produziu resultados de acordo tanto com o ELISA Q5 quanto com o EIE-LVC. Lci13 não compartilha elementos em comum com DPP ou Q5 e, em avaliação anterior, foi considerado um excelente antígeno para diagnóstico de LVC usando o ensaio ELISA [16]. Nesta fase, não é possível descartar a possibilidade de as diferenças de desempenho observadas também poderem ser impactadas pelos diferentes métodos utilizados, nomeadamente teste rápido ou ELISA. No entanto, o número significativo de soros positivos para DPP que aqui foram encontrados com resultados negativos com o teste EIE-LVC, bem como com os ensaios ELISA Q5 e Lci13, levanta preocupações quanto ao uso de DPP para o diagnóstico de animais assintomáticos, sugerindo um número substancial de resultados falso-positivos. Esses resultados são consistentes com uma análise comparativa anterior na qual vários resultados positivos para DPP foram observados em amostras onde um ensaio de PCR Real-Time não encontrou evidências de DNA de *Leishmania* [12].

Neste estudo, utilizamos amostras de soro armazenadas na vigilância epidemiológica de rotina da LVC, o que pode ser visto como uma limitação potencial, pois não podemos inferir nada sobre os resultados clínicos dos cães. Além disso, como não exploramos a presença de outras infecções oportunistas nos cães

avaliados, isso poderia atuar como um fator de confusão na LVC diagnosticada pelo soro. Estudos de coorte adicionais poderiam esclarecer a influência potencial de outras coinfeções oportunistas e latentes.

O estudo piloto em que a quimera Q5 recombinante foi descrita pela primeira vez, avaliou um total de 39 soros positivos para LVC, com diagnóstico confirmado por PCR e/ou cultura, utilizando como controle soros de animais jovens saudáveis de uma área não endêmica. Os ensaios ELISA desses soros apresentaram valores de 100% de sensibilidade e especificidade com Q5, indicando um desempenho muito bom para o diagnóstico de LVC [17]. Esses resultados marcadamente diferentes daqueles observados no presente estudo quando todo o conjunto de soros positivos para DPP é considerado.

5. Conclusões

As discrepâncias aqui observadas com os resultados de ELISA para os soros de animais assintomáticos e sem sintomas clínicos conhecidos não permitem a inclusão destes grupos para uma avaliação adequada do desempenho do Q5, pelas razões discutidas acima. Quando considerados apenas os soros de animais sintomáticos, os resultados do estudo piloto anterior são confirmados pelos dados do presente estudo, reforçando o excelente potencial para utilização da proteína Q5, ou versões melhoradas, para o diagnóstico de LVC, seja em ensaios ELISA ou como parte de testes rápidos. Tais testes podem ser incluídos como parte de estratégias de controle adequadas com o objetivo de aumentar o diagnóstico precoce de LVC em cães e reduzir a propagação da doença, incluindo tratamento adequado para

animais infectados, uso de coleiras repelentes e medidas de controle de vetores para reduzir transmissão.

Materiais Suplementares: As seguintes informações de apoio podem ser baixadas em: www.mdpi.com/xxx/s1.

Tabela S1: Resultados dos ensaios imunoenzimáticos (ELISA) utilizando proteínas Q5 (ureia 8M e 2M) e Lci13 (ureia 8M e 2M) realizados nas 74 amostras de soro, comparados com os resultados de DPP e EIE-LVC. *OD—densidade óptica NI—Sem informação. Tabela S2: Desempenho do teste imunocromatográfico rápido Q5 (ureia 8M e 2M) e Lci13 (ureia 8M e 2M) em amostras de grupos de animais controle saudáveis para determinar os valores de corte. DO – densidade óptica.

Contribuições dos autores: L.F.d.A.P., A.d.S. e H.R.F.d.S. realizou os experimentos. Além disso, L.F.d.A.P. e A.d.S. escreveu o manuscrito. MP-C., VMFdL, MROdCB. e M.B.A.S. manejou os cães para obter os soros utilizados. O.P.d.M.N., W.J.T.d.S. e Z.M.M. participou da concepção dos experimentos e da discussão dos resultados, e coordenou todo o estudo, bem como e revisou o manuscrito. Todos os autores leram e concordaram com a versão publicada do manuscrito.

Financiamento: Este estudo contou com o apoio das agências brasileiras de fomento CAPES, CNPq e FACEPE para bolsas de estudo para os alunos envolvidos.

Declaração do Conselho de Ética em Pesquisa: A pesquisa foi iniciada após avaliação e aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA/UPE, sob registro nº 03/2020.

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido: Não aplicável.

Declaração de disponibilidade de dados: Os dados brutos estão disponíveis no autor correspondente e também são fornecidos em tabelas no material suplementar.

Conflitos de interesse: Os autores declaram não ter interesses conflitantes.

Referências

1. Lima, I.D.; Lima, A.L.M.; Mendes-Aguiar, C.O.; Coutinho, J.F.V.; Wilson, M.E.; Pearson, R.D.; Queiroz, J.W.; Jeronimo, S.M.B. Changing demographics of visceral leishmaniasis in northeast Brazil: Lessons for the future. *PLoS Neglected Trop. Dis.* **2018**, *12*, e0006164.
2. Costa, D.N.C.C.; Bermudi, P.M.M.; Rodas, L.A.C.; Nunes, C.M.; Hiramoto, R.M.; Tolezano, J.E.; Cipriano, R.S.; Cardoso, G.C.D.; Codeço, C.T.; Chiaravalloti Neto, F. Human visceral leishmaniasis and relationship with vector and canine control measures. *Rev. Saude Publica* **2018**, *52*, 92.
3. Mohebalı, M.; Moradi-Asl, E.; Rassi, Y. Geographic distribution and spatial analysis of *Leishmania infantum* infection in domestic and wild animal reservoir hosts of zoonotic visceral leishmaniasis in Iran: A systematic review. *J. Vector Borne Dis.* **2018**, *55*, 173–183.
4. Marcondes, M.; Day, M.J. Current status and management of canine leishmaniasis in Latin America. *Res. Vet. Sci.* **2019**, *123*, 261–272.
5. Duthie, M.S.; Lison, A.; Courtenay, O. Advances toward Diagnostic Tools for Managing Zoonotic Visceral Leishmaniasis. *Trends Parasitol.* **2018**, *34*, 881–890.
6. Morales-Yuste, M.; Martín-Sánchez, J.; Corpas-Lopez, V. Canine Leishmaniasis: Update on Epidemiology, Diagnosis, Treatment, and Prevention. *Vet. Sci.* **2022**, *9*, 387.
7. Borja, L.S.; Coelho, L.B.; Jesus, M.S.; de Queiroz, A.T.L.; Celedon, P.A.F.; Zanchin, N.I.T.; Silva, E.D.; Ferreira, A.G.P.; Krieger, M.A.; Veras, P.S.T.; 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 Trop. Dis.* **2018**, *12*, e0006871.

8. Reis, L.E.; Coura-Vital, W.; Roatt, B.M.; Bouillet, L.; Ker, H.G.; Fortes de Brito, R.C.; Resende, D.d.M.; Carneiro, M.; Giunchetti, R.C.; Marques, M.J.; et al. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: A comparative study of three methods using skin and spleen from dogs with natural *Leishmania infantum* infection. *Vet. Parasitol.* **2013**, *197*, 498–503.
9. Grimaldi, G.; Teva, A.; Ferreira, A.L.; dos Santos, C.B.; Pinto, I.; de-Azevedo, C.T.; Falqueto, A. 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*, 54–59.
10. Pattabhi, S.; Whittle, J.; Mohamath, R.; El-Safi, S.; Moulton, G.G.; Guderian, J.A.; Colombara, D.; Abdoon, A.O.; Mukhtar, M.M.; Mondal, D.; et al. Design, development and evaluation of rK28-based point-of-care tests for improving rapid diagnosis of visceral leishmaniasis. *PLOS Neglected Trop. Dis.* **2010**, *4*, e822.
11. Lira, R.A.; Cavalcanti, M.P.; Nakazawa, M.; Ferreira, A.G.; Silva, E.D.; Abath, F.G.; Alves, L.C.; Souza, W.V.; Gomes, Y.M. Canine visceral leishmaniasis: A comparative analysis of the EIE-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos and the IFI-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos kits. *Vet. Parasitol.* **2006**, *137*, 11–16.
12. de Carvalho, F.L.N.; Riboldi, E.O.; Bello, G.L.; Ramos, R.R.; Barcellos, R.B.; Gehlen, M.; Halon, M.L.; Romão, P.R.T.; Dallegrove, E.; Rossetti, M.L.R. Canine visceral leishmaniasis diagnosis: A comparative performance of serological and molecular tests in symptomatic and asymptomatic dogs. *Epidemiol. Infect.* **2018**, *146*, 571–576.
13. Krawczak, F.a.S.; Reis, I.A.; Silveira, J.A.; Avelar, D.M.; Marcelino, A.P.; Werneck, G.L.; Labruna, M.B.; Paz, G.F. *Leishmania*, *Babesia* and *Ehrlichia* in urban pet dogs: Co-infection or cross-reaction in serological methods? *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **2015**, *48*, 64–68.
14. Travi, B.L.; Cordeiro-da-Silva, A.; Dantas-Torres, F.; Miró, G. Canine visceral leishmaniasis: Diagnosis and management of the reservoir living among us. *PLoS Neglected Trop. Dis.* **2018**, *12*, e0006082.
15. Campos, R.M.; Nascimento, M.; Ferraz, J.C.; Pereira, M.M.; Rocha, P.O.; Thompson, G.M.; Cysne-Finkelstein, L.; Figueiredo, R.C.; de Melo Neto, O.P. Distinct mitochondrial HSP70 homologs conserved in various *Leishmania*

- species suggest novel biological functions. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2008**, *160*, 157–162.
16. Magalhães, F.B.; Castro Neto, A.L.; Nascimento, M.B.; Santos, W.J.T.; Medeiros, Z.M.; Lima Neto, A.S.; Costa, D.L.; Costa, C.H.N.; Dos Santos, W.L.C.; Pontes de Carvalho, L.C.; et al. Evaluation of a new set of recombinant antigens for the serological diagnosis of human and canine visceral leishmaniasis. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0184867.
 17. Santos, W.J.T.; Tavares, D.H.C.; Castro Neto, A.L.; Nascimento, M.B.; Dhalia, R.; Albuquerque, A.L.; Costa, C.H.N.; Magalhães, F.B.; Rezende, A.M.; de Melo Neto, O.P. Gene design, optimization of protein expression and preliminary evaluation of a new chimeric protein for the serological diagnosis of both human and canine visceral leishmaniasis. *PLoS Neglected Trop. Dis.* **2020**, *14*, e0008488.
 18. de Paiva Cavalcanti, M.; Felinto de Brito, M.E.; de Souza, W.V.; de Miranda Gomes, Y.; Abath, F.G. The development of a real-time PCR assay for the quantification of *Leishmania infantum* DNA in canine blood. *Vet. J.* **2009**, *182*, 356–358.
 19. Oliveira-Lima, J.W.; Faria Filho, O.F.; Vieira, J.B.; Gadelha, F.V.; Oliveira Filho, A.M. [Peridomestic changes and implications for *Triatoma brasiliensis* control]. *Cad. Saude Publica* **2000**, *16* (Suppl. 2), 75–81.
 20. Fraga, D.B.; Pacheco, L.V.; Borja, L.S.; Tuy, P.G.; Bastos, L.A.; Solcà, M.d.S.; Amorim, L.D.; Veras, P.S. 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 Trop. Dis.* **2016**, *10*, e0004333.
 21. Figueiredo, F.B.; Vasconcelos, T.C.B.; Madeira, M.F.; Menezes, R.C.; Maia-Elkhoury, A.N.S.; Marcelino, A.P.; Werneck, G.L. Validation of the Dual-path Platform chromatographic immunoassay (DPP® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2018**, *113*, e180260.
 22. Fujimori, M.; de Almeida, A.D.B.P.; Barrouin-Melo, S.M.; Cortez, L.R.P.B.; Duthie, M.S.; Hiramoto, R.M.; de Pinho, F.A.; Reed, S.G.; Sousa, V.R.F.; Souza, N.F.; et al. Validation of ELISA with recombinant antigens in serological diagnosis

- of canine *Leishmania infantum* infection. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2021**, *116*, e200428.
23. Oliveira, G.G.; Magalhães, F.B.; Teixeira, M.C.; Pereira, A.M.; Pinheiro, C.G.; Santos, L.R.; Nascimento, M.B.; Bedor, C.N.; Albuquerque, A.L.; dos-Santos, W.L.; 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*, 1025–1034.
24. Cañavate, C.; Bern, C.; Chicharro, C.; Blackstock, A.J.; Alvar, J.; Herrero, M.; Aparicio, P.; Cruz, I.; Argaw, D.; Nieto, J.; et al. Evaluation of two rK39 dipstick tests, direct agglutination test, and indirect fluorescent antibody test for diagnosis of visceral leishmaniasis in a new epidemic site in highland Ethiopia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2011**, *84*, 102–106.
25. Maia, C.; Campino, L. Biomarkers Associated with *Leishmania infantum* Exposure, Infection, and Disease in Dogs. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2018**, *8*, 302.
26. Santos, W.J.T.; Tavares, D.H.C.; Castro Neto, A.L.; Nascimento, M.B.; Dhalia, R.; Albuquerque, A.L.; Costa, C.H.N.; Magalhães, F.B.; Rezende, A.M.; de Melo Neto, O.P. Gene design, optimization of protein expression and preliminary evaluation of a new chimeric protein for the serological diagnosis of both human and canine visceral leishmaniasis. *PLoS Neglected Trop. Dis.* **2020**, *14*, e0008488. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008488>.

5 ARTIGO 2

Desempenho aprimorado no teste de ELISA de uma nova proteína quimérica recombinante (Q8) baseada em epítomos imunogênicos de proteínas da *Leishmania infantum* com potencial para o sorodiagnóstico da leishmaniose visceral canina e humana

Manuscrito em preparação nas páginas seguintes (Revista PLOS ONE)

A doutoranda é primeira autora desse artigo, sendo responsável pela escrita e pelo desenho do gene quimérico, produção, expressão e purificação da proteína recombinante e sua variante, execução dos ensaios de ELISA e análise dos dados estatísticos. Uma nova proteína recombinante quimérica (Q8) foi desenvolvida, baseada na precedente (Q5), mas com modificações em sua sequência e adição de fragmentos de duas novas proteínas antigênicas, Lci5 e Lci13, identificadas como eficientes no diagnóstico da LV canina. Ensaios de ELISA foram realizados para investigar seu potencial no diagnóstico da LV canina e humana. Foram avaliadas amostras de cães (n=108), entre cães sintomáticos (n=44) e assintomáticos (n=64), e humanos (n=75), infectados com *L. infantum*. Como controles, foram utilizadas amostras de soros caninos (n=30) e de humanos saudáveis (n=41). Para avaliação da reatividade cruzada, foram analisados soros de cães infectados com anaplasmoze e ehrliquiose, além de soros humanos acometidos por leishmaniose

tegumentar, Zika, Dengue e Doença de Chagas. Estes ensaios foram realizados utilizando-se como segundo anticorpo, na revelação, anti-IgG humano ou de cão, conforme o caso, conjugados a peroxidase. Os parâmetros de sensibilidade, especificidade e precisão ideais foram estabelecidos usando análises de Curva ROC. Em síntese, os dados obtidos com a Q8 mostraram potencial desse novo antígeno no diagnóstico da LV canina e humana, com valores de sensibilidade ainda melhores do que a sua precedente (Q5), e uma especificidade de 100%. A Q8 identificou (100%) dos cães sintomáticos testados, (93,75%) dos assintomáticos e (97,3%) de humanos com LV. A reatividade cruzada foi observada na Q8 apenas por cães infectados por *Ehrlichia canis* (n=4). Ao final, foi observado um reconhecimento satisfatório na identificação de soros assintomáticos (92,8%) e de humanos (100%) com LV por meio de um único teste de ELISA realizado utilizando proteína A.

Desempenho aprimorado no teste de ELISA de uma nova proteína quimérica recombinante (Q8) baseada em epítomos imunogênicos de proteínas da *Leishmania infantum* com potencial para o sorodiagnóstico da leishmaniose visceral canina e humana

Hemilly R. F. da Silva^{1&}, Adalúcia da Silva¹; Matheus F. Bezerra¹; Larissa F.A Paz³; Maria R. O. C. Beltrão², Zulma M. Medeiros¹, Wagner J. Tenório dos Santos^{4&}, Osvaldo P. de Melo Neto^{1&*}.

¹Instituto Aggeu Magalhães – Fiocruz, Recife, Pernambuco, Brasil;

²Laboratório Central de Pernambuco, Pernambuco, Brasil;

³Universidade de Pernambuco, Recife, Brasil;

⁴Laboratório de Tecnologia Diagnóstica – Bio-Manguinhos, Brasil.

*Autor correspondente

e-mail: osvaldo.pompilio@fiocruz.br

&Esses autores contribuíram igualmente para este trabalho

Resumo

O sorodiagnóstico da leishmaniose visceral (LV) apresenta falhas na precisão devido as variações na sensibilidade e/ou especificidade dos testes. Nesse contexto, antígenos mais refinados devem ser identificados e usados para o aprimoramento do diagnóstico precoce da doença. Aqui, descrevemos uma nova proteína quimérica recombinante (Q8) eficaz para ser usada no sorodiagnóstico da LV canina e humana. O gene sintético da Q8, é derivado daquele codificante de uma outra proteína quimérica previamente descrita (Q5), mas com modificações nas sequências dos fragmentos antigênicos e adição de fragmentos de dois novos antígenos sabidamente eficientes no diagnóstico da LV canina. A proteína Q5, mostrou potencial para diagnosticar cães e humanos infectados com *L. infantum*. Porém, quando avaliada com um número maior de soros de cães com LV, foi constatada a necessidade de melhorias adicionais em sua sequência. O potencial diagnóstico da Q8 foi então avaliado com soros de cães e indivíduos portadores de LV de forma comparativa com a Q8SX2, uma variante truncada onde os fragmentos da Lci5 e Lci13 removidos, e com a Q5. A Q8 apresentou níveis superiores a Q8SX2 e Q5 de sensibilidade para diagnosticar a LV canina e humana, com capacidade de identificar cães sintomáticos e assintomáticos, sem resultados falsos positivos e reatividade cruzada com leishmaniose tegumentar. Também, foi observado resultados satisfatórios da Q8 no ELISA usando proteína A tanto para humanos como caninos. Desta maneira, esse novo antígeno mostrou ser potencialmente capaz em diagnosticar cães e humanos afetados com LV, e uma possível alternativa aos ensaios atualmente recomendados no Brasil.

Introdução

O protozoário parasita *Leishmania infantum* é o principal agente etiológico da Leishmaniose visceral (LV) no Brasil, uma zoonose infecciosa, de evolução crônica e negligenciada [1]. No ciclo epidemiológico da LV, os cães (*Canis familiaris*) são os reservatórios domésticos mais importantes da *L. infantum*, e sabe-se que sua infecção precede os casos humanos. Assim, os cães podem ser considerados marcadores de sinalização da LV, e a detecção rápida e precisa de cães infectados assintomáticos, pode ser a chave para o potencial sucesso do controle da LVC, uma vez que, esses cães constituem a maior parte da população infectada [2-3].

O diagnóstico precoce da LV permite estabelecer medidas de controle eficientes, e conseqüentemente um tratamento mais rápido e eficaz [4]. Um grande número de trabalhos tem sido então direcionado para o desenvolvimento de novos testes diagnósticos. As técnicas sorológicas que detectam anticorpos anti- *Leishmania*, como exemplos o ELISA e o teste rápido imunocromatográfico, oferecem várias vantagens, incluindo baixo custo e rapidez nos resultados, bem como parâmetros adequados de sensibilidade e especificidade quando antígenos apropriados são empregados [5,6]. Diferentes proteínas recombinantes da *Leishmania spp.*, têm sido avaliadas como antígenos promissores para melhorar o desempenho do imunodiagnóstico. Entretanto, a produção de um sistema diagnóstico com duas, três ou mais proteínas recombinantes aumentaria os custos e dificultaria a padronização. Uma alternativa é o uso de polipeptídeos quiméricos baseados em antígenos previamente caracterizados [7,8].

No Brasil, o Ministério da Saúde no Brasil, recomenda para o diagnóstico sorológico da LVC, a Plataforma de duplo percurso (DPP; Bio-Manguinhos, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil), como teste de triagem, que utiliza a proteína quimérica rK26/rK39 como antígeno, combinado com o teste ELISA Leishmaniose Canina (EIE-LVC; Bio-Manguinhos, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil) para confirmação. Entretanto, a precisão destes testes tem sido prejudicada por fatores que afetam sua sensibilidade e/ou especificidade, principalmente relacionados aos antígenos empregados [9,10]. Para o diagnóstico da LVH, o Sistema Único de Saúde tem disponibilizado o teste de imunofluorescência (IFI), utilizando antígeno bruto de *L. infantum*, e os RDT rK39, produzidos por Bio-Manguinhos/ Fiocruz, ao mesmo tempo que, vários outros testes comerciais baseados em ensaios de ELISA e imunofluorescência são registrados na ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária – responsável por que regulamentar a comercialização de testes diagnósticos no Brasil), e são amplamente utilizados, principalmente no setor privado de saúde [11].

Em etapas preliminares a esse estudo, diferentes proteínas recombinantes, derivadas de 13 antígenos distintos (Lci1 a Lci13) foram assim identificadas, com resultados promissores quando utilizadas em um ensaio imunoenzimático (ELISA) com soros humanos e de cães com LV, sendo que os melhores antígenos para o diagnóstico da LV humana diferiam daqueles para a LV canina [12-16]. Com a avaliação de que misturas de antígenos recombinantes eram mais eficientes para o diagnóstico da LV humana e canina do que antígenos individuais, foi desenvolvida uma proteína quimérica recombinante (Q5), construída reunindo três dos potenciais antígenos recombinantes previamente descritos e que mostraram sensibilidade e

especificidade eficientes para o diagnóstico da LV humana (Lci2) ou canina (Lci3 e Lci12) [13,14]. Esta proteína foi avaliada no diagnóstico sorológico por ELISA e mostrou um desempenho bastante satisfatório no diagnóstico tanto da LV humana como da canina [17]. Ainda assim, aumentando o número de soros caninos com suspeita de LV, os dados obtidos para a Q5 ressaltaram a necessidade de melhorias adicionais em sua sequência [43].

O presente trabalho descreve a geração e avaliação de uma nova proteína quimérica recombinante (Q8), baseada na Q5 [17]. A proteína Q8 apresenta modificações nas sequências dos fragmentos antigênicos e inclui ainda segmentos de dois outros antígenos (Lci5, Lci13) que mostraram alta sensibilidade e especificidade para o sorodiagnóstico da LV em cães [14,16]. Os valores de sensibilidade e especificidade usando a Q8 foram investigados em amostras de soros caninos e humanos pelo método sorológico ELISA indireto. Os resultados mostraram que a Q8 apresentou resultados ainda melhores do que a Q5 para o diagnóstico da LV canina e humana, revelando um reconhecimento satisfatório na identificação de cães sintomáticos e assintomáticos e indivíduos com LV por meio de um único teste ELISA realizado utilizando-se a proteína A.

Métodos

Desenho do gene quimérico através de predição de epítomos

Para a predição de epítomos nas sequências das proteínas Lci5 e Lci13 foi utilizado o servidor ABCpred, que prevê regiões lineares de epítomos de células B [18]. Os servidores, NetMHCII 2.3 e NetMHCII pan, foram utilizados para prever a ligação de peptídeos a moléculas MHC de classe II de humanos [19], uma vez que

não há preditores para cães descritos na literatura e foi observada uma similaridade na estrutura genômica do MHC II de humanos e de cães, com três sub-regiões conservadas: *DP*, *DQ* e *DR* [20].

A sequência do gene desenhado foi otimizada para expressão em *Escherichia coli* através do programa Gendesigner e enviado para síntese comercial na ThermoGENEART. O gene foi adquirido clonado nos sítios XbaI/HindIII do vetor pRSETA (Thermo Fisher Scientific, US) e no vetor de clonagem pMK-RQ (Thermo Fisher Scientific, US). Os sítios de restrição Xba I e Hind III foram adicionados às extremidades 5' e 3', respectivamente, do gene sintético, como estratégia para subclonagem em diferentes vetores de expressão e de clonagem. Também, este gene possui sítios para enzimas de restrição Sal I/Xho I entre as sequências inseridas, favorecendo novas construções. Para a purificação por afinidade da proteína recombinante, uma sequência codificando seis histidinas (6x-His) foi adicionada a montante do códon de parada do gene sintético.

Expressão das proteínas recombinantes em *Escherichia coli*

Para expressão da proteína, o plasmídeo pRSETA com o gene quimérico sintetizado foi transformado em *E. coli* BL21 DE3 e *E. coli* Rosetta™ 2 DE3 (Novagen), seguida de seleção com ampicilina (100 µg/ml) e cloranfenicol (25 µg/ml) a 37°C em meio Luria-Bertani (LB) e indução a 30°C e/ou 18°C (OD 800 ~ 0,8) durante três horas com 0,5 mM de isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG). A verificação da indução das proteínas foi monitorada por gel SDS-PAGE corado com azul de Coomassie e as proteínas visualizadas através do Sistema de imagem Ibrighth da Invitrogen ThermoFisher.

Para a avaliação da solubilidade da proteína recombinante em ureia, sedimentos bacterianos coletados após a indução com IPTG, e mantidos no freezer -20 °C, foram descongelados em gelo e ressuspensos em quatro alíquotas de tampão A (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 300 mM NaCl, 20 mM imidazol, 10 mM 2-Mercaptoetanol), com três destas alíquotas contendo concentrações crescentes de ureia (2M; 4M; 8M) e uma outra fração de tampão A sem ureia. As alíquotas foram submetidas a dez ciclos de congelamento no nitrogênio e descongelamento no banho-maria a 37°C. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 10.000 rpm e tiveram suas frações separadas. Após a separação das frações proteicas contidas no sedimento celular e sobrenadante, realizou-se uma análise em eletroforese gel SDS-PAGE para a avaliação da solubilidade da proteína recombinante. Uma vez que a proteína foi considerada solúvel em todas as concentrações de ureia, optou-se por usar o tampão A com a menor concentração de ureia (2M), para torná-la solúvel e viável para as etapas seguintes de purificação.

Purificação por cromatografia de afinidade

A purificação das proteínas recombinantes foi realizada através de cromatografia de afinidade, utilizando a coluna HisTrap HP de 5 mL (GE Healthcare), no sistema AKTApure (GE Healthcare). Culturas bacterianas foram ressuspensas em 20 ml de tampão A (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 300 mM NaCl, 20 mM imidazol, 2 M ureia, 10 mM 2-Mercaptoetanol) e lisadas por ultrasonicação com seis pulsos de 30 segundos a 4°C. A fração solúvel foi isolada por centrifugação a 20.000 g por 30 minutos a 4°C e carregada na coluna His-Trap HP de 5 mL (GE Healthcare Life Sciences) equilibrada com tampão A. As proteínas foram eluidas em duas etapas: com um gradiente linear

de 10 volumes de coluna (CV) de 0% a 10% de tampão B (tampão A + 500 mM de imidazol) seguido por um gradiente linear de 20 CV de 10% a 100% de tampão B. A verificação da proteína nas frações eluídas foi monitorada por gel SDS-PAGE corado com azul de Coomassie e visualizadas através do Sistema de imagem Ibrigth da Invitrogen Thermo Fisher.

Amostras de soros humanos

Amostras de soros de indivíduos com LV (n=75) foram obtidas do Mato Grosso do Sul-MS (n=75), Centro-Oeste, Brasil; e do Piauí-PI, Nordeste, Brasil, consideradas áreas endêmicas para LV. As amostras foram previamente triadas pela técnica parasitológica e confirmadas pelo ELISA baseado no lisado total de *L. major*. Também foram utilizadas amostras de soro de indivíduos não infectados (n=41) residentes de áreas endêmicas de Pernambuco, Nordeste, Brasil. Soros de indivíduos com Leishmaniose Tegumentar (LT) (n=8), doença de Chagas (n=2), Dengue (n=7) e Zika (n=2) foram utilizados para avaliar a reatividade cruzada.

Amostras de soros caninos

O painel de soros caninos utilizados foi fornecido pela vigilância epidemiológica da LVC no sistema público de saúde, Ministério da Saúde (responsável pela realização de testes confirmatórios de LV) do Estado de Pernambuco, Nordeste, Brasil. As informações sobre as condições epidemiológicas e clínicas relatadas foram coletadas no momento do registro dos cães positivos para LV.

Um total de 108 amostras de cães infectados positivos para LV foram obtidas para avaliação no ELISA. As amostras foram primeiramente triadas pelo teste rápido imunocromatográfico TR-DPP Bio-Manguinhos e os resultados foram confirmados

pelo EIE-Bio-Manguinhos (FIOCRUZ, Kit ELISA) conforme recomendação do Ministério da Saúde do Brasil. As amostras foram agrupadas das seguintes formas: cães sintomáticos (n=44), e assintomáticos (n=64). Soros de cães saudáveis (n=30) foram utilizados como controles, sendo todos soros caninos de área endêmica do Estado de Pernambuco. Amostras de soros de cães infectados por *Ehrlichia canis* (n=5) e *Anaplasma spp.* (n=5), foram usados para avaliar a possibilidade de reatividade cruzada.

Ensaio imunoenzimático indireto (ELISA)

Para avaliação antigênica das proteínas quiméricas Q8, Q8SX2 e Q5, foi realizado ELISA indireto, utilizando soros caninos e humanos. Antes da execução do teste, foi feita a padronização das concentrações de antígeno, soro e conjugado. Foram testadas quatro concentrações do antígeno (100ng, 200ng, 400ng e 600ng); e quatro faixas de diluição do soro (1:600, 1:900, 1:1.200, 1:1.800). Por fim, a concentração de 100 ng e a diluição do soro de 1:900 foram escolhidas para cada antígeno e aplicadas para avaliação das amostras.

Uma mistura de soros de cães positivos para LV, com diagnóstico prévio no DPP e EIE-LVC, foi utilizado como controle positivo. O controle negativo foi definido com uma mistura de soros de cães saudáveis, sem sinais clínicos da doença, com diagnósticos sorológico e parasitológico negativos para LV.

A quantificação das amostras sorológicas do estudo no ELISA foi realizada em microplacas de poliestireno com 96 poços (BIOFIL®) revestidas com (100µL/poço) do antígeno (0,1µg/ml), diluído em tampão carbonato-bicarbonato 0,05 M pH 9,6. A placa foi sensibilizada à 4°C por 16horas. No dia posterior, as placas foram lavadas

pela Lavadora de Microplacas PW40 da BIO-RAD, por duas vezes (500µL/poço) com solução salina tamponada com fosfato (PBS) pH 7,2. As placas foram bloqueadas com 100µL/poço de PBS, contendo 10% de leite desnatado (Molico, Nestlé) (PBS-L 10%) por 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram lavadas, por duas vezes com solução PBS contendo 0,05% de Tween 20 (monolaurato de polioxietileno-sorbitano, Sigma-Aldrich, St. USA) (PBS-T). As amostras de soros selecionadas foram diluídas 1:900 em PBS-T contendo 10% de leite desnatado (Molico, Nestlé) (PBS-TL 10%), e aplicadas em triplicatas (100µL/poço) por 1 hora à temperatura ambiente. Após duas lavagens com PBS-T, os poços foram incubados com 100µL anti-IgG canino conjugado com peroxidase (Sigma Aldrich, USA), para os ensaios com soros caninos; 100µL anti-IgG humano conjugado com peroxidase (Invitrogen Thermo Fisher, BR), para os ensaios com soros humanos; e com proteína A, os poços foram incubados com 100µL do conjugado (Sigma Aldrich, USA). Todos os conjugados foram aplicados na proporção de 1:10.000 com uso de solução PBS-TL 10%, por 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram lavadas, por duas vezes com solução PBS contendo 0,05% de Tween 20. Ao final, a atividade enzimática foi revelada com 150µL peróxido de hidrogênio 0,01% e orto-fenilenodiamina (OPD, da Sigma-Aldrich) em tampão fosfato-citrato pH 5,0, durante 30 minutos e a reação interrompida com 100µl de Ácido Sulfúrico (H₂SO₄) 2,5M. As absorbâncias foram lidas com o filtro de 492nm em um Benchmark Plus Microplate Manager 5.2 (BIO-RAD). Para cada amostra de soro/proteína, os ensaios foram realizados em triplicata com o resultado proveniente da média das três amostras subtraindo os valores dos poços em branco (apenas com PBS-TL).

Análises estatísticas

Os dados foram inseridos em planilhas no Microsoft office Professional Plus Excel (2021) e analisados no GraphPad Prism™ (versão 6.0 para Windows) e no OpenEpi, Versão 3, calculadora de código aberto. Curvas características de operação do receptor (ROC) foram construídas para determinar os limites de reatividade (*cut-off*) e para estimar a sensibilidade (Se), especificidade (Sp) e intervalos de confiança (95% IC) de cada ensaio. O *cut-off* foi usado para discriminar entre os números de amostras verdadeiro positivas (VP) e verdadeiro negativas (VN). As curvas de soros caninos foram traçadas com os valores de cães com LV (n=108), compreendendo animais sintomáticos (n=44) e assintomáticos (n=64) *versus* o grupo controle de cães saudáveis (n=30). Todos esses soros caninos são de Pernambuco, área endêmica para LVC. Por outro lado, as curvas para os soros humanos foram estabelecidas com os valores dos soros LVH (n=75), que inclui soros do Mato Grosso do Sul (n=34) e Piauí (n=41) *versus* o grupo controle composto por indivíduos saudáveis (n=41). Outros parâmetros importantes para o desempenho de um teste diagnóstico, como o valor preditivo (positivo e negativo) e a acurácia também foram avaliados.

As curvas dos ensaios usando o conjugado à base de proteína A, foram traçadas com os valores de cães assintomáticos com LV (n=14), *versus* o grupo controle de cães saudáveis (n=14). E as curvas para os soros humanos foram estabelecidas com soros de indivíduos com LV (n=8), *versus* o grupo controle de indivíduos saudáveis (n=9). O gráfico de correlação foi gerado e analisado no GraphPad Prism™ (versão 6.0 para Windows). Foi considerado o coeficiente de correlação de Pearson, avaliando se as variáveis estavam diretamente relacionadas.

A concordância dos resultados das técnicas (DPP e EIE-LVC) para cães, e (Parasitológico e ELISA baseado em extrato bruto de *Leishmania*) para humanos, com os antígenos deste estudo, foi avaliado por meio do índice Kappa.

Considerações éticas

Para o ELISA com as amostras de cães, a pesquisa teve início após avaliação e aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais - CEUA/UPE sob registro nº 03/2020.

As amostras de soros humanos com LV do Piauí, tiveram seu uso aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Piauí (0116/2005). E os soros de indivíduos do Mato Grosso do Sul foram incluídos em um estudo aprovado pelo Comitê de Ética do Ministério da Saúde do Brasil (25000.119007/2002-03). O uso de soros infectados com outros patógenos, mais os controles de indivíduos saudáveis foram aprovados pelo Comitê de Ética do IAM/FIOCRUZ, registrado no CAEE 11083812.7.0000.5190.

Resultados

Reavaliação das regiões antigênicas originalmente presentes na proteína quimérica Q5

A estratégia de desenho do novo gene quimérico teve como base aquele codificando a proteína Q5 já descrita [17]. A Q5 consistiu de quatro fragmentos repetitivos de oito aminoácidos do antígeno Lci12; cinco repetições de 39 aminoácidos do antígeno Lci2; dez repetições de 14 aminoácidos do Lci3; da região C-terminal da Lci3 de 235 aminoácidos; e de uma cauda de seis histidinas na

extremidade C-terminal. Em um primeiro momento, resolvemos reavaliar os fragmentos antigênicos incluídos e verificar a possibilidade de incluir e/ou eliminar fragmentos selecionados de forma a reduzir o tamanho da proteína e/ou aumentar ainda mais sua antigenicidade. Optou-se por não modificar os motivos das Lci2 e Lci12, porém, em relação as dez repetições da Lci3 que compreendiam vários motivos iguais, foram decididas manter apenas quatro repetições, aquelas com maior divergência de sequência. A figura 1 representa esquematicamente a posição dos fragmentos antigênicos dos três antígenos originais mantidos na nova proteína quimérica a ser produzida.

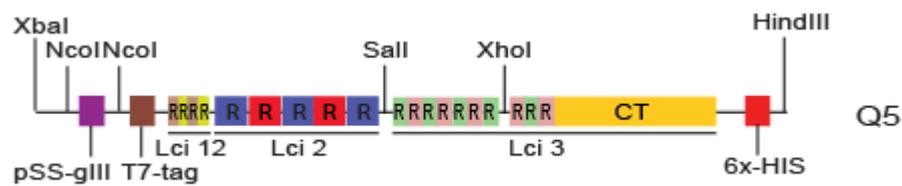


Fig. 1 Avaliação dos domínios antigênicos e representação esquemática do gene quimérico Q5. Representação esquemática da construção da Q5 projetada com as repetições da Lci2, Lci12 e repetições extras da Lci3 flanqueada pelos sítios de restrição Sal I/Xho I.

Identificação de fragmentos da Lci5 e Lci13 para inclusão na nova proteína quimérica

Tendo em vista o ótimo desempenho individual dos antígenos Lci5 e Lci13 para o diagnóstico da LV canina, conforme previamente descrito [14-16], decidiu-se incluir fragmentos da Lic5 e Lci13 na nova proteína quimérica. Entretanto, ambos os antígenos são derivados de proteínas longas e mais complexas e por isso foram selecionados fragmentos menores ao longo de sua sequência, mas que poderiam

ser potencialmente mais relevantes do ponto de vista antigênico. A partir da Lci5 foram identificados 89 peptídeos de interesse através do programa NetMHCII 2.3; 72 epítomos pelo NetMHC pan e 07 epítomos pelo ABCpred. Para a Lci13, foram identificados 55 epítomos pelo NetMHCII 2.3; 92 epítomos pelo NetMHC pan e 16 epítomos pelo ABCpred. Todos estes epítomos foram considerados fortes por possuírem afinidade prevista com um conjunto de 200.000 epítomos naturais aleatórios do mesmo comprimento. Uma análise posterior foi realizada, selecionando apenas os epítomos que foram similares nos três algoritmos computacionais utilizados, restando apenas dois epítomos para Lci5 e cinco epítomos para Lci13. Ao final, utilizamos o PyMOL que é um sistema de visualização de molécula para modelagem da proteína Lci13 e localização dos cinco epítomos preditos em sua estrutura. Foram excluídos dois epítomos garantindo um tamanho considerável do novo gene sintético. A figura 2 ilustra as etapas realizadas para predição dos epítomos.

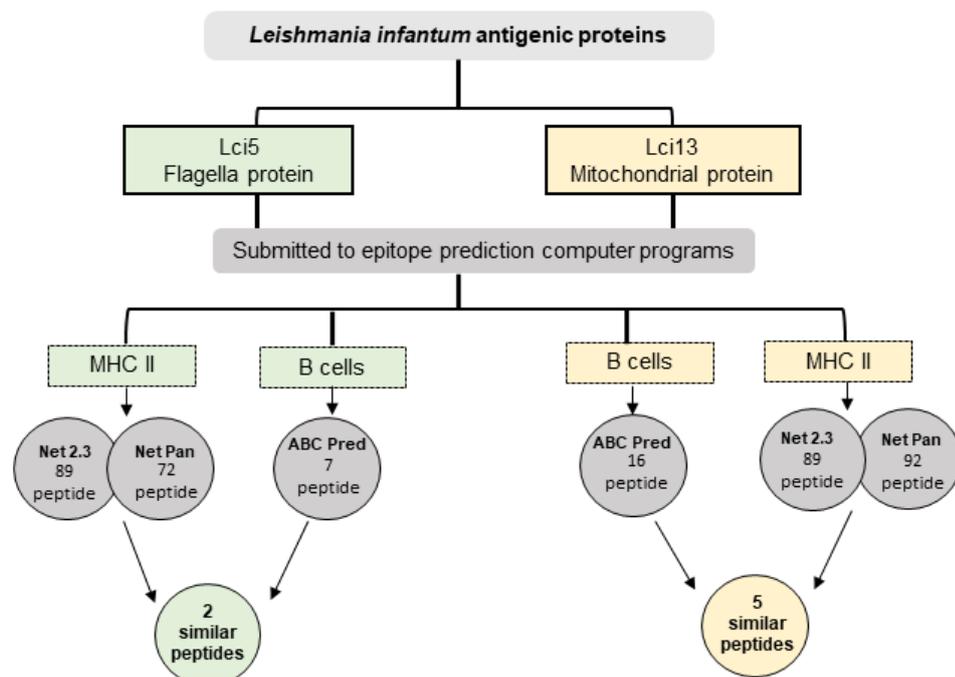


Fig. 2 Fluxograma mostrando as etapas realizadas para predição dos epítomos com as proteínas Lci5 e Lci13. Legenda: MHC II- Complexo principal de histocompatibilidade classe II.

Com base nos epítomos selecionados foram definidos então dois peptídeos para a Lci5, o primeiro de 29 aminoácidos, e um segundo de 21 aminoácidos, correspondentes aos dois epítomos identificados para esta proteína. Já da Lci13, dois peptídeos foram definidos, o primeiro de 34 aminoácidos, e correspondente a dois dos epítomos selecionados para esta proteína, e um segundo, de 24 aminoácidos, correspondente ao terceiro epítomo. Sequências codificantes destes quatro fragmentos foram então desenhadas para inclusão no novo gene quimérico, sendo que para aumentar a flexibilidade dos peptídeos resultantes, sequências codificadoras de ligantes flexíveis (Gly-Pro-Gly-Pro-Gly) [21] foram usadas como espaçador entre as sequências dos fragmentos das Lci5 e Lci13.

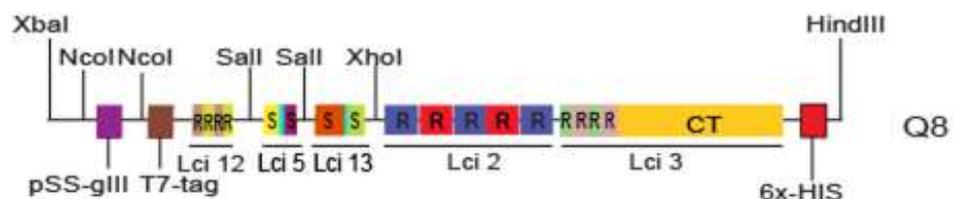
Desenho e síntese do novo gene quimérico e proteína recombinante

A fim de gerar uma nova proteína quimérica recombinante Q8 eficaz para o diagnóstico da LV canina e humana, os fragmentos dos cinco genes selecionados (Lci2, Lci3, Lci5, Lci12 e Lci13) tiveram seus códons otimizados para expressão em *E. coli*. Para potencializar a expressão, foram incluídas sequências adicionais em sua extremidade 5' e que, incluem um sítio de ligação ao ribossomo, e o elemento Shine-Dalgarno (pRBS), para estimular a tradução do mRNA; um domínio líder N-terminal da proteína III do pSS-gIII, um fago filamentoso, geralmente usado para a expressão eficiente de fragmentos de proteínas em bibliotecas de expressão de

exibição de fagos [22]; e antecedendo o fragmento da Lci12, os primeiros onze resíduos da nova proteína são do bacteriófago T7 (o epítipo T7 tag) [23].

Ao final do gene quimérico, uma sequência codificando para seis histidinas (6x-His) foi incluída na extremidade 3' antes do códon de terminação da tradução, para permitir a purificação da nova proteína, independente do vetor de expressão utilizado. Sítios de enzimas de restrição foram adicionados e localizados em posições estratégicas ao longo da sequência, permitindo modificações nesse gene (Fig. 3A). A partir destes sítios foi então produzido uma variante codificando para uma versão truncada da proteína Q8, denominada de (Q8 SX2), gerada a partir da digestão com as enzimas de restrição Sal I / Xho I e religação com a enzima T4 DNA ligase (Fig. 3B). Esta nova proteína consiste basicamente dos mesmos fragmentos antigênicos presentes na proteína Q5 original na configuração modificada conforme ilustrada na figura 1.

A)



B)

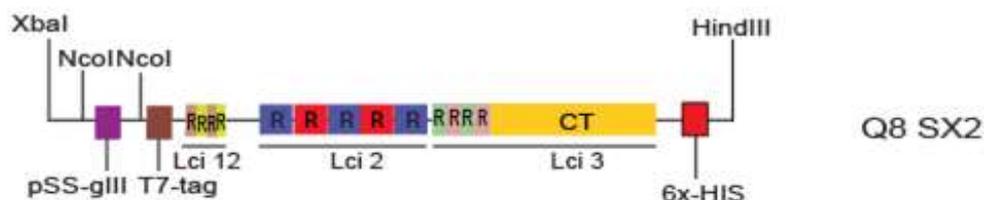


Fig. 3 Avaliação dos domínios antigênicos e representação esquemática do novo gene quimérico. A) Representação esquemática da construção da Q8 projetada com as

repetições da Lci12, fragmentos antigênicos da Lci5, Lci13, flanqueada por locais de restrição Sal I/XhoI, além das sequências da Lci2 e repetições extras da Lci3 incluindo a região CT (região C- terminal). B) As digestões com as enzimas de restrição Sal I/Xho I e religações foram realizadas para gerar uma variante truncada do gene sintético original Q8, denominada (Q8SX2). A Q8SX2 em sua sequência possui ausência dos fragmentos da Lci5 e Lci13.

Perfis de expressão em *Escherichia coli* das proteínas quiméricas

As proteínas Q8 e a Q8 SX2, foram expressas em *E. coli*, gerando proteínas apresentando cerca de 97 kDa e 68 kDa, respectivamente (Fig. 4A; Fig. 4B). Avaliamos a expressão de ambas a 37°C; 30°C e 18°C em diferentes tempos, mas não houve uma diferença na expressão quantitativa da proteína entre as células induzidas nas diferentes temperaturas e períodos de incubação. A expressão proteica maximizada foi de duas maneiras: em *E. coli* Rosetta™2 a 30°C por 3h após indução; e em *E. coli* BL21 a 18°C por 16h após indução.

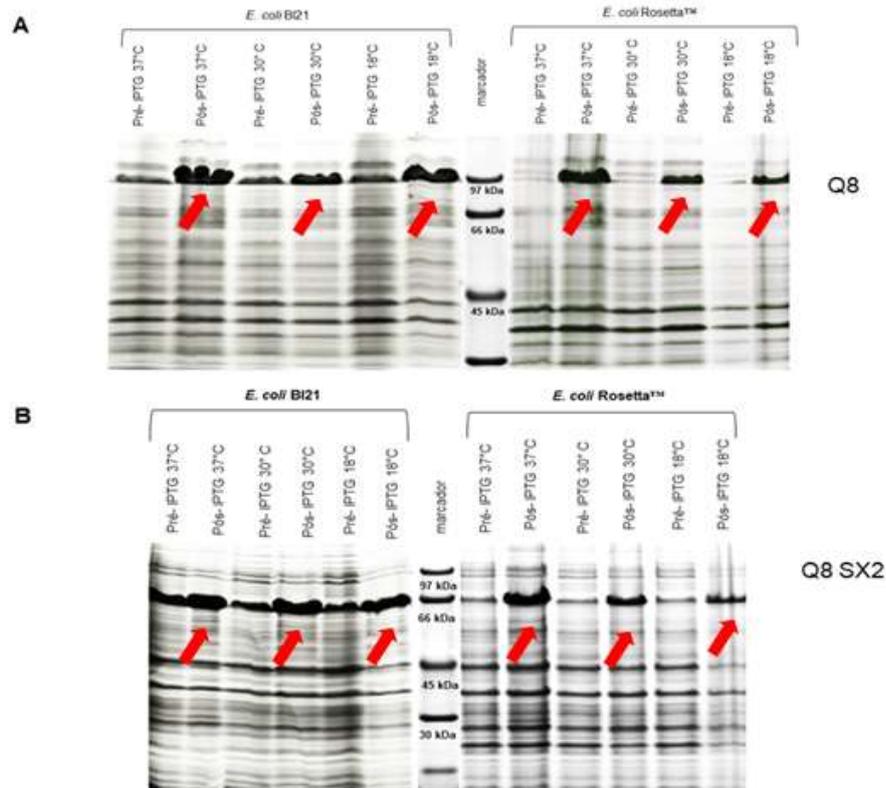
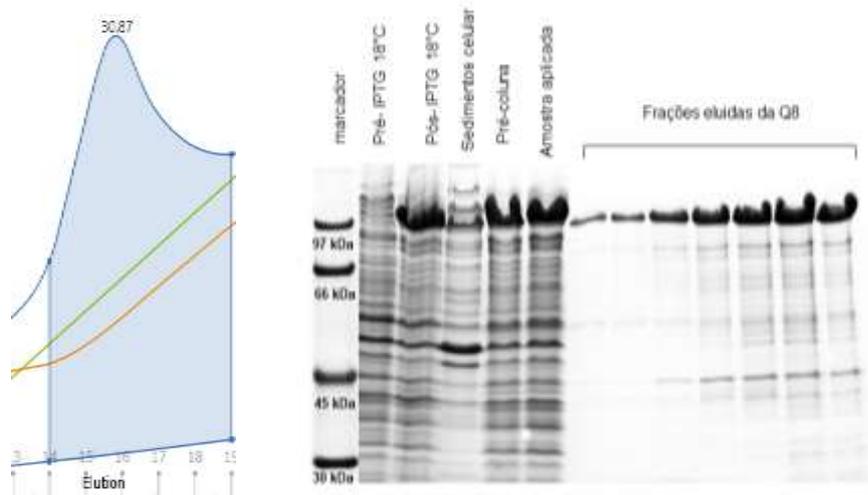


Fig. 4 Gel SDS-PAGE mostrando a expressão da Q8 e sua variante Q8 SX2. A) Gel SDS-PAGE a 15% corado com Coomassie Blue mostrando a expressão da Q8 em *E. coli* (BL21 e Rosetta™2). B) O mesmo para expressão da variante Q8 SX2 em *E. coli* (BL21 e Rosetta™2). Os números no centro da figura indicam os tamanhos dos marcadores de peso molecular. As setas indicam as bandas das proteínas, Q8 apresentando cerca de 95 kDa, e Q8SX2 com cerca de 68 kDa.

A seguir, buscou-se avaliar a solubilidade das proteínas recombinantes. As proteínas Q8 e Q8SX2 foram solubilizadas em maior proporção na concentração de 2M de ureia, condição selecionada para as etapas posteriores de purificação. Em seguida foram então purificadas eficientemente por cromatografia de afinidade (Fig.5A; Fig.5B). A concentração das proteínas purificadas foi calculada pelo *iBright™ Image Analysis Report*, considerando os valores de densidade das bandas em comparação com diferentes concentrações conhecidas de curva padrão de

albumina sérica bovina (BSA). No geral, nossos resultados destacam uma eficaz produção de proteínas quiméricas recombinantes em sistema heterólogo, de maneira rápida e de fácil execução.

A)



B)

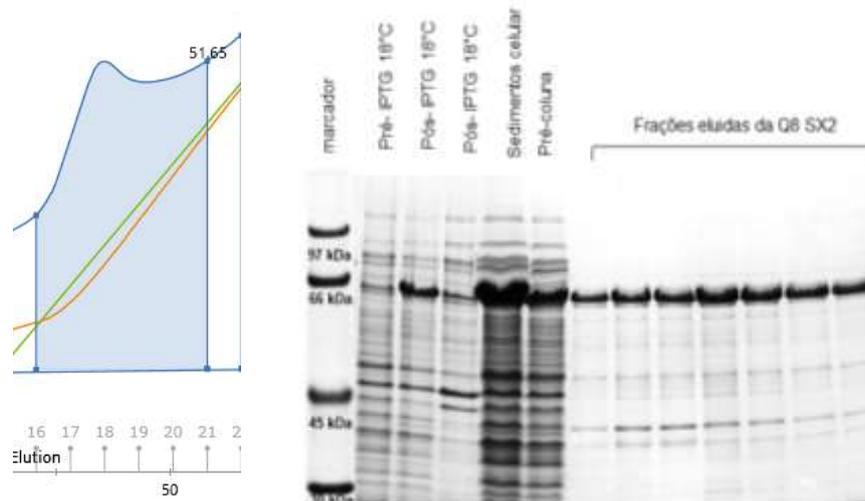


Fig. 5 Análise da purificação por cromatografia de afinidade das proteínas Q8 e Q8SX2 em uma coluna de níquel. Os gráficos a direita mostram os perfis de eluição das proteínas Q8 (A) e Q8SX2 (B) no aparelho Akta. A esquerda, observam-se os resultados dos géis SDS-PAGE mostrando as duas proteínas purificadas a 2M de ureia. Legenda: linha azul= eluição da proteína; linha verde= concentração do imidazol; linha laranja=

concentração do tampão A. Pré-coluna: é a amostra antes de ser aplicada a coluna HisTrap HP de 5 ml.

Avaliação diagnóstica para LVH das proteínas quiméricas recombinantes no ELISA

A eficácia diagnóstica das quimeras Q8, Q8SX2 e Q5 foram avaliadas no ELISA, como já descrito para os soros caninos (Figura 6). Os resultados mostraram que a Q8 identificou 97,3% dos soros de indivíduos com LV, enquanto que a Q8SX2 teve resultados positivo com 96% desses soros e a Q5 reagiu com 81,3% destes, gerando ainda um resultado falso positivo. Os valores de sensibilidade e especificidade, bem como de valor preditivo positivo e valor preditivo negativo, estão descritos na tabela 1.

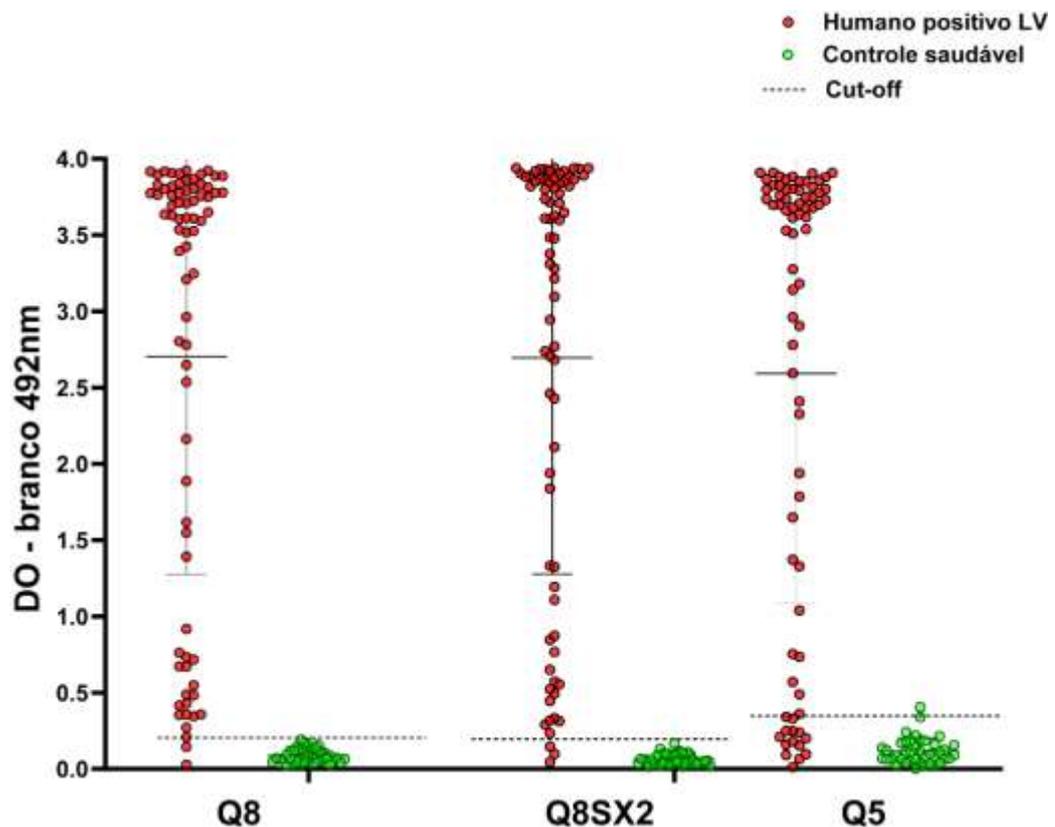


Fig. 6 Ensaio sorológico empregando os antígenos quiméricos recombinantes.

Amostras de soros humanos com LV totalizam 75 soros, sendo soros de humanos com LV do MS (n=34), e do PI (n=41). Soros de indivíduos saudáveis, de áreas endêmicas para LVH, foram usados como controles (n=41). As linhas pontilhadas representam o valor de corte obtido pelas curvas ROC, que foram utilizadas para obter a sensibilidade, especificidade e AUC dos antígenos para cada grupo. DO- Densidade Óptica; Branco- valores dos poços em branco (apenas com PBS-TL).

Tabela 1. Amostras de soro humano usadas neste estudo.

Diagnóstico prévio parasitológico e ELISA extrato de *Leishmania*.

ELISA	LVH (n=75) MS/ PI	MS (n=34)	PI (n=41)	CT (n=41)	VPP (%)	VPN (%)	AC (%)	k
	Se (%)	Se (%)	Se (%)	Es (%)	%	%	%	-
Q8	97,3 (91 - 99)	100 (90- 100)	96 (89- 99)	100 (91- 100)	100 (95-100)	95,3 (84-99)	98,3 (94-99)	0,962 (0,8-1,1)
Q8SX2	96 (89 - 99)	100 (90- 100)	92,6 (80- 97)	100 (89- 100)	100 (95-100)	93,1 (82-98)	97,4 (93-99)	0,944 (0,8-1,1)
Q5	82,6 (72 - 89)	82,3 (66- 92)	82,9 (68- 91)	97,5 (87- 99)	98 (91-100)	74 (61-84)	87 (80-92)	0,736 (0,5-0,9)

Os parâmetros foram calculados usando todas as amostras apresentadas neste trabalho: Controles saudáveis (CT, n=41) e positivo para Leishmaniose Visceral (LV, 75), composto por indivíduos do Estado do Mato Grosso do Sul (MS, n=34), e indivíduos do Estado do Piauí (PI, n=41).

*Cut-off obtido pela curva ROC.

Abreviaturas: LVH, Leishmaniose Visceral Humana; Se, sensibilidade; Es, especificidade; CT, controles; IC, intervalo de confiança; VPP, valor preditivo positivo; VPN, valor preditivo negativo; AC, precisão; k, índice kappa.

Avaliação comparativa das proteínas quiméricas recombinantes para diagnóstico da LVH

A análise da curva ROC foi também realizada para avaliar a precisão de cada antígeno no ELISA para o diagnóstico da LVH. Representados pelos valores da área sob a curva (AUC), observou-se desempenho significativo da Q8 contra soros de indivíduos positivos para LV do MS e do PI em conjunto (0,985; IC 95%= 0,959-

1,000) (Figura 9). Quando avaliados de forma separada, a AUC dos indivíduos LV do MS mostrou um desempenho considerado superior (1,000 IC 95%= 1,000- 1,000) em comparação com a observadas com as amostras do PI (0,983; IC 95%= 0,957- 1,000) (resultados não mostrados no gráfico).

A variante Q8SX2 também demonstrou precisão quando analisado os valores da AUC para soros de indivíduos com LV do MS e do PI em conjunto (0,987; IC 95%= 0,969- 1,000) (Figura 9); soros com LV apenas do MS (1,000; IC 95%= 1,000– 1,000); e soros com LV só do PI (0,977; IC 95%= 0,943- 1,000) (resultados não mostrados no gráfico). Para avaliação da Q5, utilizou-se o mesmo grupo de soros humanos desse estudo. A Q5 apresentou diminuição da precisão nas análises da curva ROC para soros com LV do MS e do PI em conjunto (0,947; IC 95%= 0,907- 0,986) (Figura 7); para amostras de soros LVH apenas do MS (0,954; IC 95%= 0,907– 1,000); e amostras de soros LVH só do PI (0,941; IC 95%= 0,882- 0,999) (resultados não mostrados no gráfico).

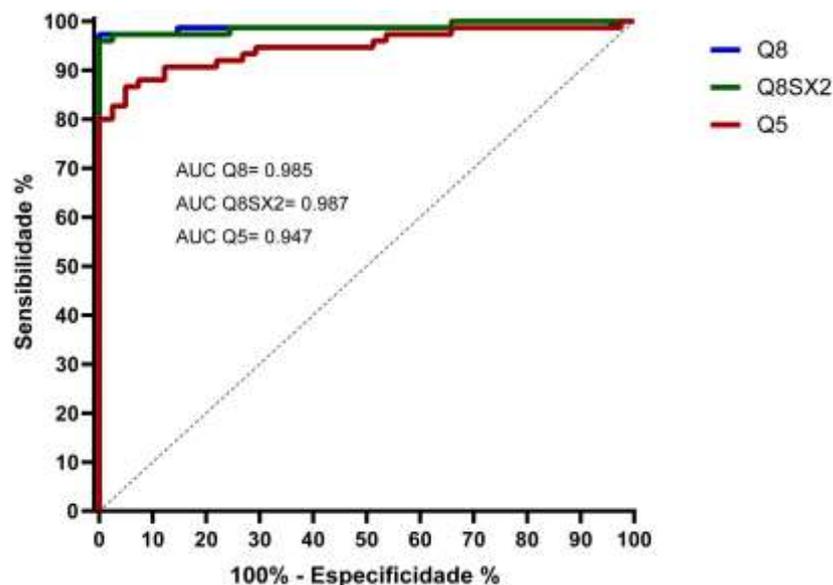


Fig. 7 Desempenho diagnóstico dos antígenos quiméricos recombinantes no ELISA. A análise da curva ROC dos dados obtidos no ELISA foi realizada. A AUC da Q8,

Q8SX2 e Q5 mostra os resultados obtidos quando analisados em conjunto indivíduos com LV do MS e PI e indivíduos saudáveis de Pernambuco.

Também, foi determinada a sensibilidade e especificidade para cada proteína quimérica recombinante pela análise da curva ROC e avaliados os valores preditivos (positivos e negativos), assim como, a acurácia dos testes. Os experimentos foram realizados equitativamente para demonstrar a robustez do ensaio (tabela 2). Em particular, em termos de sensibilidade a Q8 e a Q8SX2 foram mais sensíveis, com valores de 97,3% e 96%, respectivamente. A Q5 demonstrou valores menores de sensibilidade (82,3%) e especificidade (97,5%) para a LVH. Todos os antígenos demonstraram dados relevantes de especificidade, indicando sua utilidade na exclusão de humanos verdadeiramente saudáveis, evitando um diagnóstico falso positivo para LVH. Os valores de PPV (100%) e PNV (95,3%) da Q8 indicaram a precisão desse antígeno no ELISA em discriminar humanos infectados com *L. infantum* e com resultados positivos para LV de indivíduos saudáveis serem realmente normais. O índice kappa (0,962), revelou que a Q8 apresenta concordância com o teste parasitológico e o ELISA baseado em lisado bruto de *Leishmania* para o diagnóstico da LV humana.

Assim, nossos dados suportam a ideia do potencial da Q8 na triagem e detecção da LVH.

Avaliação diagnóstica para LVC das proteínas quiméricas recombinantes no ELISA

A eficácia diagnóstica das quimeras Q8, Q8SX2 e Q5 foi avaliada por meio de ensaios de ELISA utilizando como segundo anticorpo, anti-IgG de cão ou anti-IgG

humano, conforme o caso, adquiridos comercialmente conjugados a peroxidase. No caso da avaliação com os soros caninos, os resultados mostraram que a Q8 foi identificada por todos os soros de cães sintomáticos testados (100%), e pela grande maioria de cães assintomáticos (93,75%), com valores de sensibilidade e especificidade, bem como com valores elevados para os parâmetros de valor preditivo positivo e valor preditivo negativo, descritos na (Tabela 2). A Q8SX2 e Q5 usadas como antígenos comparativos apresentaram boa reatividade com cães sintomáticos 100% e 95,45%, respectivamente, mas com valores inferiores para cães assintomáticos, respectivamente 89,06% e 81,25% (Figura 8).

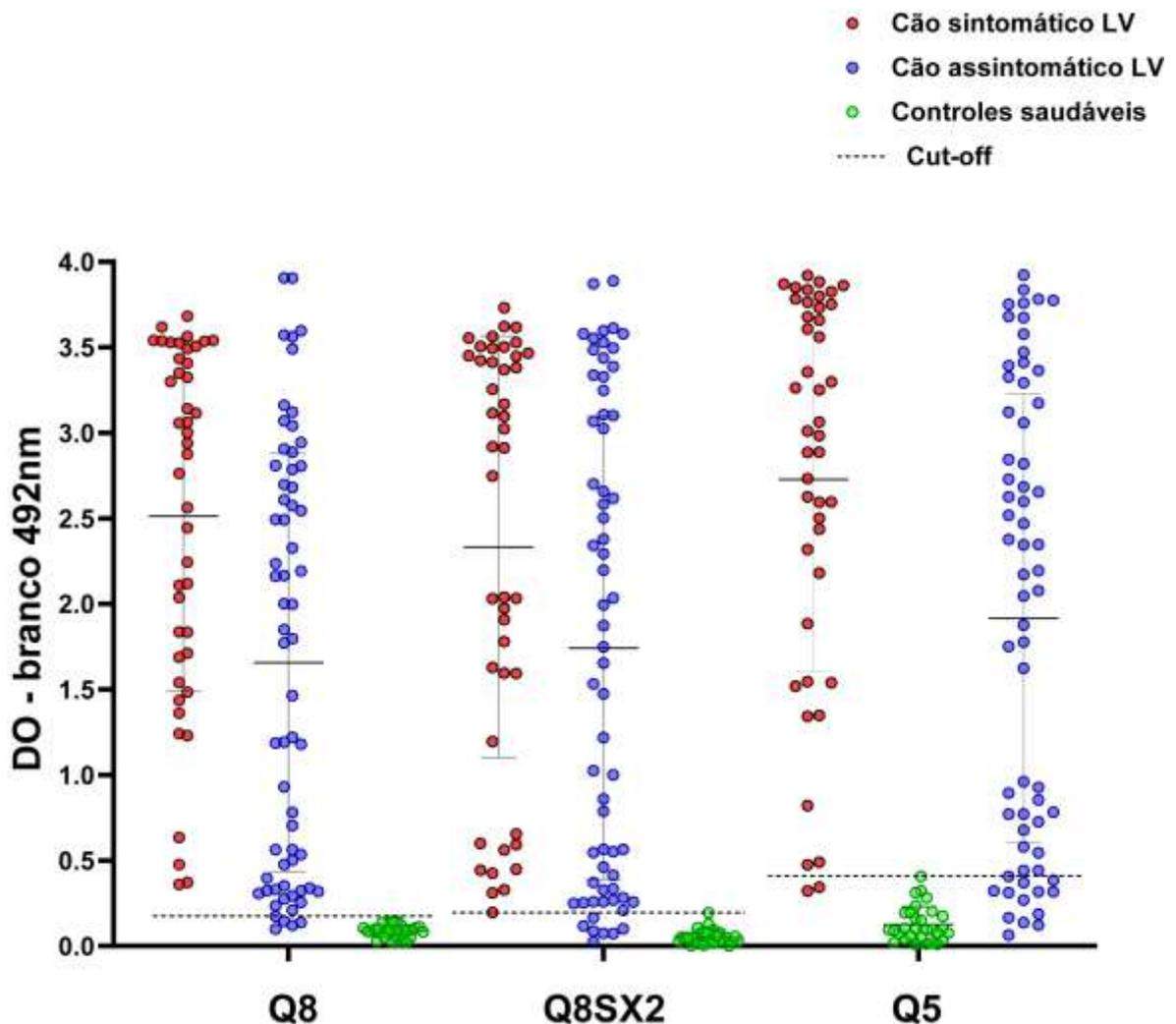


Fig. 8 Ensaio sorológico empregando os antígenos quiméricos recombinantes.

Amostras de cães sintomáticos (n=44) e assintomáticos (n=64) com LV, bem como cães saudáveis usados como controles (n=30). Todos os cães são de Pernambuco, Nordeste, Brasil, área endêmica para LVC. As linhas pontilhadas representam o valor de corte obtido pelas curvas ROC, que foram utilizadas para obter a sensibilidade, especificidade e AUC dos antígenos para cada grupo; DO- Densidade Óptica; Branco- valores dos poços em branco (apenas com PBS-TL).

Tabela 2: Amostras de soro canino usadas nesse estudo.

Diagnóstico prévio no teste DPP e EIE-LVC.

ELISA	LVC (n=108) Si/ As	Si (n=44)	As (n=64)	CT (n=30)	VPP (%)	VPN (%)	AC (%)	k
	Se (%)	Se (%)	Se (%)	Es (%)	%	%	%	-
Q8	96,3 (91 - 98)	100 (92- 100)	93,7 (85- 97)	100 (89- 100)	100 (96-100)	88,2 (73-95)	97,1 (93-99)	0,918 (0,7-1,0)
Q8SX2	93,5 (87 - 97)	100 (92- 100)	89 (79- 95)	100 (89- 100)	100 (96-100)	81 (66-90)	94,3 (90-97)	0,862 (0,7-1,0)
Q5	87 (79 - 92)	95,4 (85- 99)	81,2 (70- 89)	100 (89- 100)	100 (96-100)	68,2 (53-80)	89,9 (84-94)	0,744 (0,6-0,9)

Os parâmetros foram calculados usando todas as amostras apresentadas neste trabalho: Controles saudáveis (CT, n=30) e positivos para Leishmaniose Visceral (LV, 108), cães sintomáticos (Si, n=44) e cães assintomáticos (As, n=64).

*Cut-off obtido pela curva ROC.

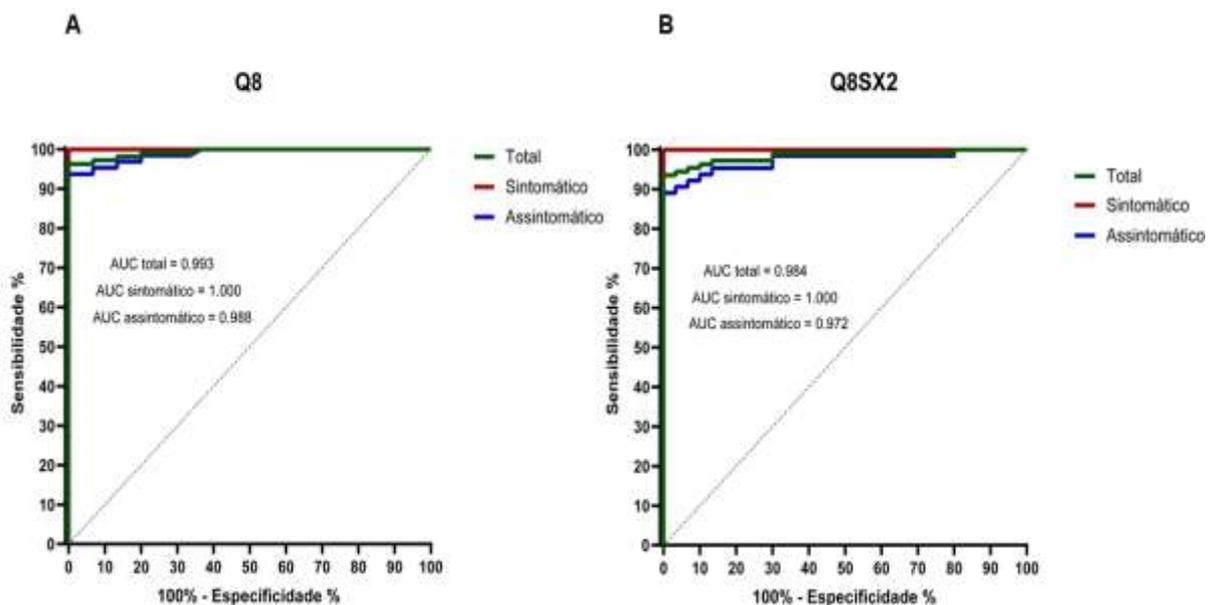
Abreviaturas: LVC, Leishmaniose Visceral Canina; Si, sintomático; As, assintomático; Se, sensibilidade; Es, especificidade; CT, controles; IC, intervalo de confiança; VPP, valor preditivo positivo; VPN, valor preditivo negativo; AC, precisão; k, índice kappa.

Avaliação comparativa das proteínas quiméricas recombinantes para diagnóstico da LVC

A análise da curva ROC foi realizada para avaliar a precisão de cada antígeno no ELISA para o diagnóstico da LVC (Figura 9). Representados pelos valores da área sob a curva (AUC), observou-se desempenho superior da Q8 quando avaliada

a AUC com cães sintomáticos e assintomáticos (0,993; IC 95%= 0,984-1,000); apenas cães sintomáticos (1,000; IC 95%= 1,000– 1,000); e cães assintomáticos (0,988; IC 95%= 0,973- 1,000) (Figura 9A).

A variante Q8SX2 também demonstrou precisão frente aos soros de cães com LV. Um desempenho considerado foi observado para AUC com cães sintomáticos e assintomáticos (0,984; IC 95%= 0,966- 1,000); apenas cães sintomáticos (1,000; IC 95%= 1,000– 1,000); e cães assintomáticos (0,972; IC 95%= 0,943- 1,000) (Figura 9B). Para avaliação da Q5, utilizou-se o mesmo grupo de soros caninos desse estudo. A Q5 apresentou diminuição da precisão nas análises da curva ROC. A AUC para cães sintomáticos e assintomáticos foi de (0,976; IC 95%= 0,955- 0,997); apenas cães sintomáticos (0,998; IC 95%= 0,993– 1,000); e cães assintomáticos (0,961; IC 95%= 0,927- 0,995) (Figura 9C).



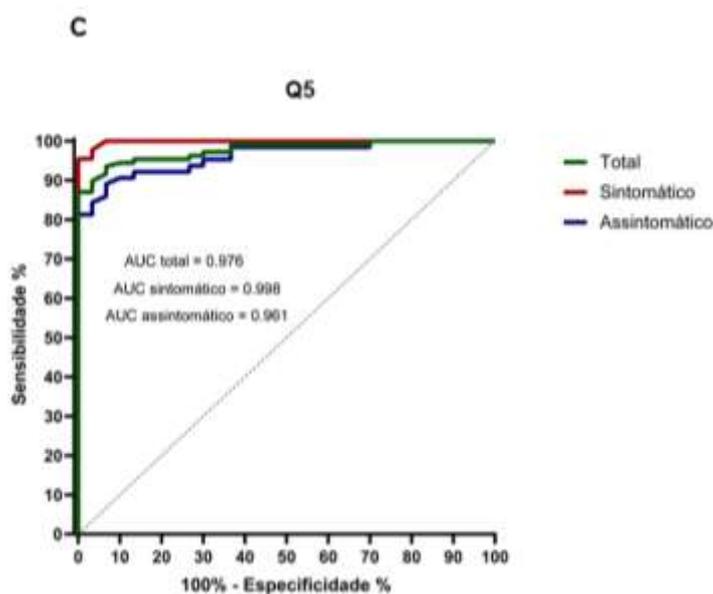


Fig. 9 Desempenho diagnóstico dos antígenos quiméricos recombinantes no ELISA. A) Análise da curva ROC dos dados obtidos no ELISA da Q8 quando comparados os cães sintomáticos e assintomáticos; apenas cães sintomáticos; e apenas cães assintomáticos. B) e C) O mesmo que A, mas comparando os resultados para as proteínas Q8SX2 e Q5, respectivamente. Legenda: total= amostras de soro de cães sintomáticos e assintomáticos.

Foram também estabelecidos os parâmetros de sensibilidade e especificidade para cada proteína quimérica recombinante pela análise da curva ROC e os valores preditivos (positivos e negativos), assim como, a acurácia dos testes. Os experimentos foram realizados equitativamente para demonstrar a robustez do ensaio (tabela 2). Em particular, em termos de sensibilidade a Q8 e a Q8SX2 foram mais sensíveis com 96,3% e 93,5%, respectivamente, além disso, a Q8 mostrou ser mais sensível na detecção de cães assintomáticos, 93,7%, indicando sua adequação para o diagnóstico da LVC. A Q5 demonstrou uma sensibilidade inferior contra os soros de cães sintomáticos e assintomáticos (87%), apenas cães assintomáticos (89%), mas com uma sensibilidade superior para cães sintomáticos (95,4%). Todos os antígenos demonstraram alta especificidade, indicando sua

utilidade na exclusão de cães verdadeiramente negativos, evitando um diagnóstico falso positivo para LVC. Os valores de VPP (100%) e VPN (88,2%) da Q8 indicaram a precisão desse antígeno no ELISA em discriminar os cães infectados com *L. infantum* com resultados positivos para LV dos cães saudáveis serem realmente normais. A concordância com os testes DPP e EIE-LVC recomendados pelo Ministério da Saúde para o diagnóstico da LV canina, foi observada pelo índice kappa, com valores próximos de 1, principalmente para a Q8 (0,918).

Assim, nossos dados suportam a ideia do potencial da Q8 na triagem e detecção da LVC.

Avaliação de reatividade cruzada das proteínas quiméricas recombinantes no ELISA

Os resultados mostraram que a Q8 foi reconhecida por cães infectados por *Ehrlichia canis* (n=4), não sendo reconhecida pelos outros patógenos avaliados nesse estudo. Vale destacar, que os resultados positivos para Erliquiose canina tiveram valores próximos ao *cut-off*, ao limite de corte. Por outro lado, a variante Q8SX2 mostrou apenas uma única reatividade inespecífica com soros de cães com anaplasmose e humano com Zika. A Q5 foi reconhecida por três soros de humanos com Leishmaniose Tegumentar e não apresentou reatividade cruzada com soros de cães com erliquiose e anaplasmose (Figura 10).

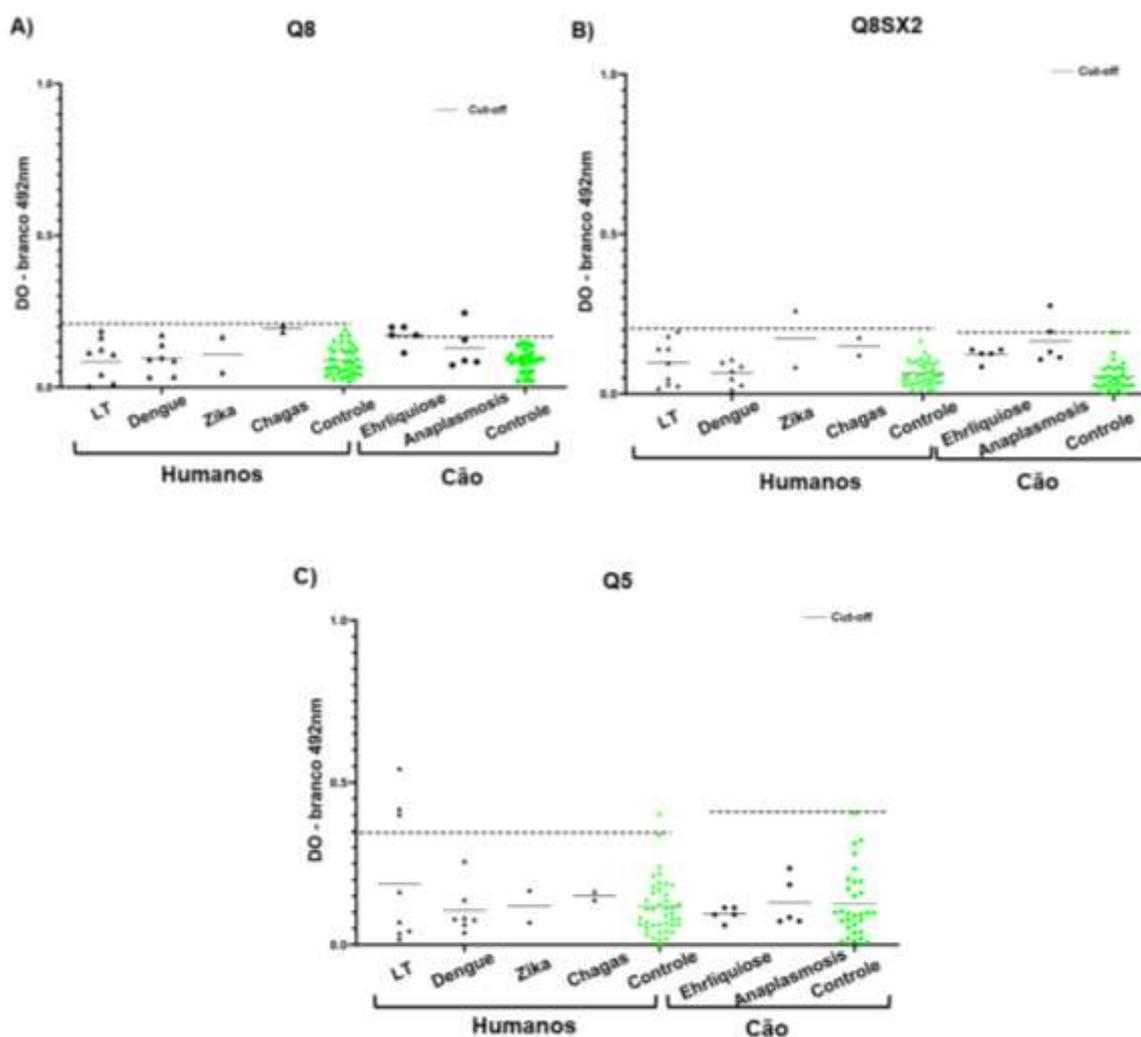


Fig. 10 Avaliação da reatividade cruzada empregando os antígenos quiméricos recombinantes. A) Avaliação da reatividade cruzada da Q8 contra soros de cães e humanos com outros patógenos. B) Avaliação da reatividade cruzada da Q8SX2 contra soros de cães e humanos com outros patógenos. C) Avaliação da reatividade cruzada da Q5 contra soros de cães e humanos com outros patógenos. Todos os soros de cães e humanos são de áreas endêmicas para os patógenos testados. Legenda: LT= leishmaniose tegumentar. As linhas pontilhadas representam o valor de corte obtido pelas curvas ROC, que foram utilizadas para obter a sensibilidade, especificidade e AUC dos antígenos para cada grupo.

Avaliação comparativa da proteína Q8 no ELISA com Proteína A e anti- IgG de cão e humano

Tendo em vista o seu melhor desempenho nos ensaios de ELISA para humanos e cães, optou-se então para avaliar de forma comparativa, e com um quantitativo menor de soros, a proteína Q8 em ensaios avaliando seu desempenho entre o ELISA com Proteína A e os conjugados anti- IgG de cão e humano (Figura 11). Os resultados mostraram que a Q8 no ELISA-proteína A reconheceu (92,8%) dos soros de cães assintomáticos avaliados, enquanto que o ELISA-IgG de cão reagiu com (85,75). Já os resultados com soros de indivíduos com LV, a Q8 reagiu com 100% desses soros no ELISA-Proteína A e ELISA-IgG humano.

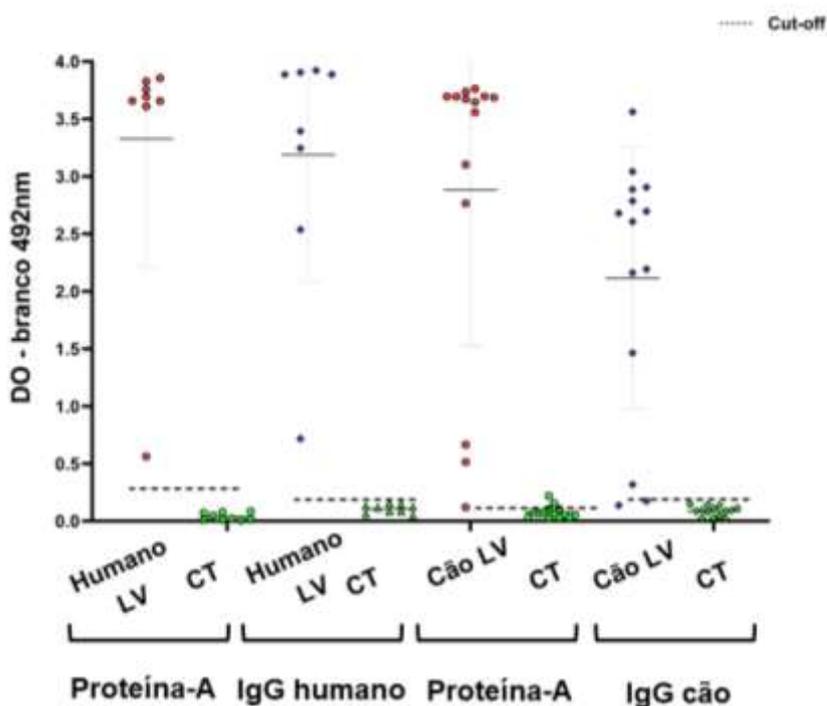


Fig. 11 Ensaio sorológico com a Q8 usando diferentes conjugados. Amostras de cães assintomáticos com LV, bem como de cães saudáveis usados como controles (CT), foram avaliadas nos ensaios para cão, com todos os soros vindo de animais de áreas endêmicas para LVC. Para os ensaios com soros humanos, amostras de soros de indivíduos com LV, e indivíduos saudáveis como controles, também foram avaliadas. As

linhas pontilhadas representam o valor de corte obtido pelas curvas ROC, que foram utilizadas para obter a sensibilidade, especificidade e AUC dos antígenos para cada grupo. DO- Densidade Óptica; Branco- valores dos poços em branco (apenas com PBS-TL).

O coeficiente de correlação (r) mostrou que os valores individuais das médias das densidades ópticas (DO) dos testes de ELISA-proteína A e ELISA-IgG cão e humano apresentaram correlação de ($r=0,946$) e ($r=0,969$), respectivamente (Figura 12).

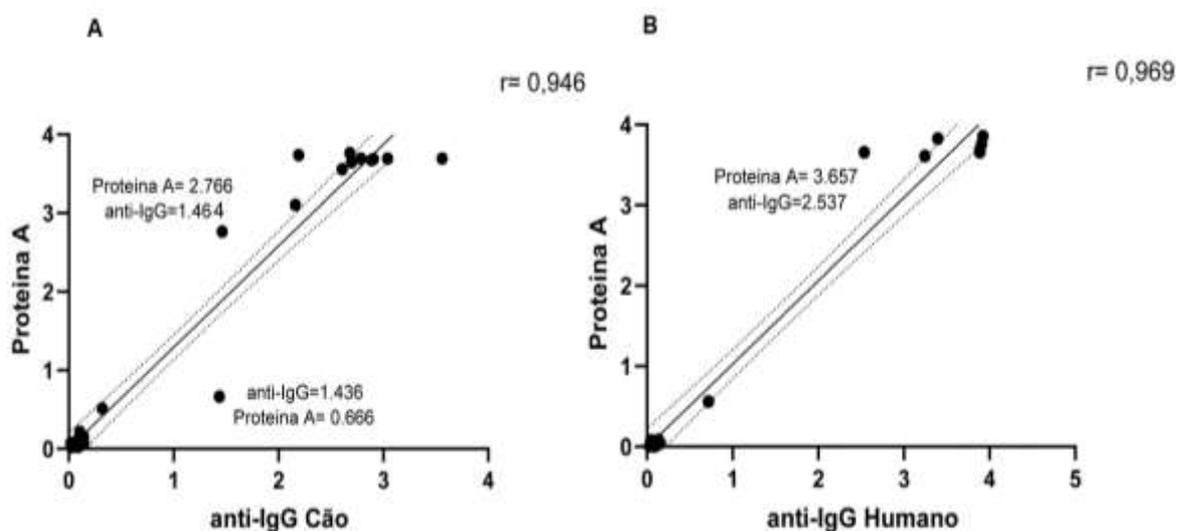


Fig. 12 Diagrama de correlação das amostras de soros com Proteína A e conjugado anti- IgG no ELISA. A) Amostras de soros de cães assintomáticos com LV ($n=14$) e de cães saudáveis ($n=14$), usando Proteína A e o conjugado anti- IgG de cão. B) Amostras de indivíduos com LV ($n=8$), e indivíduos saudáveis ($n=9$), usando Proteína A e o conjugado anti- IgG de humano. Os valores descritos dentro do diagrama correspondem as DO das amostras testadas no ELISA-proteína A e ELISA-IgG.

Discussão

A LV é uma doença altamente negligenciada que pode ser fatal se evoluída e não tratada [24]. No Brasil, é uma importante zoonose e a identificação prévia de cães parasitados pode ajudar a prevenir a ocorrência da doença em humanos [25]. Os protocolos adotados pelo Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral (PVC-LV), do Ministério da Saúde (MS) para detecção de cães e humanos infectados por *L. infantum* tem causado muitas discussões importantes [26]. Vários estudos demonstraram que a estratégia atual apresenta vantagens por serem menos complexas, rápidas e de fácil execução [9,10]. Por outro lado, a acurácia dos testes diagnósticos está longe do ideal, devido aos valores variados de sensibilidade, especificidade, valor preditivo negativo e acurácia [26,27]. Técnicas sorológicas têm sido aplicadas para uma finalidade diagnóstica mais precisa; entretanto, sensibilidade e/ou especificidade variáveis têm sido observadas, principalmente de acordo com os antígenos utilizados [28].

Em um estudo anterior, nós avaliamos o potencial de uma quimera recombinante (Q5), que no primeiro momento, apresentou altos níveis de sensibilidade (82%) em humanos e (100%) em cães, com 100% de especificidade, demonstrando ser potencialmente útil para detecção de humanos e cães com LV [21]. Mesmo com resultados relevantes e promissores, foi realizado uma nova avaliação com a proteína Q5 a fim de constatar seu potencial diagnóstico para LVC. Análises comparativas confirmaram desempenho equivalente da Q5 no ELISA com o EIE-LVC que utiliza antígeno bruto de *L. major*, apenas para animais sintomáticos, apresentando sensibilidade de 92% para ambos os ensaios. No caso de cães assintomáticos,

essas análises revelaram considerável número de resultados negativos e conseqüentemente divergência com o teste DPP, uma vez que a Q5 e o EIE-LVC apresentaram sensibilidade de 62% e 58%, respectivamente (Paz et al., 2023).

Devido a necessidade do desenvolvimento de um teste padrão-ouro, que apresente precisão em ensaios sorológicos e que identifique precocemente humanos e cães com LV, uma nova proteína quimérica recombinante foi desenvolvida (Q8). Inicialmente foram selecionados epítomos imunogênicos preditos a partir de cinco antígenos promissores (Lci2, Lci3, Lci5, Lci12 e Lci13), três destes presentes na Q5 (Lci2, Lci3 e Lci12), como descritos anteriormente [21], potencialmente capazes de reconhecer soros de humanos e cães com LV [13- 16]. No presente estudo, a proteína quimérica recombinante Q8, foi, pela primeira vez, avaliada no ELISA para o sorodiagnóstico da LV canina e humana. Além disso, ferramentas de bioinformática identificaram epítomos específicos para MHC de classe II e células B na sequência de duas proteínas, Lci5 e Lci13, de *L. infantum* que foram selecionados e inseridos na sequência do novo gene sintético com propósitos diagnósticos para LVC em cães sintomáticos e assintomáticos [14-16]. Este achado é relevante, pois as proteínas quiméricas compostas por peptídeos sintéticos, quando comparadas ao lisado bruto do parasita, são mais simples e baratas de produzir, além de terem sido bem avaliadas em imunoenaios para o sorodiagnóstico da LVC e LVH [17,29,30]. Os resultados aqui apresentados mostraram altos valores de sensibilidade e especificidade quando utilizado o novo antígeno quimérico Q8, inclusive quando testado com soros de cães sintomáticos e assintomáticos, além de soros de indivíduos positivos para LV. Demonstram então a viabilidade do emprego desse antígeno em experimentos de ELISA ou incorporados em outras plataformas de sorodiagnóstico, por exemplo, Teste Rápido

Imunocromatográfico de Fluxo Lateral (TR), para diagnóstico da LV canina e humana.

As proteínas rK28, rK39 representaram um avanço significativo no sorodiagnóstico da LV quanto a sua sensibilidade e especificidade [9,31]. Estes antígenos, assim como outras cinesinas de *Leishmania spp.* tem sido incorporado em plataformas imunocromatográficas, e os testes rápidos têm mostrado bom desempenho na detecção de casos sintomáticos [32]. No entanto, as cinesinas apresentam sensibilidade variável em diferentes regiões e baixa especificidade, além de falharem em detectar casos com níveis baixos ou ausentes de anticorpos específicos anti-*Leishmania*, principalmente em cães assintomáticos, mesmo que combinados em uma molécula quimérica [33, 34]. Com os ensaios realizados com a Q8, foi observada uma reatividade eficaz ao testar soros de cães assintomáticos (93,7%), enquanto a Q8 SX2 e a Q5 apresentaram um desempenho menos eficiente, 89,06%, 81,25%, respectivamente. A diminuição da reatividade da Q8 SX2 e Q5 já era esperado, devido à ausência dos fragmentos dos antígenos recombinantes Lci5 e Lci13 da construção. Como descritos anteriormente, esses antígenos apresentaram desempenho promissores para o diagnóstico da LV canina e são potencialmente capazes de reconhecer cães sintomáticos e assintomáticos [14,16]. Notavelmente, os componentes adicionados a Q8 levaram a uma maior diversidade antigênica da sequência e isso pode ter sido responsável pelo seu desempenho aprimorado.

Um bom teste imunológico confirmatório, deve ser capaz de detectar baixos níveis de anticorpos específicos para doença em questão e ter uma boa especificidade [26]. Todas as quimeras desse estudo, apresentaram valores satisfatórios quando soros de cães e humanos saudáveis foram avaliados no ELISA.

Outra questão importante para o diagnóstico preciso da LV é o potencial da reatividade cruzada com coinfeções de espécies relacionadas a *Leishmania* ou mesmo patógenos diferentes, devido à alta homologia (69-90%) entre algumas espécies, *infantum*, *L. braziliensis* e *L. amazonenses*. Infelizmente, observou-se um potencial de reatividade cruzada para sorodiagnóstico da LVC, o que foi demonstrado para Q8, foi reconhecida por cães infectados por *Ehrlichia canis*, e para a Q8SX2 que mostrou uma única reatividade com soro de cão com anaplasrose. Também a Q5 reativou com amostras de indivíduos com LT, além de, uma única reatividade com soros positivo pra Zika. O reconhecimento da Q8 com soros de cães com Eriquiose (Figura 10A), é um fator importante a se observar, mas que pode ser justificado, uma vez que a bactéria intracelular *Ehrlichia canis* infecta cães em todo o mundo, principalmente em regiões tropicais, como o Brasil, onde a prevalência é alta [35,36]. Ainda assim, os resultados relevantes de sensibilidade e especificidade da Q8 com *L. braziliensis* e *Trypanosoma cruzi*, filogeneticamente mais próximos da *L. infantum*, implica que a co-infecção com *Ehrlichia canis* pode não ser uma grande preocupação. Ainda nesse contexto, é importante ressaltar que as técnicas sorológicas constituem importante ferramentas, mas possuem como desvantagem a possibilidade da ocorrência de reatividade cruzada, principalmente entre as leishmanioses cutânea e visceral [37].

Não há consenso sobre quais valores mínimos de sensibilidade e especificidade são necessários para um teste diagnóstico de LV. Segundo Boelaert et al. (2007) [38] para um teste de triagem de LV, a sensibilidade e a especificidade mínimas necessárias seriam de 95% e 98%, respectivamente. Considerando esses parâmetros, a Q8 aqui avaliada, apresentou valores satisfatórios de sensibilidade e especificidade, acima de 95%, tanto para LVC e/ ou LVH. A precisão no diagnóstico

da LV humana pela Q8 que mostrou sensibilidade (97,3%), e especificidade (100%), é um achado importante quando observado o aumento números de casos de LVH no Brasil [39].

Um resultado considerável neste estudo, foi observado nos ensaios de ELISA usando proteína A que apresentou valores maiores de densidade óptica com as amostras testadas. Este fato pode estar relacionado com a detecção pela proteína A não apenas de IgG, mas também com outras classes de imunoglobulinas, IgM e IgA, por exemplo. Goudswaard et al. (1978), descreveram que a reatividade da proteína A com imunoglobulinas de cães é bastante forte, principalmente com todas as subclasses de IgG [40]. Portanto, afinidade da proteína A pelos anticorpos da classe IgG presentes no soro aumenta significativamente o reconhecimento de cães e humanos infectados por *Leishmania* no ELISA-proteína A [41]. Senso assim, nossos resultados corroboram com a literatura, mostrando que a Q8 pode ser empregada nos ensaios de ELISA-proteína A, usando um único conjugado, capaz de detectar anticorpos específicos de diferentes espécies de animais, e na detecção específica de anticorpos de *Leishmania* em soros de cães e indivíduos com leishmaniose visceral [41,42].

Em resumo, nossos achados revelaram uma proteína quimérica recombinante facilmente expressa em sistema procariótico, com tecnologia nacional e potencial para o diagnóstico cães e humanos infectados com *L. infantum*. O novo antígeno forneceu valores aceitáveis de sensibilidade e especificidade no ELISA-IgG e ELISA-proteína A, sustentando fortemente a ideia do seu potencial no diagnóstico precoce da LV canina e humana, e uma alternativa aos ensaios atuais do Ministério da Saúde.

Informações suplementares

Figura S1: Padronização da concentração dos antígenos nos ensaios de ELISA para leishmaniose visceral canina.

Figura S2: Padronização da diluição do soro nos ensaios de ELISA para leishmaniose visceral canina.

Figura S3: Padronização da concentração dos antígenos nos ensaios de ELISA para leishmaniose visceral humana.

Figura S4: Padronização da diluição do soro nos ensaios de ELISA para leishmaniose visceral humana.

Material suplementar

Figura 1

Padronização da concentração dos antígenos nos ensaios de ELISA para leishmaniose visceral canina

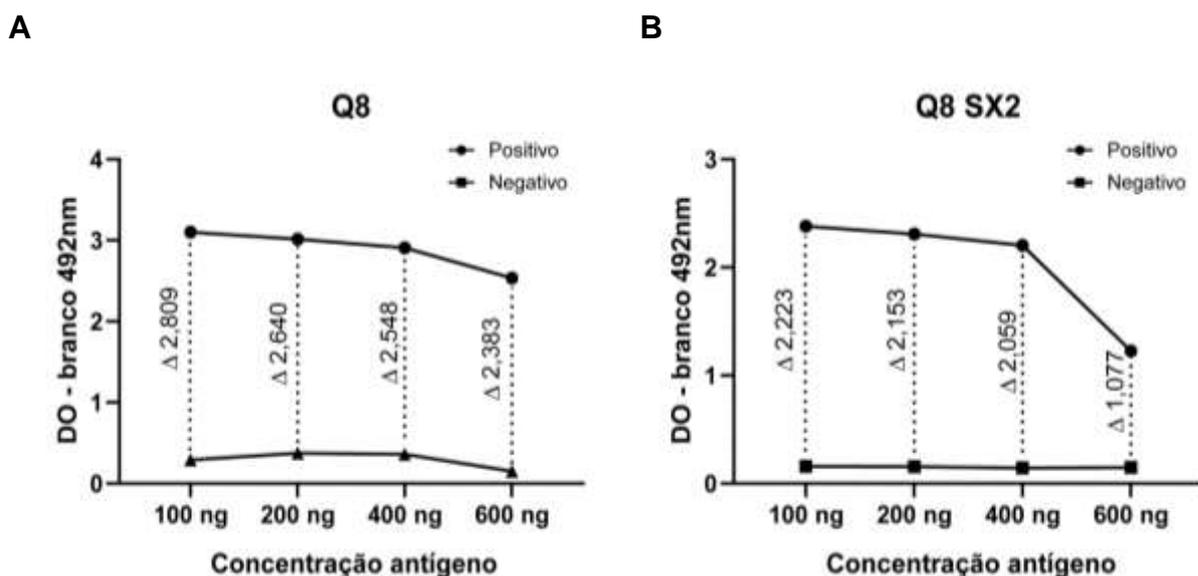


Fig 1 Suplementar: Padronização da concentração dos antígenos para os ensaios de ELISA com soros caninos. Para estabelecer a concentração ideal da Q8 e Q8SX2 no ELISA, foram usadas amostras de cães positivos para LV (n=7) e amostras de cães saudáveis para doença (n=7). Todas as amostras de soros de cães foram avaliadas nas diferentes concentrações testadas. O “ Δ ” foi definido por meio da diferença entre as médias dos valores da densidade óptica (DO) de todas as amostras positivas para LV e negativas para doença. Ao final da análise, a concentração de 100 ng foi a que melhor distinguiu amostras positivas das negativas para LV.

Figura 2

Padronização da diluição do soro nos ensaios de ELISA para leishmaniose visceral canina

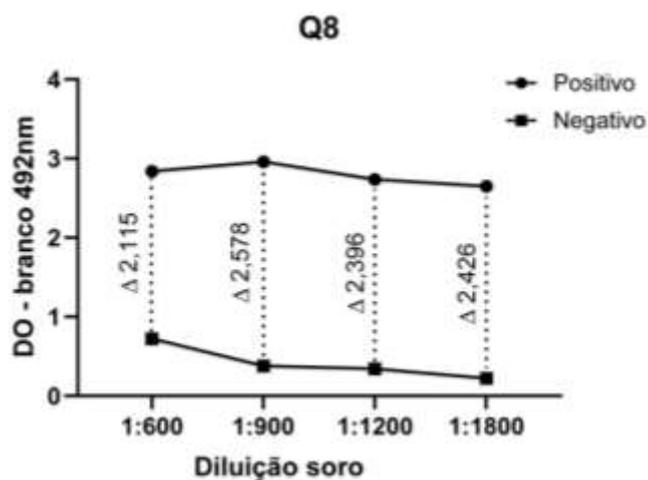


Fig 2 Suplementar: Padronização da diluição dos soros caninos para os ensaios de ELISA usando a Q8. Para estabelecer a diluição ideal dos soros caninos no ELISA, foram usadas amostras de cães positivos para LV (n=7) e amostras de cães saudáveis para doença (n=7). Todas as amostras de soros de cães foram avaliadas nas diferentes diluições testadas. O “Δ” foi definido por meio da diferença entre as médias dos valores da densidade óptica (DO) de todas as amostras positivas para LV e negativas para doença. Ao final da análise, a diluição de 1:900 foi a que melhor distinguiu amostras positivas das negativas para doença.

Figura 3

Padronização da concentração dos antígenos nos ensaios de ELISA para leishmaniose visceral humana

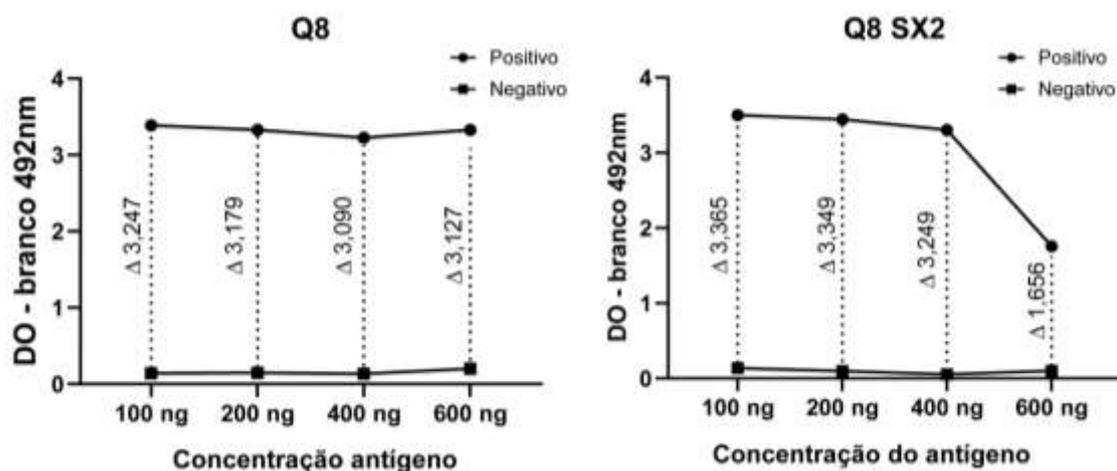


Fig 3 Suplementar: Padronização da concentração dos antígenos para os ensaios de ELISA com soros humanos. Para estabelecer a concentração ideal da Q8 e Q8SX2 no ELISA, foram usadas amostras de soros de humanos positivos para LV (n=7) e amostras soros de humanos saudáveis para doença (n=7). Todas as amostras de soros foram avaliadas nas diferentes concentrações testadas. O “Δ” foi definido por meio da diferença entre as médias dos valores da densidade óptica (DO) de todas as amostras positivas para LV e negativas para doença. Ao final da análise, a concentração de 100 ng foi a que melhor distinguiu amostras positivas das negativas para LV.

Figura 4

Padronização da diluição do soro nos ensaios de ELISA para leishmaniose visceral humana

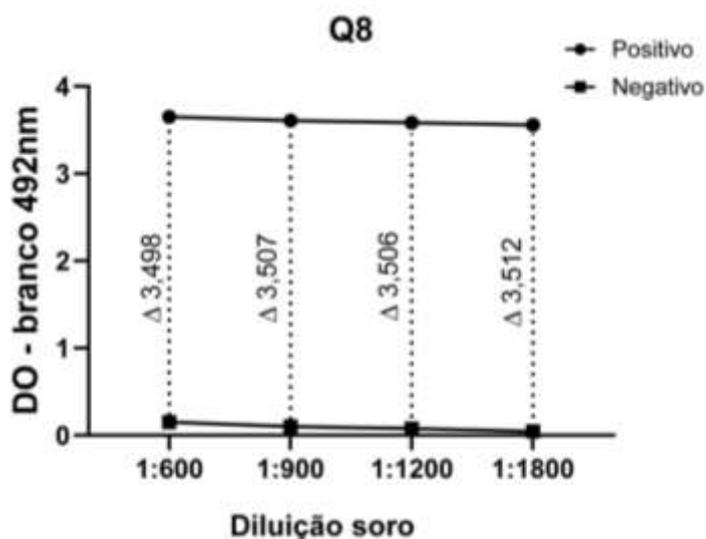


Fig 4 Suplementar: Padronização da diluição dos soros humanos para os ensaios de ELISA usando a Q8. Para estabelecer a diluição ideal dos soros humanos no ELISA, foram usadas amostras de indivíduos positivos para LV (n=7) e amostras de humanos saudáveis para doença (n=7). Todas as amostras de soros de humanos foram avaliadas nas diferentes diluições testadas. O “Δ” foi definido por meio da diferença entre as médias dos valores da densidade óptica (DO) de todas as amostras positivas para LV e negativas para doença. Ao final da análise, a diluição escolhida foi 1:900 para que os ensaios fossem realizados de maneira equitativa. A diluição de 1:900, também distinguiu bem as amostras positivas das negativas para doença.

Agradecimentos

Gostaríamos de agradecer às agências brasileiras de financiamento, CNPq, CAPES e FACEPE, bem como ao programa Inova da Fiocruz.

Referências

1. Laurenti MD, de Santana Leandro MV, 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. *Veterinary Parasitology*. 2014;205: 444–450. doi:10.1016/j.vetpar.2014.09.002;
2. Manual_vigilancia_prevencao_controle_zoonoses.pdf. Available: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_prevencao_controle_zoonoses.pdf;
3. Coelho EAF, Ramírez L, Costa MAF, Coelho VTS, Martins VT, Chávez-Fumagalli MA, et al. Specific Serodiagnosis of Canine Visceral Leishmaniasis Using Leishmania Species Ribosomal Protein Extracts. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2009;16: 1774–1780. doi:10.1128/CVI.00295-09;
4. Esteva L, Vargas C, Vargas de León C. The role of asymptomatics and dogs on leishmaniasis propagation. *Mathematical Biosciences*. 2017;293: 46–55. doi:10.1016/j.mbs.2017.08.006;
5. Georgiadou SP, Makaritsis KP, Dalekos GN. Leishmaniasis revisited: Current aspects on epidemiology, diagnosis and treatment. *J Transl Int Med*. 2015;3: 43–50. doi:10.1515/jtim-2015-0002;
6. Motazedian M, Fakhar M, Motazedian MH, Hatam G, Mikaeili F. A urine-based polymerase chain reaction method for the diagnosis of visceral leishmaniasis in

- immunocompetent patients. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2008;60: 151–154. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2007.09.001;
7. Farahmand M, Nahrevanian H. Application of Recombinant Proteins for Serodiagnosis of Visceral Leishmaniasis in Humans and Dogs. *Iran Biomed J*. 2016;20: 128–134. doi:10.7508/ibj.2016.03.001;
 8. dos Santos ARR, Serufo ÂV, Figueiredo MM, Godoi LC, Vitória JG, Marcelino AP, et al. Evaluation of three recombinant proteins for the development of ELISA and immunochromatographic tests for visceral leishmaniasis serodiagnosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2019;114: e180405. doi:10.1590/0074-02760180405;
 9. Laurenti MD, de Santana Leandro MV, 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. *Veterinary Parasitology*. 2014;205: 444–450. doi:10.1016/j.vetpar.2014.09.002;
 10. Grimaldi G Jr, Teva A, Ferreira AL, dos Santos CB, Pinto I de-Souza, 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. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2012;106: 54–59. doi:10.1016/j.trstmh.2011.10.001;
 11. Página inicial. In: Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa [Internet]. [cited 21 Feb 2023]. Available: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/pagina-inicial>;
 12. Teixeira MCA, Oliveira GGS, Silvany MA, Alcântara-Neves NM, Soares MBP, Ribeiro-dos-Santos R, et al. A strategy for identifying serodiagnostically relevant antigens of *Leishmania* or other pathogens in genetic libraries. *Biologicals*. 2007;35: 51–54. doi:10.1016/j.biologicals.2006.01.005;
 13. Oliveira GGS, Magalhães FB, Teixeira MCA, Pereira AM, Pinheiro CGM, 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: 1025–1034. doi:10.4269/ajtmh.2011.11-0102;

14. Magalhães FB, Castro Neto AL, Nascimento MB, Santos WJT, Medeiros ZM, Lima Neto AS, et al. Evaluation of a new set of recombinant antigens for the serological diagnosis of human and canine visceral leishmaniasis. *PLoS One*. 2017;12: e0184867. doi:10.1371/journal.pone.0184867;
15. Campos RM, Nascimento M, Ferraz JC, Pereira MMC, Rocha PO, Thompson GM, et al. Distinct mitochondrial HSP70 homologues conserved in various *Leishmania* species suggest novel biological functions. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 2008;160: 157–162. doi:10.1016/j.molbiopara.2008.04.013;
16. 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. doi:10.1371/journal.pntd.0006871;
17. Santos WJT, Tavares DHC, Neto ALC, Nascimento MB, Dhália R, Albuquerque AL, et al. Gene design, optimization of protein expression and preliminary evaluation of a new chimeric protein for the serological diagnosis of both human and canine visceral leishmaniasis. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2020;14: e0008488. doi:10.1371/journal.pntd.0008488;
18. Saha S, Raghava GPS. Prediction of continuous B-cell epitopes in an antigen using recurrent neural network. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. 2006;65: 40–48. doi:10.1002/prot.21078;
19. Jensen KK, Andreatta M, Marcatili P, Buus S, Greenbaum JA, Yan Z, et al. Improved methods for predicting peptide binding affinity to MHC class II molecules. *Immunology*. 2018;154: 394–406. doi:10.1111/imm.12889;
20. Yuhki N, Beck T, Stephens R, Neelam B, O'Brien SJ. Comparative Genomic Structure of Human, Dog, and Cat MHC: HLA, DLA, and FLA. *Journal of Heredity*. 2007;98: 390–399. doi:10.1093/jhered/esm056;

21. Robinson CR, Sauer RT. Optimizing the stability of single-chain proteins by linker length and composition mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95: 5929–5934. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC34497/>;
22. Cwirla SE, Peters EA, Barrett RW, Dower WJ. Peptides on phage: a vast library of peptides for identifying ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87: 6378–6382. doi:10.1073/pnas.87.16.6378;
23. Rosenberg AH, Lade BN, Chui DS, Lin SW, Dunn JJ, Studier FW. Vectors for selective expression of cloned DNAs by T7 RNA polymerase. *Gene*. 1987;56: 125–135. doi:10.1016/0378-1119(87)90165-x;
24. Alemayehu B, Alemayehu M. Leishmaniasis: A Review on Parasite, Vector and Reservoir Host. *Health Science Journal*. 11: 0–0. doi:10.21767/1791-809X.1000519;
25. Sevá A da P, Brandão APD, Godoy SN, Soares RM, Langoni H, Rodrigues BC, et al. Investigation of canine visceral leishmaniasis in a non-endemic area in Brazil and the comparison of serological and molecular diagnostic tests. *Rev Soc Bras Med Trop*. 54: e0182-2021. doi:10.1590/0037-8682-0182-2021;
26. Fraga DBM, Pacheco LV, Borja LS, Tuy PG da SE, Bastos LA, Solcà M da S, 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. doi:10.1371/journal.pntd.0004333;
27. Peixoto HM, de Oliveira MRF, Romero GAS. Serological diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil: systematic review and meta-analysis. *Tropical Medicine & International Health*. 2015;20: 334–352. doi:10.1111/tmi.12429;
28. Zhang W-W, Ghosh AK, Mohamath R, Whittle J, Picone A, Lypaczewski P, et al. Development of a sandwich ELISA to detect *Leishmania* 40S ribosomal protein S12 antigen from blood samples of visceral leishmaniasis patients. *BMC Infect Dis*. 2018;18: 500. doi:10.1186/s12879-018-3420-2;

29. Menezes-Souza D, Mendes TA de O, Gomes M de S, Bartholomeu DC, Fujiwara RT. Improving Serodiagnosis of Human and Canine Leishmaniasis with Recombinant *Leishmania braziliensis* Cathepsin L-like Protein and a Synthetic Peptide Containing Its Linear B-cell Epitope. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2015;9: e3426. doi:10.1371/journal.pntd.0003426;
30. Epitope mapping of recombinant *Leishmania donovani* virulence factor A2 (recLdVFA2) and canine leishmaniasis diagnosis using a derived synthetic bi-epitope | *PLOS Neglected Tropical Diseases*. [cited 27 Jun 2023]. Available: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0005562>;
31. Bangert M, Flores-Chávez MD, Llanes-Acevedo IP, Arcones C, Chicharro C, García E, et al. Validation of rK39 immunochromatographic test and direct agglutination test for the diagnosis of Mediterranean visceral leishmaniasis in Spain. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018;12: e0006277. doi:10.1371/journal.pntd.0006277;
32. Mohapatra TM, Singh DP, Sen MR, Bharti K, Sundar S. Comparative evaluation of rK9, rK26 and rK39 antigens in the serodiagnosis of Indian visceral leishmaniasis. *The Journal of Infection in Developing Countries*. 2010;4: 114–117. doi:10.3855/jidc.544;
33. van Griensven J, Diro E. Visceral Leishmaniasis: Recent Advances in Diagnostics and Treatment Regimens. *Infectious Disease Clinics of North America*. 2019;33: 79–99. doi:10.1016/j.idc.2018.10.005;
34. Lauricella MA, Maidana CG, Frias VF, Romagosa CM, Negri V, Benedetti R, et al. An rK28-Based Immunoenzymatic Assay for the Diagnosis of Canine Visceral Leishmaniasis in Latin America. *Am J Trop Med Hyg*. 2016;95: 92–98. doi:10.4269/ajtmh.13-0768;
35. Alves Souza N, Souza Leite R, de Oliveira Silva S, Groenner Penna M, Figueiredo Felicori Vilela L, Melo MN, et al. Detection of mixed *Leishmania* infections in dogs from an endemic area in southeastern Brazil. *Acta Tropica*. 2019;193: 12–17. doi:10.1016/j.actatropica.2019.02.016;

36. Dantas-Torres F, da Silva YY, de Oliveira Miranda DE, da Silva Sales KG, Figueredo LA, Otranto D. Ehrlichia spp. infection in rural dogs from remote indigenous villages in north-eastern Brazil. *Parasites & Vectors*. 2018;11: 139. doi:10.1186/s13071-018-2738-3;
37. Vale AM, Fujiwara RT, da Silva Neto AF, Miret JA, Alvarez DCC, da Silva JCF, et al. Identification of highly specific and cross-reactive antigens of Leishmania species by antibodies from Leishmania (Leishmania) chagasi naturally infected dogs. *Zoonoses Public Health*. 2009;56: 41–48. doi:10.1111/j.1863-2378.2008.01183.x;
38. Boelaert M, Verdonck K, Menten J, Sunyoto T, van Griensven J, Chappuis F, et al. Rapid tests for the diagnosis of visceral leishmaniasis in patients with suspected disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014;2014: CD009135. doi:10.1002/14651858.CD009135.pub2;
39. Cavalcante KK de S, Borges KMO, Cavalcante FRA, Correia FGS, Florêncio CMGD, Alencar CH. Epidemiological Aspects and High Magnitude of Human Visceral Leishmaniasis in Ceará, Northeast of Brazil, 2007-2021. *Rev Soc Bras Med Trop*. 55: e0684-2021. doi:10.1590/0037-8682-0684-2021;
40. Goudswaard J, Van Der Donk JA, Noordzij A, Van Dam RH, Vaerman J-P. Protein A Reactivity of Various Mammalian Immunoglobulins. *Scandinavian Journal of Immunology*. 1978;8: 21–28. doi:10.1111/j.1365-3083.1978.tb00492.x;
41. Reed SG, Shreffler WG, Burns JM, Scott JM, Orge M da G, Ghalib HW, et al. An Improved Serodiagnostic Procedure for Visceral Leishmaniasis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1990;43: 632–639. doi:10.4269/ajtmh.1990.43.632;
42. Bandyopadhyay S, Chatterjee M, Pal S, Waller RF, Sundar S, McConville MJ, et al. Purification, characterization of O-acetylated sialoglycoconjugates-specific IgM, and development of an enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis and follow-up of indian visceral leishmaniasis patients. *Diagnostic Microbiology*

and Infectious Disease. 2004;50: 15–24.
doi:10.1016/j.diagmicrobio.2004.04.014.

43. Paz LF de A, Silva A da, Silva HRF da, Paiva-Cavalcanti M, de Lima VMF, Beltrão MRO da C, et al. A comparative and evaluation of an ELISA on the Q5 recombinant protein for the diagnosis of the canine visceral leishmaniasis, incidence of false-positive results associated with the DPP test. 2023. doi:10.21203/rs.3.rs-2705707/v1

6 DISCUSSÃO GERAL

Apesar dos avanços tecnológicos do século XX, e o aumento na variedade de testes diagnósticos para LV, a ausência de um teste preciso, com parâmetros aceitáveis de sensibilidade e especificidade tem resultado no tratamento tardio da doença e em altas taxas de mortalidade (DOS SANTOS et al., 2019). Até o momento, ainda não está disponível um antígeno produzido com tecnologia nacional, que seja empregado em um método sorológico de fácil execução com potencial para uso no diagnóstico da LV canina e humana. Existem duas principais razões para o desempenho insatisfatório dos métodos diagnósticos da LV: é uma doença negligenciada que fornece às empresas pequenos retornos sobre o investimento em pesquisa e desenvolvimento, além de ser, uma infecção de alta complexidade biológica (ANTINORI; SCHIFANELLA; CORBELLINO, 2012; MEDEIROS et al., 2017).

Até 2011, os testes de triagem e confirmação recomendados pelo Ministério da Saúde para diagnóstico sorológico da LV canina eram, ELISA (teste EIE-LVC; Bio-Manguinhos/Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil) e o IFAT (teste IFI-LVC; Bio-Manguinhos/Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil), respectivamente, ambos utilizando antígenos de promastigotas de espécies semelhantes a *Leishmania major* (LIRA et al., 2006). Essa abordagem além de ser considerada imprecisa, levava um tempo prolongado (em torno de 60 dias) entre a coleta e a liberação dos resultados (BELO et al., 2017). Devido a essas limitações, no final de 2011, um imunoenensaio utilizando uma Plataforma de duplo percurso (DPP) (Bio-Manguinhos, Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), passou a ser utilizado no procedimento de triagem combinado com o ELISA EIE-LVC, baseado em lisado bruto de *L. major*, retido para confirmação (COURA-VITAL et al., 2014).

O teste DPP fornece resultados mais rápidos, além da facilidade na execução e flexibilidade no tipo de amostras biológicas utilizadas (sangue, soro ou plasma). Vários estudos, contudo, demonstraram variações na especificidade e sensibilidade do teste DPP (GRIMALDI et al., 2012; RIBEIRO et al., 2015; DE ARRUDA et al.,

2016). Em contrapartida, Fraga et al., (2016) constatou que a combinação DPP/EIE-LVC oferece maior especificidade e maior valor preditivo positivo do que a abordagem de triagem anterior, ELISA e o IFAT, embora a sensibilidade seja praticamente a mesma. Por outro lado, ainda existem poucos relatos sobre a concordância entre as duas técnicas adotadas (DPP versus ELISA) (SCHUBACH; FIGUEIREDO; ROMERO, 2014; FRAGA et al., 2016). Embora Santos et al., (2013) tenha afirmado que o teste DPP é eficaz tanto em campo quanto em laboratório, até o momento, poucos estudos avaliaram a concordância entre o teste DPP realizado com amostras do sangue periférico em campo e com soro em condições de laboratório. De fato, Belo et al., (2017) relatou que houve discordância substancial entre DPP-campo e DPP-laboratório, embora em um nível que não foi estatisticamente significativo ($p=0,41$).

A acurácia diagnóstica dos testes, DPP seguido do EIE-LVC, ainda gera controvérsia. Coura-Vital et al., (2014), mostrou que o protocolo utilizando DPP e ELISA detectou maior prevalência (8,1%) de cães infectados do que o protocolo utilizando ELISA e IFAT (prevalência, 6,2%). Estudos anteriores demonstraram um bom desempenho do DPP, com sensibilidade variando de 93% a 100% e especificidade entre 92% a 100% (ALVES et al., 2012; GRIMALDI et al., 2012; MARCONDES et al., 2013). Já os resultados obtidos por Grimaldi et al. (2012) indicaram que o DPP tem potencial para o diagnóstico de cães sintomáticos, mas é falho em identificar cães assintomáticos infectados por *L. infantum*. Em um outro estudo, a maioria dos cães avaliados foi classificada como assintomática (COURA-VITAL et al., 2014) no entanto, DPP e ELISA ainda apresentaram melhor desempenho. É importante notar que a sensibilidade de um teste diagnóstico muda durante o curso clínico da infecção (QUINNELL et al., 2001).

Nos últimos anos, pesquisas têm sido desenvolvidas com o objetivo de melhorar a qualidade do sorodiagnóstico da LV. O ELISA é uma das técnicas sorológicas promissoras, que tem apresentado resultados mais satisfatórios, a depender do antígeno utilizado (MAIA; CAMPINO, 2011). Devido a aplicabilidade do ELISA na triagem de um grande número de amostras em um curto período de tempo, essa técnica vem sendo escolhida para avaliar e validar antígenos recombinantes para o diagnóstico de cães e humanos infectados com *L. infantum* (FONSECA et al., 2019; ALGHAMDI et al., 2022).

A utilização de proteína A conjugada com várias moléculas repórteres, incluindo corantes fluorescentes, marcadores enzimáticos (peroxidase, β -galactosidase, fosfatase alcalina), biotina e ouro coloidal, nos ensaios de ELISA, tem apresentado um aumento significativo nos valores de absorvância em soros positivos para LV. Isso permite uma distinção mais confiável entre os soros de LV (incluindo aqueles com títulos comparativamente baixos) (LIMA et al., 2005). Uma superioridade do ELISA-proteína A é a afinidade da proteína A para IgGs de várias espécies animais, possibilitando com que um único conjugado, como a proteína A peroxidase, seja usado para detectar anticorpos específicos de diferentes espécies animais e também para a detecção específica de anticorpos de *Leishmania* em soros tanto de cães como humanos (LINDMARK; THORÉN-TOLLING; SJÖQUIST, 1983; (REED et al., 1990). No entanto, existe carência de estudos no Brasil, que comparem ensaios de ELISA com proteína A e ELISA usando anti-IgG de cão ou humano para detecção de anticorpos anti-*Leishmania* em cães e humanos naturalmente infectados.

A avaliação do desempenho das proteínas recombinantes nos ensaios de ELISA, tem contribuído para a evolução no diagnóstico da LV. Lemos et al., (2014) realizou um estudo comparativo, avaliando o desempenho no ELISA da rKDDR, uma cinesina recombinante, com o rK39, uma outra cinesina, e com o EIE-LVC, baseado em lisado de *L. major* atualmente recomendado pelo Ministério da Saúde do Brasil para o diagnóstico da LV canina. O rKDDR apresentou maior sensibilidade e especificidade tanto no diagnóstico da LV humana (sensibilidade 92,86% e especificidade 100%), quanto na LVC (sensibilidade 88,54% e especificidade 97,30%) em comparação com os soros rK39 (humano: sensibilidade 90,48% e especificidade 97,92%; canino: sensibilidade 78,13% e especificidade 90,09%). No entanto, o EIE-LVC apresentou sensibilidade superior (93,75%) ao rKDDR (88,54%), mas uma especificidade inferior, EIE-LVC (86,49%) e rKDDR (97,30%), indicando que o reconhecimento sorológico da LVC usando rKDDR foi superior ao usando rK39 e o kit EIE-VLC (DHOM-LEMOS et al., 2019).

Em resumo, os estudos citados justificam a busca pelo desenvolvimento de um antígeno quimérico com melhor potencial para ser utilizado em testes sorológicos no diagnóstico da LV canina e humana. A proteína quimérica Q8, desenvolvida e avaliada nesta tese, mostrou ser um antígeno eficaz no diagnóstico de cães sintomáticos, assintomáticos e indivíduos infectados com *L. infantum*, e uma

alternativa aos ensaios atualmente recomendados pelo Ministério da Saúde do Brasil.

7 CONCLUSÕES

Artigo I

1. A proteína quimérica recombinante Q5 apresentou concordância com o teste EIE-LVC recomendado pelo Ministério da Saúde;
2. Os dados da proteína recombinante Lci13 corroboraram com a Q5 e com o teste EIE-LVC;
3. O teste EIE-LVC e os testes de ELISA baseados nas proteínas Q5 e Lci13 apresentaram uma baixa concordância com o teste DPP, no caso de soros de cães assintomáticos ou sem sintomatologia clínica definida.

Artigo II

1. A nova proteína quimérica (Q8) e sua variante (Q8 SX2) se mostraram eficientemente expressas em sistema procariótico e com alto rendimento após purificação por cromatografia de afinidade;
2. A Q8 tem potencial para identificar cães e humanos infectados com *L. infantum* no ELISA;
3. A Q8 apresentou eficácia no sorodiagnóstico precoce de cães assintomáticos com LV;
4. Os antígenos recombinantes Lci5 e Lci13, possivelmente foram responsáveis pelo desempenho aprimorado da Q8 nos ensaios do ELISA;
5. A Q8 apresentou aumento significativo nos valores de absorbância em soros caninos e humanos positivos para LV no ELISA usando proteína A.

REFERÊNCIAS

- AFONSO, M. M. DOS S. et al. Studies on the Feeding Habits of *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) Populations from Endemic Areas of American Visceral Leishmaniasis in Northeastern Brazil. **Journal of Tropical Medicine**, v. 2012, p. e858657, 18 jan. 2012.
- AGAYEV, I. et al. Epidemiological situation and spatial distribution of visceral leishmaniasis in the Republic of Azerbaijan. **Journal of Parasitic Diseases: Official Organ of the Indian Society for Parasitology**, v. 44, n. 3, p. 639–645, set. 2020.
- ALAM, M. Z. et al. PCR-based detection of *Leishmania donovani* DNA in a stray dog from a visceral Leishmaniasis endemic focus in Bangladesh. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 75, n. 1, p. 75–78, 31 jan. 2013.
- ALGHAMDI, W. et al. LBCEPred: a machine learning model to predict linear B-cell epitopes. **Briefings in Bioinformatics**, v. 23, n. 3, p. bbac035, 1 maio 2022.
- ALMEIDA, M. et al. Seroprevalence and Risk Factors Associated with *Leishmania* Infection in Dogs from Portugal. **Microorganisms**, v. 10, n. 11, p. 2262, nov. 2022.
- ALONSO, F. H. et al. Canine leishmaniasis in Northern California-A case report. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 50, n. 1, p. 71–75, mar. 2021.
- ALVES, A. S. et al. Evaluation of serological cross-reactivity between canine visceral leishmaniasis and natural infection by *Trypanosoma caninum*. **Research in Veterinary Science**, v. 93, n. 3, p. 1329–1333, 1 dez. 2012.
- ANTINORI, S.; SCHIFANELLA, L.; CORBELLINO, M. Leishmaniasis: new insights from an old and neglected disease. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 31, n. 2, p. 109–118, 1 fev. 2012.
- ASFARAM, S.; FAKHAR, M.; TESHNIZI, S. H. Is the cat an important reservoir host for visceral leishmaniasis? A systematic review with meta-analysis. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 25, 10 jun. 2019.
- BANETH, G. et al. Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. **Trends in Parasitology**, v. 24, n. 7, p. 324–330, 1 jul. 2008.

BANGERT, M. et al. Validation of rK39 immunochromatographic test and direct agglutination test for the diagnosis of Mediterranean visceral leishmaniasis in Spain. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 3, p. e0006277, 1 mar. 2018.

BATES, P. A. Leishmania sand fly interaction: progress and challenges. **Current Opinion in Microbiology**, Host–microbe interactions: fungi/parasites/viruses. v. 11, n. 4, p. 340–344, 1 ago. 2008.

BELO, V. S. et al. Reliability of techniques used in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis by the national control program in Brazil: A survey in an area of recent transmission. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 146, p. 10–15, 1 out. 2017.

BERN, C. et al. Use of the recombinant K39 dipstick test and the direct agglutination test in a setting endemic for visceral leishmaniasis in Nepal. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 63, n. 3–4, p. 153–157, 2000.

BOELAERT, M. et al. Rapid tests for the diagnosis of visceral leishmaniasis in patients with suspected disease. **The Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 2014, n. 6, p. CD009135, 20 jun. 2014.

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. 10, p. e0006871, 26 out. 2018a.

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. 10, p. e0006871, 26 out. 2018b.

BRASIL. **Ministério da Educação**. Brasília, 2018.

BRASIL. **Ministério da Educação**. Brasília, 2020.

BRASIL. **Ministério da Educação**. Brasília, 2021.

BRAZ, L. M. A. et al. Visceral Leishmaniasis diagnosis: a rapid test is a must at the hospital bedside. **Clinics**, v. 75, p. e2036, 2020.

CAMPOS, R. M. et al. Distinct mitochondrial HSP70 homologues conserved in various Leishmania species suggest novel biological functions. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 160, n. 2, p. 157–162, 1 ago. 2008.

CAVALCANTE, K. K. DE S. et al. Epidemiological Aspects and High Magnitude of Human Visceral Leishmaniasis in Ceará, Northeast of Brazil, 2007-2021. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 55, p. e0684-2021, [s.d.].

CHATZIS, M. K. et al. Cytological and molecular detection of *Leishmania infantum* in different tissues of clinically normal and sick cats. **Veterinary Parasitology**, v. 202, n. 3, p. 217–225, 28 maio 2014.

CLOOTS, K. et al. Diagnosis of Visceral Leishmaniasis in an Elimination Setting: A Validation Study of the Diagnostic Algorithm in India. **Diagnostics**, v. 12, n. 3, p. 670, 9 mar. 2022.

COSTA-VAL, A. P. DA et al. Serological study of feline leishmaniasis and molecular detection of *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis* in cats (*Felis catus*). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 29, 8 jun. 2020.

COURA-VITAL, W. et al. Evaluation of Change in Canine Diagnosis Protocol Adopted by the Visceral Leishmaniasis Control Program in Brazil and a New Proposal for Diagnosis. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, p. e91009, 7 mar. 2014.

DANTAS-TORRES, F. et al. Prevalence and incidence of vector-borne pathogens in unprotected dogs in two Brazilian regions. **Parasites & Vectors**, v. 13, n. 1, p. 195, 21 abr. 2020.

DE ARRUDA, M. M. et al. Sensitivity and specificity of parallel or serial serological testing for detection of canine *Leishmania* infection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 3, p. 168–173, mar. 2016.

DHOM-LEMOS, L. et al. *Leishmania infantum* recombinant kinesin degenerated derived repeat (rKDDR): A novel potential antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. **PLoS ONE**, v. 14, n. 1, p. e0211719, 31 jan. 2019.

DOS SANTOS, A. R. R. et al. Evaluation of three recombinant proteins for the development of ELISA and immunochromatographic tests for visceral leishmaniasis serodiagnosis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 114, p. e180405, 4 fev. 2019.

DOS SANTOS MEIRA, C.; GEDAMU, L. Protective or Detrimental? Understanding the Role of Host Immunity in Leishmaniasis. **Microorganisms**, v. 7, n. 12, p. 695, 13 dez. 2019.

FARAHMAND, M.; NAHREVANIAN, H. Application of Recombinant Proteins for Serodiagnosis of Visceral Leishmaniasis in Humans and Dogs. **Iranian Biomedical Journal**, v. 20, n. 3, p. 128–134, jul. 2016a.

FARAHMAND, M.; NAHREVANIAN, H. Application of Recombinant Proteins for Serodiagnosis of Visceral Leishmaniasis in Humans and Dogs. **Iranian Biomedical Journal**, v. 20, n. 3, p. 128–134, jul. 2016b.

FARIA, A. R. et al. Canine visceral leishmaniasis follow-up: a new anti-IgG serological test more sensitive than ITS-1 conventional PCR. **Veterinary Parasitology**, v. 248, p. 62–67, 15 dez. 2017.

FONSECA, T. H. S. et al. Chemiluminescent ELISA with multi-epitope proteins to improve the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **The Veterinary Journal**, v. 253, p. 105387, 1 nov. 2019.

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. e0004333, 5 jan. 2016.

FREIRE, M. L. et al. Cost-effectiveness of serological tests for human visceral leishmaniasis in the Brazilian scenario. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 10, p. e0008741, 8 out. 2020.

GAZZONIS, A. L. et al. Detecting antibodies to Leishmania infantum in horses from areas with different epizooticity levels of canine leishmaniosis and a retrospective revision of Italian data. **Parasites & Vectors**, v. 13, p. 530, 22 out. 2020.

GONÇALVES, A. A. M. et al. An Overview of Immunotherapeutic Approaches Against Canine Visceral Leishmaniasis: What Has Been Tested on Dogs and a New Perspective on Improving Treatment Efficacy. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, p. 427, 18 dez. 2019.

GRIMALDI, G., Jr 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. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 106, n. 1, p. 54–59, 1 jan. 2012.

HAKKOUR, M. et al. Risk Factors Associated with Leishmaniasis in the Most Affected Provinces by Leishmania infantum in Morocco. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, v. 2020, p. 6948650, 25 jun. 2020.

HOLZMULLER, P.; BRAS-GONÇALVES, R.; LEMESRE, J.-L. Phenotypical characteristics, biochemical pathways, molecular targets and putative role of nitric oxide-mediated programmed cell death in Leishmania. **Parasitology**, v. 132, n. S1, p. S19–S32, mar. 2006.

HOMMEL, M. Visceral leishmaniasis: biology of the parasite. **Journal of Infection**, v. 39, n. 2, p. 101–111, 1 set. 1999.

IKEDA-GARCIA, F. A. et al. Avaliação clínica e parasitológica de cães naturalmente infectados por Leishmania (Leishmania) chagasi submetidos a tratamento com

antimoniato de meglumina e alopurinol. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 47, n. 3, p. 218, 1 jun. 2010.

JAMEIE, F. et al. Development of a Multi-Epitope Recombinant Protein for the Diagnosis of Human Visceral Leishmaniasis. **Iranian Journal of Parasitology**, v. 16, n. 1, p. 1–10, 2021.

KHATONIER, R. et al. Immunomodulatory role of Th17 pathway in experimental visceral leishmaniasis. **Immunobiology**, v. 226, n. 6, p. 152148, 1 nov. 2021.

LAGE, R. S. et al. Analysis of the cytokine profile in spleen cells from dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 115, n. 1–2, p. 135–145, 15 jan. 2007.

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, p. 444–450, 15 out. 2014.

LAURICELLA, M. A. et al. An rK28-Based Immunoenzymatic Assay for the Diagnosis of Canine Visceral Leishmaniasis in Latin America. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, n. 1, p. 92–98, 6 jul. 2016.

LE RUTTE, E. A. et al. Incidence and geographical distribution of canine leishmaniosis in 2016–2017 in Spain and France. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 25, p. 100613, 1 jul. 2021.

LIMA, V. M. F. DE et al. Serological diagnosis of visceral leishmaniasis by an enzyme immunoassay using protein A in naturally infected dogs. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 25, p. 215–218, dez. 2005.

LINDMARK, R.; THORÉN-TOLLING, K.; SJÖQUIST, J. Binding of immunoglobulins to protein A and immunoglobulin levels in mammalian sera. **Journal of Immunological Methods**, v. 62, n. 1, p. 1–13, 1 jan. 1983.

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, p. 11–16, 15 abr. 2006.

LOPES, U. G.; WIRTH, D. F. Identification of visceral *Leishmania* species with cloned sequences of kinetoplast DNA. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 20, n. 1, p. 77–84, jul. 1986.

MACHADO, C. A. L. et al. Patterns and drivers of Human Visceral Leishmaniasis in Pernambuco (Brazil) from 2007 to 2018. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 17, n. 2, p. e0011108, 8 fev. 2023.

MAGALHÃES, F. B. et al. Evaluation of a new set of recombinant antigens for the serological diagnosis of human and canine visceral leishmaniasis. **PLoS ONE**, v. 12, n. 9, p. e0184867, 28 set. 2017a.

MAGALHÃES, F. B. et al. Evaluation of a new set of recombinant antigens for the serological diagnosis of human and canine visceral leishmaniasis. **PLOS ONE**, v. 12, n. 9, p. e0184867, 28 set. 2017b.

MAIA, C.; CAMPINO, L. Cytokine and Phenotypic Cell Profiles of *Leishmania infantum* Infection in the Dog. **Journal of Tropical Medicine**, v. 2012, 9 ago. 2011.

MANCIANTI, F. et al. Studies on canine leishmaniasis control. 1. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 82, n. 4, p. 566–567, 1 jul. 1988.

MARCONDES, M. et al. Longitudinal analysis of serological tests officially adopted by the Brazilian Ministry of Health for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in dogs vaccinated with Leishmune®. **Veterinary Parasitology**, v. 197, n. 3, p. 649–652, 8 nov. 2013.

MAROLI, M. et al. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniases and other diseases of public health concern. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 27, n. 2, p. 123–147, jun. 2013.

MARTÍN-SÁNCHEZ, J. et al. Leishmaniasis due to *Leishmania infantum*: Integration of human, animal and environmental data through a One Health approach. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 67, n. 6, p. 2423–2434, 2020.

MEDEIROS, F. A. C. et al. Development and Validation of a PCR-ELISA for the Diagnosis of Symptomatic and Asymptomatic Infection by *Leishmania (Leishmania) infantum*. **Journal of Tropical Medicine**, v. 2017, p. 7364854, 2017.

MEDEIROS, F. A. C. et al. Phase II validation study of the rK39 ELISA prototype for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 37, p. e00041320, 7 abr. 2021.

MENEZES-SOUZA, D. et al. Cytokine and transcription factor profiles in the skin of dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* presenting distinct cutaneous parasite density and clinical status. **Veterinary Parasitology**, v. 177, n. 1, p. 39–49, 19 abr. 2011.

MORALES-YUSTE, M.; MARTÍN-SÁNCHEZ, J.; CORPAS-LOPEZ, V. Canine Leishmaniasis: Update on Epidemiology, Diagnosis, Treatment, and Prevention. **Veterinary Sciences**, v. 9, n. 8, p. 387, 27 jul. 2022.

MURRAY, H. W. et al. Advances in leishmaniasis. **The Lancet**, v. 366, n. 9496, p. 1561–1577, 29 out. 2005.

NASCIMENTO, L. F. J. et al. Epidemiological and diagnostic aspects of feline leishmaniasis with emphasis on Brazil: a narrative review. **Parasitology Research**, v. 121, n. 1, p. 21–34, 2022.

NOTOMI, T. et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 12, p. E63, 15 jun. 2000.

NYLÉN, S.; GAUTAM, S. Immunological Perspectives of Leishmaniasis. **Journal of Global Infectious Diseases**, v. 2, n. 2, p. 135–146, 2010.

NZELU, C. O.; KATO, H.; PETERS, N. C. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): An advanced molecular point-of-care technique for the detection of Leishmania infection. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 11, p. e0007698, 7 nov. 2019.

ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DE SAÚDE- OPAS. **Manual de Procedimentos para Vigilância e controle das Leishmanioses nas Américas**. ISBN: 978-92-75-32063-1, 2019.

OLIVEIRA, G. G. S. 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. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 85, n. 6, p. 1025–1034, 1 dez. 2011.

PACE, D. Leishmaniasis. **Journal of Infection**, Hot Topics in Infection and Immunity in Children - Papers from the 11th annual IIC meeting, Oxford, UK, 2013. v. 69, p. S10–S18, 1 nov. 2014.

PAPADOGIANNAKIS, E. I.; KOUTINAS, A. F. Cutaneous immune mechanisms in canine leishmaniosis due to Leishmania infantum. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 163, n. 3, p. 94–102, 15 fev. 2015.

PATTABHI, S. et al. Design, Development and Evaluation of rK28-Based Point-of-Care Tests for Improving Rapid Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 9, p. e822, 14 set. 2010.

PAZ, L. F. DE A. et al. A comparative and evaluation of an ELISA on the Q5 recombinant protein for the diagnosis of the canine visceral leishmaniasis, incidence

of false-positive results associated with the DPP test. , 2023. **Disponível em:** <<https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2705707/v1>>. Acesso em: 25 set. 2023

PEIXOTO, H. M.; DE OLIVEIRA, M. R. F.; ROMERO, G. A. S. Serological diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil: systematic review and meta-analysis. **Tropical Medicine & International Health**, v. 20, n. 3, p. 334–352, 2015.

PEREIRA, I. E. et al. Performance of recombinant proteins in diagnosis and differentiation of canine visceral leishmaniasis infected and vaccinated dogs. **European Journal of Microbiology & Immunology**, v. 10, n. 3, p. 165–171, 27 ago. 2020.

PETERSEN, C. A. Leishmaniasis, an emerging disease found in companion animals in the United States. **Topics in Companion Animal Medicine**, v. 24, n. 4, p. 182–188, nov. 2009.

PIMENTEL, D. DE S. et al. Prevalence of zoonotic visceral leishmaniasis in dogs in an endemic area of Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, p. 491–493, 26 jun. 2015.

PITTA, M. G. R. et al. IL-17 and IL-22 are associated with protection against human kala azar caused by *Leishmania donovani*. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 119, n. 8, p. 2379–2387, 3 ago. 2009.

QUINNELL, R. J. et al. Detection of *Leishmania infantum* by PCR, serology and cellular immune response in a cohort study of Brazilian dogs. **Parasitology**, v. 122, n. Pt 3, p. 253–261, mar. 2001.

READY, P. D. Biology of Phlebotomine Sand Flies as Vectors of Disease Agents. **Annual Review of Entomology**, v. 58, n. 1, p. 227–250, 2013.

REED, S. G. et al. An Improved Serodiagnostic Procedure for Visceral Leishmaniasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 43, n. 6, p. 632–639, 1 dez. 1990.

REIS, A. B. et al. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Special Issue: The 8th International Veterinary Immunology Symposium (8th IVIS). v. 128, n. 1, p. 87–95, 15 mar. 2009.

RIBEIRO, R. A. N. et al. Ability of immunodiagnostic tests to differentiate between dogs naturally infected with *Leishmania infantum* and Leishmune®-vaccinated dogs. **Veterinary Research Communications**, v. 39, n. 2, p. 87–95, 1 jun. 2015.

ROCHA, A. V. V. O. et al. Diagnosis and epidemiology of *Leishmania infantum* in domestic cats in an endemic area of the Amazon region, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 273, p. 80–85, 1 set. 2019.

RODRIGUES, O. R. et al. Identification of regulatory T cells during experimental *Leishmania infantum* infection. **Immunobiology**, v. 214, n. 2, p. 101–111, 1 fev. 2009.

RODRIGUES, V. et al. Regulation of immunity during visceral *Leishmania* infection. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, p. 118, 1 mar. 2016.

ROSÁRIO, E. Y. DO et al. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay using crude *Leishmania* and recombinant antigens as a diagnostic marker for canine visceral leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 197–203, abr. 2005.

SAFAVI, M.; ESHAGHI, H.; HAJIHASSANI, Z. Visceral Leishmaniasis: Kala-azar. **Diagnostic Cytopathology**, v. 49, n. 3, p. 446–448, 2021.

SAHA, S.; RAGHAVA, G. P. S. Prediction of continuous B-cell epitopes in an antigen using recurrent neural network. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 65, n. 1, p. 40–48, 2006.

SANCHEZ, M. C. A. et al. Performance of rK39-based immunochromatographic rapid diagnostic test for serodiagnosis of visceral leishmaniasis using whole blood, serum and oral fluid. **PLoS ONE**, v. 15, n. 4, p. e0230610, 2 abr. 2020.

SANTOS, W. J. T. et al. Gene design, optimization of protein expression and preliminary evaluation of a new chimeric protein for the serological diagnosis of both human and canine visceral leishmaniasis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 7, p. e0008488, 27 jul. 2020a.

SANTOS, W. J. T. et al. Gene design, optimization of protein expression and preliminary evaluation of a new chimeric protein for the serological diagnosis of both human and canine visceral leishmaniasis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 7, p. e0008488, 27 jul. 2020b.

SCHALLIG, H. D. F. H.; OSKAM, L. Molecular biological applications in the diagnosis and control of leishmaniasis and parasite identification. **Tropical medicine & international health: TM & IH**, v. 7, n. 8, p. 641–651, ago. 2002.

SCHUBACH, E. Y. P.; FIGUEIREDO, F. B.; ROMERO, G. A. S. Accuracy and reproducibility of a rapid chromatographic immunoassay for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 108, n. 9, p. 568–574, 1 set. 2014.

SHAW, J. SciELO - Brasil -. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 541–547, ago. 2007.

SILVA, D. A. DA et al. Epidemiology of canine visceral leishmaniasis in a vulnerable region in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 30, 6 set. 2021.

SINGH, O. P.; SUNDAR, S. Immunotherapy and Targeted Therapies in Treatment of Visceral Leishmaniasis: Current Status and Future Prospects. **Frontiers in Immunology**, v. 5, p. 296, 26 jun. 2014.

SIQUEIRA, W. F. et al. Serodiagnosis of leishmaniasis in asymptomatic and symptomatic dogs by use of the recombinant dynamin-1-like protein from *Leishmania infantum*: A preliminary study. **Acta Tropica**, v. 239, p. 106827, 1 mar. 2023.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. *Leishmania infantum*-specific production of IFN- γ and IL-10 in stimulated blood from dogs with clinical leishmaniosis. **Parasites & Vectors**, v. 9, p. 317, 3 jun. 2016.

SOUZA, T. D. et al. Visceral leishmaniasis in zoo and wildlife. **Veterinary Parasitology**, v. 200, n. 3, p. 233–241, 1 mar. 2014.

SRIVIDYA, G. et al. Diagnosis of visceral leishmaniasis: developments over the last decade. **Parasitology Research**, v. 110, n. 3, p. 1065–1078, 1 mar. 2012.

STEVERDING, D. The history of leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 1, p. 82, 15 fev. 2017.

SUNDAR, S.; SINGH, O. P. Molecular Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. **Molecular Diagnosis & Therapy**, v. 22, n. 4, p. 443–457, 1 ago. 2018.

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, 1 mar. 2007.

TEODORO DA COSTA, R. et al. Standardization of a rapid immunochromatographic test with the recombinant antigens K39 and K26 for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 97, n. 6, p. 678–682, 1 nov. 2003.

TOEPP, A. J.; PETERSEN, C. A. The Balancing Act: Immunology of Leishmaniosis. **Research in veterinary science**, v. 130, p. 19–25, jun. 2020.

TRAVI, B. L. et al. Canine visceral leishmaniasis: Diagnosis and management of the reservoir living among us. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 1, p. e0006082, 11 jan. 2018.

VAISH, M. et al. Evaluation of rK28 antigen for Serodiagnosis of Visceral Leishmaniasis in India. **Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 18, n. 1, p. 81–85, jan. 2012.

VARANI, S. et al. Serological and molecular tools to diagnose visceral leishmaniasis: 2-years' experience of a single center in Northern Italy. **PLOS ONE**, v. 12, n. 8, p. e0183699, 23 ago. 2017.

VILLANUEVA-SAZ, S. et al. Comparison of a qualitative immunochromatographic test with two quantitative serological assays for the detection of antibodies to *Leishmania infantum* in dogs. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 61, p. 38, 7 ago. 2019.

WHO EXPERT COMMITTEE ON THE CONTROL OF THE LEISHMANIASES; WORLD HEALTH ORGANIZATION, OMS. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22-26 March 2010. **Control de las leishmaniasis: informe de una reunión del Comité de Expertos de la OMS sobre el Control de las Leishmaniasis, Ginebra, 22 a 26 de marzo de 2010**, WHO technical report series ; 949. 2010.

WHO EXPERT COMMITTEE ON THE CONTROL OF THE LEISHMANIASES; WORLD HEALTH ORGANIZATION, OMS. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22-26 March 2022. **WHO technical report series ; 949. 2021.**

WHO EXPERT COMMITTEE ON THE CONTROL OF THE LEISHMANIASES; WORLD HEALTH ORGANIZATION, OMS. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22-26 March 2023. **Control de las leishmaniasis: informe de una reunión del Comité de Expertos de la OMS sobre el Control de las Leishmaniasis, Ginebra, 22 a 26 de marzo de 2022**, WHO technical report series ; 949. 2022.

WHO EXPERT COMMITTEE ON THE CONTROL OF THE LEISHMANIASES; WORLD HEALTH ORGANIZATION, OMS. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the **WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis**, Geneva, 22-26 March 2023. WHO technical report series ; 949. 2023.

APÊNDICES

APÊNDICE A –CERTIFICADO DE ACEITAÇÃO DO ARTIGO I DESTA TESE.

Submetido: 04 de agosto de 2023; aceito para publicação: 20 de setembro de 2023; Status- Revisão do autor



ANEXOS

ANEXO I

Normas da revista *PLOS* a qual será publicado o artigo “Desempenho aprimorado no teste de ELISA de uma nova proteína quimérica recombinante (Q8) baseada em epítomos imunogênicos de proteínas da *Leishmania infantum* com potencial para o sorodiagnóstico da leishmaniose visceral canina e humana”

Obs. Anexo I em meio digital