



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

WAGNER JOSÉ TENÓRIO DOS SANTOS

**Avaliação de proteínas recombinantes com potencial para diagnóstico da
Leishmaniose Visceral e indução de imunidade protetora**

Recife

2019

WAGNER JOSÉ TENÓRIO DOS SANTOS

**Avaliação de proteínas recombinantes com potencial para diagnóstico da
Leishmaniose Visceral e indução de imunidade protetora**

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

Área de concentração: Biologia Molecular

Orientador: Dr. Osvaldo Pompilio de Melo Neto

Coorientadores: Dr. Christian Robson de Souza Reis

Dr. Franklin Barbalho Magalhães

Recife

2019

Catálogo na fonte
Elaine C Barroso (CRB4/1728)

Santos, Wagner José Tenório dos

Avaliação de proteínas recombinantes com potencial para diagnóstico da *Leishmaniose* Visceral e indução de imunidade protetora / Wagner José Tenório dos Santos- 2019.

174 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Osvaldo Pompílio de Melo Neto

Coorientadores: Christian Robson de Souza Reis e Franklin Barbalho Guimarães

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Genética. Recife, 2019.

Inclui referências, apêndices e anexos

1. Leishmaniose visceral 2. Peptídeos 3. Vacina I. Melo Neto, Osvaldo Pompílio de (orient.) II. Reis, Christian Robson de Souza (coorient.) III. Guimarães, Franklin Barbalho (coorient.) IV. Título

616.9364

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2019-163

WAGNER JOSÉ TENÓRIO DOS SANTOS

**Avaliação de proteínas recombinantes com potencial para diagnóstico da
Leishmaniose Visceral e indução de imunidade protetora**

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

Aprovado em: 28/03/2019

Banca Examinadora:

Dr. Osvaldo Pompilio de Melo Neto
Instituto Aggeu Magalhães

Dr. Tercílio Calsa Junior
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Maria Carolina Accioly Brelaz de Castro
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Armando de Menezes Neto
Instituto Aggeu Magalhães

Dr. Danilo Elias Xavier
Instituto Aggeu Magalhães

Gostaria de agradecer a DEUS que sempre esteve guiando todos os momentos me possibilitando cada conquista.

AGRADECIMENTOS

A minha família, meus pais, Regivaldo e Nadja, meus irmãos, Willian, Wictor e Wanessa, por todo o afeto, amor, carinho, confiança e paciência que eles me passaram durante esta etapa. Agradecer por nunca ter me deixado fraquejar e sempre seguir em frente;

Ao meu orientador, Osvaldo Pompilio de Melo Neto, pelos ensinamentos e confiança, por me deixando correr em busca dos meus objetivos com muita maturidade, por toda paciência inicial e colaborações destinadas a mim;

Aos meus coorientadores, Franklin e Christian, pela confiança;

Ao meu amigo e mentor, Artur Leonel, “Bixo”, pelos incentivos, paciência, dedicação, companheirismo e motivação, obrigado por me escutar e aconselhar tanto no profissional quanto no pessoal;

A minhas amigas de vida jornada, Ludmila e Camila, por todos os momentos de descontração e companheirismo, por todos os ensinamentos trocados e acolhimento inicial;

Ao meu grande amigo Igor Rocha, por todos os momentos divertidos e loucos juntos, pelos ensinamentos trocados e por topar tudo sem dizer nada;

As minhas amigas mais que especiais que fazem do meu dia cheio de luz, e que quero levar para o resto da vida, por todos os momentos de descontração, companheirismo, fidelidade e amizade, Thaíse, Lilian, Adriana Neuman, Adriana Roberto, Beatriz e Mayara;

Aos meus amigos do Laboratório que foram minha família desde o início, pelo acolhimento, Gustavo, Moezio, Ira, Maria, Ada, Isis, Carol, Dani e Allana;

Aos amigos novos que chegaram no Laboratório, por toda energia boa recebida, Stephanny, Yallen, Maressa, Renata e Rafaela;

Aos meus amigos de laboratório que já passaram e deixaram alguns ensinamentos, Marília, Rodrigo, Éden, Larissa, Felipe, Rômulo, João e Diego, Antônio Resende e Crhisllane;

A Carol Pereira, pela eficiência no departamento de microbiologia;

Ao grupo de pesquisa comandado pela Dra. Valéria, Dra. Zulma, Dra. Milena e Dr. Manoel, por todos os ensinamentos e ouvidos dados a mim, pela colaboração firmada de grandes frutos e oportunidades;

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

A Bio-Manguinhos comandado por Edmilson, pela atenção e produção dos testes;

A plataforma de NPT, pelos experimentos realizados;

Ao programa de Pós-Graduação em Genética, UFPE e CAPES pelos incentivos;

Aos meus amigos de toda a vida, que eu sempre busco nas horas de aperto e nos momentos de descontração, obrigado pela paciência e companheirismo, em especial, Hugo, Érico, Jerffeson, Anderson, Diego, Priscilla, Ellen, Gabriella, Alyson e outros.

"É preciso coragem. É preciso abrir as suas asas e voar sem medo. Voar apenas na sua imaginação não trará nada além de insatisfação e para tirar do papel tudo aquilo que você sempre sonhou você só precisa voar, voar com o coração"

(COSENZA, 2018)

RESUMO

A Leishmaniose Visceral (LV), forma mais grave da Leishmaniose, acomete humanos e cães. O controle da LV ainda depende de métodos mais eficientes de diagnóstico e prevenção. Para seu diagnóstico, ensaios sorológicos constituem a melhor opção, pois apresentam grande sensibilidade, especificidade e fácil execução para sua prevenção. Este estudo objetivou a avaliação de proteínas recombinantes para uso no diagnóstico precoce e em alternativas de vacina contra a LV humana e canina. Inicialmente, ensaios utilizando extrato total de *Leishmania infantum* mostraram uma sensibilidade relevante em soros humanos de LV, porém com reação cruzada com soro de pacientes com Doença de Chagas. Já antígenos recombinantes individuais (as Lci) mostraram maior especificidade, mas apenas uma mistura destes alcançou alta sensibilidade e especificidade em soros de humanos e caninos. Baseado nisto, buscou-se o desenvolvimento de uma proteína quimérica (Q5) contendo fragmentos dos melhores antígenos recombinantes individuais. Essa quimera se mostrou de fácil produção e com uma alta eficácia em diagnosticar humanos (82%) e cães (99%) com LV. Foi realizado ainda uma predição de epítomos a partir dos antígenos individuais e definidos peptídeos que foram reunidos em nova proteína quimérica, agora para indução de imunidade protetora após expressão em *Leishmania tarentolae*. Estes resultados sugerem o uso dos novos antígenos quiméricos recombinantes como alternativas tanto para o diagnóstico quanto para a imunoterapia da LV.

Palavras-chave: Leishmaniose Visceral. Diagnóstico. Peptídeos. Vacina.

ABSTRACT

Visceral Leishmaniasis (VL), a more serious form of Leishmaniasis, affects humans and dogs. The control of VL still depends on more efficient methods of diagnosis and prevention. For their diagnosis, serological tests are the best option, since they present great sensitivity, specificity and easy execution for their prevention. This study aimed at the evaluation of recombinant proteins for use in early diagnosis and in alternatives of vaccine against human and canine VL. Initially, assays using total extract of *Leishmania infantum* showed a relevant sensitivity in human sera of VL, but with cross-reaction with serum of patients with Chagas' disease. Already individual recombinant antigens (the Lci) showed greater specificity, but only a mixture of these reached high sensitivity and specificity in human and canine sera. Based on this, we sought the development of a chimeric (Q5) protein containing fragments of the best individual recombinant antigens. This chimera proved to be easy to produce and highly efficacious in diagnosing humans (82%) and dogs (99%) with VL. Further prediction of epitopes from the individual antigens and defined peptides that were pooled into a novel chimeric protein, now for induction of protective immunity after expression in *Leishmania tarentolae*. These results suggest the use of the new recombinant chimeric antigens as alternatives both for the diagnosis and for the immunotherapy of VL.

Keywords: Visceral Leishmaniasis. Diagnosis. Peptides. Vaccine.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO DA LITERATURA

Figura 1 –	Ciclo biológico da Leishmaniose	20
Figura 2 –	Dados epidemiológicos sobre a LV no Brasil.....	22
Figura 3 –	Imunopatogênese da LV	24

ARTIGO I

Figura 1 –	Preliminary assessment of a chimeric protein based on the Lci2, Lci3 and Lci12 antigens.....	56
Figura 2 –	Construction of the chimeric genes	57
Figura 3 –	Evaluation of the expression of chimeric proteins in <i>Escherichia coli</i>	58
Figura 4 –	Serological evaluation of selected chimeric proteins	59
Figura 5 –	Comparison of the Q1 gene with the new Q5 construct	60
Figura 6 –	Indirect ELISA of the chimeric proteins	61
Figura 7 –	ELISA Q5 with other diseases	62
Figura suplementar 1 –	Purification of chimeric proteins.....	64

ARTIGO II

Figura 1 –	Dois protótipos do teste rápido para leishmaniose visceral canina e humana com a proteína quimérica Q5	80
Figura 2 –	Avaliação da Q5 frente aos soros de humanos e cães com LV.....	81
Figura 3 –	Comparação das proteínas Q5 e k39 frente a soros de humanos	82
Figura 4 –	Comparação dos testes TR-Q5, ELISA-Q5 e DPP.....	83

ARTIGO III

Figura 1 –	Fluxograma da metodologia empregada para predição de epítomos.....	108
Figura 2 –	Modelagem das estruturas dos MHC II e os gráficos de Ramachandran.....	109
Figura 3 –	Complexo (peptídeo + MHC).....	110
Figura 4 –	Gene quimérico vacinal.....	111

ARTIGO IV

Figura 1 –	Cassete de construção dos genes, integração no genoma e avaliação da expressão.....	125
Figura 2 –	Imunofluorescência das construções na <i>Leishmania tarentolae</i>	126
Figura 3 –	Cinética de infecção de <i>L. tarentolae</i> e <i>L. infantum</i> em macrófagos.....	127
Figura 4 –	Imunofluorescência confocal de macrófago.....	128

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DA LITERATURA

Tabela 1 –	Testes sorológicos utilizados para diagnostico da Leishmaniose visceral humana.....	28
Tabela 2 –	Testes sorológicos utilizados para diagnostico da Leishmaniose visceral canina.....	29
Tabela 3 –	Resumo das principais vacinas contra LVC.....	31

ARTIGO I

Tabela 1 –	Values of sensitivity, specificity, positive and negative predictive values, of chimeric protein D2. Serum dilution 1:6000.....	54
Tabela 2 –	Values of sensitivity, specificity, positive and negative predictive values comparing the chimeric proteins.....	54
Tabela 3 –	Test of chimeric Q5 protein against dog and human sera with Visceral Leishmaniasis.....	55
Tabela Suplementar 1 –	Gene constructs generated and evaluated here.....	63

ARTIGO II

Tabela 1 –	Teste da proteína quimérica Q5 frente a soros de cão e humano com Leishmaniose Visceral.....	78
Tabela 2 –	Avaliação de ensaios teste rápido e imunoenzimáticos para o diagnóstico de Leishmaniose Visceral em humanos e cães	78
Tabela 3 –	Avaliação de ensaios teste rápido e imunoenzimáticos para o diagnóstico de Leishmaniose Visceral em humanos e cães com soros confirmados por testes parasitológicos.....	78
Tabela 4 –	Desempenho dos antígenos k39 e Q5 nas plataformas de TR e ELISA com soros humanos com LV.....	79

Tabela 5 –	Desempenho das plataformas TR – Q5, ELISA – Q5 e DPP com soros cães com LV.....	79
------------	---	----

ARTIGO III

Tabela 1 –	Predição de estruturas secundárias das proteínas mostrando a antigenicidade dos genes baseados nos parâmetros de dobramento aleatório, não estruturadas e de Alfa-Hélice.....	104
Tabela 2 –	Predição de epítomos promissores para as duas classes de MHC, mostrando o total de peptídeos para cada proteína utilizada em cada software.....	105
Tabela 3 –	Identificação da quantidade de peptídeos, suas propriedades e os alelos que são estimulados pelos peptídeos.....	106
Tabela 4 –	Os valores de escore (Isc) para cada peptídeo com o alelo respectivo mostrando a energia de afinidade.....	107

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DCs	Células dendriticas
ELISA	Ensaio imunoenzimático indireto
gp63	Glicoproteína 63
hBR	Receptor de Hemoglobina
IFN	Interferon
IL	Interleucina
iNOS	Oxido Nítrico Sintetase
LPG	Lipofosfoglicano
LV	Leishmaniose Visceral
LVC	Leishmaniose Visceral Canina
LVH	Leishmaniose Visceral Humana
NO	Oxido nítrico
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
TNF	Fator de Necrose Tumoral
Treg	T reguladoras
YRFP	Proteína infravermelha fluorescente

MHC	Complexo de Histocompatibilidade
TGF	Fator de transformação do crescimento
DPP	Dual Path Plataform
RIFI	Imunofluorescência indireta
DAT	Teste de Aglutinação direta
KAtex	Teste de aglutinação em látex
IC	Imunocromatografia
TR	Teste rápido
HLA	Antígeno leucocitário humano
LB	Luria-Bertani
PBS	Tampão fosfato-salino

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	20
2.1 ASPECTOS GERAIS SOBRE A LEISHMANIOSE.....	20
2.2 EPIDEMIOLOGIA.....	21
2.3 IMUNOPATOGENESE DA LEISHMANIOSE VISCERAL.....	23
2.4 DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL.....	25
2.4.1 Métodos para diagnóstico sorológico humano e canino.....	26
2.5 DESENVOLVIMENTO DE VACINAS.....	29
2.5.1 Vacinas contra a leishmaniose.....	39
2.5.2 Vacinas comerciais desenvolvidas.....	30
2.6 NOVOS ESTUDOS PARA DESENVOLVIMENTO DE VACINAS.....	31
2.6.1 A <i>Leishmania tarentolae</i> como modelo vacinal.....	32
2.7 ANTÍGENOS PARA O DIAGNÓSTICO OU PREVENÇÃO DA LV.....	33
2.8 OBJETIVOS.....	35
3 ARTIGO I -	36
4 ARTIGO II -	65
5 ARTIGO III -	84
6 ARTIGO IV -	112
7 DISCUSSÃO GERAL.....	129
8 CONCLUSÕES.....	134
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	135
APÊNDICE A – Artigo publicado I.....	144
APÊNDICE B – Artigo publicado II.....	152

ANEXO I - Normas da revista para submissão do artigo III.....	171
ANEXO II - Normas da revista para submissão do artigo IV.....	172
ANEXO III - Normas da revista para submissão do artigo V.....	173
ANEXO IV - Normas da revista para submissão do artigo VI.....	174

1. INTRODUÇÃO

A Leishmaniose caracteriza-se por um grupo de enfermidades com sintomas diversos, constituindo uma das seis doenças tropicais de maior importância global, é considerada uma doença negligenciada, pois afeta principalmente regiões de países em desenvolvimento. A Leishmaniose se apresenta em três formas clínicas distintas: Leishmaniose Tegumentar ou Cutânea, Leishmaniose Muco-cutânea e a Leishmaniose Visceral (LV), forma mais grave da doença.

No Brasil, a LV é causada pelo parasita *Leishmania infantum* e o cão doméstico é o seu principal reservatório, com quase 50% dos casos ocorrendo na região Nordeste, porém em expansão para outras regiões. Em relação ao tratamento e ao controle da doença humana, houve poucos avanços e o tratamento ainda é oneroso, tóxico e pouco eficiente. Em relação a LV canina, muitos cães de áreas endêmicas são portadores de infecções assintomáticas, embora tenham a mesma capacidade infectante que os cães sintomáticos. É então de grande importância a realização de um diagnóstico precoce, pois quanto mais cedo os cães assintomáticos forem identificados, menor o potencial de disseminação da doença. Ainda não existem esquemas terapêuticos que sejam eficientes no seu tratamento e ainda que o cão fique clinicamente curado ele permanece portador do parasita.

Proteínas recombinantes são promissoras em estudos para o desenvolvimento de testes diagnósticos contra a LV utilizam ensaios sorológicos com proteínas recombinantes, pois apresentam grande sensibilidade e especificidade, além do baixo custo e fácil execução. Até o momento, entretanto, ainda não se conseguiu identificar um único antígeno capaz de, por meio de testes sorológicos, detectar satisfatoriamente a produção de anticorpos em cães e humanos com LV. O ideal é a produção de uma única proteína quimérica que seja tão eficiente no diagnóstico da forma humana quanto canina da leishmaniose visceral.

Visando o controle da LV é imprescindível a construção de alternativas terapêuticas e profiláticas que sejam eficazes e de baixo custo dirigido para o cão e para o humano. Têm se assim investido em inovações terapêuticas através de vacinas atenuadas com o parasita *Leishmania*, uma vez que a percepção deste tipo de vacinação é mais semelhante à doença natural e melhor é a produção de uma

resposta imunitária protetora. A *Leishmania tarentolae*, por não infectar naturalmente mamíferos, está sendo avaliada como proposta vacinal por sua eficácia em modelos de expressão de antígenos recombinantes. Este é um parasita que demonstrou ter como alvo células apresentadoras de antígenos, incluindo células dendríticas (DC), e que ativa o seu processo de maturação, induzindo a proliferação de células T e a produção de IFN- γ , desviando de CD4 + células T em relação a um fenótipo de células Th1.

Em trabalhos anteriores proteínas quiméricas (D1, D2 e D3) foram geradas a partir de três antígenos de *Leishmania infantum* identificados (Lci2, Lci3 e Lci12) e avaliadas como eficientes para utilização no diagnóstico da LV humana ou canina e ainda com potencial vacinal e imunoterápico, embora tenham sido de difícil produção. Nossa proposta então foi identificar uma única proteína quimérica (Q5), de fácil expressão em bactéria, que seja capaz de detectar eficientemente as duas formas da doença. Para os estudos vacinais nossa proposta foi, a utilização de uma nova proteína quimérica (Q6) e a *L. tarentolae* como vacina viva expressando diferentes antígenos (Lci10 e Q1).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ASPECTOS GERAIS SOBRE A LEISHMANIOSE

A Leishmaniose é uma doença infecto-parasitária causada por protozoários flagelares pertencentes à família Trypanosomatidae e ao gênero *Leishmania* (ALVAR et al., 2012). Estes parasitas apresentam ciclo de vida heteróximo (Figura 1), vivendo alternadamente em hospedeiros vertebrados (o homem e outros mamíferos silvestres e/ou domésticos) e insetos vetores, estes últimos pertencendo aos gêneros *Phlebotomus* (velho mundo) e *Lutzomyia* nas Américas (Sacks & Kamhawi 2001).

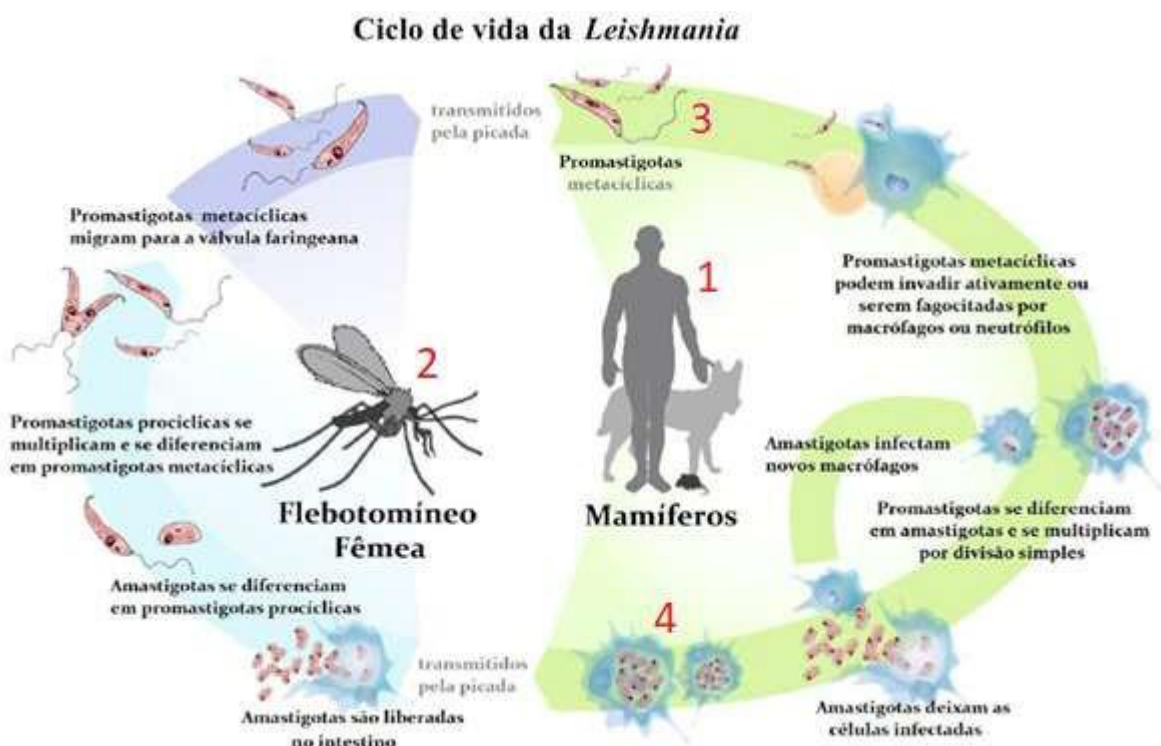


Figura 1. Ciclo biológico da Leishmaniose. Pode-se destacar na figura alguns pontos importantes desse ciclo. 1 – Homem e cão como hospedeiros, 2 - Mosquito como transmissor, 3 – forma promastigota (extracelular) e 4 – Forma amastigota (intracelular). Fonte: Ministério da saúde.

A Leishmaniose está distribuída em 98 países (ALVAR et al., 2012) e aproximadamente 350 milhões de pessoas estão em situação de risco, porém mais de 90% dos casos mundiais ocorrem em Bangladesh, Índia, Sudão, Sudão do Sul, Etiópia e Brasil (MAROLI et al., 2013; STEVERDING, 2017). Estima-se que as atuais alterações climáticas, a crescente influência do aquecimento global, as recentes guerras e os movimentos migratórios aumentem a distribuição global da doença (SHAW, 2007).

No homem a Leishmaniose se apresenta em três formas clínicas bem distintas que variam de acordo com a espécie de *Leishmania*, o que muda a forma de manifestação da doença (BRASIL, 2014): Leishmaniose Tegumentar ou Cutânea; Leishmaniose Muco-cutânea; e a Leishmaniose Visceral (LV). Causado pelo parasita *Leishmania infantum* (no novo mundo), a LV é a forma mais grave da doença, que também pode acometer os cães e causar a Leishmaniose Visceral Canina (LVC) (IKEDA-GARCIA et al., 2007; PALTRINIERI et al., 2010).

2.2 EPIDEMIOLOGIA

Atualmente é estimada uma incidência de até 1,7 milhões de pessoas que se encontram em situação de risco para Leishmaniose, com 350 mil casos sendo da LV. Embora a taxa de desenvolvimento da doença seja baixa, mais de 20 mil chegam à morte, o que demonstra que esta doença está longe de ser considerada sob controle (WHO, 2016). O Brasil é, atualmente, responsável por cerca de 90% dos casos de LV da América Latina. No ano de 2016 foram notificados 3.200 casos da doença em humanos em todo Brasil, com uma incidência da ordem de 1,55 casos/100.000 habitantes e uma taxa de letalidade de 7,8%. A região mais acometida do Brasil é a região Nordeste (47,6%), porém 22 Estados e as cinco regiões do país estão acometidas com a doença (Figura 1), com valores médios de cerca de 1800 casos de LV e 140 óbitos por ano, entre os anos de 2000 até 2016 (Marcondes & Rossi 2013; Brasil 2016).

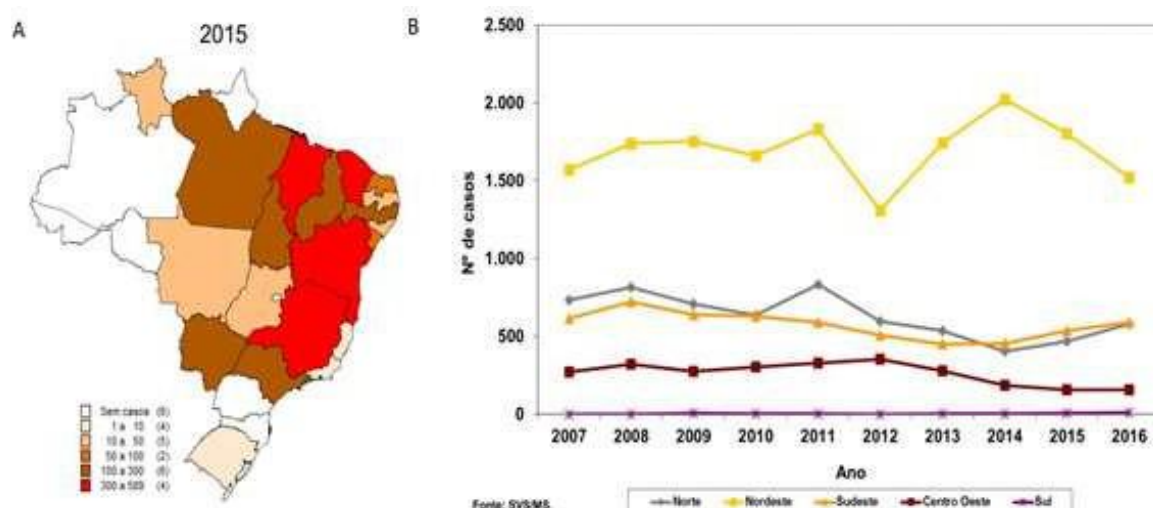


Figura 2. Dados epidemiológicos sobre a Leishmaniose Visceral Brasil. A: mostrando a distribuição da LV nos estados no ano de 2015. B: mostrando que a região Nordeste é a mais acometida com a doença. Fonte: SVS/MS.

A LV no Brasil e no restante da América é causada pelo parasita *L. infantum* que, como os demais membros do gênero *Leishmania*, apresenta duas formas distintas de vida. A forma flagelar, promastigota, vive no vetor invertebrado e é inoculada no hospedeiro vertebrado através da derme onde é internalizada pelas células dendríticas, pelos os macrófagos, e transforma-se na forma amastigota. Esta última prospera e se multiplica no interior das células do hospedeiro mamífero e é passível de nova etapa de transmissão pelo vetor invertebrado (Joshi et al. 2014; Walker et al. 2015).

Como principal reservatório da LV, o cão além de ter uma prevalência muito alta de infecção (40%), apresenta um grande número de animais assintomáticos (de até 80%) o que o torna uma fonte muito vasta do parasita para o inseto vetor. Somado a isso, geralmente a infecção nos cães precede a infecção em humanos, sendo então apontada como uma das responsáveis pela expansão da doença (Gonçalves et al. 2013; Pacheco et al. 2013).

2.3 IMUNOPATOGENESE DA LEISHMANIOSE VISCERAL

Para obter uma resposta imune eficaz e protetora é necessário um melhor entendimento da imunogenética da Leishmaniose, uma vez que os parasitas responsáveis pela doença desenvolveram inúmeros mecanismos de escape do sistema imune hospedeiro, permanecendo ainda por longos períodos no interior de macrófagos (TEWARY et al., 2004).

Na LV, o padrão de resposta imune do tipo Th1 com produção de IFN- γ , TNF e IL-12, tem sido associado com o controle da infecção por ativação macrofágica e destruição parasitária (Roberts 2006; Ameen 2010). A citocina IFN- γ atua em sinergia com o TNF levando a enzima óxido nítrico sintase (iNOS) a produzir óxido nítrico (NO), causando a morte intracelular do parasito e controle da doença (Bogdan et al. 2000; Nylén & Gautam 2010). Por outro lado, citocinas como IL-4, IL-10 e TGF- β , consideradas do tipo Th2, favorecem a multiplicação parasitária, inibindo a produção de NO pelos macrófagos ativados por IFN- γ (MATOS et al., 2007). Estas citocinas também são capazes de inibir a diferenciação dos linfócitos T para um perfil Th1 e sua consequente produção de IFN- γ e TNF (Baratta-Masini et al. 2007). Essa interação da *Leishmania* com o sistema imune e a produção de citocinas pelos perfis Th1 e Th2 está mostrado na figura 3.

IMUNOPATOGÊNESE DA LV

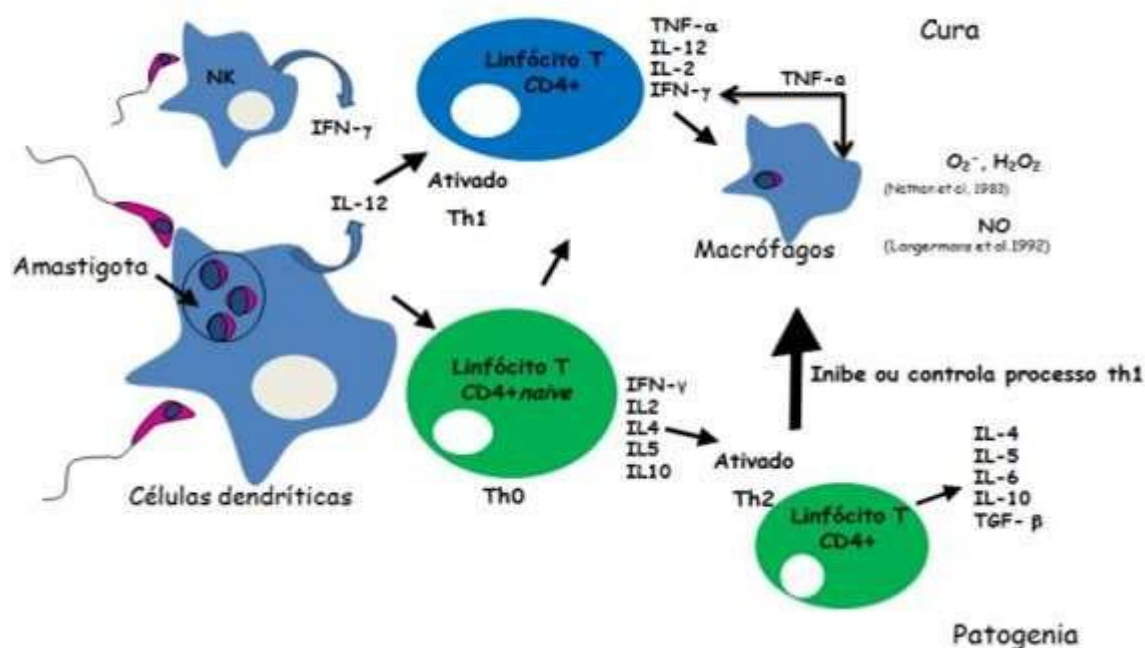


Figura 3. Imunopatogênese da LV. Em azul temos o perfil de cura (Th1) do hospedeiro ativado principalmente pela citocina IFN- γ , enquanto em verde temos o perfil de patogenicidade (Th2) do hospedeiro ativado principalmente pela citocina IL-4. Fonte: Andréia Vieira Pereira.

A imunologia e patogenicidade das Leishmanioses são complexas e estão associadas a um grande número de fatores genéticos e celulares que implicam na resistência e susceptibilidade. O controle da infecção acontece através do recrutamento de células da resposta Th1 e interleucinas (IL) IL-12, IL-18, IL-27 que ativam os macrófagos. Como o IFN- γ , a IL-12 também gera uma resposta efetiva aumentando a produção da resposta Th1. Por outro lado, no baço, a resposta Th2 sustenta a persistência do parasita (NOZZI et al., 2014).

Embora os estudos da compreensão do paradigma Th1/Th2 na Leishmaniose ainda sejam válidos, a polarização Th2 nunca foi capaz de explicar a gravidade das doenças. Recentemente, vários outros subconjuntos de células T, incluindo as células reguladoras T (Treg) e Th17, têm se mostrado desempenhando um papel importante na susceptibilidade e resistência a Leishmaniose. As células Th17 e Treg são subconjuntos amplamente aceitos com funções importantes na indução e controle da resposta inflamatória (LEE et al., 2009).

A resposta mediada por Th17 na pele e mucosa desempenham um papel vital na proteção contra vários patógenos extracelulares, mas também são descritas na mediação de patologias imunológicas severas. Acredita-se que essas células estão envolvidas no recrutamento, migração e ativação de neutrófilos. A IL-22 também é produzida por células Th17 e, em menor grau, por células NK e Th1 (Korn et al. 2009), que são particularmente envolvidas na imunidade nos níveis epitelial e mucoso (WOLK et al., 2014).

IL-17 e IL-22 são citocinas inflamatórias que desempenham um papel protetor contra parasitas intracelulares, como é o caso da *Leishmania* (Nascimento et al. 2014). No entanto, o papel da IL-17 e IL-22 durante esta infecção permanece mal definido (GONZALEZ-LOMBANA et al., 2013). Além do perfil Th1/Th2/Th17 tem-se a modulação da resposta pelas células chamadas de Treg (células T regulatórias), que tem a capacidade de inibir a resposta de outras células T e estudos mostram que essa resposta promove a sobrevivência do parasita *Leishmania* dentro das células (KATARA et al., 2013).

2.4 DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL

O diagnóstico da LV é de fundamental importância para o controle precoce da doença e diferentes técnicas podem ser utilizadas para esse diagnóstico nas formas humana e canina da doença. O padrão ouro para esse tipo de doença é o método parasitológico, onde é possível visualizar o parasita (forma amastigota) nos tecidos extraídos para análise, onde a sensibilidade é variável de 50% até 99% dependendo do tecido utilizado. Muitos avanços têm sido gerados na área de diagnóstico da LV, porém, ao que se diz respeito aos testes disponíveis para esse diagnóstico, nenhum apresenta 100% de sensibilidade e especificidade (BEVILACQUA; ALVES, 2004; SRIVASTAVA et al., 2011).

2.4.1 Métodos para diagnóstico sorológico humanos e caninos

Uma das características principais da LV é a presença de hipergamaglobulinemia e grande produção de anticorpos, o que facilita o uso de técnicas imunológicas para detecção de anticorpos anti-*Leishmania*, evitando os invasivos testes parasitológicos. Entre os testes sorológicos se destacam as reações de: ELISA (ensaio imunoenzimático), RIFI (imunofluorescência indireta), DAT (teste de aglutinação direta), KAtex (Teste de Aglutinação em Latex) e os testes rápidos (SRIVASTAVA et al., 2011). O teste de ELISA é uma metodologia moderna que permite a realização de grande número de exames em curto espaço de tempo, sendo o mais comumente utilizado para imunodiagnóstico de LV. Esse teste tem alta sensibilidade e permite a detecção de baixos títulos de anticorpos, mas é pouco preciso na detecção de casos subclínicos ou assintomáticos.

A RIFI apresenta sensibilidade considerável, porém com baixa especificidade onde observam-se reações cruzadas em títulos baixos com outras doenças como a Doença de Chagas. O DAT é baseado na detecção da aglutinação direta de promastigotas de *Leishmania* que reage com anticorpos anti-*Leishmania* no soro, resultando na aglutinação das formas promastigotas, apresentando também baixa especificidade (BOELAERT et al., 2004; CAÑAVATE et al., 2011; CHAPPUIS et al., 2007; METTLER et al., 2005; SRIVASTAVA et al., 2011; SUNDAR; RAI, 2002).

O ensaio KAtex detecta um antígeno de *Leishmania* de baixo peso molecular (5-20 kD) estável ao calor em amostras de urina a técnica emprega esferas de látex sensibilizadas com anticorpos contra *L. donovani*. Este antígeno está presente em ambas as formas promastigota e amastigota do parasita e o teste apresenta alta especificidade (82–100%), mas uma sensibilidade variável (47–95%) (Srividya et al. 2012; Sakkas et al. 2016).

Os testes sorológicos apresentam resultados moderados de sensibilidade e especificidade, porém todos exigem equipamentos que não são apropriados para o uso em campo em regiões menos desenvolvidas (CAÑAVATE et al., 2011). Uma alternativa são os testes rápidos imunocromatográficos (IC), o mais conhecido dos quais utiliza o antígeno recombinante (rK39), fixado na membrana de nitrocelulose.

O antígeno recombinante rK39 é um peptídeo 39 aminoácidos de *L. infantum* que foi identificado como muito atraente para o diagnóstico da LV (PAUL D READY, 2014). Este antígeno reconhece os anticorpos específicos anti-*Leishmania*, do complexo *donovani*.

O teste rápido baseado no rK39 apresentou 100% de sensibilidade e 98% de especificidade em testes de reconhecimento da LVH. Com isso, este teste passou a ser visto como um instrumento promissor em programas de controle da LVH, pois requer pequena quantidade de sangue periférico e é de rápida execução e leitura (entre 10 e 20 minutos), podendo ser utilizado em condições de campo (BOELAERT et al., 2008; CHAPPUIS et al., 2007; GOMES et al., 2008). Entretanto, foram levantadas discrepâncias de sensibilidade entre trabalhos que utilizaram a rK39 em diferentes países do mundo, por exemplo no continente africano, e mostraram resultados marcadamente diferentes. Além disso, embora tenha uma sensibilidade em humano alta, a sensibilidade em cães foi baixa (TRAVI et al., 2018).

Os dados do teste rápido sugerem que a sensibilidade de um antígeno pode variar em relação à região em que ele está sendo utilizado (GUSTAVO A. S. ROMERO, 2010; SRIVASTAVA et al., 2011). Mesmo no Brasil, o desempenho diagnóstico do rK39 foi considerado apenas razoável para confirmação da infecção em casos suspeitos de LVC, e a sensibilidade para detectar cães infectados foi muito baixa para estudos epidemiológicos de grande escala e programas de controle operacional (QUINNELL et al., 2013).

Em 2011, no Brasil, o Ministério da Agricultura (MAPA) registrou um novo teste rápido (DPP® - Dual-path Platform) visando o diagnóstico da LVC. Este teste consiste em um dispositivo impregnado com antígeno recombinante (uma quimera combinando os antígenos K26 e K39) de *L. infantum*. Apesar dessas características e da facilidade de aplicação, a discussão sobre a precisão do DPP persiste, especialmente quanto à sensibilidade para detecção de infecção assintomática em animais (BRASIL, 2014; PATTABHI et al., 2010).

Os resultados de sensibilidade, especificidade, vantagens e desvantagens de cada teste utilizado para LV segue nas tabelas 1 e 2, onde podemos observar quais os testes mais aplicados para a LVH e a LVC.

Tabela 1. Testes sorológicos utilizados para diagnostico da LVH.

Teste	Sensibilidade	Especificidade	Limitações	Referência
RIFI	96%	98%	Requer laboratórios relativamente bem equipados	(BOELAERT et al., 2008)
DAT	95%	97%	Longa incubação e reação cruzada com outras parasitoses	(CHAPPUIS et al., 2006)
ELISA (k39)	94%-100%	81 - 96%	Diferenças em outras regiões	(BOELAERT et al., 2008; CHAPPUIS et al., 2006)
TR (k39)	100%	96%	Diferenças em outras regiões	(Kumar et al. 2001; Sundar & Rai 2002)

Tabela 2. Testes sorológicos utilizados para diagnóstico da LVC.

Teste	Sensibilidade	Especificidade	Limitações	Referência
DAT	72-100%	91 - 100%	Longos períodos de incubação	(ADAMS et al., 2012)
RIFI	90%	100%	Equipamento especializado e pessoal treinado	(PALTRINIERI et al., 2016)
ELISA	87.1%	96 - 99%	Aparelhos adequados e depende do antígeno.	(SANTARÉM et al., 2010)
rK39 dipstick	72 - 77%	61 - 75%	Variabilidade na sensibilidade	(BABAKHAN et al., 2009; REITHINGER et al., 2002)
(DPP)	89%	70%	Baixa sensibilidade em assintomáticos	(GRIMALDI et al., 2012)

2.5 DESENVOLVIMENTO DE VACINAS

2.5.1 Vacinas contra a Leishmaniose

O desenvolvimento de uma vacina para a Leishmaniose é um objetivo de saúde pública, pois avanços como a compreensão da patogênese da infecção pelo parasita *Leishmania*, a observação de geração da imunidade protetora do hospedeiro e o estudo do genoma de *Leishmania* abriram novas abordagens para a pesquisa de vacinas (JOSHI et al., 2014). Entretanto o seu desenvolvimento deve levar em conta várias características importantes, como segurança, baixo custo de produção, indução de imunidade protetora e resposta de células T de longo prazo (EVANS; KEDZIERSKI, 2012).

2.5.2 Vacinas comerciais desenvolvidas

O uso de vacinas contra a LV em cães em áreas endêmicas representa um desafio diagnóstico adicional se a vacina promover a seroconversão detectada por testes de diagnóstico convencionais, bem como por alguns ensaios de imunidade mediada por células. Duas vacinas para essa doença (Leish-Tec®, Hertape Calier; e Leishmune®, Zoetis) foram comercializadas por vários anos no Brasil (REGINA-SILVA et al., 2016).

Duas outras vacinas (CaniLeish®, Virbac; e LetiFend®, Leti) são atualmente comercializadas na Europa (CARCELÉN et al., 2009); OLIVIA et al., 2014). O uso dessas vacinas exige uma atenção sobre o seu impacto no diagnóstico atual. A Leishmune® estava disponível comercialmente no Brasil de 2004 a 2014, após isso foi retirado do mercado por não apresentar bons resultados de estudo de fase III. O LetiFend® recentemente foi registrado na Europa, mas existem publicações limitadas disponíveis sobre o uso em larga escala desta vacina (BONGIORNO et al., 2013).

É importante ressaltar que os cães infectados vacinados demonstraram ser infecciosos para os mosquitos. A presença de um número crescente de vacinas anti-*Leishmania* no mercado global torna a LVC um desafio de diagnóstico para o veterinário, o patologista clínico e as autoridades de saúde pública em países endêmicos e regiões não-endêmicas onde a infecção importada é preocupante (BANETH et al., 2008).

Um resumo das vacinas disponíveis contra a LVC, suas principais características (antígenos relacionados) está listado na Tabela 3 (SOLANO-GALLEGO et al., 2017).

Tabela 3: Resumo das principais vacinas contra LVC.

NOME E PAÍS	ANTÍGENO	REFERÊNCIA	PROTEÇÃO (%)
LEISHMUNE (BRASIL)	FML	(MARCONDES et al., 2013)	-
LEISH-TEC (BRASIL)	A2	(REGINA-SILVA et al., 2016)	71%
CANILEISH (FRANÇA)	LiESP	(MORENO et al., 2012; OLIVA et al., 2014)	68%
LETIFEND (ESPANHA)	H2A, LiP2a, LiP2b, e LiPo	(FERNÁNDEZ COTRINA et al., 2018)	72%

Tabela adaptada de Solano-Gallego et al, 2017.

O Brasil tornou-se o primeiro país do mundo a oferecer vacinas comercialmente disponíveis para imunizar cães contra *L. infantum*. Em 2003, a vacina Leishmune®, originalmente comercializada pela *Fort Dodge Animal Health* e mais tarde pela Zoetis, foi licenciada para a prevenção da LVC pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento de Alimentos do Brasil (MAPA) e vendida no mercado de 2004 a 2014. Em 2007, o MAPA licenciou o uso da vacina Leish-Tec® (Hertape Calier Saúde Animal, Brasil), que atualmente é a única vacina comercial disponível contra o LVC no Brasil, porém não confere proteção total aos cães vacinados (REGINA-SILVA et al., 2016; SOLANO-GALLEGO et al., 2017).

2.6 NOVOS ESTUDOS PARA DESENVOLVIMENTO DE VACINAS

Vários antígenos de *Leishmania* foram testados como candidatos a vacina contra diferentes espécies, tanto sob a forma de proteína recombinantes como vacinas de subunidade ou como vacinas de DNA, mas a falta de resultados

confiáveis significou que poucos antígenos tenham avançado para ensaios clínicos humanos ou caninos (DUTHIE; REED, 2017; SRIVASTAVA et al., 2016), 2016).

Nos primeiros ensaios vacinais, as proteínas de *Leishmania* foram usadas tanto de maneira bruta como purificada para provocar respostas imunes protetoras. *Escherichia coli* e levedura estão entre os sistemas mais utilizados para a produção de proteínas recombinantes (FERRER-MIRALLES et al., 2009) e a bioinformática facilitou a produção de uma variedade de proteínas recombinantes que foram investigadas como antígenos candidatos a vacinas contra *Leishmania* em modelos animais (COSTA et al, 2011; DUARTE et al, 2016).

Pequenos fragmentos de proteínas (peptídeos) também podem servir como candidatos a vacina, bem como podem ser usados para imunoterapia. No entanto, a identificação de peptídeos (ou epítomos ou regiões antigênicas) que podem ser utilizadas para imunização contra um patógeno é um dos maiores desafios. Numerosas ferramentas foram desenvolvidas para a identificação de regiões antigênicas em proteínas ou antígenos patogênicos (DHANDA et al., 2017). A utilização de avanços na bioinformática ajudou a estudar a predição de epítomos de células T a partir de sequências de proteínas e foi proposto como alternativa para desenvolvimento de vacinas (LARSEN et al., 2005). Os peptídeos promissores (epítomos de células T) podem se ligar a diferentes variantes alélicas de HLA/MHC (Complexo de Histocompatibilidade) e podem ser usados para desenvolver uma vacina promissora contra uma maior proporção de populações humanas e caninas (DHANDA et al, 2017).

2.6.1 A *Leishmania tarentolae* como modelo vacinal

O tripanossomatídeo *Leishmania tarentolae* é um parasita não patogênico a mamíferos e isolado do lagarto (*Tarentolae annularis*). Sua principal característica é uma rápida proliferação celular com baixas necessidades nutricionais. Também são ricos em glicoproteínas de superfície, podendo até ultrapassar 10% do total de

proteínas celulares, e tem sido utilizado como um novo sistema de expressão eucarioto (FERGUSON, 1997; FRITSCHÉ et al. 2008).

Um estudo pioneiro utilizou a *L. tarentolae* como um vetor vacinal candidato contra a LV. Este estudo demonstrou que esse parasita tem tropismo por células apresentadoras de antígeno, incluindo células dendríticas (DCs), ativa o processo de maturação de DC e induz a proliferação de células T e a produção de interferon gama (IFN- γ) (BRETON et al., 2005). Foi possível observar que, além de estimular a maturação de células dendríticas, este modelo induziu a proliferação de células T e a produção de interferon gama, ocasionando o desvio de células T (CD4+) para uma resposta do tipo Th1 (MIZBANI et al., 2009).

Um segundo estudo avaliou a eficácia de uma nova combinação de fusão proteínas recombinantes (CPA/CPB) expressas em *L. tarentolae*. Essa combinação gerou eficácia protetora quando desafiados com a *L. major* na infecção de BALB / c e C57BL/6. (ZAHEDIFARD et al., 2014).

2.7 ANTÍGENOS PARA O DIAGNÓSTICO OU PREVENÇÃO DA LV

Em estudos precursores que deram origem ao presente trabalho, foi possível identificar treze antígenos recombinantes de *Leishmania infantum* (Lci1 a Lci13) que apresentaram resultados de sensibilidade e especificidade eficientes para uso no diagnóstico da LV. Contudo nenhum desses antígenos recombinantes individuais testados foi capaz de diagnosticar humanos e cães com LV no mesmo teste, pois os antígenos que foram eficientes no diagnóstico da LVH não foram eficientes para o diagnóstico da LVC e vice-versa (MAGALHÃES et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2011b).

Um estudo utilizando misturas de dois ou mais desses antígenos recombinantes na placa de ELISA também foi realizado, gerando resultados promissores, sendo observado um aumento da sensibilidade dos testes com os soros humanos sem prejuízo no diagnóstico da infecção com soros de cães (MAGALHÃES et al., 2017). Em continuidade, três das melhores proteínas recombinantes, dentre as treze originais, foram utilizadas para gerar proteínas

quiméricas a partir da síntese química dos seus genes. Estas foram avaliadas quanto a sua construção e os métodos de otimização dessa proteína para expressão em procariotos (Santos, 2015; Tavares, 2012).

Baseado nos métodos de otimização das proteínas quiméricas realizados em trabalhos prévios, este estudo optou pela construção de novas proteínas quiméricas voltadas para o diagnóstico das formas humanas e caninas de Leishmaniose Visceral com a finalidade de melhorar o painel de diagnósticos sorológicos utilizados atualmente, visto que ainda não existe nenhum antígeno capaz de diagnosticar as duas formas da doença no mesmo teste. Em relação aos estudos voltados para o desenvolvimento de vacinas, foram selecionados peptídeos preditos para compor uma proteína quimérica com os melhores peptídeos selecionados e utilizar a *L. tarentolae* como vetor atenuado vacinal.

2.8 OBJETIVOS

2.8.1 Objetivo geral

Gerar e avaliar antígenos recombinantes e quiméricos com potencial na utilização de diagnóstico para Leishmaniose Visceral e como vacina contra a doença a partir de sua expressão em sistemas procarióticos e em *Leishmania tarentolae*.

2.8.2 Objetivos específicos

1. Comparar em diferentes plataformas o extrato bruto de *Leishmania infantum* no diagnóstico sorológico da LV;
2. Avaliar a eficiência de uma nova proteína quimérica (Q5) no diagnóstico sorológico da LV;
3. Validar a Q5 como teste rápido e frente a soros de cães e humanos com LV em diferentes regiões do país;
4. Identificar *in silico* os melhores peptídeos das proteínas antigênicas para a utilização como modelo vacinal;
5. Avaliar a capacidade da *Leishmania tarentolae* em expressar antígenos recombinantes de *L. infantum* de forma contínua nas duas fases de crescimento da célula

3. ARTIGO I:

3.1 DESENHO GÊNICO, OTIMIZAÇÃO DA EXPRESSÃO PROTEICA E AVALIAÇÃO PRELIMINAR DE UMA NOVA PROTEÍNA QUIMÉRICA PARA O DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL HUMANA E CANINA

Artigo anexo na página seguinte (Revista: *PLOS Neglected Tropical Diseases*),

OBS: No seu doutorado, o autor desta tese e deste artigo foi responsável pelo desenho do gene quimérico Q5, expressão e purificação das proteínas quiméricas, testes de ELISA com soros de humanos e cães e análise dos dados estatísticos.

Resumo dos principais resultados: A avaliação das múltiplas proteínas quiméricas produzidas nesse trabalho (Q1, Q2, Q3, Q4 e Q5), construídas com peptídeos de antígenos recombinantes de trabalhos prévios (Lci2, Lci3, Lci12 e Lci13), permitiu a identificação de uma ótima alternativa para o diagnóstico tanto da LVH quanto da LVC no ELISA, bem como para sua expressão em modelo procariótico. Os melhores resultados de sensibilidade foram das proteínas Q5 (82% em humanos e 99% em cães) e Q1 (71% em humanos e 99% em cães).

Gene design, protein expression optimization and preliminary evaluation of a new chimeric protein for the serological diagnosis of both human and canine visceral leishmaniasis

Wagner José Tenório dos Santos^{1,2}, Diego de Hollanda Cavalcanti Tavares¹, Artur Leonel de Castro Neto¹, Marília Barbosa do Nascimento¹, Antônio Mauro Resende¹, Franklin Barbalho Magalhães³, Osvaldo Pompilio de Melo Neto¹

¹Aggeu Magalhães Institute - Oswaldo Cruz Foundation, Recife, Pernambuco, Brazil;

²Federal de Pernambuco University, Recife, Pernambuco, Brazil;

³Tabosa de Almeida University, Caruaru, Pernambuco, Brazil.

ABSTRACT

A more promising approach for the diagnosis of Visceral Leishmaniasis (VL) uses serological assays with recombinant proteins, since they show high sensitivity and specificity and are easy to carry out. Tests developed for the human form of the disease, however, have not been shown to be efficient for its diagnosis in the canine host, the major reservoir for the American VL. We have previously evaluated thirteen recombinant antigens from *L. infantum* for their efficiency in detecting human and canine VL, with some antigen performing best for one or the other but none efficient for both disease hosts. In this study, three of those with the best performances for either human or canine VL were selected aiming for a single diagnostic test for both forms of the disease. DNA fragments encoding the best antigenic regions from each protein were joined in order to generate chimeric genes which were then optimized for expression in prokaryotes. The corresponding, his tagged, chimeric proteins were expressed in *Escherichia coli*, affinity purified and tested with sera against two of the original proteins confirming their antigenicity. The diagnostic potential of the chimeric proteins was then evaluated through ELISA assays with serum from humans and dogs. The ELISA results showed high levels of sensitivity and specificity for one of the chimeric proteins, named Q5, in humans (82% and 100%) and in dogs (100% for both). These results suggest that this chimeric protein is potentially useful for the

detection of both humans and dogs afflicted with Leishmaniasis, with its use in rapid tests necessary for validation as a new diagnostic tool.

INTRODUCTION

Leishmaniasis are a group of infectious-parasitic diseases caused by flagellated protozoa belonging to the family Trypanosomatidae, genus *Leishmania* [1]. These parasites have a heteroxenic life cycle, living alternately in vertebrate hosts (man and other wild and/or domestic mammals) and insect sandfly vectors [2,3]. This disease is distributed in 98 countries and is considered a major global public health problem, as 350 million people are at risk of infection, with an annual incidence of more than 12 million cases worldwide [1].

In humans, the Leishmaniasis are present in three main clinical forms, cutaneous, mucocutaneous and visceral leishmaniasis (VL). The visceral form of the disease, potentially fatal if not treated, is caused by the *L. donovani* (Old World) and *L. infantum* (New World and Old World) species [4]. In many regions, the domestic dog has a major role for the epidemiology VL, not only due to its high infection prevalence, compared to humans, but also due to the high number of asymptomatic animals that transmit the parasite [5–7].

There are many ways to diagnose the leishmaniasis, each having different applications and sensitivities. Several studies have shown that the serological diagnosis is the more appropriate method to use in endemic regions, since it is easy to use, non invasive and fast in producing results. Despite many advances that have been made in this field, no test so far presents a high performance in detecting the disease in both humans and dogs [8–10].

Among all the serological methods currently used (DAT, IFAT, ELISA and immunocromatographic tests) the ELISA is the most efficient platform, when using recombinant proteins [11]. ELISA based on the rK39 antigen is the most common test used for human VL, with high sensitivity results (67 - 99%) [12,13]. Alternatively, the rK39 immunocromatographic (IC) test, despite being considered an efficient test for HVL, shows variable sensitivities when used in different regions of the world. Studies in India showed a 97% sensitivity and 90% specificity, but in East Africa the results with the same test showed 85% sensitivity/ 91% specificity [14]. Regarding

canine VL diagnosis in Brazil, the rK39 serological tests displayed low sensitivities (less than 80%) in both ELISA and IC [15]. The combination of two antigens (rKLO8 and rK26), however, aiming to increase the sensitivity of the tests has been shown to be effective, with an 85% sensitivity and 93% specificity compared to individual sensitivities and specificities for both antigens (68% and 92 % for KLO8, respectively, with 77% and 91% for rK26) [16].

Through the screening of genomic and cDNA expression libraries, we have previously identified novel *L. infantum* antigens (Lci1 to Lci13) with potential to improve the serological diagnosis of either dogs or human afflicted with VL [17,18][19]. However, none of these antigens proved to be efficient for both the human and canine VL diagnosis. Mixtures of proteins with the best performances for the detection of human and dog VL were performed and some improvement were made [17]. The production of a diagnostic system with two, three or more recombinant proteins, however, increases costs and complicates standardization. One way of eliminating this difficulty is the construction of chimeric polypeptides. These results led us to evaluate the possibility of generating a chimeric protein based on the previously characterized antigens as a novel tool to diagnose both human and canine forms of VL.

METHODS

Chemical synthesis and subcloning of chimeric genes

A prediction of linear B cell epitopes in selected protein sequences (Lci2, Lci3 and Lci12) was performed by the BCPred1.2 program [20]. Sequences of the genes optimized for expression in *E. coli* were designed through the Gendesigner program [21,22] and sent to commercial synthesis in GenScript, (Piscataway, New Jersey, USA) (Chimec proteins) and Thermo (Life Tech, St. Paulo, Brazil) (Q5 only). These genes were synthesized cloned into pUC57 and then subcloned in the pRSETa vector (Thermo Life Tech, São Paulo, Brazil). After the first subcloning of the genes into the pRSETa vector different gene combinations were produced through different restriction enzymes' digestions, removal of smaller DNA fragments and religation. All constructs were confirmed by restriction enzyme digestion and sequencing.

Expression and purification of recombinant proteins

For the expression of the chimeric proteins, the various plasmid constructs were transformed into *E. coli* BL21 or Rosetta™ 2 (Merck Millipore) using standard procedures and selection with ampicillin (50 mg/ml) and chloramphenicol (34 mg/ml). Clones of the transformed cells were cultured in liquid LB medium with the same concentrations of antibiotics and induction of recombinant protein expression made with IPTG (0.5mM). The result was visualized through polyacrylamide gel (SDS-PAGE 15%) after Coomassie Blue R-250 staining. Proteins were purified using Ni-NTA agarose beads (Qiagen) [23], checked on SDS-PAGE gels and quantified using the Bradford method [24].

Indirect ELISA Assay

The ELISA was performed as described in [17]. Briefly, 600 ng of the chimeric protein was added to each well. The human and canine sera were then incubated at a dilution of 1: 2500 and 1: 900, respectively, followed by the secondary antibody incubation with either the peroxidase-linked anti-human IgG (1:10000) or anti-canine IgG (1:1200). Readings were performed on a 490nm filter in the Benchmark Plus Microplate Manager 5.2 (BIO-RAD). For D2 protein the serum dilution for humans was 1: 6000 and dogs were 1: 900.

Human sera

All human sera were collected following approval of their use by the appropriate ethics committees. A control group consisted of 50 sera from healthy individuals living in a non-endemic VL area, kindly provided by Dr. Rafael Dhália from the Laboratory of Virology and Experimental Therapy (LAVITE) of the Instituto Aggeu Magalhães (IAM-FIOCRUZ). These sera were included in a study approved by the Ethics Committee of the Ministry of Health (25000.119007/2002-03). The VL positive group consisted of 50 sera from VL patients, with the clinical and laboratory

examination confirmed by parasitological and serological diagnosis, kindly provided by Dr. Carlos Henrique Costa of the Federal University of Piauí. Use of these sera was approved by the Ethics Committee of the Federal University of Piauí (0116/2005). We also used 80 sera from patients with cutaneous leishmaniasis, included in the CAEE project 0014.0.095.000-05, approved by the ethics committee of IAM-FIOCRUZ (08/03/2008). Finally, eight sera from patients with coinfection (HIV/VL) and seven sera from HIV-only patients, also evaluated in this proposal, were provided by Dr. Zulma Medeiros, and their use also approved by the Ethics Committee from IAM-FIOCRUZ (CAEE: 53495816.0.0000.5190).

Dog sera

Sera from 100 domestic or wandering dogs were obtained from an endemic VL area from Jequié, state of Bahia (provided by Dr. Geraldo Oliveira IGM-FIOCRUZ). A second set of 90 VL positive dog sera were kindly provided by Dr. Valéria Pereira, of IAM-FIOCRUZ. All dogs were treated according to FIOCRUZ animal testing standards. The use of sera from dogs in this study was approved by the Ethical Commission on the Use of Animals (IGM-FIOCRUZ, Ceua, protocol N.040 / 2005 and IAM-FIOCRUZ, Ceua, protocol 27/2016).

Statistical Analysis of Indirect ELISA Results

Sensitivity, specificity, positive predictive value, negative and confidence interval parameters were estimated using the MedCalc program (version 12.3) (MedCalc Software, Ostend, Belgium). The dot plot was obtained through the GraphPad Prism program (GraphPad Prism version 6.00 for Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA).

RESULTS

Production and evaluation of chimeric proteins through gene shuffling

To validate the chimeric protein approach, three proteins were selected among the best previously evaluated by us for the diagnosis of human and visceral leishmaniasis, named Lci2, Lci3 and Lci12. These three proteins were chosen since, despite having no sequence homology to each other, all have similar structures consisting of multiple copies of small motifs repeated several times and flanked by non-repetitive regions. Lci2 consists of repeats 39 amino acids long and was the best antigen for the diagnosis of human leishmaniasis, among the thirteen recombinant proteins tested by us. Lci3, based on repeats consisting of 14 amino acids, and Lci12, based on eight amino acids repeats were most efficient for canine leishmaniasis [17,18].

For each protein, a synthetic gene was first designed *in silico* consisting of both N-terminal and C-terminal regions flanking a small set of repetitive motifs (five for Lci2, two for Lci3 and four for Lci12), with those including the most variable repeats found in the original proteins. Within the coding sequences selected restriction enzymes were included to facilitate the exchange of genetic fragments. All three genes were chemically synthesized and subjected to multiple subcloning steps aiming to unite fragments of the different protein coding sequences.

Three chimeric constructs were thus generated, one of those having the N-terminal region of Lci2 and the other two with the N-terminus of Lci12. All three constructs included the full set of repeats from the three synthetic genes (Figure 1A), although their order varied along each protein sequence. The three chimeric genes were then expressed in *Escherichia coli*, generating recognizable bands that were affinity purified (Figure 1B). These were then assayed for their ability to diagnose VL through ELISA assays. All were very efficient for VL diagnosis with the best of them having sensitivity values of 94 and 76% for both human and dog sera, respectively (D2 in Table 1). Remarkably, positive values in the ELISA assays were achieved using sera diluted five fold more than the dilutions commonly used for the original, non-chimeric, recombinant proteins (Figure 1C).

These results indicated that the construction of chimeric proteins based on the previously described antigens is a possible and feasible alternative for the improvement of serological diagnostic tests for human and canine LV. The synthetic genes, however, were not optimized for expression in *Escherichia coli* and the chimeric proteins proved to be very difficult to produce and likely toxic, which impaired large scale validation assays.

Chimeric genes designed *in silico*

In order to generate a chimeric protein based on the previously described antigens that was effective for VL diagnosis as well as efficiently expressed in bacterial systems, we opted to go through a new round of chimeric gene design and synthesis. This time, and aiming to improve the results with the canine sera, we opted to include a fourth antigen, Lci13, which has the best performance for canine VL diagnosis. We also minimized cloning procedures and designed the chimeric constructs already having fragments of the different antigens in alternative positions, in all synthesizing four different chimeric genes.

All four genes had their codons optimized for expression in *E. coli* but, in order to maximize expression, and they also had included additional translation enhancing sequences, such as: pRBS-SD1 + 6AA – a ribosome binding site and Shine-Dalgarno sequence; pSS-gIII - N-terminal sequence of bacteriophage envelope protein to optimize expression; T7 tag peptide - N-terminal sequence to stabilize and optimize expression. A ET-6His - polyhistidine (six) sequence was also introduced at their C-terminuses, prior to the translation termination codon, to allow purification of the different proteins, independently of the expression vector used. Restriction enzyme sites were added at strategic positions along the sequences enabling further manipulation of these genes, by facilitating the exclusion of selected sequences, as described below. The four chimeric constructs (Q1, Q2, Q3 and Q4 - Figure 2A), were all chemically synthesized and subcloned into a bacterial expression vector.

Using the internal restriction sites found only on the synthetic genes, restriction enzyme digestions and religations were performed, in order to generate truncated variants through the removal of different fragments encoding selected portions of the

proteins. This aimed to facilitate testing alternatives and possible antigenic combinations so as to improve the protein expression in the prokaryotic system. So, for all four genes, an alternative construct was generated by digestion with NcoI and religation after removal of the 75 bp fragment encoding the N-terminal peptide pSS-gIII, included for expression optimization purposes (exemplified in Figure 2B for the Q1 gene), generating the NN variants, such as Q1NN. Using equivalent strategies, selected antigenic encoding fragments were also removed. For the Q1, for instance, the DNA fragment encoding the Lci13 C-terminal region was removed after digestion with Sall/XhoI and relegation, generating the Q1SX construct. The second Q1 variant is also exemplified in Figure 2B, but similar variants were also generated for the other three genes, based on the included restriction sites, in all resulting in 16 different chimeric constructs (Listed on supplementary Table 1).

Evaluation of chimeric proteins' expression in *E. coli*

For the production of the different recombinant proteins, all constructs were transformed into *E. coli* cells and their expression evaluated through SDS-PAGE gels. Recombinant protein expression was first evaluated after Coomassie Blue staining of whole cell extracts in two different *E. coli* cell lines (BL21 and BL21 or Rosetta™ 2). Of all constructs evaluated, clearly identifiable bands were only seen for the Q2SX construct in BL21 (not shown) and for the Q1SX, Q2SX and Q4SX constructs Rosetta™ 2 (Figure 3A). To confirm expression of these and other constructs, and to confirm the presence of their C-terminal polyhistidine tag when expressed in BL21 cells, the bacterial extracts were then subjected to a Western Blot with an anti-His monoclonal antibody (Figure 3B). These confirm the expression of most proteins, even in the BL21 cells, despite not being visible in the Coomassie Blue stained gels, and also generally confirm that removal of the pSS-gIII - N- terminal sequence from most of the chimera substantially reduce its expression (compare Q2 with Q2NN in the figure, for example).

We next assayed the same extracts with polyclonal antisera directed against the Lci3, Lci12 and Lci13 antigens. In most cases these sera recognized the chimeric proteins having the corresponding protein fractions. For instance, all three sera recognized the Q1 full length and Q1NN construct, but only the Lci3 and Lci12 sera

recognized Q1SX, missing the Lci13 fragment (Figure 3C). Overall our results show a very poor expression of the Q3 chimera and its derivatives in *E. coli*, indicating that the order in which the individual fragments were positioned was detrimental for protein expression. For the other three chimeric constructs, these results also highlight the greater expression efficiency for the lower molecular weight proteins, the SX variants.

Assessment of selected chimeric proteins for the VL diagnosis

The three proteins having the best expression results (Q1SX, Q2SX and Q4SX) were then selected for large scale expression and affinity purification. In contrast to the recombinant proteins from the first round of chimeric gene design, all three expressed well in the large scale settings and the first two proteins also were easily purified, although the Q4SX did not purify well (Figure 1 Supplementary). All three, nevertheless, were submitted to the evaluation of their diagnostic potential through ELISA with sera from dogs and humans with Visceral Leishmaniasis. With the dogs' sera, both Q1SX and Q2SX proteins performed very well, with a clear distinction between positive and negative samples for Q1SX and a slightly weaker performance for Q2SX (Figure 4A), with sensitivity values of 99 and 89%, respectively, for the two proteins (Table 2). In contrast, the Q4SX protein did not perform well, with a significant number of false negative samples and an overall poorer performance, with 71% sensitivity. Against the human sera, all three proteins performed less efficiently, with all having many false negative samples, although the Q4SX was still much worse than the other two (Figure 4B). Sensitivity values for the Q1SX and Q2SX were still satisfactory, 72 and 76% (Table 2), respectively, although not ideal for diagnostic purposes. Results for Q4SX, however were insufficient with a sensitivity of only 32%.

Construction of the new chimeric Q5 gene

Considering the greater sensitivity for the human sera achieved with the chimeric protein from the first round of gene design (D2 – 94% sensitivity), much better than a very similar protein from the second round (Q1SX – 72% sensitivity), we

decide to investigate the differences between the two proteins, first performing an alignment comparing the D2 and Q1SX sequences (Figure 5A). Although nearly identical, the D2 protein includes one extra repeat from Lci3 that is missing from Q1SX. To increase sensitivity to human sera, while maintaining sensitivity to canine sera, this region was inserted *in silico* in the Q1SX sequence and a new chimeric gene synthesized, now named Q5. The difference between the Q1SX and Q5 chimeras, then, is the fragment encoding the extra Lci3 repeat, flanked by Sall and XhoI sites, shown in the scheme from Figure 5B. After synthesis, subcloning and expression, the novel chimera was efficiently expressed and demonstrated to be recognized by the anti-poly-histidine marker antibody. Efficient expression was maintained by large-scale induction in *E. coli* and were efficiently affinity purified (Figure 5C).

Comparative evaluation of Q1SX and Q5 proteins regarding their potential for the diagnosis of VL

Purified Q1SX and Q5 proteins were quantified by comparison with defined amounts of BSA on SDS-PAGE and used in ELISA assays to assess their potential in the diagnosis of human and canine VL. Each protein was then evaluated with human sera from individuals proven to be infected with *L. infantum*, sera from healthy controls, sera from dogs carrying VL and the healthy controls. The Q1 ELISA results with human and dog sera showed 76% sensitivity and 100% specificity for human, and the results from dog sera showed 99% sensitivity and 100% specificity. The Q5 ELISA results showed a 81% sensitivity for human sera, while the results with sera from dogs maintained a sensitivity of 99% (Figure 6). Based on the best results obtained for protein Q5, it was used in a new ELISA assays to evaluate its cross-reactivity with sera from patients with tegumentary leishmaniasis. The results with these sera showed a non-specific reaction of 8%. Then sera from patients co-infected with VL and HIV were evaluated, showing 98% sensitivity and 100% specificity and no reaction with HIV-positive sera (Figure 7). Table 3 shows the results of all analyzes with the sera of the groups described above with the Q5 and Q1SX protein, showing the sensitivity, specificity and amount of sera evaluated.

DISCUSSION

The search for recombinant antigens for the use in serological diagnosis is of extreme importance and over the years, promising studies have been developed to identify novel antigens that can be used to improve diagnostic techniques for visceral leishmaniasis. The use of chimeric antigens may be included as alternatives for improving the performance of diagnostic tests. These chimeras consist of the junction of different peptide fragments, giving rise to a synthetic protein. In this way, they can express different antigenic determinants, where it has already been shown to be responsible for increasing the sensitivity of diagnostic tests. Many studies have already used chimeric proteins as a diagnostic tool for malaria [25], toxoplasmosis [26], tuberculosis [27], Chagas disease [28], dengue [29], among others.

Here we were able to generate very efficient results for VL diagnosis using two different chimeric proteins derived from the Q1 and Q2 constructs. Moreover, in an attempt to increase the test sensitivity we included another repeat encoding DNA fragment in the chimeric gene Q5, which showed even better results, mainly in humans when comparing to the Q1 results. A recent study performed the prediction of *Leishmania donovani* epitopes for B cells and found some epitopes formed by repetitive regions, when these repetitive regions were joined it increased the sensitivity and specificity in ELISA with sera from dogs [30].

A study showed the validation of these B-cell epitopes prediction methods in *Trypanosoma cruzi*, which identified 36 peptides and the best one of them showing 95.8% sensitivity and 88.5% specificity in sera from patients infected with Chagas disease [31]. A more recent study also corroborates these bioinformatics methods based on the prediction of B-cell epitopes showing their efficiency, with the construction of the *Taenia saginata* chimeric protein, that increased the test sensitivity [32].

The ELISA technique is widely used as a screening test to diagnose both forms of leishmaniasis. It can be adapted for use with several recombinant antigens or crude antigens, such as the *Leishmania* cell total lysate [33]. Regarding studies with recombinant proteins, reports have already shown that a single molecule containing several antigens allows a better distribution of the antigenic determinants

in the ELISA plate, when compared to the use of multiple molecules in the same assay. For instance, a study showed that recombinant antigens increase the specificity and sensitivity of diagnostic tests when compared to the use of crude antigens [33]. These data corroborate with ours, especially in the case of CVL sensitivity, where the chimeric antigens (Q1 and Q5) were shown to have increased sensitivity (99%) and specificity (100%) when compared to the crude antigen.

A relevant study with *Leishmania* chimeric proteins showed that it was possible to join epitopes of the immunogenic proteins k9, K39 and K26 in a single chimeric protein [34]. The sensitivity obtained was 96%, while the specificity was 99% in dog sera, whereas the individual results with the best regions from the same proteins were not significant [35].

Previous evaluations performed with three proteins (Lci2, Lci3 and Lci12) that are part of the chimeric proteins (Q1 and Q5) showed sensitivities of 97%, 36% and 46% in human sera and a sensitivity of 83%, 91% and 91% in sera from dogs, respectively [17,18]. However, neither of these proteins were suitable for the human and dog diagnostic simultaneously. There is still no diagnostic test with a high efficacy for both form of visceral leishmaniasis and our data show an excellent sensitivity for CVL (99%) and a sensitivity considered good for HVL (82%). Our preliminary results with the ELISA data then show that the Q5 chimeric protein has the potential to diagnose both human and canine forms of Visceral Leishmaniasis.

REFERENCE

1. Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. PLoS One. 2012;7.
doi:10.1371/journal.pone.0035671
2. Ready PD. Biology of Phlebotomine Sand Flies as Vectors of Disease Agents. Annu Rev Entomol. 2013;58: 227–250. doi:10.1146/annurev-ento-120811-153557
3. Maroli M, Feliciangeli MD, Bichaud L, Charrel RN, Gradoni L. Phlebotomine

sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Med Vet Entomol*. 2013;27: 123–147. doi:10.1111/j.1365-2915.2012.01034.x

4. Torres-Guerrero E, Quintanilla-Cedillo MR, Ruiz-Esmenjaud J, Arenas R. Leishmaniasis: a review. *F1000Research*. 2017;6: 750. doi:10.12688/f1000research.11120.1
5. Torres FD. Situação atual da epidemiologia da leishmaniose visceral em Pernambuco. *Revista de Saúde Pública*. 2006;40: 537–41. doi:10.1590/S0034-89102006000300024
6. Miró G, Cardoso L, Pennisi MG, Oliva G, Baneth G. Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. *Trends Parasitol*. 2008;24: 371–377. doi:10.1016/j.pt.2008.05.003
7. Paltrinieri S, Solano-Gallego L, Fondati A, Lubas G, Gradoni L, Castagnaro M, et al. Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. *J Am Vet Med Assoc*. 2010;236: 1184–1191. doi:10.2460/javma.236.11.1184
8. Bevilacqua PD, Alves WA. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. *Cad Saude Publica*. 2004;20: 259–265. doi:10.1590/S0102-311X2004000100043
9. Boelaert M, Rijal S, Regmi S, Singh R, Karki B, Jacquet D, et al. A comparative study of the effectiveness of diagnostic tests for visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*. 2004;70: 72–7. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14971701>
10. Srivastava P, Dayama A, Mehrotra S, Sundar S. Diagnosis of visceral

leishmaniasis [Internet]. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene; 2011. pp. 1–6. doi:10.1016/j.trstmh.2010.09.006

11. Singh OP, Sundar S. Developments in diagnosis of visceral leishmaniasis in the elimination era. J Parasitol Res. Hindawi Publishing Corporation; 2015;2015. doi:10.1155/2015/239469
12. Shahana S, Ahmed B. Evaluation of recombinant K39 antigen and various promastigote antigens in sero-diagnosis of visceral leishmaniasis in Bangladesh. PAREPI. The Authors; 2016;1: 219–228. doi:10.1016/j.parepi.2016.07.003
13. Mauri C, Maia Z, Li M, Badaro R. Comparative Study of rK39 Leishmania Antigen for Serodiagnosis of Visceral Leishmaniasis : Systematic Review with Meta-Analysis. 2012;6. doi:10.1371/journal.pntd.0001484
14. 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;6: CD009135. doi:10.1002/14651858.CD009135.pub2
15. Reithinger R, Davies CR. Canine leishmaniasis: Novel strategies for control. Trends Parasitol. 2002;18: 289–290. doi:10.1016/S1471-4922(02)02296-1
16. Martínez Abad LP, Almeida CS, Mattos AMM, Mendonça ACP, Alves MJM, Pinheiro AC, et al. Diagnostic accuracy of rKLO8 versus rK26 ELISAs for screening of canine visceral leishmaniasis. Acta Trop. Elsevier B.V.; 2017;166: 133–138. doi:10.1016/j.actatropica.2016.11.021
17. Magalhães FB, Neto ALC, Nascimento MB, Wagner J, Santos T, Medeiros ZM, 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
18. 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
 19. 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. Mol Biochem Parasitol. 2008;160: 157–162. doi:10.1016/j.molbiopara.2008.04.013
 20. Dhanda SK, Vir P, Raghava GP, Elhay M, Andersen P, Andersen P, et al. Designing of interferon-gamma inducing MHC class-II binders. Biol Direct. 2013;8: 30. doi:10.1186/1745-6150-8-30
 21. Welch M, Villalobos A, Gustafsson C, Minshull J. Designing genes for successful protein expression [Internet]. 1st ed. Methods in Enzymology. Elsevier Inc.; 2011. doi:10.1016/B978-0-12-385120-8.00003-6
 22. Villalobos A, Ness JE, Gustafsson C, Minshull J. Gene Designer : a synthetic biology tool for constructing artificial DNA segments. 2006;8: 1–8. doi:10.1186/1471-2105-7-285
 23. Osvaldo P De Melo Neto, Standartl N, Sa CM De. Autoregulation of poly (A) binding in vitro protein synthesis. 1995;23: 20–23.
 24. Zaia DAM, Zaia CTB V, Lichtig J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: Vantagens e desvantagens dos métodos existentes. Quim Nova. 1998;21: 787–793. doi:10.1590/S0100-40421998000600020

25. Garcia VS, Gonzalez VDG, Caudana PC, Vega JR, Marcipar IS, Gugliotta LM. Synthesis of latex-antigen complexes from single and multiepitope recombinant proteins. Application in immunoagglutination assays for the diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. Elsevier B.V.; 2013;101: 384–391. doi:10.1016/j.colsurfb.2012.07.018
26. Dai J, Jiang M, Wang Y, Qu L, Gong R, Si J. Evaluation of a recombinant multiepitope peptide for serodiagnosis of *Toxoplasma gondii* infection. *Clin Vaccine Immunol*. 2012;19: 338–342. doi:10.1128/CVI.05553-11
27. Cheng Z, Zhao JW, Sun ZQ, Song YZ, Sun QW, Zhang XY, et al. Evaluation of a novel fusion protein antigen for rapid serodiagnosis of tuberculosis. *J Clin Lab Anal*. 2011;25: 344–349. doi:10.1002/jcla.20483
28. Camussone C, Gonzalez V, Belluzo MS, Pujato N, Ribone ME, Lagier CM, et al. Comparison of recombinant *Trypanosoma cruzi* peptide mixtures versus multiepitope chimeric proteins as sensitizing antigens for immunodiagnosis. *Clin Vaccine Immunol*. 2009;16: 899–905. doi:10.1128/CVI.00005-09
29. Tripathi NK, Shrivastva A, Pattnaik P, Parida M, Dash PK, Gupta N, et al. Production of IgM specific recombinant dengue multiepitope protein for early diagnosis of dengue infection. *Biotechnol Prog*. 2007;23: 488–493. doi:10.1021/bp0602698
30. Mendes TM, Roma EH, Costal-Oliveira F, Dhom-Lemos L de C, Toledo-Machado CM, Bruna-Romero O, et al. Epitope mapping of recombinant *Leishmania donovani* virulence factor A2 (recLdVFA2) and canine leishmaniasis diagnosis using a derived synthetic bi-epitope. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11: 1–14. doi:10.1371/journal.pntd.0005562
31. de Oliveira Mendes TA, Reis Cunha JL, de Almeida Lourdes R, Rodrigues Luiz

- GF, Lemos LD, dos Santos ARR, et al. Identification of Strain-Specific B-cell Epitopes in *Trypanosoma cruzi* Using Genome-Scale Epitope Prediction and High-Throughput Immunoscreening with Peptide Arrays. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7. doi:10.1371/journal.pntd.0002524
32. Guimarães-Peixoto RPM, Pinto PSA, Santos MR, Zilch TJ, Apolinário PF, Silva A. Development of the multi-epitope chimeric antigen rqTSA-25 from *Taenia saginata* for serological diagnosis of bovine cysticercosis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018;12: 1–14. doi:10.1371/journal.pntd.0006371
33. Maia C, Campino L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Vet Parasitol*. 2008;158: 274–287. doi:10.1016/j.vetpar.2008.07.028
34. Rosati S, Ortoffi M, Profiti M, Mannelli A, Mignone W, Bollo E, et al. Prokaryotic expression and antigenic characterization of three recombinant *Leishmania* antigens for serological diagnosis of canine leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2003;10: 1153–6. doi:10.1128/CDLI.10.6.1153
35. Boarino A, Scalone A, Gradoni L, Ferroglio E, Vitale F, Zanatta R, et al. Development of Recombinant Chimeric Antigen Expressing Immunodominant B Epitopes of *Leishmania infantum* for Serodiagnosis of Visceral Leishmaniasis. *Clin Vaccine Immunol*. 2005;12: 647–653. doi:10.1128/CDLI.12.5.647-653.2005.

Table 1. Values of sensitivity, specificity, positive and negative predictive values, of chimeric protein D2. Serum dilution 1:6000.

	Human	Dog
Sensitivity	94%	76%
Specificity	100%	100%
Positive predictive value	94%	100%
Negative predictive value	94%	61%
number of sera	50 (Positive) + (50 negative)	39 (Positive) + (15 negative)

Table 2. Values of sensitivity, specificity, positive and negative predictive values comparing the chimeric proteins.

	Human		Dog	
	Sensitivity	Specificity	Sensitivity	Specificity
Q1SX	72%	100%	99%	100%
Q2SX	76%	100%	89%	100%
Q4SX	32%	100%	71%	100%
number of sera	50 (Positive) + (50 negative)		39 (Positive) + (15 negative)	

Table 3. Test of chimeric Q5 protein against dog and human sera with Visceral Leishmaniasis.

	Human		Dog	
	Q1	Q5	Q1	Q5
Sensitivity	72%	82%	100%	99%
Specificity	100%	100%	100%	100%
Positive predictive value	98%	100%	100%	100%
Negative predictive value	87%	96%	99%	98%

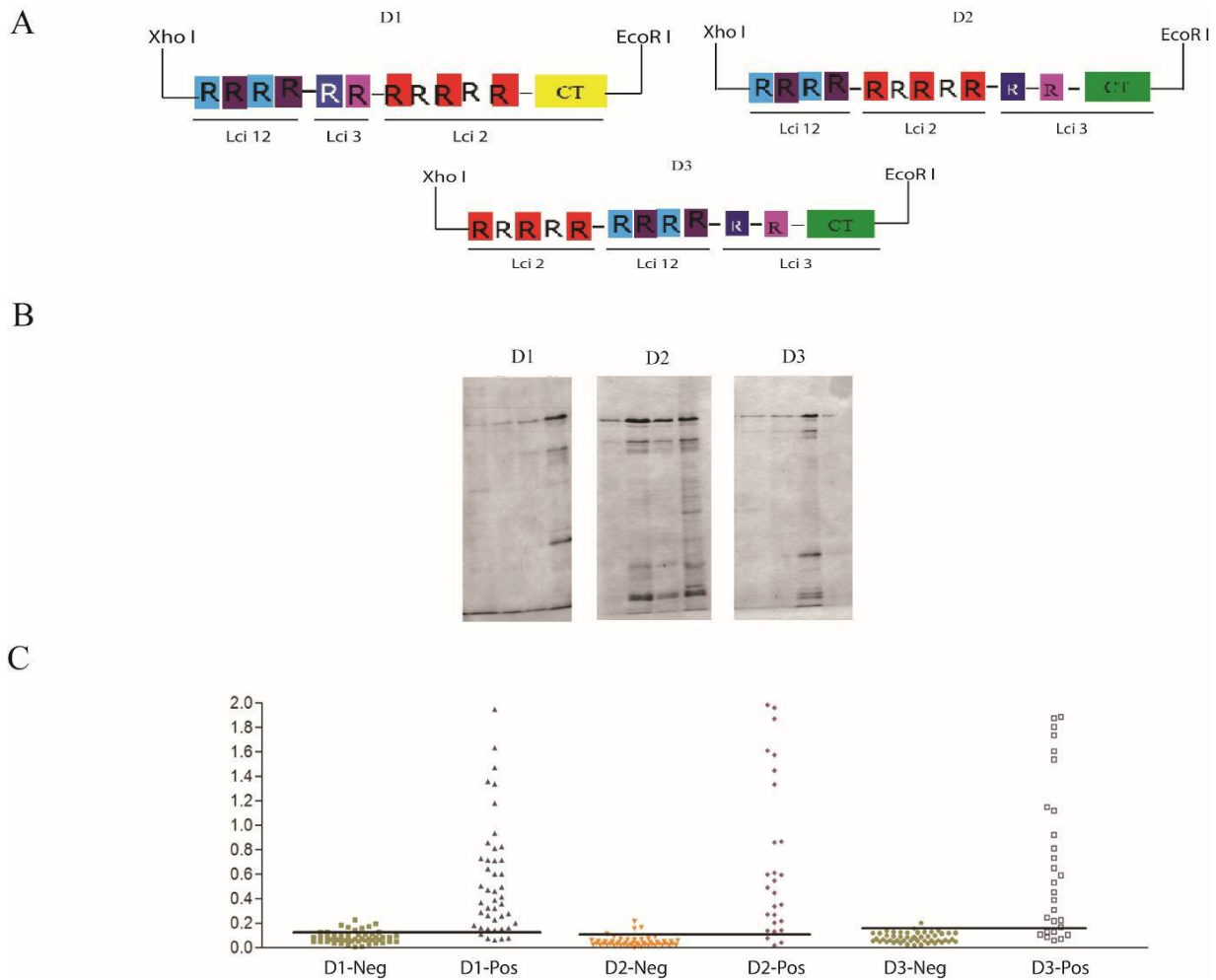
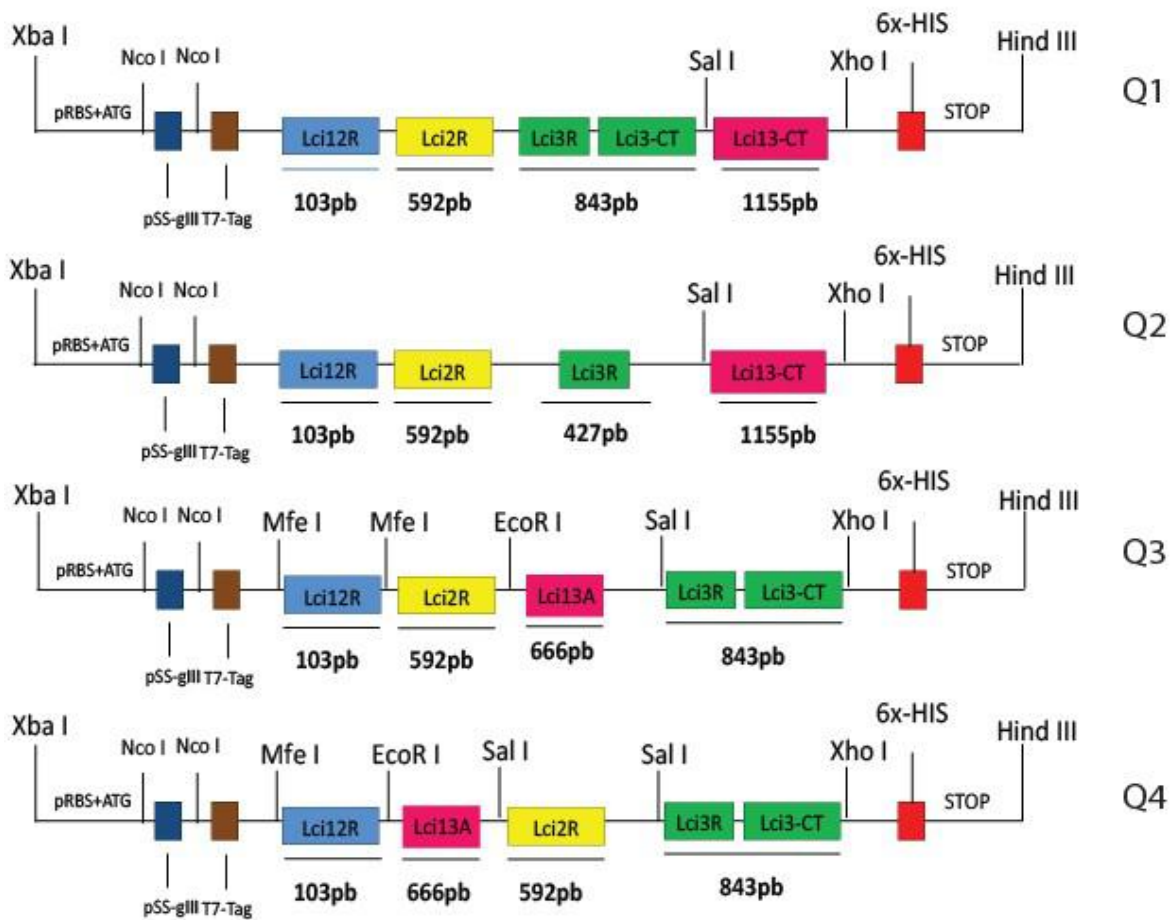


Figure 1: Preliminary assessment of a chimeric protein based on the Lci2, Lci3 and Lci12 antigens. A: The chimeric constructs previously designed by altering the order of presentation of the individual antigens and the number of repetitive regions, named D1, D2 and D3. B: The purification of the chimeric proteins in *E. coli* cells fractionated in SDS-PAGE gel. C: ELISA showing the number of sera that were detected by the chimeric proteins, where D2 obtained the best result that the ones in the dilution of 1: 6000 of the human sera.

A



B

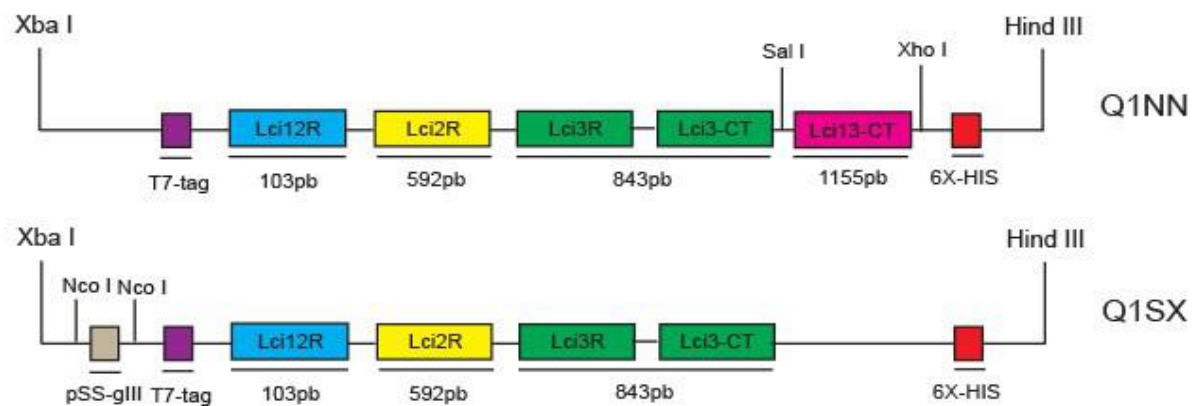


Figure 2: Construction of the chimeric genes. A: Construction of the four chimeric genes showing the regions of the selected genes and restriction sites between regions. B: Constructs made from the complete Q1 gene after removal of selected fragments through digestion with restriction enzymes and religation. Q1NN: Q1 without tag pSS-gIII after digestion with NcoI and religation; Q1SX: Q1 without Lci13-CT, after digestion with SalI/XhoI and religation.

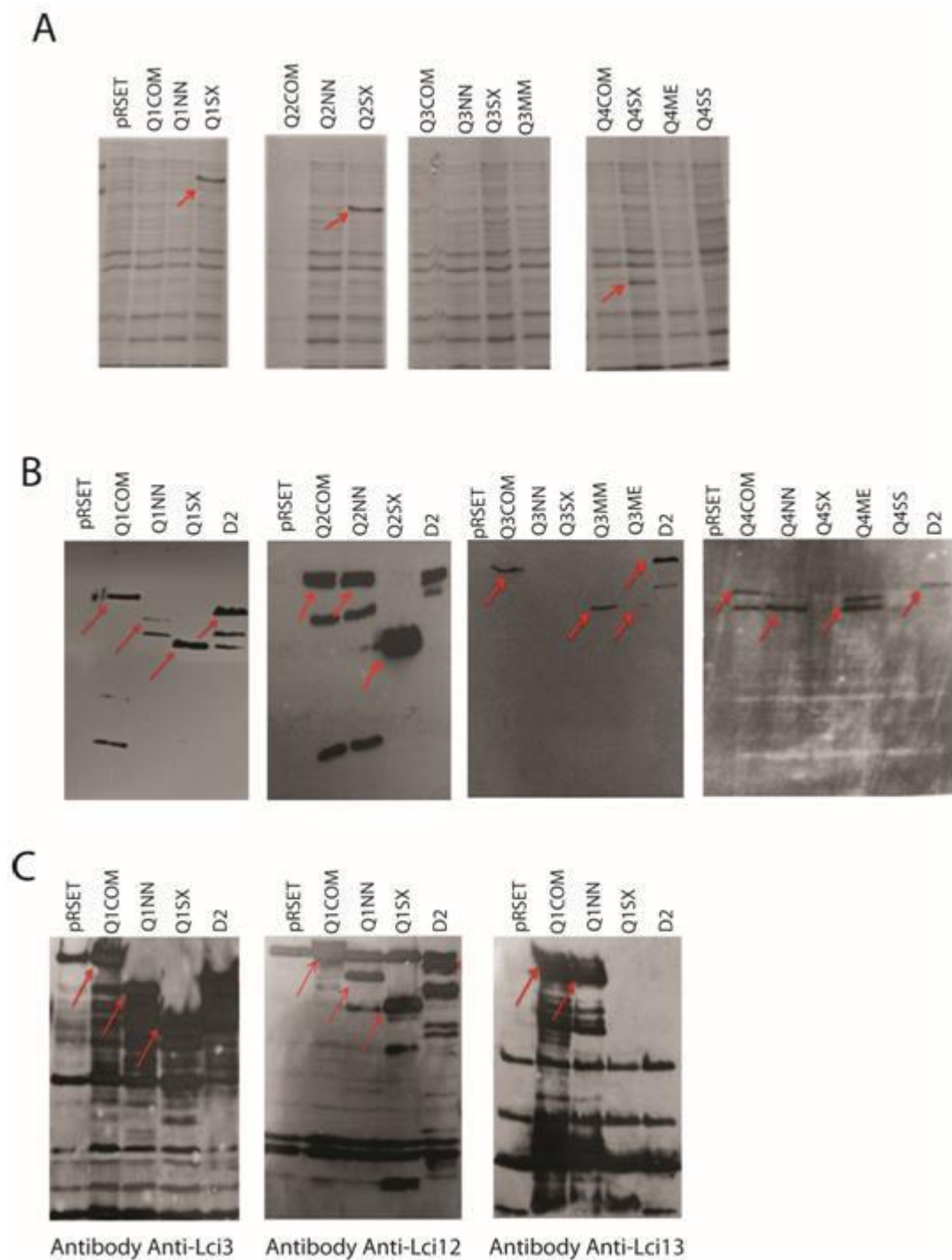


Figure 3. Evaluation of the expression of chimeric proteins in *Escherichia coli*. A: Efficient expression of chimeric Q1SX, Q2SX and Q4SX proteins in Rosetta 2 cells. B: Western blot assay showing the recognition of chimeric proteins with anti-histidine antibody. C: Western blot assay showing the recognition of chimeric proteins with antibodies specific for each individual region, showing the recognition exemplified for the Q1 construct.

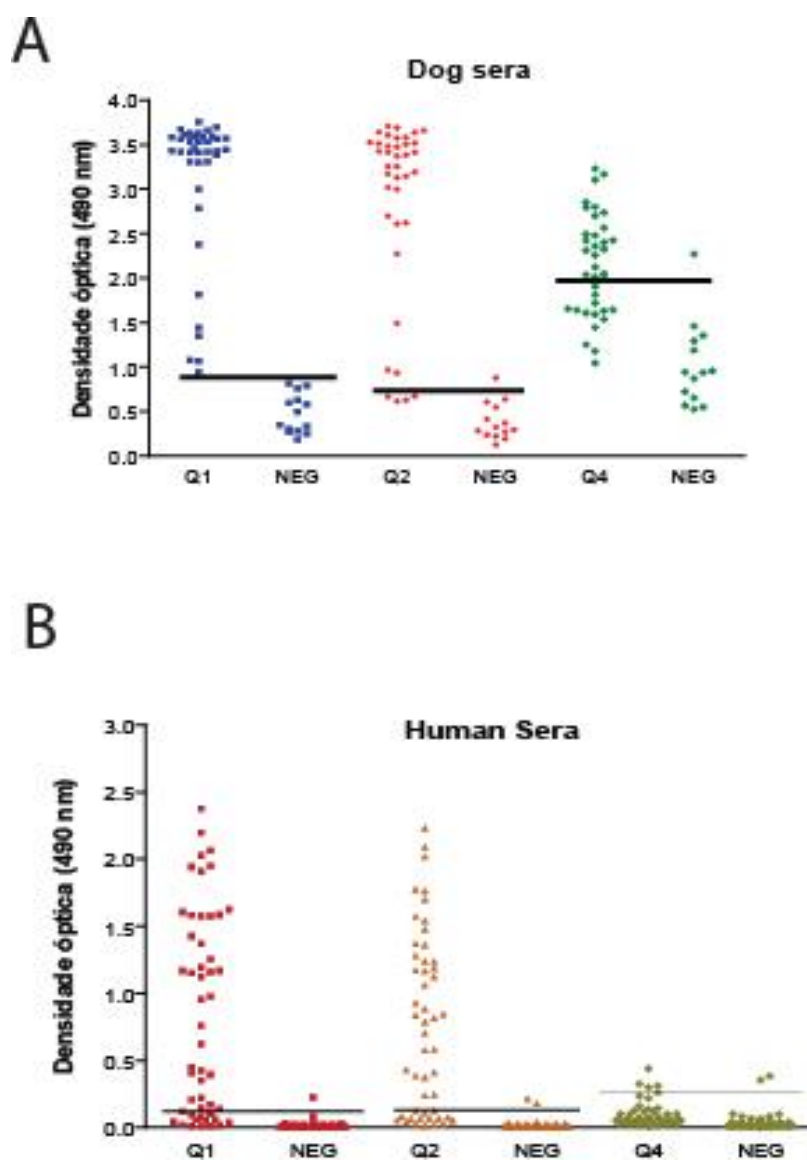
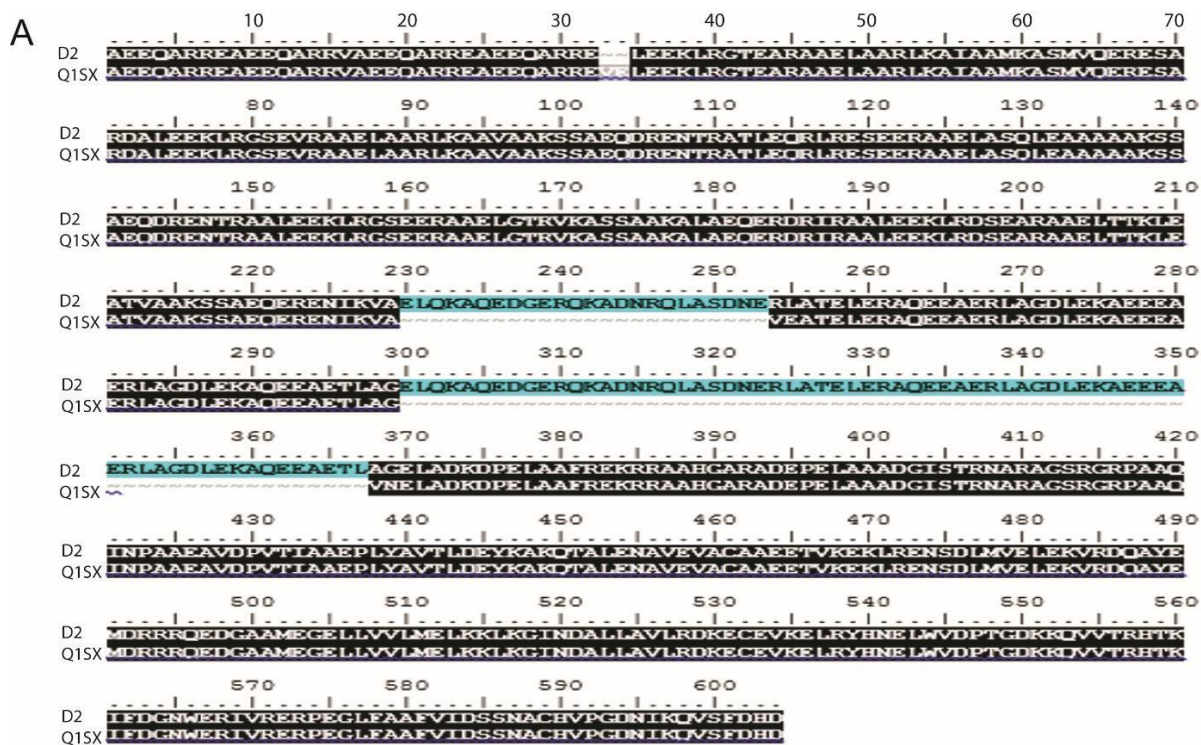
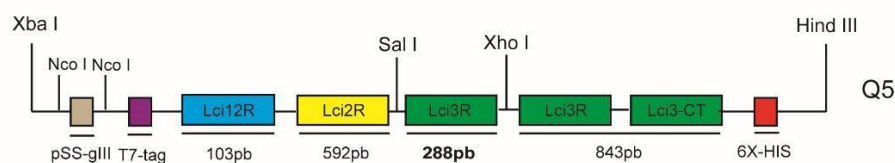


Figure 4. Serological evaluation of selected chimeric proteins. Summary of the ELISA results using the chimeric proteins against sera from dogs (A) and humans (B).



B



C

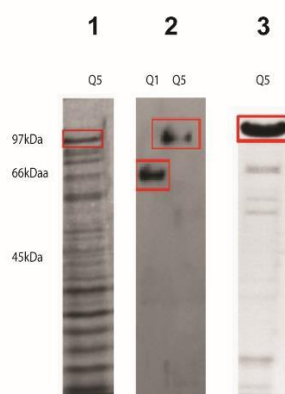


Figure 5. Comparison of the Q1 gene with the new Q5 construct. A: Showing the alignment between D2 and Q1SX chimeras where it is possible to verify the lack of a repetitive region of Lci3 in Q1SX. B: showing the difference of the insertion of a repeating region of Lci3 in the new Q5 construct and the exclusion of Lci13-CT. C: expression-1, Western blot-2 and purification-3 with the chimeric Q5.

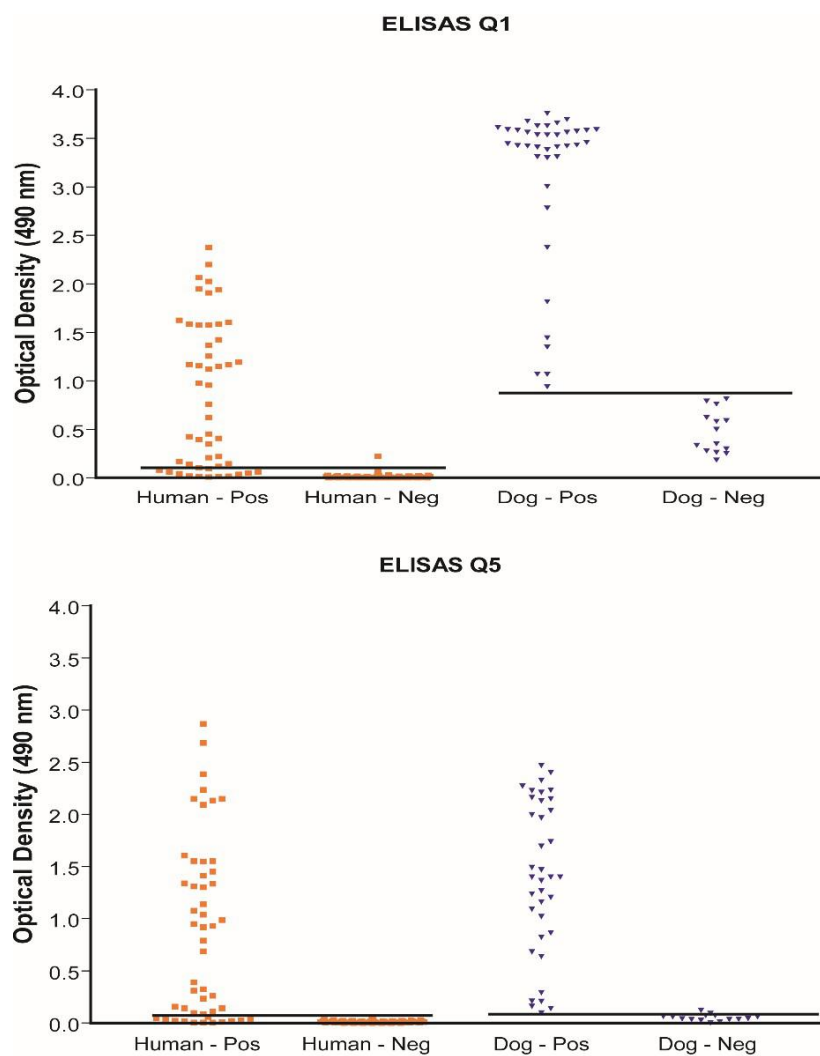


Figure 6. Indirect ELISA of the chimeric proteins. The Q1 protein presented 72% sensitivity in humans while the Q5 protein presented 81%, in the case of the dogs the sensitivity remained the same for both proteins.

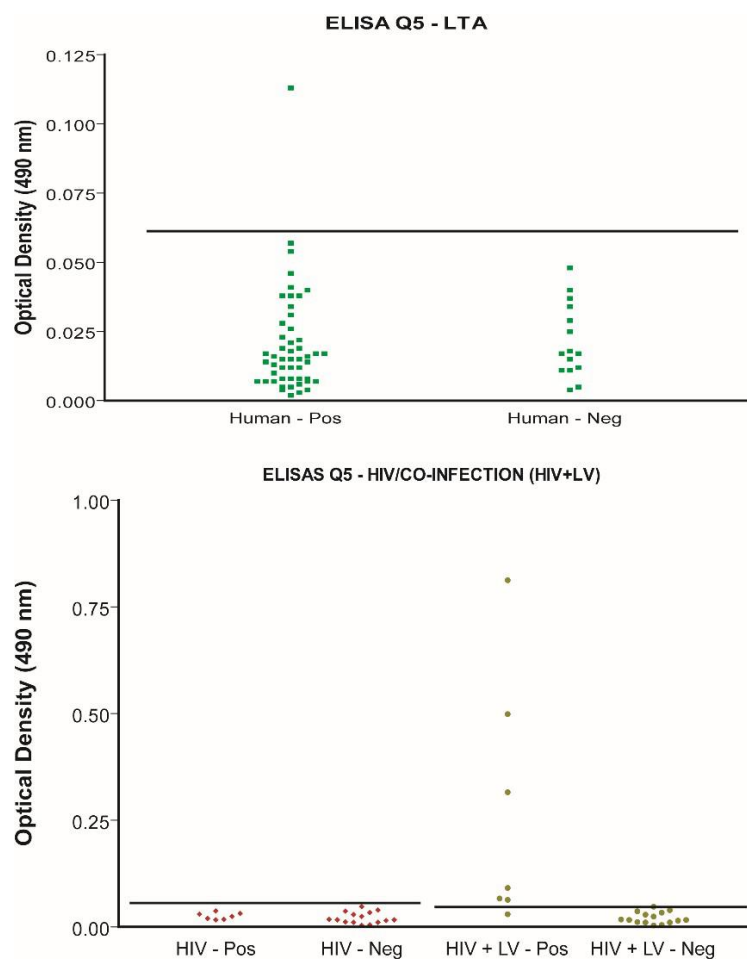
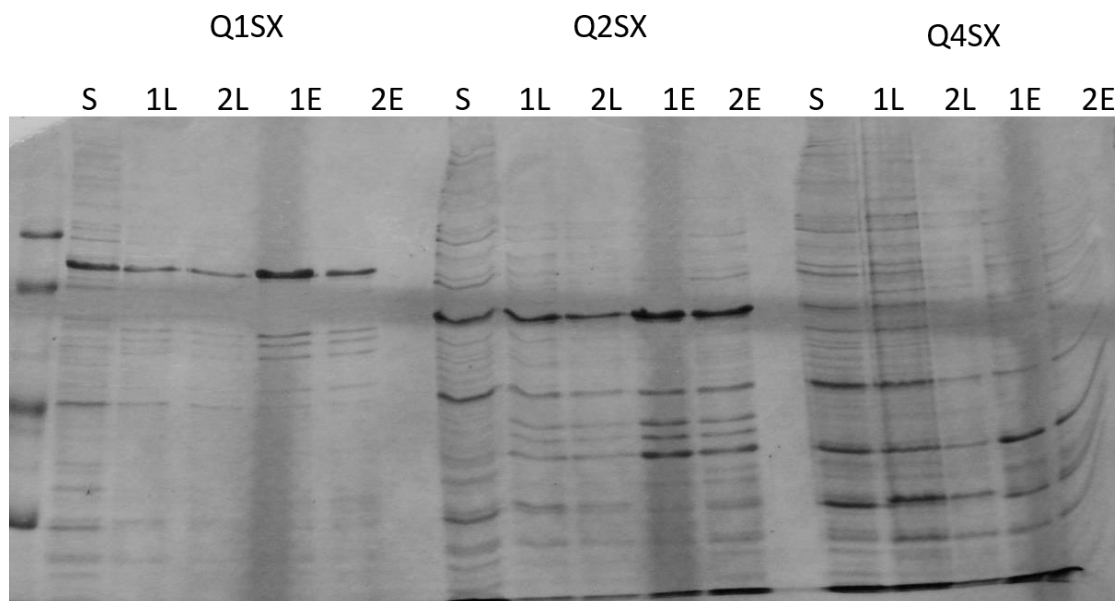


Figure 7. ELISA Q5 with other diseases. Showing the ability of Q5 to be specific for LV, where only coinfecting sera (HIV / LV) were identified.

Supplementary Table 1. Gene constructs generated and evaluated here.

Nomenclature	Restriction sites used for the final construct	Size in bp of the final gene product	Predicted molecular weight of the protein (in kDa)	Expression in <i>E. coli</i> Coomassie*
Q1	-	2845	102,65	-
Q1NN	NcoI	2734	99,26	-
Q1SX	Sall/XhoI	1690	60,46	++
Q2	-	2430	87,07	-
Q2NN	NcoI	2319	83,68	-
Q2SX	Sall/XhoI	1275	44,88	++
Q3	-	2360	84,76	+
Q3NN	NcoI	2249	81,37	-
Q3SX	Sall/XhoI	1517	53,56	-
Q3MM	MfeI	2205	80,48	-
Q3ME	MfeI/EcoRI	1719	63,21	-
Q4	-	2358	84,35	-
Q4NN	NcoI	2247	81,21	-
Q4SX	Sall/XhoI	923	32,03	++
Q4ME	MfeI/EcoRI	2202	80,18	-
Q4SS	Sall	1716	63,28	-

* Expression in Rosetta2, as seen in Coomassie Bluer stained gels.



Supplementary Figure 1. Purification of chimeric proteins. SDS-PAGE gel showing the purification of the proteins that had the best performance in expression.

4. ARTIGO II:

4.1 AVALIAÇÃO E VALIDAÇÃO DE UM NOVO TESTE RÁPIDO E ELISA VIÁVEL PARA O DIAGNÓSTICO DAS FORMAS HUMANA E CANINA DA LEISHMANIOSE VISCERAL

Artigo anexo na página seguinte (Revista: *PLOS Neglected Tropical Diseases*),

OBS: O autor desta tese e deste artigo foi responsável pela expressão e purificação da proteína quimérica Q5, envio da proteína para confecção do teste rápido, avaliação com soros de humanos e cães, comparação da Q5 no teste rápido com a K39 e o teste DPP, bem como pela análise dos dados estatísticos.

Resumo dos principais resultados: A proteína quimérica Q5, a mais eficiente nos resultados de ELISA, foi utilizada para confecção de um teste rápido (*Lateral-flow*). Esse teste foi avaliado com soros de humanos e cães de regiões do Brasil e apresentaram resultados maiores de sensibilidade e especificidade para humanos de 95% e 100% que os testes de ELISA, enquanto que os resultados com soros de cães mostraram sensibilidade (71%) e especificidade (94%) inferiores que os testes de ELISA. Os testes rápidos ainda foram comparados com os testes comerciais k39 (humanos) e DPP (cães) e a Q5 se mostrou muito eficiente no diagnóstico sorológico para LVH e LVC.

Avaliação e validação de um novo teste rápido e ELISA viável para o diagnóstico das formas humana e canina da leishmaniose visceral

Wagner José Tenório dos Santos^{1,2}, Artur Leonel de Castro Neto^{1,2}, Elis Dionísio da Silva¹, Rômulo Pessoa e Silva¹, Milena de Paiva Cavalcanti¹, Zulma Maria de Medeiros¹, Manoel Sebastião da Costa Lima Júnior¹, Edimilson Domingos da Silva⁴, Carlos Henrique Nery Costa⁵, Valéria Marçal Felix de Lima⁶, Franklin Barbalho Magalhães³, Osvaldo Pompílio de Melo Neto¹.

¹Instituto Aggeu Magalhães – Fundação Oswaldo Cruz, Recife, Pernambuco, Brasil;

²Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil;

³Centro Universitário Tabosa de Almeida, Caruaru, Pernambuco, Brasil.

⁴Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Bio-Manguinhos, Rio de Janeiro, Brasil.

⁵Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, Brasil.

⁶Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, São Paulo, Brasil.

RESUMO

Testes sorológicos com antígenos recombinantes são atualmente uma das formas mais promissora para o diagnóstico contra a Leishmaniose Visceral (LV), pois apresentam altas sensibilidade e especificidade, associados a fácil execução. Em estudos anteriores, foi possível produzir e avaliar uma proteína quimérica (Q5), quanto a sua eficiência em detectar a LV humana e Canina através de estudos em ELISA. Este estudo objetivou desenvolver e avaliar testes sorológicos com potencial para o diagnóstico da LV humana e canina. O potencial diagnóstico da proteína quimérica foi avaliado por ensaios ELISA com soro de humanos e cães, e foi realizado um teste rápido para avaliar a proteína Q5, ainda comparar a Q5 com a K39 para humanos e o DPP para os cães, utilizando o mesmo painel de soro. Os

resultados do ELISA mostraram uma sensibilidade e especificidade da Q5 (81% e 100%), enquanto os resultados do TR na Q5 mostraram uma sensibilidade e especificidade (98% e 100%) em humanos. Os resultados em cães foram os mesmos para as duas plataformas testadas (78% de sensibilidade e 100% no Elisa e 93% especificidade no TR). Quando comparados a K39, a Q5 mostrou resultados estatisticamente semelhantes a K39 com o mesmo painel de soros em humanos. Esses dados sugerem que essa proteína quimérica tem grande eficácia na detecção de humanos e cães infectados com Leishmaniose e testes rápidos em mais áreas e grupos de estudo são necessários para validação desse novo teste.

INTRODUÇÃO

O parasita *Leishmania infantum* é o agente etiológico da Leishmaniose Visceral (LV) em vários países da América Central e do Sul, na bacia do Mediterrâneo, no Oriente Médio e na Ásia, sendo os cães os principais reservatórios domésticos para infecção humana. A LV é distribuída em 98 países [1] e estudos epidemiológicos realizados em áreas endêmicas sugerem fortemente que as infecções humanas assintomáticas são comuns [2,3]. Fatores de risco para progressão para doença incluem idade, desnutrição, co-infecção por HIV e outras condições imunossupressoras [4,5]. Portanto apesar do nível muito baixo de parasitemia, pelo menos em portadores imunocompetentes assintomáticos, seu papel como hospedeiros reservatórios exige uma identificação precoce [2].

Nas últimas décadas, avanços significativos têm sido feitos para a melhoria do diagnóstico e tratamento das leishmanioses; estes desenvolvimentos deveriam ter facilitado a implementação de programas de controle nacionais e regionais sustentáveis, no entanto, a mortalidade e morbidade por leishmaniose ainda mostram uma preocupação crescente em todo o mundo [6].

O diagnóstico clínico da LV é complexo e sua confirmação pode ser conduzida por meio de testes parasitológicos, sorológicos ou moleculares [7]. As técnicas parasitológicas são consideradas padrão de referência, mas, em áreas endêmicas,

testes sorológicos são usados como uma ferramenta em levantamentos epidemiológicos para facilitar o diagnóstico e um controle preciso da doença [8].

Embora vários antígenos tenham sido identificados com potencial uso no diagnóstico sorológico da LV, os melhores resultados em humanos foram obtidos com o antígeno rK39, que demonstrou ser um marcador precoce da progressão da doença em LV com sensibilidade e especificidade de 100% e 96%, respectivamente [9]. No caso dos cães alguns antígenos estão sendo utilizados para sua pesquisa, como o antígeno recombinante rK28 (uma quimera combinando os antígenos K9, K26 e K39) no dispositivo chamado de DPP (*Dual-Path Platform*). Neste caso, contudo, apesar da facilidade de aplicação, ainda existe discussão sobre sua precisão, especialmente quanto à sensibilidade para detecção de infecção assintomática nos cães [10].

Neste contexto baseado em estudos com proteínas recombinantes e sua eficácia já descrito em outros trabalhos [11,12], foi possível produzir e avaliar a eficácia de uma proteína quimérica (Q5) como antígeno alvo para o diagnóstico tanto da LV humana como da canina (Manuscrito em preparação). Nesses estudos a proteína apresentou resultados de sensibilidade altos, de 82% e 100% respectivamente, frente a um número limitados de soros humanos e de cães, por meio de testes de ELISA.

No presente estudo a proteína Q5 foi avaliada como componente de um teste rápido (TR) do tipo *lateral flow*, agora utilizando um quantitativo maior de soros de diferentes regiões do Brasil. Além disso, comparamos duas plataformas de testes utilizando a Q5 (ELISA e TR) com os testes de diagnósticos utilizados comercialmente para cão (DPP) e humano (rK39).

MATERIAIS E MÉTODOS

Seleção e coleta de soros humanos com LV em Pernambuco

Os soros dos pacientes de Pernambuco foram cedidos pela Dra. Zulma Maria de Medeiros, onde foram selecionados um total de 80 soros de pacientes com LV.

Esta coleta foi aprovada pelo comitê de Ética em pesquisa de Pernambuco IAM/Fiocruz (CAEE 0121.0.095.00-08).

Seleção e coleta de soros humanos em Mato Grosso do Sul

Os soros do Mato Grosso do Sul foram cedidos pela Dra. Herintha Coeto Neitzke-Abreu e são procedentes de pacientes com LV diagnosticados pela Universidade Federal de Grande Dourados, em Dourados – MS, com um total de 57 soros. Os procedimentos realizados para a produção da referida sorotéca foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal da Grande Dourados (CAEE: 55556916.2.0000.5160).

Seleção e coleta de soros humanos em Piauí

Os soros do Piauí foram cedidos pelo Dr. Carlos Henrique Nery Costa e são procedentes de pacientes com LV tratados no Instituto de Doenças Tropicais Natan Portella, em Teresina, com o total 50 soros. Os procedimentos realizados para a produção da referida sorotéca foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Piauí (Processo no. 0116/2005).

Seleção e coleta de soros humanos sem LV

O grupo controle foi indicado quando o paciente obteve os exames realizados com resultados negativos, tendo a mesma procedência dos casos, ou seja, pacientes hospitalizados com suspeita clínica e epidemiológica de LV. Para o presente estudo, foram utilizados alíquotas de 100 soros derivados de pacientes de áreas endêmicas e não-endêmicas para LV.

Soros de cães com LV

Os soros dos animais utilizados neste estudo foram coletados sobre responsabilidade dos colaboradores que são provenientes de Pernambuco, Mato Grosso do Sul, Bahia e São Paulo (CEUA, Processos números: N°27/2016; N°16/2014; N°40/2005). Foram cedidos 100 soros de cada região.

Ensaio imunoenzimático indireto (ELISA-K39; ELISA-Q5) e teste rápido DPP®

Para realização dos ensaios de ELISA, o antígeno recombinante comercial K39 foi quantificado (1 µg/µl), diluído em tampão carbonato-bicarbonato para uma concentração de 600 ng num volume final de 100 µl por poço, após isso foi realizada a sensibilização das placas permanecendo por 16 horas a 4°C em câmara úmida. A metodologia aplicada aos ensaios de ELISA-k39 (utilizando uma diluição de soro humano 1:900) e ELISA-Q5 (utilizando uma diluição de soro humano 1:2500 e para cão de 1:900) foi de acordo com o já descrito no manuscrito (Santos et al., 2019). O teste DPP foi utilizado como descrito em seu protocolo de uso do fabricante, onde pode-se utilizar 5 µl de soro ou 10 µl de sangue [10].

Confecção e avaliação dos protótipos de testes rápidos

De posse da proteína quimérica purificada (Q5), a mesma foi enviada para o Laboratório de Biomanguinhos – Fiocruz – RJ, onde foram feitos testes de avaliação dessa proteína para uso em teste rápido do tipo *lateral flow*. Foram feitos testes de padronização de proteína e estabilidade da reação, por fim a confecção dos testes e checagem da acurácia dos testes produzidos para serem enviados para o controle de qualidade que libera ou não para uso. Depois de produzido, o teste foi encaminhado para a FIOCRUZ-PE, onde foram realizados os testes de eficiência do mesmo. Os mesmos grupos de soros que foram utilizados nos ensaios de avaliação

do ELISA *in house* foram utilizados para a validação dos testes produzidos no formato comercial.

RESULTADOS

Teste rápido Q5

Após os bons resultados obtidos nos testes de ELISA (Santos et al, 2019) e da colaboração com Bio-Manguinhos, foram produzidos 100 protótipos do teste rápido com a proteína Q5. Eles foram testados com soros positivos de cão (n=40) e humano (n=40) com LV (confirmados com exame parasitológico) e soros de cães (n=10) e humanos saudáveis (n=10) (controle negativo). Os testes rápidos mostrados na figura 1, apontam a reatividade do teste considerado positivo (marcando as duas fitas no teste) tanto para humanos quanto para os cães testados, como também apontam a reatividade dos testes considerados negativos (marcando somente a fita controle do teste). A tabela 1 mostra a que estes ensaios preliminares com o teste rápido proposto têm sensibilidade (96% e 100%) e especificidade de (100% e 92%) para humanos e cães.

Validação da Q5 frente aos soros de humanos e cães

Com a formação de uma soroteca maior e a confecção de 300 novos testes rápidos realizou-se um estudo com uma quantidade de soros maior que os testes preliminares, todos os soros que foram utilizados nesse estudo de validação da Q5 possuem testes sorológicos, parasitológicos e moleculares para confirmar a LV humana e canina de várias regiões do país. A Q5 foi avaliada em duas plataformas de teste sorológico, o ELISA e o Teste rápido (TR), com a finalidade de comparar qual a melhor plataforma de diagnosticar as formas humanas e caninas de LV. Estes resultados podem ser identificados na figura 2A e tabela 2 que mostra os resultados

de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo juntamente com a quantidade de soros que foram testadas nos ensaios.

Como resultados, podemos observar uma sensibilidade maior da Q5 no TR (98%) comparado com a sensibilidade da Q5 no ELISA (81%) nos soros de humanos, já a especificidade se manteve estável em ambas plataformas testadas (100%) em relação a indivíduos sadios. Com relação aos soros de cães podemos observar uma sensibilidade igual para os dois testes (78%), mas uma especificidade de 73% para o TR e no ELISA (98%). Foram também testados soros de pacientes e cães que tiveram resultados somente de parasitológicos positivos para LV, onde foi observado que os soros de cães no ELISA também aumentaram sensibilidade (90%), já os outros valores não tiveram aumentos significativos (Figura 2B), na tabela 3 pode-se ver os resultados de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e a quantidade de soros com parasitológico confirmados.

Comparação da proteína Q5 com a K39 frente a soros humanos

Em humanos o TR – K39 (IT LEISH® BIO-RAD Laboratories Inc., France) e ELISA – K39 (Rekom Biotech S.L) são utilizados como método de diagnostico pelo Ministério da saúde, e tem apresentado sensibilidade eficiente frente a soros de humanos. A proteína Q5 avaliada nesse estudo apresentou resultados de sensibilidade altos em soros de humanos, principalmente com parasitológico positivo (99% para TR e 80% para ELISA). Diante disto, foi realizada uma comparação entre os antígenos K39 e a Q5 nas duas plataformas de diagnostico (TR e ELISA) frente a soros de humanos. Como se pode observar na figura 3 com soros de humanos, os resultados mostraram uma sensibilidade de 98% e especificidade de 100% para a TR - Q5, enquanto a K39 apresentou 94% de sensibilidade e 99% de especificidade, já nos resultados do ELISA - Q5 uma sensibilidade de 81% e especificidade de 100%, enquanto a k39 mostrou 87% de sensibilidade e 99% de especificidade. A tabela 4 mostra a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo, como também a quantidade de soros analisados para comparar os dois antígenos.

Comparação da proteína Q5 com o teste DPP frente a soros cães

Atualmente a plataforma de diagnóstico sorológico para LVC é o DPP, porém ele consiste em material importado e de grande custo, apesar da sua alta sensibilidade. A proteína Q5 apresentou resultados considerados satisfatórios em testes de ELISA e no TR (90% e 79% respectivamente) e seria outra alternativa para o diagnóstico sorológico da LVC. Os resultados comparando as plataformas de ELISA-Q5, TR-Q5 e DPP mostraram uma sensibilidade alta para o DPP (97%) e uma sensibilidade igual nas duas plataformas utilizando o antígeno Q5 (78%). A especificidade dos soros também foi melhor no teste DPP (100%) quando comparados ao ELISA-Q5 e TR-Q5, que apresentaram 98% e 73% respectivamente. Esses dados de comparação podem ser visualizados na figura 4. A sensibilidade e especificidade pode ter diminuído com a inserção dos soros de cães de Pernambuco que eram soros não confirmados pelo teste parasitológico (confirmados pelos testes de DPP e Elisa). Na tabela 5, novamente podemos observar a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo, como também a quantidade de soros analisados para comparar os dois antígenos.

DISCUSSÃO

Tanto o ELISA quanto o teste rápido (TR) para diagnóstico contra as formas de LV, são bem estabelecidos e utilizados como forma precoce de identificar a doença. Desta forma estudos tem buscado cada vez mais melhorar a sensibilidade e especificidade dos testes para cães e humanos acometidos com a doença, através de antígenos recombinantes [13]. Em um estudo de comparação de antígenos recombinantes para diagnóstico da LV humana, constatou-se que o antígeno k39 (desenvolvido da espécie *L. donovani*) pode não detectar outras espécies causadoras de LV humana, isso poderia ajudar a entender a variedade grande nos resultados de sensibilidade em outras regiões [14].

Em um estudo avaliando a sensibilidade do teste com o TR - K39, mostrou uma variação entre 67% a 100% utilizando soro de pacientes de vários países. A mais alta sensibilidade (100%) ocorreu em pacientes da Índia e Nepal. Pacientes da Venezuela tiveram menor porcentagem de resultados verdadeiros positivos (88%), e o teste com o rk39 foi menos sensível em pacientes do Sudão e outras áreas [15].

No Brasil a sensibilidade do TR - K39 e ELISA foram 90% e 89% respectivamente, enquanto a especificidade em pacientes sadios foi 100% e 98% respectivamente [16]. Nossos dados mostram que a proteína quimérica Q5 tem potencial para ser uma nova forma de diagnóstico sorológico para a LV (Manuscrito em andamento), onde comparamos a K39 em TR e ELISA com a Q5 também em TR e ELISA utilizando o mesmo painel de soros de pacientes com LV confirmados. A sensibilidade e especificidade do teste rápido foi de 98% e 100% (Q5) e 94% e 99% (k39) enquanto no ELISA foi de 81% e 100% (Q5) e 87% e 99% (k39). Contudo, a Q5 consegue ser mais sensível e específica que a k39 na plataforma de TR.

Atualmente o teste DPP que é o teste produzido com proteína quimérica também, utilizado para diagnosticar a Leishmaniose Visceral canina, tem apresentado resultados de sensibilidade de 98% em soros do Brasil [18], enquanto que outro estudo mostrou uma sensibilidade e especificidade de 89% e 70% respectivamente e ainda mostrou que o DPP diminui a sensibilidade quando os cães são assintomáticos (75%) [19].

Em estudos recentes avaliando o DPP como teste diagnóstico para LVC mostrou-se que ele é eficiente na detecção de cães sintomáticos, sendo uma das melhores formas de diagnóstico, porém em regiões não endêmicas (onde a grande maioria dos animais são assintomáticos) ele não tem uma eficácia de diagnóstico para LVC, sendo necessário outros testes combinados de suporte com ele para confirmar a doença [20].

Nossos dados indicam que a proteína quimera Q5 construída através de epítopos tem uma ótima eficácia para diagnóstico da Leishmaniose Visceral Humana e Canina no mesmo teste, isso levaria a um menor custo de produção e padronização deste teste no Brasil. Porém resultados utilizando grupos de estudos e em outras regiões (endêmicas e não endêmicas) estão sendo feitos para uma

avaliação ampla da eficácia do teste diagnóstico para as formas humana e canina da Leishmaniose Visceral.

REFERÊNCIAS

1. Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. PLoS One. 2012;7. doi:10.1371/journal.pone.0035671
2. Michel G, Pomares C, Ferrua B, Marty P. Importance of worldwide asymptomatic carriers of *Leishmania infantum* (*L. chagasi*) in human. Acta Trop. 2011;119: 69–75. doi:10.1016/j.actatropica.2011.05.012
3. Costa CH, Stewart JM, Gomes RB, Garcez LM, Ramos PK, Bozza M, Satoskar A, Dissanayake S, Santos RS, Silva MR, Shaw JJ, David JR MJ. Asymptomatic human carriers of *Leishmania chagasi*. Am J Trop Med Hyg. 2002;66: 334–7. doi:10.4269/ajtmh.2002.66.334
4. Gradoni L GM. Leishmaniosis. In: OIE manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (mammals, birds and bees). [Internet]. 7th ed. Paris: Office International des Epizooties. 2014. Available: <http://www.oie.int/en/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>
5. Lindoso JA, Cota GF, da Cruz AM, Goto H, Maia-Elkhoury ANS, Romero GAS, et al. Visceral Leishmaniasis and HIV Coinfection in Latin America. PLoS Negl Trop Dis. 2014;8. doi:10.1371/journal.pntd.0003136
6. Burza S, Croft SL, Boelaert M. Seminar Leishmaniasis. 2018;6736: 1–20. doi:10.1016/S0140-6736(18)31204-2
7. Solano-Gallego L, Cardoso L, Pennisi MG, Petersen C, Bourdeau P, Oliva G, et al. Diagnostic Challenges in the Era of Canine *Leishmania infantum* Vaccines. Trends Parasitol. Elsevier Ltd; 2017;xx: 1–12. doi:10.1016/j.pt.2017.06.004
8. Brasil M da S. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral [Internet]. Secretaria de Vigilância em Saúde. 2014. Available:

http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_viscerai_1edicao.pdf

9. Fabrizio Bruschi, Gradoni L. The Leishmaniasis: Old Neglected Tropical Diseases. The Leishmaniasis : Old Neglected Tropical Diseases. 2018. doi:<https://doi.org/10.1007/978-3-319-72386-0>
10. Grimaldi G, Teva A, Ferreira AL, dos Santos CB, Pinto I de S, de-Azevedo CT, et al. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP ® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. Trans R Soc Trop Med Hyg. Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene; 2012;106: 54–59. doi:10.1016/j.trstmh.2011.10.001
11. Oliveira GG, Magalhaes FB, Teixeira MC, Pereira AM, Pinheiro CG, Santos LR, et al. Characterization of novel Leishmania infantum recombinant proteins encoded by genes from five families with distinct capacities for serodiagnosis of canine and human visceral leishmaniasis. AmJTropMedHyg. Centro de Pesquisas Goncalo Moniz, Fundacao Oswaldo Cruz, Salvador, Bahia, Brazil. ggileno@bahia.fiocruz.br; 2011;85: 1025–1034.
12. Magalhães FB, Neto ALC, Nascimento MB, Wagner J, Santos T, Medeiros ZM, 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
13. Coelho EAF, Costa LE, Lage DP, Martins VT, Garde E, de Jesus Pereira NC, et al. Evaluation of two recombinant Leishmania proteins identified by an immunoproteomic approach as tools for the serodiagnosis of canine visceral and human tegumentary leishmaniasis. Vet Parasitol. 2016;215: 63–71. doi:10.1016/j.vetpar.2015.11.006
14. Suradej Siripattanapiponga, Hirotomo Katob, Peerapan Tan-ariyaa MM& SL. Comparison of Recombinant Proteins of Kinesin 39, Heat Shock Protein 70, Heat Shock Protein 83, and Glycoprotein 63 for Antibody Detection of Leishmania martiniquensis Infection. J Eukaryot Microbiol. 2017;92: 820–828. doi:10.1111/jeu.12415
15. Srivastava P, Dayama A, Mehrotra S, Sundar S. Diagnosis of visceral

leishmaniasis [Internet]. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene; 2011. pp. 1–6. doi:10.1016/j.trstmh.2010.09.006

16. Lemos EM, Carvalho SFG, Corey R, Dietze R. Avaliação do teste rápido utilizando o antígeno recombinante k39 no diagnóstico da leishmaniose visceral no Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2003;36 Suppl 2: 36–38. doi:10.1590/S0037-86822003000700011
17. Travi BL, Cordeiro-da-Silva A, Dantas-Torres F, Miró G. Canine visceral leishmaniasis: Diagnosis and management of the reservoir living among us. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018;12: 1–13. doi:10.1371/journal.pntd.0006082
18. Lima JT, Gennari SM, Soares HS, Minervino AH, Malheiros AF, Marques FS, Laurenti MD, Machado RZ, Marcili A, Labruna MB SR. Serodiagnosis of visceral and cutaneous leishmaniasis in human and canine populations living in Indigenous Reserves in the Brazilian Amazon Region. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2017;32: 100–103. doi:10.1590/0037-8682-0377-2016
19. Figueiredo FB, Vasconcelos TCB de, Madeira M de F, Menezes RC, Maia-Elkhoury ANS, Marcelino AP, et al. 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. doi:10.1590/0074-02760180260
20. De Carvalho FLN, Riboldi, E. O., Bello GL, Ramos RR, Barcellos RB, Gehlen M, Halon ML, et al. Canine visceral leishmaniasis diagnosis: A comparative performance of serological and molecular tests in symptomatic and asymptomatic dogs. *Epidemiol Infect*. 2018;146: 571–576. doi:10.1017/S0950268818000225.

Tabela 1. Teste da proteína quimérica Q5 frente a soros de cão e humano com Leishmaniose Visceral.

Tipo de Soro	Sensibilidade (95% I.C.)	Especificidade do sorosadio (95% I.C.)	Quantidade de soros positivos
Humanos LV	96 %	100 %	38
Cães LV	100 %	92 %	40

Tabela 2. Avaliação de ensaios teste rápido e imunoenzimáticos para o diagnóstico de Leishmaniose Visceral em humanos e cães.

	Humano		Cão	
	TR - Q5	ELISA - Q5	TR - Q5	ELISA - Q5
Sensibilidade	98%	81%	78%	78%
Especificidade	100%	100%	73%	98%
Valor Preditivo Positivo	100%	100%	91%	99%
Valor Preditivo Negativo	97%	74%	49%	58%
Quantidade Amostras	94 (Teste) e 70 (Controle)	128 (Teste) e 70 (Controle)	108 (Teste) e 30 (Controle)	150 (Teste) e 46 (Controle)

Tabela 3. Avaliação de ensaios teste rápido e imunoenzimáticos para o diagnóstico de Leishmaniose Visceral em humanos e cães com soros confirmados por testes parasitológicos.

	Humano		Cão	
	TR - Q5	ELISA - Q5	TR - Q5	ELISA - Q5
Sensibilidade	99%	80%	79%	90%
Especificidade	100%	100%	84%	98%
Valor Preditivo Positivo	100%	100%	89%	99%
Valor Preditivo Negativo	99%	78%	72%	80%
Quantidade Amostras	88 (Teste) e 70 (Controle)	97 (Teste) e 70 (Controle)	71 (Teste) e 30 (Controle)	115 (Teste) e 46 (Controle)

Tabela 4. Desempenho dos antígenos k39 e Q5 nas plataformas de TR e ELISA com soros humanos com LV.

	TR - Q5	ELISA - Q5	TR - K39	ELISA - k39
Sensibilidade	98%	81%	94%	87%
Especificidade	100%	100%	99%	99%
Valor Preditivo Positivo	100%	100%	98%	99%
Valor Preditivo Negativo	97%	74%	95%	87%
Quantidade Amostras	68 (Teste) e 70 (Controle)	68 (Teste) e 70 (Controle)	68 (Teste) e 70 (Controle)	68 (Teste) e 70 (Controle)

Tabela 5. Desempenho das plataformas TR – Q5, ELISA – Q5 e DPP com soros cães com LV.

	TR - Q5	ELISA - Q5	DPP
Sensibilidade	78%	78%	97%
Especificidade	73%	98%	100%
Valor Preditivo Positivo	91%	99%	100%
Valor Preditivo Negativo	49%	58%	91%
Quantidade Amostras	102 (Teste) e 30 (Controle)	102 (Teste) e 30 (Controle)	102 (Teste) e 30 (Controle)

Testes preliminares do teste rápido (dipstick)

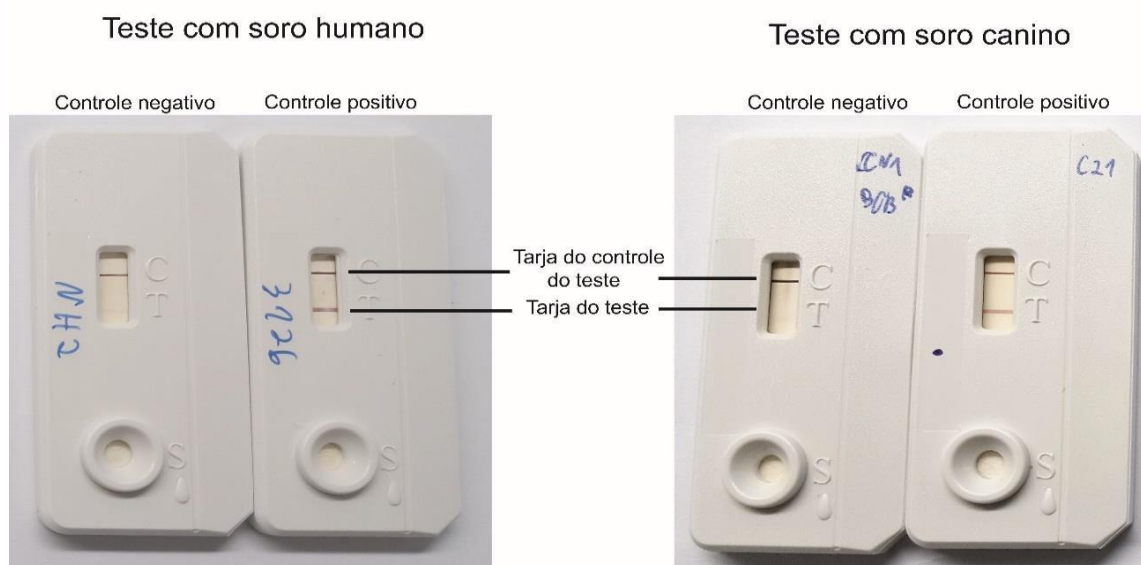


Figura 1. Figura representativa de dois protótipos do teste rápido para leishmaniose visceral canina e humana com a proteína quimérica Q5. A – Teste com soros humanos sadios (controle negativo) e soros positivos para leishmaniose visceral com exame parasitológico positivo (controle positivo). B - Teste com soro canino sadio (controle negativo) e com Leishmaniose canina (controle positivo).

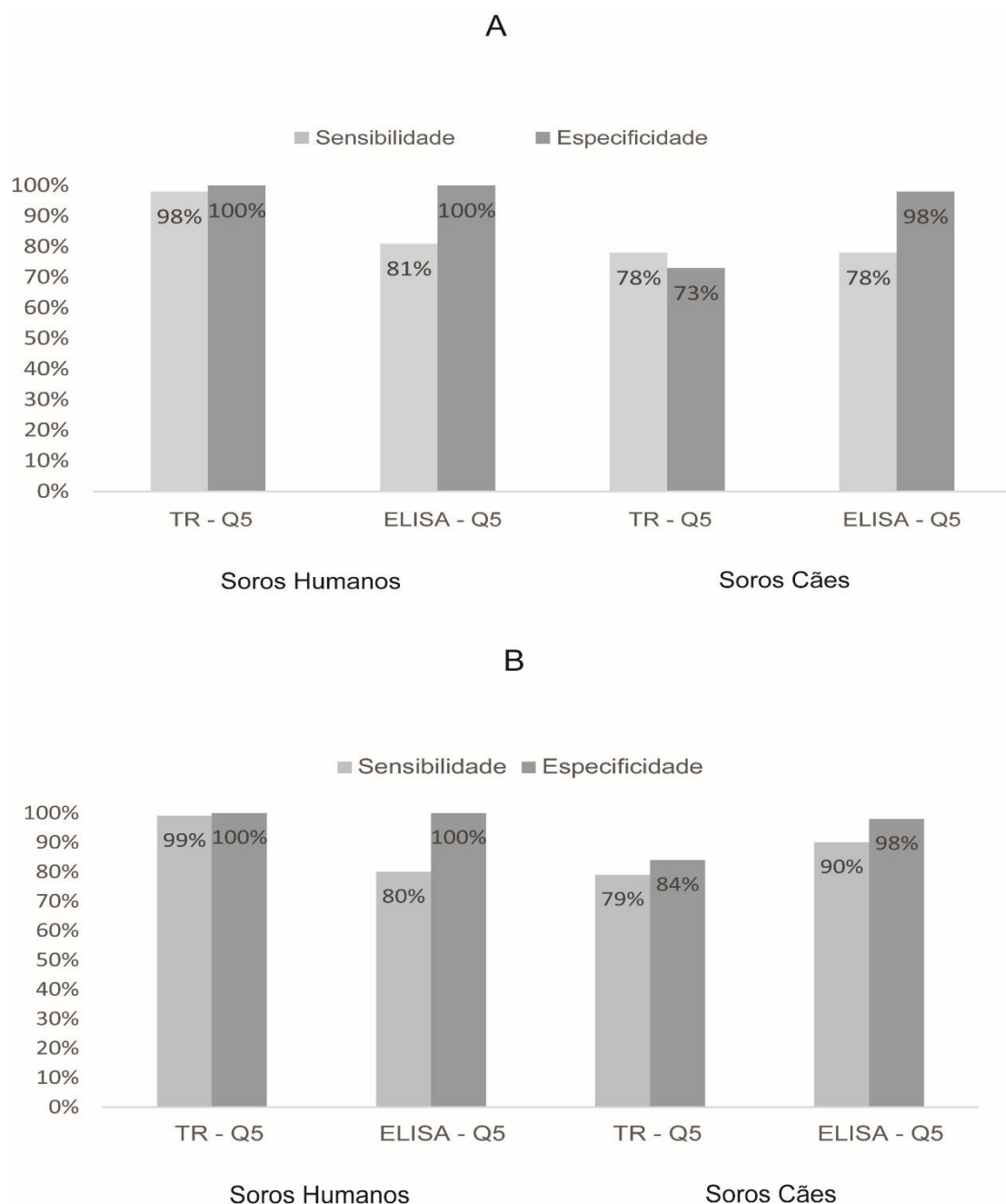


Figura 2. Avaliação da Q5 frente aos soros de humanos e cães com LV. A) mostrando uma maior sensibilidade frente aos soros de humanos no TR e uma especificidade igual, no caso dos soros dos cães temos uma sensibilidade igual e uma especificidade maior no ELISA. B) mostrando um aumento da sensibilidade dos TR em humanos e cães com parasitológico positivo e um aumento do ELISA nos soros de cães. TR=Teste Rápido.

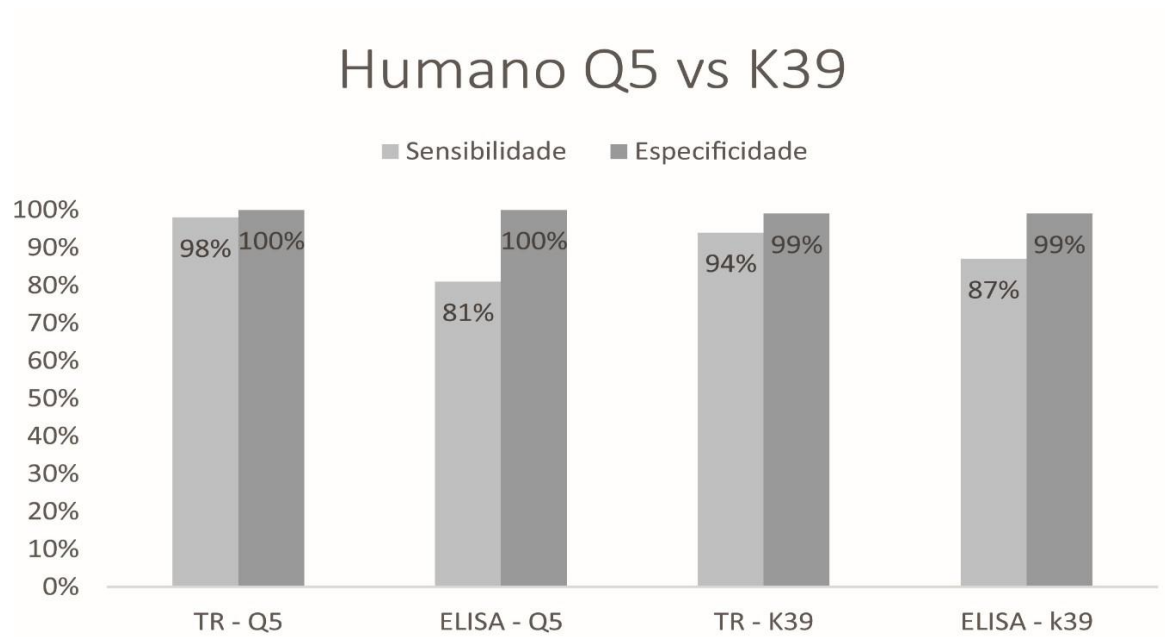


Figura 3. Comparação das proteínas Q5 e k39 frente a soros de humanos. O gráfico em barras mostra uma sensibilidade e especificidade melhor no TR da Q5 comparado a k39, enquanto no ELISA mostra uma sensibilidade da k39 maior que a Q5

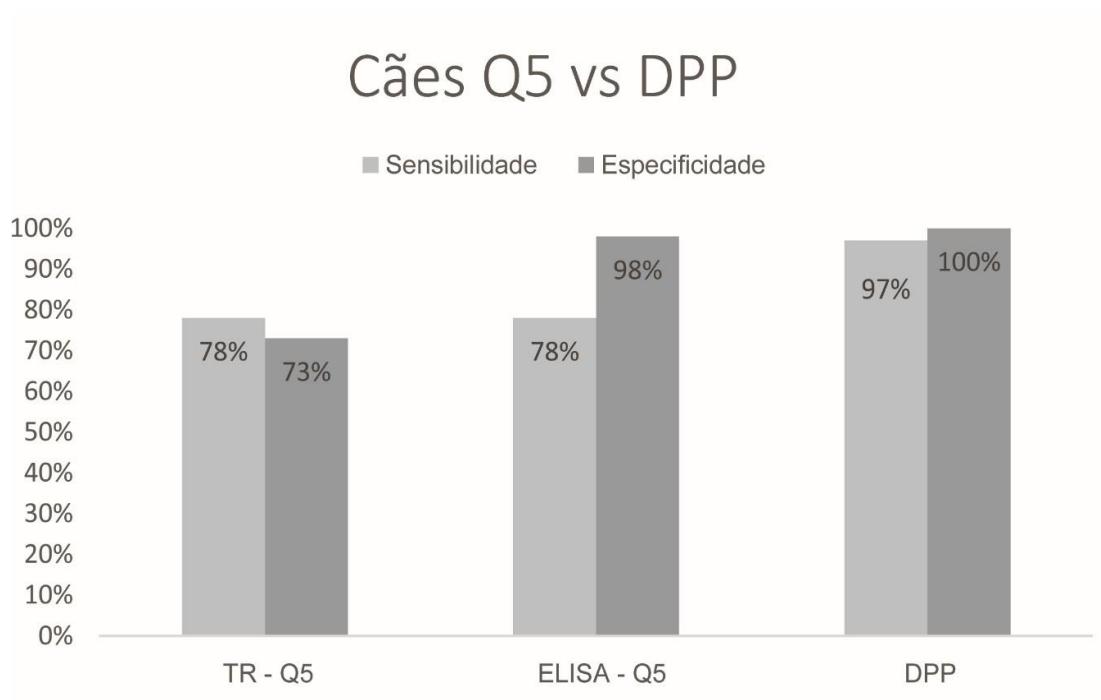


Figura 4. Comparação dos testes TR-Q5, ELISA-Q5 e DPP. O gráfico em barras mostra uma sensibilidade e especificidade melhor no DPP comparado aos outros testes com a Q5

5. Artigo III:

5.1 AVALIAÇÃO E PREDIÇÃO *IN SILICO* DE PEPTÍDEOS PARA CÉLULAS CD4 E CD8 ATRAVÉS DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE *LEISHMANIA INFANTUM* COMO PROPOSTA VACINAL

Artigo anexo na página seguinte (Revista: *Trends in Parasitology*),

OBS: O autor desta tese e deste artigo foi responsável pela predição de epítomos promissores, análise dos melhores peptídeos que estimulam Th1 e Th2 como epítomos que estimulem CD4 e CD8 e desenho do gene quimérico Q6 contendo os melhores peptídeos.

Resumo dos principais resultados: Os antígenos recombinantes dos estudos prévios foram submetidos a predição de epítomos promissores para se ligar as classes I e II de MHC. Após a predição dos peptídeos para MHC, os mesmos foram submetidos a predição de estímulo de resposta Th1 e Th2 e foram selecionados um total de 15 peptídeos que se ligam com maior afinidade as moléculas, esses peptídeos foram unidos em um gene quimérico Q6 junto com adjuvante e espaçadores para estimular a resposta imune para células T.

Predição *in silico* de peptídeos para células CD4 e CD8 a partir de proteínas antigênicas de *Leishmania infantum* e avaliação como proposta vacinal

Wagner José Tenório dos Santos^{1,2}, Artur Leonel de Castro Neto^{1,2}, Chrisllane Rafael dos Santos Vasconcelos^{1,2}, Franklin Barbalho Magalhães³, Osvaldo Pompilio de Melo Neto¹.

¹Instituto Aggeu Magalhães – Fiocruz, Recife;

²Universidade Federal de Pernambuco, Recife,

³Universidade Tabosa de Almeida, Caruaru.

RESUMO

A forma visceral da leishmaniose é a forma mais grave desta doença no homem e que também acomete o cão doméstico, sendo este seu principal reservatório e com importante papel no seu ciclo biológico. Atualmente não existe nenhuma vacina que ofereça eficácia protetora para a leishmaniose visceral (LV), então pesquisas tem se voltado para desenvolver métodos eficazes que gerem uma resposta imune protetora e duradoura contra esta doença, mediada por células CD4 e CD8. A imunoinformática enfatiza o estudo de algoritmos para o potencial mapeamento de epítomos, o que acelera o tempo e reduz o custo necessário para análises laboratoriais. O objetivo deste estudo foi a seleção de peptídeos promissores a gerar uma resposta imune eficaz contra a LV humana e canina. Para isso, proteínas antigênicas de *Leishmania infantum*, selecionadas de estudos prévios, foram submetidas a programas computacionais de predição de antigenicidade e de epítomos para MHC classe I e II. Em seguida, foram selecionados os peptídeos presentes nas duas classes para saber seu potencial na indução da resposta Th1(IFN-) e Th2 (IL-4) utilizando ferramentas *in silico*. Os melhores peptídeos foram testados

quanto a sua interação com os alelos de MHC II através de *docking* molecular. Os resultados indicaram uma grande quantidade de peptídeos promissores, onde 15 foram escolhidos, por serem os únicos peptídeos que se associam *in silico* em MHC classe I e II e por sua capacidade de induzir resposta imune Th1 e Th2. Os resultados do *docking* mostraram que estes peptídeos têm fortes ligações e afinidades com os alelos de MHC II, através do grande número de pontes de hidrogênio. Esses peptídeos se mostram muito promissores ao desenvolvimento de vacinas contra a LV e devem ser avaliados experimentalmente como parte de uma proteína quimérica.

INTRODUÇÃO

Atualmente, não há vacina contra nenhuma das formas clínicas da leishmaniose humana. A maioria das pessoas que estão infectados com parasitas de *Leishmania* e não desenvolveram nenhum sintoma e obtêm imunidade resistiva contra a reinfeção. Por isso, o desenvolvimento de uma vacina para leishmaniose é um objetivo de saúde pública [1]. Vacinas contra espécies de *Leishmania* têm como principal função ativar corretamente o sistema imunológico para desenvolver uma resposta protetora composta principalmente pelas células T CD4+ e CD8+ [2]. Esta resposta tem sido associada ao controle de doenças, ativação de macrófagos e eliminação de parasitas do hospedeiro [3], [4].

As abordagens voltadas ao desenvolvimento de vacina contra a leishmaniose se concentraram na estimulação dos linfócitos T CD4+, negligenciando as células T CD8+ importantes. No entanto, o uso de múltiplas ferramentas de imunoinformática para explorar genomas inteiros de *Leishmania* e identificação de potenciais candidatos com capacidades de estimulação de células CD4+ e CD8+ [5].

Durante o processo de resposta imune em mamíferos, as moléculas MHC de classe II ligam-se a pequenos fragmentos de proteínas (peptídeos) do patógeno gerados a partir da proteólise de suas proteínas antigênicas, e

apresentam na superfície celular para reconhecimento por células T CD4+. Já os MHC de classe I apresentam antígenos na superfície celular para reconhecimento de células T CD8+ [6]. As moléculas de MHC I geralmente ligam-se a peptídeos entre 8 e 11 aminoácidos de comprimento, enquanto que os peptídeos que se ligam aos MHC II podem ter comprimento de 12 a 25 aminoácidos [7].

Fragments peptídicos podem servir diretamente como candidatos a vacinas, bem como podem ser usados para imunoterapia. No entanto, a identificação de peptídeos (ou epítomos ou regiões antigênicas) que podem ser utilizadas para imunização contra um patógeno é um dos maiores desafios. Numerosas ferramentas foram desenvolvidas para a identificação de regiões antigênicas em proteínas ou antígenos patogênicos [8]. A utilização de avanços na bioinformática ajudou a estudar a predição do epítomo de células T a partir de sequências de proteínas e foi proposto como alternativa para desenvolvimento de vacina [11]. Os peptídeos (epítomos de células T) podem se ligar a diferentes variantes alélicas de HLA e podem ser usados para desenvolver uma vacina contra uma maior proporção de populações humanas [12].

Em trabalhos prévios diretamente ligado a este estudo, novos antígenos de *Leishmania* foram identificados através do rastreamento de bibliotecas de expressão de *L. infantum* com soros de animais e humanos acometidos pela leishmaniose visceral [13,14]. No presente estudo, sequências selecionadas destes antígenos foram submetidas a análises de bioinformática para predição de epítomos ligantes de MHC I e MHC II e com potencial para um amplo estímulo de células T (CD4+ e CD8+). Os melhores peptídeos selecionados pela predição foram submetidos a modelagem de sua interação com as moléculas de MHC II e, a partir daí identificados aqueles que foram usados na construção de um gene quimérico que poderá ser utilizado como proposta vacinal.

MATERIAIS E MÉTODOS

Seleção dos genes

Os genes utilizados neste estudo são derivados de estudos anteriores [13,14], onde foi possível identificar proteínas denominadas Lci derivadas do rastreamento de bibliotecas de expressão genômica e de cDNA. Essas proteínas foram triadas primeiramente para um potencial diagnóstico, porém não foi descartado seu uso como potencial terapêutico e vacinal, avaliado aqui.

Antigenicidade e estruturas secundárias

As sequências proteicas foram submetidas à predição de estruturas secundárias e checagem de antigenicidade através do software SOPMA (*Self-Optimized Prediction Method with Alignment*). Essa ferramenta leva em consideração informações de alinhamento de sequências pertencentes à mesma família (homologas) e se baseia em banco de dados completo [15]. Os parâmetros do limite de similaridade e largura da janela foram definidos para 8 e 17 e os parâmetros de restrição foram feitos com o padrão do programa.

Seleção dos alelos para predição

Os alelos de HLA para os dois tipos de MHC (classe I e II) foram selecionados de acordo com a frequência nas regiões do Brasil, utilizando o acesso (<http://www.allelefrequencies.net>) que armazena dados de frequência populacional (alelos, genes ou haplótipos) relacionados a antígenos de

leucócitos humanos (HLA) [16]. Foi utilizado para esse estudo os subtipos mais frequentes na classe de MHC classe I (A01, A02, A03, A24, A26, B07, B27, B44 e B58) e MHC II (DRB1*01, DRB1*07, DRB1*11, DRB1*13 e DRB1*15).

Predição de epítomos

Com base nas sequencias de aminoácidos dos genes selecionados foi realizada a identificação dos peptídeos promissores, utilizando ferramentas de bioinformática para predição de MHC I (sendo considerados nove aminoácidos) através dos *NetMHC 4.0 Server* [17,18] e *NetCTL 1.2 Server*. Estes realizam previsões para todas as moléculas de MHC classe I com sequência de proteína conhecida e permite previsões para peptídeos de oito a 11 aminoácidos de comprimento, sendo que para nosso estudo foi definido o comprimento de nove aminoácidos [19]. O MHC II se liga a peptídeos de 12 a 25 aminoácidos [7], onde foram considerados 15 aminoácidos e a predição foi realizada pelo *NetMHCIIpan 3.1 Server* [20]. Essas ferramentas baseiam-se em limite de similaridade entre os epítomos gerados com bancos de dados e são classificados como fracos ou fortes.

Seleção dos peptídeos

Peptídeos foram selecionados com base na sua afinidade de ligação em relação aos diferentes alelos de HLA MHC classe I e II, de acordo com o valor de IC_{50} (concentração mínima de inibição de uma substância biológica) [21,22]. Os peptídeos fortes mostraram valor de $IC_{50} < 500$ nM e os peptídeos não ligantes (fracos) mostraram valor $IC_{50} > 5000$ nM (Guan *et al.*, 2006). Para um melhor aproveitamento dessas análises, apenas foram selecionados peptídeos fortes. Após a realização das predições dos peptídeos no MHC I, e selecionando as sequencias que se encaixaram nas duas ferramentas incluídas nas análises, verificou-se em seguida a similaridade destes com a

predição de peptídeos ligados a MHCII, de forma que foram selecionados peptídeos que estivessem associados às duas classes de MHC.

Estes peptídeos selecionados foram então submetidos a análise de predição de seu potencial de indução das citocinas IL-4 (pelo IL-4pred, para identificar, entre os ligantes de MHC II, aqueles que podem ativar as células *T-helper* indutoras de IL4 [23]) e IFN- γ (pelo *IFN epitope*, ferramenta que identifica, entre os ligantes do MHC classe II, aqueles que podem ativar as células *T-helper* indutoras de IFN- γ [24]). Os peptídeos selecionados nesta predição foram identificados e submetidos a modelagem e interação com a estrutura de MHCII.

Predição estrutural dos MHCs de classe II

Devido à ausência de estrutura tridimensional depositada na base de dados Protein Data Bank (PDB) [25] para os MHCs DRB01, DRB07 e DRB13, os que melhor interagiram com os peptídeos selecionados, uma modelagem computacional comparativa foi utilizada para prever a estrutura dessas moléculas. A escolha da estrutura molde foi realizada através de uma busca por similaridade de sequência entre os MHCs de interesse e as proteínas com estrutura conhecida depositada no PDB, utilizando a ferramenta de alinhamento Blastp [26,27]. A estrutura com o maior valor de identidade e cobertura foi utilizada como molde no protocolo de modelagem do pacote de algoritmos Modeller versão 9.19 [28]. Este protocolo alinha cada sequência de interesse com a sequência molde e extrai restrições espaciais do arquivo de coordenadas atômicas, que serão utilizadas para impor seis possíveis estruturas para cada sequência alvo. Os modelos gerados foram avaliados com a ferramenta Procheck [29] e através da função normalizada DOPE (*Discrete Optimized Protein Energy*) do pacote Modeller. Apenas os modelos melhor avaliados foram utilizados nas demais etapas.

Docking Molecular

A estrutura predita de cada MHC II com os melhores valores de DOPE e de ângulos de torção na região mais provável do gráfico de Ramachandran foram alinhadas a estrutura *template* utilizando o PyMol [30]. Essa etapa permitiu posteriormente a utilização do Rosetta [31] para substituição do epítipo co-cristalizados pelos epítipos preditos.

A etapa de docking molecular e refinamento dos complexos foi realizado utilizando o protocolo de alta resolução de *docking* peptídeo-proteína FlexPepDock [32]. Para quantificar a afinidade MHC-epítipo utilizamos a pontuação média de interface (*average Interface score* - *Isc*), que consiste na soma de contribuições energéticas de cada resíduo da interface de interação MHC-epítipo. Por fim, foi selecionada a solução de menor valor de *Isc* para cada complexo. Esse parâmetro permite avaliar a afinidade, uma vez que há a redução de *Isc* quando há formação de ligações de hidrogênio entre o epítipo e a proteína [9,33].

Construção do gene quimérico vacinal

Para a construção do gene quimérico, foram selecionados os melhores peptídeos que estimularam tanto células T CD8+ quanto T CD4+ baseado nos dados *in silico*. As sequências dos genes quiméricos foram otimizadas para expressão em *Escherichia coli* e desenhadas através do programa Gendesigner [34] e a síntese comercial foi realizada pela empresa Thermo (Life Tech, São Paulo, Brasil) (proteína Q6). Estes genes foram entregues já clonados no vetor comercial pMK simples flanqueados por sítios de restrição para as enzimas XbaI/HindIII.

RESULTADOS

Genes selecionados e visão geral da abordagem proposta

A metodologia executada neste estudo está esquematizada de forma resumida na Figura 1. Os genes utilizados para a presente proposta estão listados na Tabela 1 e já foram descritos previamente em estudos prévios ([13,14]). A análise de homologia das sequências genéticas dos genes obtidos revelou que esses genes são conservados entre diferentes espécies do gênero *Leishmania* (*L. major*, *L. infantum* e *L. donovani*) [13]. As propriedades antigênicas das proteínas foram então acessadas através da previsão de suas estruturas secundárias, levando-se em conta que proteínas que apresentam grandes proporções e porcentagens de regiões preditas como não estruturadas (*Extended Strands*) ou de dobramento aleatório (*Random Coils*) ou ainda com estruturas de Alfa Hélice são mais propensas a formar epítomos antigênicos e estáveis [35]. As proteínas que possuíram alta porcentagem desses parâmetros indicados acima estão destacadas na Tabela 1. Foi possível observar uma porcentagem variável estruturas de alfa hélice (32% a 97%) nas proteínas, indicando estabilidade na sua estrutura, enquanto os resultados da proporção de regiões de dobramento aleatório (1% a 32%) e não estruturadas (0% a 20%) mais frequentes em algumas das proteínas indicam que essas proteínas têm fortes regiões antigênicas (no caso as Lci1, Lci5, Lci6, Lci7, Lci9, Lci11, Lci12 e Lci13). Assim, os resultados indicaram que a oito proteínas recombinantes possuem várias chances de ter epítomos antigênicos.

Predição dos peptídeos nas classes de MHCI e MHCII

As 11 proteínas selecionadas foram submetidas a duas ferramentas de predição de MHC I. Para facilitar e filtrar os peptídeos, apenas foram recrutados os que tiveram altas taxas de ligações (<500 nM) e 100% de

afinidade com os alelos selecionados. Na primeira ferramenta NetMHC foram encontrados 6.045 peptídeos e considerados um total de 460 peptídeos fortes, distribuídos entre as 11 proteínas mostrado na Tabela 2. Os resultados da tabela mostram que as proteínas com maior quantidade de peptídeos preditos promissores foram as Lci1, Lci5, Lci6 e Lci12. Ainda na Tabela 2 é possível verificar também a predição de epítopos preditos pelo programa NetCTL 1.2 Server e um total de 6.045 peptídeos foram identificados, dos quais 1.298 foram considerados peptídeos fortes. As maiores frequências de peptídeos promissores estão também entre as proteínas Lci1, Lci5, Lci6 e Lci12.

Com relação a predição para MHC classe II, também foram considerados apenas peptídeos que tinham alta afinidade. Nas 11 proteínas utilizadas foram considerados 1.493 peptídeos, dos quais um total de 311 peptídeos foram considerados fortes e estão mostrados na Tabela 2. Os resultados mostram um grande número de peptídeos promissores nas Lci6, Lci7, Lci9 e Lci12.

Após a predição dos melhores peptídeos das classes de MHCI e MHCII, foi realizada uma verificação dos peptídeos que estavam presentes nos dois tipos de MHC, com a finalidade de diminuir o número de peptídeos e ter uma melhor resposta imune voltada para os dois perfis de resposta celular (CD4+ e CD8+). Após a análise de compatibilidade entre os dois tipos de MHC, foi possível observar um total de 116 peptídeos fortes distribuídos entre as Lci1, Lci3, Lci6, Lci7, Lci10 e Lci12.

Avaliação de predição da indução de IFN- γ , IL-4 e do fator de hirofobicidade dos peptídeos

Após a análise de compatibilidade dos peptídeos presente nas duas classes de MHC, foi avaliada *in silico* a capacidade dos peptídeos em estimular a resposta imune através de IFN- γ (Th1) e IL-4 (Th2). Foram encontrados vários peptídeos promissores com capacidade de estimular o perfil amplo tanto de células de perfil Th1 quanto o Th2. Dessa forma o número de peptídeos promissores para as duas respostas foi reduzido para 15 nas proteínas

selecionadas (Lci6, Lci7 e Lci12), como mostrado na Tabela 3. É possível verificar também nessa mesma tabela quais os alelos de MHCII eles estimulam, sendo possível verificar que alguns peptídeos estimulam mais de um alelo, o que possibilita uma maior estimulação da resposta imunológica pelo MHC.

Predição estrutural dos MHCs de classe II e avaliação da sua interação com peptídeos selecionados

A avaliação de similaridade de sequência utilizando o blastp mostrou que a cadeia A de todos os MHCs utilizados no trabalho possuem 100% de identidade e cobertura com a sequência do HLA-DR1 de *Homo sapiens* que possui número de identificação 3pdo no PDB [25]. No entanto a cadeia B desta estrutura apresentou sequência com identidade de 100% e cobertura de 74% frente ao DRB01, e identidade de 90% e 74% de cobertura frente ao DRB07 e DRB13. Desta forma, a estrutura 3pdo foi utilizada como molde para modelagem computacional dos MHCs alvos do estudo. A sequência dos MHCs de interesse juntamente com a sequência e estrutura do HLA-DR1 foram submetidas a modelagem proteica e a avaliação a partir dos parâmetros estereoquímicos e energéticos permitiu a seleção de uma estrutura com o melhor posicionamento dos ângulos de torção e menor energia livre para cada MHC II (Figura 2).

Após as modelagens das estruturas dos peptídeos e das moléculas de HLA (MHCII), foram geradas soluções sendo selecionadas de acordo com os valores de ΔG , tendo todos os complexos (peptídeo + MHC) testados e valores de ΔG inferiores a -45. Estes valores são condizentes com os complexos de maior afinidade já testado em outros artigos [33]. Os valores de encaixe de todos os 15 peptídeos promissores estão mostrados na tabela 4. Os complexos que foram escolhidos para melhor representar essa energia de ligação entre as duas moléculas (Peptídeos e MHC II) foram os complexos: peptídeo 1 com

HLA-DRB01; peptídeo 14 com o HLA-DRB7 e o peptídeo 4 com o HLA-DRB13, sendo mostrados na Figura 3.

Desenho do gene quimérico para vacina

Os melhores peptídeos selecionados pela predição de MHC I (CD8) e MHC II (CD4) foram utilizados para o desenho de um gene quimérico como proposta vacinal, onde foram adicionados peptídeos na região N-Terminal até a região C-Terminal desse gene. Primeiramente, foram adicionadas sequências de otimização de expressão já testadas em trabalhos prévios com genes quiméricos (Santos et al, 2019). Em seguida foi incluída uma sequência codificadora do adjuvante BCG (Bacillus Calmette-Guérin) que confere proteção em humanos e um semento de ligação, EAAAK, inserido próximo da sequência do adjuvante com a finalidade reduzir a interferência entre segmentos da proteína e causar uma separação efetiva. Seguindo o desenho gênico foram adicionados os peptídeos promissores para células CD8 entre os sítios de restrição das enzimas (Sall/XhoI), sendo que entre cada dois peptídeos foi inserido adaptadores GPGPG que estimulam respostas T auxiliares. Um outro segmento foi adicionado em seguida ao longo da sequência codificadora codificando os peptídeos promissores para células CD4+ e que estimulam uma resposta Th1 e Th2. Entre cada dois destes peptídeos foi inserido o motivo AAY, para melhorar a apresentação de epítomos e remover epítomos juncionais como mostra a figura 4 [36,37]. A proteína quimérica completa então é uma proposta de antígeno vacinal a ser avaliado quanto ao seu potencial de induzir imunidade protetora para a leishmaniose visceral.

DISCUSSÃO

As vacinas preventivas são a melhor e a mais rentável medida de proteção contra patógenos infecciosos incluindo o parasita *Leishmania*. Contudo, ainda não existe uma vacina que ofereça uma eficácia prolongada disponível para a leishmaniose visceral, seja em homem ou no cão [38]. Acredita-se que, como o desenvolvimento de resposta imune Th1 é importante para a proteção contra a leishmaniose [39–41], proteínas ou peptídeos capazes de estimular esta resposta poderiam ser consideradas fortes candidatos para proteger contra a doença [42–44]. De fato, a utilização de peptídeos como potencial vacina é de grande eficácia, visto que muitos estudos já utilizam essa abordagem e tem gerado bons resultados em estudos experimentais. Um estudo com predição de peptídeos com alelos mais frequentes na China foi utilizado como proposta vacinal para o vírus HIV e os resultados mostraram um estímulo de resposta imune celular e humoral em camundongos [45]. Em *Leishmania*, a eficácia da predição de epítomos e seu potencial vacinal já foi avaliada em estudo que fez a predição de epítomos de células T de proteínas de *Leishmania infantum* e *L. donovani*. De fato peptídeos gerados neste estudo foram testados e estimularam resposta imune celular e humoral em células de pacientes infectados. Contudo estes peptídeos foram derivados da proteína NH36, principal composição da vacina Leishmune e que foi proibida de ser comercializada no Brasil, por não gerar resposta imune duradoura em cães [46].

As proteínas recombinantes selecionadas para o presente estudo, já comprovadamente antigênicas do ponto de vista experimental, foram utilizadas na predição de epítomos de células T usando abordagens *in silico* e que também levaram em conta suas características antigênicas, preditas através de suas estruturas secundárias. De uma forma geral algumas das proteínas desse estudo se assemelham a outras utilizadas e avaliadas com as mesmas metodologias para fins de uso vacinal, como a proteína Emy162 de *Echinococcus multilocularis*, com níveis relativamente equivalentes de regiões

de alfa-hélice ou não estruturadas [35], como também a transketolase de *Plasmodium falciparum*, com atividade anti-malaria [47].

Nossas proteínas recombinantes foram ainda submetidas a predição de epítomos contra alelos de MHC I utilizando duas ferramentas *in silico*, os dados mostram uma quantidade alta de peptídeos fortes preditos, corroborando com dados de Agallou et al, (2014), onde foi possível mostra uma quantidade alta de peptídeos preditos para MHC I, para quatro proteínas de *Leishmania infantum*. Estas ferramentas mostram muita eficiência na predição de epítomos para alelos de MHC I, utilizando matrizes de dados de proteínas conhecidas [11,49,50]. Em relação a predição de epítomos MHC II, outro estudo realizado com duas proteínas de *L.donovani* (LPG-3 e NH) mostrou um total de 34 peptídeos promissores, número inferior ao encontrado em nosso estudo, porem corroboram nossos dados com as mesmas metodologias aplicadas a predição [51]. Em outro estudo utilizando a seleção de peptídeos para as duas classes de MHC, os resultados sugerem que a combinação de análises de imunoproteomica e bioinformática é um método promissor para a identificação de novos antígenos candidatos para desenvolvimento de vacinas [52].

Outro ponto importante avaliado aqui foi o potencial de indução de resposta protetora pela expressão de IL-4 (Th2) e IFN- γ (Th1). Um estudo utilizando as mesmas metodologias, realizou predição de peptídeos de proteínas de *L. donovani* (LPG-3 e NH) e mostrou que também são capazes de estimular uma eficiente resposta do sistema imune [51]. Outro estudo utilizando predição de epítomos de MHC II para estimular IL-4 e IFN- γ , foi realizado em *Plasmodium vivax* e foram encontrados 11 peptídeos promissores, dos quais 5 foram capazes de induzir a produção de citocinas que foi avaliada em ensaios experimentais [53]. Em *Leishmania amazonensis*, a predição de epítomos promissores para as duas classes de MHC seguida de seleção de peptídeos, produção e avaliação de proteína recombinante, foi realizada experimentalmente, com a verificação da indução das citocinas IFN- γ , IL-12, IL-4 e IL-10 [54].

Os resultados de e Silva et al. (2016), utilizando predição de peptídeos de *Leishmania braziliensis*, corroboram os nossos dados de modelagem e

docking, onde é possível observar os aminoácidos dos peptídeos que interagem com a molécula de MHC. Nesses estudos os complexos (peptídeo + HLA) que foram melhores classificados são claramente aqueles que estabelecem o maior número de interações moleculares (como ligações de hidrogênio e contatos hidrofóbicos) com os grupos químicos do MHC. Entretanto, ao contrário do estudo de Kashyap et al. (2017), que mostrou somente três peptídeos promissores de *Leishmania donovani* após as análises de *docking*, isso pelo fato do complexo formado na modelagem gerar poucas pontes de hidrogênio, no caso do presente estudo foi possível mostrar que os 15 peptídeos (de *L. infantum*) testados contra os alelos de MHC II foram candidatos promissores e formaram muitas pontes de hidrogênio entre os complexos. Falta então avaliar experimentalmente os melhores peptídeos identificados, o que só será possível após a produção da proteína quimérica proposta. Assim este trabalho depende de novos estudos utilizando células de pacientes para avaliar se a construção gerada tem potencial como uma nova proposta vacinal para a Leishmaniose.

REFERÊNCIAS

- 1 Bagirova, M. *et al.* (2016) Overview of dendritic cell-based vaccine development for leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 38, 651–662
- 2 Steve O Oghumu, Claudio M. Lezama-Dávila, Angelica P. Isaac-Márquez, and A.R. and Satoskar (2013) NIH Public Access. *Exp Parasitol* 70, 646–656
- 3 Birnbaum, R. and Craft, N. (2011) Innate immunity and leishmania vaccination strategies. *Dermatol. Clin.* 29, 89–102
- 4 da Silva Santos, C. and Brodskyn, C.I. (2014) The Role of CD4 and CD8⁺T Cells in Human Cutaneous Leishmaniasis. *Front. Public Heal.* 2, 1–6
- 5 Seyed, N. *et al.* (2016) Post-genomics and vaccine improvement for Leishmania. *Front. Microbiol.* 7, 1–13

- 6 Patronov, A. and Doytchinova, I. (2013) T-cell epitope vaccine design by immunoinformatics. *Open Biol.* 3, 120139–120139
- 7 Jardetzky, T.S. *et al.* (1996) Crystallographic analysis of endogenous peptides associated with HLA-DR1 suggests a common, polyproline II-like conformation for bound peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 734–738
- 8 Dhanda, S.K. *et al.* (2017) Novel in silico tools for designing peptide-based subunit vaccines and immunotherapeutics. *Brief. Bioinform.* 18, 467–478
- 9 Costa, C.H.N. *et al.* (2011) Vaccines for the leishmaniasis: Proposals for a research Agenda. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5, 1–10
- 10 Duarte, M.C. *et al.* (2016) Recent updates and perspectives on approaches for the development of vaccines against visceral leishmaniasis. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 49, 398–407
- 11 Lundegaard, C. *et al.* (2008) NetMHC-3.0: accurate web accessible predictions of human, mouse and monkey MHC class I affinities for peptides of length 8-11. *Nucleic Acids Res.* 36, 509–512
- 12 Brusic, V. *et al.* (2002) Prediction of promiscuous peptides that bind HLA class I molecules. *Immunol. Cell Biol.* 80, 280–285
- 13 Magalhães, F.B. *et al.* (2017) Evaluation of a new set of recombinant antigens for the serological diagnosis of human and canine visceral leishmaniasis. *PLoS One* 12, e0184867
- 14 Oliveira, G.G.S. *et al.* (2011) 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.* 85, 1025–1034
- 15 C.Geourjon and G.Deleage (1995) SOPMA: significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments. *Comput. Appl. Biosci.*

- 16 González-Galarza, F.F. *et al.* (2015) Allele frequency net 2015 update: New features for HLA epitopes, KIR and disease and HLA adverse drug reaction associations. *Nucleic Acids Res.* 43, D784–D788
- 17 Nielsen, M. *et al.* (2003) Reliable prediction of T-cell epitopes using neural networks with novel sequence representations. *Protein Sci.* 12, 1007–1017
- 18 Andreatta, M. and Nielsen, M. (2015) Gapped sequence alignment using artificial neural networks: Application to the MHC class I system. *Bioinformatics* 32, 511–517
- 19 Larsen, M. V *et al.* (2007) Large-scale validation of methods for cytotoxic T-lymphocyte epitope prediction. *BMC Bioinformatics* 8, 424
- 20 Massimo Andreatta, Edita Karosiene, Michael Rasmussen, Anette Stryhn, Søren Buus, and M.N. (2016) Accurate pan-specific prediction of peptide-MHC class II binding affinity with improved binding core identification. *Immunogenetics* 11, 4643–4650
- 21 Topalian, S.L. *et al.* (1996) Melanoma-specific CD4⁺ T cells recognize nonmutated HLA-DR-restricted tyrosinase epitopes. *J. Exp. Med.* 183, 1965–71
- 22 Wang, P. *et al.* (2008) A systematic assessment of MHC class II peptide binding predictions and evaluation of a consensus approach. *PLoS Comput. Biol.* 4,
- 23 Dhanda, S.K. *et al.* (2013) Prediction of IL4 Inducing Peptides. *Clin. Dev. Immunol.* 2013, 1–9
- 24 Dhanda, S.K. *et al.* (2013) Designing of interferon-gamma inducing MHC class-II binders. *Biol. Direct* 8, 30
- 25 Berman, H.M. *et al.* (2000) The protein data bank. *Nucleic Acids Res.* 28, 235–242
- 26 Altschul, S.F. *et al.* (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403–10

- 27 Camacho, C. *et al.* (2009) BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics* 10, 421
- 28 Webb, B. and Sali, A. (2014) *Comparative protein structure modeling using MODELLER*, 2014
- 29 Laskowski, R.A. *et al.* (1993) PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Crystallogr.* 26, 283–291
- 30 Delano, W.L. and Ph, D. (2004) PyMOL : An Open-Source Molecular Graphics Tool.
- 31 Leaver-Fay, A. *et al.* (2011) R 3: An Object-Oriented Software Suite for the Simulation and Design of Macromolecules. *Methods Enzym.* 487, 545–574
- 32 Raveh, B. *et al.* (2010) Sub-angstrom modeling of complexes between flexible peptides and globular proteins. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* 78, 2029–2040
- 33 e Silva, R. de F. *et al.* (2016) Combination of in silico methods in the search for potential CD4+ and CD8+ T cell epitopes in the proteome of *Leishmania braziliensis*. *Front. Immunol.* 7,
- 34 Welch, M. *et al.* (2011) *Designing genes for successful protein expression*, (1st edn) , 498Elsevier Inc.
- 35 Li, Y. *et al.* (2013) Bioinformatic prediction of epitopes in the Emy162 antigen of *Echinococcus multilocularis*. *Exp. Ther. Med.* 6, 335–340
- 36 Pandey, R.K. *et al.* (2018) Novel Immunoinformatics Approaches to Design Multi-epitope Subunit Vaccine for Malaria by Investigating Anopheles Salivary Protein. *Sci. Rep.* 8, 1–11
- 37 Ali, M. *et al.* (2017) Exploring dengue genome to construct a multi-epitope based subunit vaccine by utilizing immunoinformatics approach to battle against dengue infection. *Sci. Rep.* 7, 1–13

- 38 Srivastava, S. *et al.* (2016) Possibilities and challenges for developing a successful vaccine for leishmaniasis. *Parasit. Vectors* 9, 277
- 39 Antonio, E. *et al.* (2003) Immune Responses Induced by the. 71, 3988–3994
- 40 Martins, V.T. *et al.* (2013) Antigenicity and Protective Efficacy of a Leishmania Amastigote-specific Protein, Member of the Super-oxygenase Family, against Visceral Leishmaniasis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7,
- 41 Martins, V.T. *et al.* (2015) Antigenicity, immunogenicity and protective efficacy of three proteins expressed in the promastigote and amastigote stages of leishmania infantum against visceral leishmaniasis. *PLoS One* 10, 1–25
- 42 Ramirez, L. *et al.* (2014) Cross-protective effect of a combined L5 plus L3 Leishmania major ribosomal protein based vaccine combined with a Th1 adjuvant in murine cutaneous and visceral leishmaniasis. *Parasit. Vectors* 7, 3
- 43 Lage, D.P. *et al.* (2016) Cross-protective efficacy of Leishmania infantum LiHyD protein against tegumentary leishmaniasis caused by Leishmania major and Leishmania braziliensis species. *Acta Trop.* 158, 220–230
- 44 Lage, D.P. *et al.* (2015) Prophylactic properties of a Leishmania-specific hypothetical protein in a murine model of visceral leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 37, 646–656
- 45 Yang, Y. *et al.* (2015) In silico design of a DNA-based HIV-1 multi-epitope vaccine for Chinese populations. *Hum. Vaccines Immunother.* 11, 795–805
- 46 Carrillo, E. *et al.* (2017) F1 domain of the Leishmania (Leishmania) donovani nucleoside hydrolase promotes a Th1 Response in Leishmania (Leishmania) infantum cured patients and in asymptomatic individuals living in an endemic area of leishmaniasis. *Front. Immunol.* 8, 1–13
- 47 Hasan, M.A. *et al.* (2015) Molecular-docking study of malaria drug target

- enzyme transketolase in *Plasmodium falciparum* 3D7 portends the novel approach to its treatment. *Source Code Biol. Med.* 10, 7
- 48 Agallou, M. *et al.* (2014) Experimental validation of multi-epitope peptides including promising MHC class I- and II-restricted epitopes of four known *Leishmania infantum* proteins. *Front. Immunol.* 5, 1–16
 - 49 Nielsen, M. *et al.* (2004) Improved prediction of MHC class I and class II epitopes using a novel Gibbs sampling approach. *Bioinformatics* 20, 1388–1397
 - 50 Larsen, M.V. *et al.* (2005) An integrative approach to CTL epitope prediction: A combined algorithm integrating MHC class I binding, TAP transport efficiency, and proteasomal cleavage predictions. *Eur. J. Immunol.* 35, 2295–2303
 - 51 Kashyap, M. *et al.* (2017) Prediction and analysis of promiscuous T cell-epitopes derived from the vaccine candidate antigens of *Leishmania donovani* binding to MHC class-II alleles using in silico approach. *Infect.*
 - 52 Agallou, M. *et al.* (2016) Identification of immunoreactive *Leishmania infantum* protein antigens to asymptomatic dog sera through combined immunoproteomics and bioinformatics analysis. *PLoS One* 11, 1–22
 - 53 JC Lima-Juniora, DM Banicb, TM Tranc, VSE Meyerc, SG De-Simoned, F Santose, L. *et al.* (2010) Promiscuous T-cell epitopes of *Plasmodium* Merozoite Surface Protein 9 (PvMSP9) induces IFN- γ and IL-4 responses in individuals naturally exposed to malaria in the Brazilian Amazon.
 - 54 Martins, V.T. *et al.* (2016) A recombinant fusion protein displaying murine and human MHC class I- and II-specific epitopes protects against *Leishmania amazonensis* infection. DOI: 10.1016/j.cellimm.2016.12.008

Tabela 1. Predição de estruturas secundárias das proteínas mostrando a antigenicidade dos genes baseados nos parâmetros de dobramento aleatório, não estruturadas e de Alfa-Hélice.

Proteínas	Dobramento Aleatório	Não Estruturada	Alfa Hélice
Lci1	32.49%	19.92%	38,28%
Lci2	1.35%	0%	97%
Lci3	15%	6.48%	74%
Lci5	32.89%	8.89%	53%
Lci6	27.81%	17.81%	46,64%
Lci7	21.76%	11.09%	57,53%
Lci9	26.85%	20.68%	41,05%
Lci10	13.10%	2.24%	81,47%
Lci11	18.36%	18.36%	53,12%
Lci12	28.88%	13.58%	51,51%
Lci13	26.27%	18.81%	46,27%

Tabela 2. Predição de epítomos promissores para as duas classes de MHC, mostrando o total de peptídeos para cada proteína utilizada em cada software.

Proteínas	NETMHC	NETCTL	NETMHCIIPan	Total
Lci1	57	133	14	204
Lci2	12	50	26	88
Lci3	15	96	4	115
Lci5	59	181	8	248
Lci6	92	246	48	386
Lci7	37	98	36	171
Lci9	20	59	33	112
Lci10	18	58	27	103
Lci11	37	111	28	176
Lci12	96	220	87	403
Lci13	17	46	0	63
Total	460	1.298	311	

Tabela 3. Identificação da quantidade de peptídeos, suas propriedades e os alelos que são estimulados pelos peptídeos.

Nº	Proteína	Epítipo	Core	Alelos
1	Lci6	DEIEAAFLADTSAAT	FLADTSAAT	HLA-DRB101
2	Lci6	EIEAAFLADTSAATG	FLADTSAAT	HLA-DRB101
3	Lci6	LFIRTTVTTHHIFQDN	IRTTVTTHHI	HLA-DRB101-07
4	Lci6	HITNIVFEANEAALL	FEANEAALL	HLA-DRB101-13
5	Lci6	NIVFEANEAALLTTF	FEANEAALL	HLA-DRB101-13
6	Lci6	IVFEANEAALLTTFE	FEANEAALL	HLA-DRB101-13
7	Lci6	VFEANEAALLTTFEV	FEANEAALL	HLA-DRB101
8	Lci6	FEANEAALLTTFEVK	FEANEAALL	HLA-DRB101
9	Lci7	YILNVSAVYFEQGDY	YILNVSAVY	HLA-DRB13
10	Lci12	TYNNVYYFSVSRLKV	VYYFSVSRL	HLA-DRB101-07
11	Lci12	PFESFEEALSAELKA	FEEALSAEL	HLA-DRB101-07
12	Lci12	FESFEEALSAELKAH	FEEALSAEL	HLA-DRB101
13	Lci12	ESFEEALSAELKAHG	FEEALSAEL	HLA-DRB101
14	Lci12	EAPFESFEEALSAEL	FEEALSAEL	HLA-DRB107
15	Lci12	APFESFEEALSAELK	FEEALSAEL	HLA-DRB107

Tabela 4. Os valores de escore (Isc) para cada peptídeo com o alelo respectivo mostrando a energia de afinidade.

Nº	Peptídeos	Alelos	Isc
1	DEIEAAFLADTSAAT	HLA-DRB101	-59.817
2	EIEAAFLADTSAATG	HLA-DRB101	-49.399
3	LFIRTTVTHHIFQDN	HLA-DRB101/07	-55.443/-50.049
4	HITNIVFEANEAALL	HLA-DRB101/13	-54.672/-57.028
5	NIVFEANEAALLTTF	HLA-DRB101/13	-59.618/-56.338
6	IVFEANEAALLTTFE	HLA-DRB101/13	-50.437/-46.952
7	VFEANEAALLTTFEV	HLA-DRB101	-52.219
8	FEANEAALLTTFEVK	HLA-DRB101	-51.327
9	YILNVSAVYFEQGDY	HLA-DRB13	-54.652
10	TYNNVYYFSVSRLKV	HLA-DRB101/07	-53.882/-46.180
11	PFESFEEALSAELKA	HLA-DRB101/07	-50.050/-47.279
12	FESFEEALSAELKAH	HLA-DRB101	-59.486
13	ESFEEALSAELKAHG	HLA-DRB101	-52.681
14	EAPFESFEEALSAEL	HLA-DRB107	-52.613
15	APFESFEEALSAELK	HLA-DRB107	-49.694

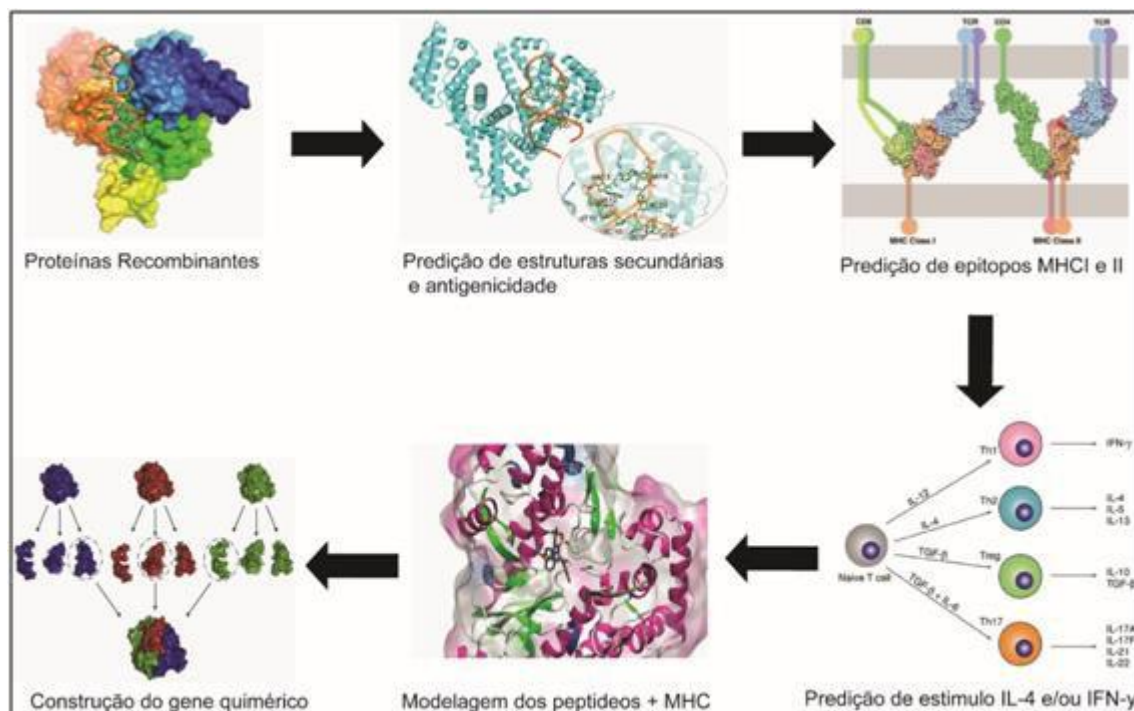


Figura 1. Fluxograma da metodologia empregada para predição de epítomos. As proteínas recombinantes identificadas previamente foram primeiramente preditas quanto as suas estruturas secundárias e antigenicidade, em seguida, foram submetidas a predição de epítomos para as duas classes de MHC como também predição de estímulo de IL-4 e IFN- γ . Os melhores peptídeos foram modelados junto com os alelos de MHC e realizado o docking molecular desse complexo e a construção do gene quimérico.

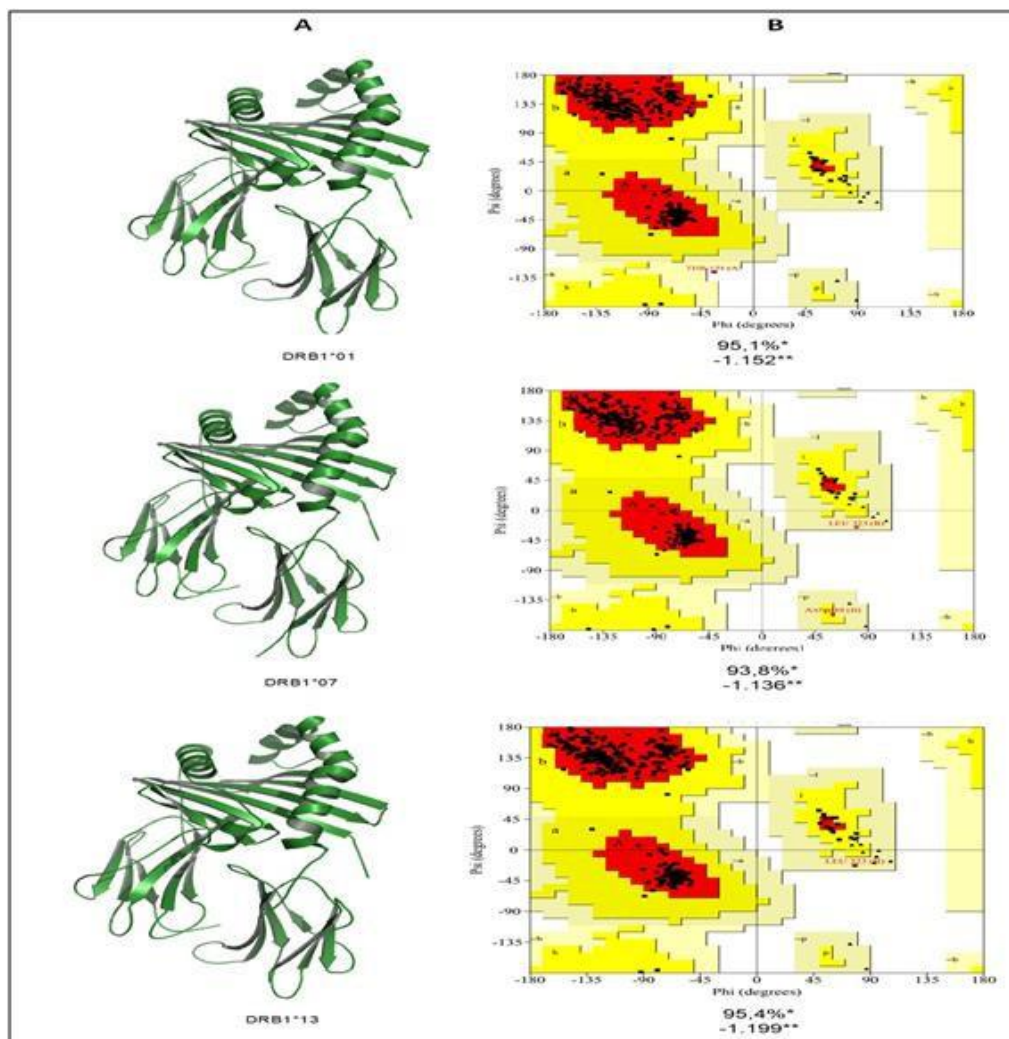
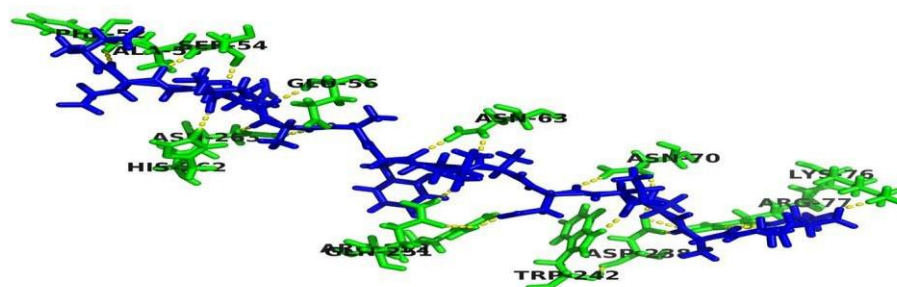


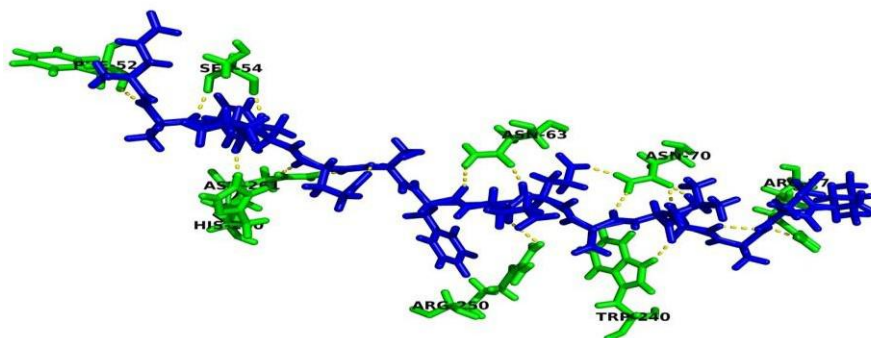
Figura 2. Modelagem das estruturas dos MHC II e os gráficos de Ramachandran.

* Porcentagem dos ângulos de torção na região mais favorável do gráfico de Ramachandran.

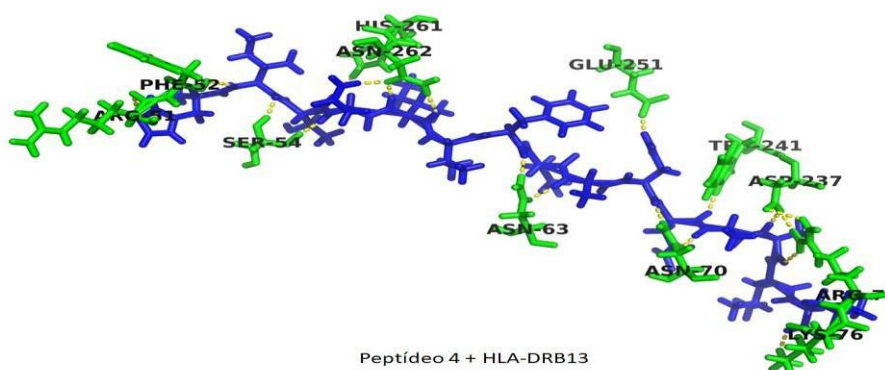
** Valor de DOPE normalizado calculado pelo módulo Discrete Optimized Protein Energy do pacote de algoritmos Modeller.



Peptídeo 1 + HLA-DRB01



Peptídeo 14 + HLA-DRB07



Peptídeo 4 + HLA-DRB13

Figura 3. Complexo (peptídeo + MHC). Mostrando a interação do complexo, em verde os aminoácidos do MHC II e em azul os aminoácidos dos peptídeos. Os pontilhados em amarelo mostram as pontes de hidrogênio entre os aminoácidos.

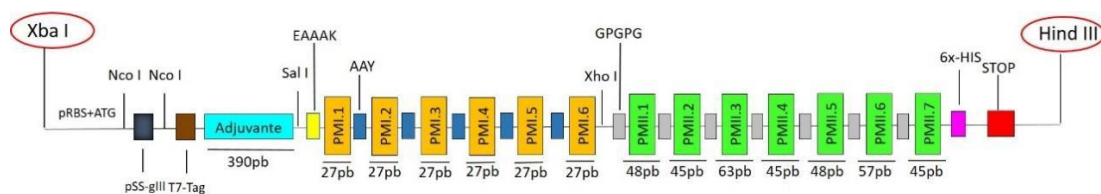


Figura 4. Gene quimérico vacinal. Mostra os peptídeos que foram inseridos na sequência do gene quimérico onde podemos ver o tag de otimização (Azul escuro), o adjuvante BCG (Azul Claro), os peptídeos CD8 (Laranja), os peptídeos CD4 (Verde), os vinculadores (Amarelo, Azul e Cinza) e uma 6-Histidina (Rosa). O gene é flanqueado pelos sítios de XbaI/HindIII.

6. ARTIGO IV:

6.1 EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EM MODELO EUCARIOTO ATRAVÉS DE *LEISHMANIA TARENTOLAE*

Artigo anexo na página seguinte (Revista: *Experimental Parasitology*),

OBS: O autor desta tese e deste artigo é responsável pelo desenho dos primers para subclonagem no vetor pLEXSY, cultivo e transfecção nas células de *Leishmania tarentolae*, ensaios de infecção em macrófagos e os ensaios de imunofluorescência para visualização das proteínas no interior das células.

Resumo dos principais resultados: A *Leishmania tarentolae* é um modelo atenuado vivo natural para imunização e ativação de resposta imune contra LV. Aqui foi visto que ela tem a capacidade de expressar no seu interior proteínas de *L. infantum* para uso na vacinação. Foi visto ainda que essa expressão é contínua, pois também é expressa quando o parasita é englobado pelas células de macrófagos.

Expressão de proteínas recombinantes em modelo eucarioto através de *Leishmania tarentolae*

Wagner José Tenório dos Santos^{1,2}, Artur Leonel de Castro Neto^{1,2}, Christian Robson de Souza Reis¹, Franklin Barbalho Magalhães³, Osvaldo Pompilio de Melo Neto¹.

¹Instituto Aggeu Magalhães – Fundação Oswaldo Cruz, Recife, Pernambuco, Brasil;

²Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil;

³Universidade Tabosa de Almeida, Caruaru, Pernambuco, Brasil.

RESUMO

Uma vacina eficaz contra a Leishmaniose Visceral deve contar com a geração de uma imunidade de células T eficiente, predominantemente com resposta Th1 para destruição dos parasitos pelo sistema imune. Nesse sentido vacinas atenuadas da *Leishmania* surgem como possíveis alternativas, uma vez que a percepção deste tipo de vacinação é mais semelhante à doença natural e melhor é a produção de uma resposta protetora. A *Leishmania tarentolae* é um modelo eficaz em expressão de antígenos recombinantes como proposta vacinal. Este estudo objetiva avaliar a expressão de antígenos recombinantes de *L. infantum* utilizando a *L. tarentolae* em macrófagos de linhagem J744A1. Linhagens de *L. tarentolae* foram geradas expressando duas proteínas recombinantes de *L. infantum*, a primeira derivada de um antígeno denominado de Lci10 e a segunda uma proteína quimérica resultante da fusão de fragmentos de três antígenos distintos, nomeada de Q1. A avaliação da expressão dessas proteínas foi através de técnicas de imunofluorescência, onde foi possível visualizar a expressão no interior de células promastigotas e em células amastigotas no interior de macrófagos em cultura. Esses ensaios mostram a eficácia dos parasitas recombinantes infectarem macrófagos e expressarem suas proteínas no seu interior. Sendo assim, a ideia principal do trabalho é utilizar a *L. tarentolae*

expressando novos antígenos de *L. infantum* para gerar uma resposta imune protetora contra a Leishmaniose Visceral em modelo murino.

INTRODUÇÃO

A Leishmaniose é uma doença infecto-parasitária causada por protozoários flagelares pertencentes à família Trypanosomatidae e ao gênero *Leishmania*. Estes parasitas apresentam ciclo de vida heteróximo, vivendo alternadamente em hospedeiros vertebrados (incluindo o homem e outros mamíferos silvestres e/ou domésticos) e insetos vetores, estes últimos pertencendo aos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia*. Esta enfermidade é endêmica em 98 países, cinco continentes, e 350 milhões de pessoas vivem em situação de risco (Alvar et al., 2012; Brasil, 2014).

No Brasil, a área mais acometida pela Leishmaniose é a região Nordeste, com cerca de 3 mil casos de Leishmaniose Visceral (LV), a forma mais grave da doença, e 231 óbitos por ano (Brasil, 2016). A LV no Brasil é causada pela *Leishmania infantum* que, como os demais membros deste gênero, apresenta duas formas distintas de vida. A forma flagelar, promastigota, vive no vetor invertebrado e é inoculada no hospedeiro vertebrado através da derme onde é internalizada pelas células dendríticas, os macrófagos, e transforma-se na forma amastigota. Esta última se multiplica intracelularmente no hospedeiro mamífero e é passível de nova etapa de transmissão pelo vetor invertebrado (Joshi et al., 2014).

Uma alternativa vacinal proposta contra a LVC baseia-se utilização de espécies não patogênicas ao homem e uma que tem se destacado pela proximidade evolutiva é a *Leishmania tarentolae* (Breton et al., 2005). Este é um parasito que se demonstrou ter como alvo células apresentadoras de antígenos, incluindo células dendríticas (DC), e que ativa o processo de maturação de DC, induzindo a proliferação de células T e a produção de IFN- γ , levando as células T CD4 + para um fenótipo de células Th1 (Taylor et al., 2010).

Este organismo modelo foi escolhido também por apresentar mais de 90% do genoma similar a espécies patogênicas do gênero *Leishmania* (como por exemplo a *L. infantum*) (Raymond et al., 2012). Entretanto, mesmo apresentando essas

semelhanças, alguns genes essenciais para a patogenicidade estão ausentes nessa espécie não levando esse parasita a infectar os macrófagos de mamíferos e se apresentando apenas na forma extracelular (Basile & Peticca 2009). As principais vantagens desse vetor é a alta taxa de crescimento comparado com outras espécies de *Leishmania* e o seu cultivo tem menor custo (Fritsche et al., 2008, 2007).

Um estudo pioneiro na utilização de *Leishmania tarentolae* avaliou o seu processo infeccioso em macrófagos de linhagem J744A1, onde foi possível observar a internalização do parasita pelos macrófagos e a possível estimulação de uma resposta Th1, uma das principais características para a vacinação e proteção contra patógenos (Breton et al. 2005; Motazedian et al. 1996).

A partir destes resultados, no presente estudo comparamos a *Leishmania tarentolae* selvagem e uma linhagem recombinante expressando proteínas antigênicas de *Leishmania infantum*, previamente utilizadas em triagem para diagnóstico contra a Leishmaniose (Magalhães et al., 2017; Oliveira et al., 2011), para avaliar seu potencial infectivo em macrófagos murinos. A presença da expressão de proteínas recombinantes (Q1 e Lci10) foi observada nas formas promastigotas, amastigotas axênicos e amastigotas internalizados pelos macrófagos. Esse vetor parasitário possibilita ensaios futuros *in vivo* para a avaliação de uma possível proposta vacinal baseada em *L. tarentolae*.

MATÉRIAS E MÉTODOS

Seleção e construção dos genes recombinantes

Os genes inicialmente selecionados para o estudo foram o gene quimérico Q1 e o gene recombinante Lci10, selecionados por meio de resultados prévios através triagem por soros de pacientes e cães com LV. Os genes estavam originalmente clonados no vetor plasmidial pRSETa e tem tamanhos aproximados de 1646pb (Q1), 900pb (Lci10), e seus tamanhos em kDa são de 60 e 35.

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), clonagem e subclonagem

Os genes (Lci10 e Q1) foi realizado a confecção dos seguintes primers para incluir os sítios NcoI/KpnI na sequência desses genes: Lci10 forward (5'-CCATGGATTGGTGACTTGCTCATGCTTCTCG-3') reverse (5'-GGTACCGTCAGCAACCGCGGCATCCT-3') e a Q1 forward (5'-CCATGGATGATCGAGGCCGAGGAACAG-3') reverse (5'-GGTACCGTCGTGGTCAAAAGACACCTGTTTG-3'). Estes pares de primers foram utilizados na realização da PCR com a enzima AccuPrime™ DNA polymerases (Invitrogen™) nas seguintes condições: 94°C por 5 min, e mais 35 ciclos de: 94° por 30 seg para desnaturação, 60°C por 30 seg para anelamento e 72°C por 1min e 30 seg para a extensão da polimerase. Ao final dos ciclos mais uma etapa de 72°C por 10min.

Após a purificação dos genes amplificados, foi realizada a ligação no plasmídeo de clonagem pGEM T-easy, pelo kit pGEM T-easy (Promega), seguido da transformação em células de *E. coli* cepa Top10. Inóculos foram então produzidos em meio LB líquido e, após crescimento e sedimentação, foi realizado o protocolo da extração de DNA plasmidial em pequena escala. Após a confirmação da clonagem, foi realizado uma digestão pelo par de enzimas NcoI/KpnI e os fragmentos obtidos por restrição enzimática foram então subclonados no vetor de expressão pLEXSY-Hyg2 (Jenna Bioscience), previamente digerido com as enzimas citadas, pela utilização da enzima T4 DNA ligase e transformação em bactérias *E. coli* cepa DH5α.

Transfecção e integração dos genes

Para transfecção de células *L. tarentolae*, cerca de 10 mL de cultura com densidade celular de aproximadamente $2,5 \times 10^8$ em 48 horas de cultivo foram centrifugadas a 3000 rpm por 5 minutos em tubos cônicos de 15 mL. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em 1 mL de tampão

HEPES-NaCl (21 mM HEPES, 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 0,7 mM Na₂HPO₄, 6 mM glicose e pH 7,05), homogeneizado e centrifugado nas mesmas condições anteriores, sendo o sedimento ressuspensão em 400 µL do tampão HEPES-NaCl e transferido para cuvetas de 0,2 mm contendo as construções pLEXSY/Q1, pLEXSY/Lci10, pLEXSY vazio e a célula selvagem utilizada como controle negativo, ambas linearizadas pela digestão com a enzima *Swa*I. A transfecção foi feita por eletroporação sob as seguintes condições: voltagem 450V; capacitância 500µF e resistência $\infty \Omega$ através do aparelho BioRad Gene Pulser II (BioRad). Após a transfecção, as células foram colocadas em garrafas e cultivadas em 5 mL de meio Schneider's por 24 horas na ausência de antibiótico. A seguir, as células foram pré-selecionadas com a adição de higromicina (50µg/mL) ao meio de cultura e após 48 horas. Para seleção das células recombinantes, 500µL da cultura da pré-seleção foram transferidas para outra garrafa contendo 4,5mL de meio e a concentração de higromicina foi dobrada (100µg/mL) e incubadas a 26°C novamente.

Imunofluorescência

Células de *L. tarentolae* de uma cultura de $2,5 \times 10^6$ células/ml foram fixadas em PFA (Paraformaldeído) 3% e lavadas com PBS. Foram então recobertas sobre lamínulas com Poli-L-Lisina por 30 min e, em seguida, recobertas com 150 µl das *L. tarentolae*. Após fixação por 15 min foram feitas cinco lavagens com o Tampão de Lavagem (PBS + Glicina 20mM). Foi feita então a permeabilização por incubação com NP40 0,1% + Glicina 20mM por 10 min e depois lavagem e bloqueio (PBS + Glicina 20mM + BSA 1%) por 20 min. As células foram então incubadas com o primeiro anticorpo (1:10) por 45 min a 37°C em estufa e, depois de lavagens, incubadas com o segundo anticorpo fluorescente (ALEXA 1:1000), por 45 min a 37°C. Por fim lamínulas foram montadas em lâminas (adicionando o DAPI) e feitas as leituras no microscópio de fluorescência nos filtros 405 (DAPI) e 488 (ALEXA).

Ensaio de infecção em macrófagos

Macrófagos da linhagem J774 foram adicionados (10^5) em lâminulas redondas em placas de 24 poços. Células de *Leishmania tarentolae*, *L. tarentolae* recombinante e *L. infantum* também foram contadas e adicionadas (10^6) junto aos macrófagos em uma proporção de 10:1 (parasitas/macrófagos), todos em duplicata. As placas foram incubadas por seis horas a 37°C 5% CO₂ e, em seguida, lavadas três vezes com PBS para remover as células que não ficaram aderidas nos poços. Após as lavagens foi adicionado a cada poço 1ml de RPMI 1640 completo e incubado novamente nas mesmas condições por tempos de 12, 24, 48, 72 horas. Nesses tempos foram coletados os sobrenadantes e congelados -80°C para análises futuras e as lâminulas foram fixadas com metanol e coradas com Giemsa. Outras lâminulas foram utilizadas para ensaios de imunocitoquímica para visualização das proteínas expressas nos amastigotas dentro dos macrófagos. Nas lâminas foram contados os macrófagos e os parasitas e feito uma razão para determinar o índice de infecção em todos os tempos determinados.

RESULTADOS

Obtenção das construções LT- Q1 e LT- Lci10 e avaliação de sua expressão por *Western-blot*

Os genes Q1 e Lci10 foram transfectados nas células de *L. tarentolae* e as células transfectadas selecionadas pelo uso do antibiótico de resistência (Higromicina). Após a seleção, as células recombinantes foram centrifugadas para extração do DNA Genômico pelo reagent DNAzol (Invitrogen™). Foi utilizado o DNA Genômico para a verificação da integração do gene no genoma da *Leishmania*, através de PCR utilizando o par de primers: 5' ssu F3001 (5'-GATCTGGTTGATTCTGCCAGTAG-3') e 3' apt A1715 (5'-TATTCGTTGTCAGATGGCGCAC-3'). Essa integração pode ser observada na

Figura 1A, que mostra o local exato da integração dos genes e a localização dos primers. Na figura 1B pode-se verificar a integração dos genes pela amplificação da banda de aproximadamente 1635pb.

Após a confirmação da integração dos genes, foi realizado fracionamento de extrato total das linhagens de *L. tarentolae* em gel SDS-PAGE para visualização da expressão das proteínas de interesse. Porém com a dificuldade de visualização das proteínas em extrato, em parte devido ao fato de que estas proteínas já são de *Leishmania*, foram realizados ensaios de *Western-Blot*, com anticorpos específicos. Como podemos verificar na figura 1C, somente a construção LT-Q1 foi visualizada (utilizado anticorpo purificado anti-Lci12 – presente na proteína quimérica). No caso da construção LT-L10 (utilizado anticorpo policlonal anti-Lci10), foi difícil visualizar sua expressão nesse ensaio, talvez por essa proteína ser conservada entre as espécies de *Leishmania*.

Avaliação da expressão das proteínas em promastigotas por imunofluorescência

Com a dificuldade de visualização da proteína da LT-10 por meio de *Western-Blot*, foi realizado a imunofluorescência com os mesmos anticorpos utilizados nestes ensaios. Foi visto na figura 2 que as proteínas foram expressas no interior das células transfectadas, no caso da Q1 foi visualizada sua expressão no interior da célula, onde não foi visto sinal na célula controle. Para a Lci10, foi confirmado que seu anticorpo marca as duas células LT-L10 tanto quanto a *L. tarentolae* selvagem, mas esses resultados mostraram que na *L. tarentolae* selvagem com o anticorpo da Lci10 mostrou uma menor fluorescência no citoplasma das células, localizado nas extremidades dessas células, mostrando o local onde essa proteína é mais expressa nas espécies de *Leishmania* onde foi investigada (dados não publicados).

Perfil de infecção de *L. tarentolae* e *L. infantum* em macrófagos da linhagem J774A1

Com a finalidade de identificar a expressão continua das proteínas em *L. tarentolae* na forma amastigota e avaliar o tempo em que essas células ficariam no interior de macrófagos foi realizado ensaios de infecção com macrófagos de linhagem (J774A1). Esse experimento foi feito em comparação com a *L. infantum*, que sabidamente prolifera nos macrófagos. Como pode ser observado na figura 3, os resultados indicam que no tempo de 6 horas, a *Leishmania tarentolae* consegue infectar os macrófagos e se diferenciar em formas semelhantes a amastigotas, embora nesse mesmo tempo a *Leishmania infantum* ainda não tenha infectado os macrófagos. Já no tempo de 24 horas os macrófagos conseguem resolver a infecção fagocitando as células de *Leishmania tarentolae*, enquanto no mesmo tempo as células de *L. infantum* já destroem o macrófago. No tempo de 48 horas os macrófagos fagocitam as *L. tarentolae* enquanto que nesse mesmo tempo as *L. infantum* tentam infectar mais células.

Avaliação da expressão das proteínas recombinantes em *L. tarentolae* no interior de macrófagos

Com base na cinética estabelecida na figura anterior, outro ensaio com os macrófagos foi realizado, só que dessa vez para visualização das proteínas expressas pelas células de *Leishmania* no seu interior. Foi realizado ensaios de imunofluorescência com os mesmos anticorpos mostrados anteriormente para as construções LT-Q1 e LT-L10. A figura 4 mostra que a expressão da proteína Q1 foi vista de forma continua na forma amastigota no interior dos macrófagos que apesar de ter um sinal no controle a fluorescência no interior das células é mais forte, como também pode-se observar os pontos azuis (DAPI) no citoplasma dos macrófagos sinalizando os núcleos das amastigotas. No caso da LT-L10 pode-se observara sinais na célula controle pelo fato da proteína ser nativa de *L. infantum*.

DISCUSSÃO

Diante do cenário precário de uma terapia de eficácia para Leishmaniose Visceral Canina, estudos tem buscado cada vez mais utilizar formas alternativas para melhorar a eficiência de uma proposta vacinal. A proposta vacinal para cães nesse estudo é baseada em modelo atenuado (*Leishmania tarentolae*) utilizando uma espécie de *Leishmania* não infectiva em células de mamíferos que, entretanto, tem se mostrado um bom modelo para expressão de proteínas recombinantes de outras espécies de *Leishmania* (Zahedifard et al., 2014).

Este modelo também tem sido utilizado para a expressão bem-sucedida de várias proteínas recombinantes de outras origens, como por exemplo, estudos com H1N1 onde foi construído uma *L. tarentolae* expressando HA recombinante e foi testado sua eficácia em modelo murino e observado que esse modelo pode ser uma alternativa para vacinas atenuadas (Pion et al., 2014).

Neste estudo produzimos células recombinantes baseadas na inserção de proteínas de *L. infantum* que tiveram resultados eficientes no diagnóstico sorológico para cães (Magalhães et al., 2017) e foram inseridas no interior da *Leishmania tarentolae* como forma de expressão contínua, através do vetor pLEXSY.

Desta forma foi possível visualizar a expressão das proteínas recombinantes nas células através de imunofluorescência direcionada com anticorpos específicos pelo fato das proteínas (principalmente a Lci10) ser uma proteína conservada entre espécies. Estudos que utilizaram a *L. tarentolae* como modelo vacinal mostraram eficiência na expressão de antígeno de *L. infantum* (A2) (Mizbani et al., 2009), porém foi visto que esse antígeno não está presente na *L. tarentolae* diferente do antígeno Q10 escolhido em nosso estudo, sendo assim uma possibilidade da dificuldade em expressar esses antígenos e na visualização em gel SDS-PAGE.

Diante de transformar a *Leishmania tarentolae* em um modelo vacinal, verificamos que a mesma não consegue ficar muito tempo no interior de células de linhagem J774A1 sem que os macrófagos as eliminem. Ainda assim, verificamos que as proteínas ainda continuariam sendo expressas na *Leishmania* na forma

amastigota dentro dos macrófagos, Isso também foi visto também em um estudo utilizando espécies de *Leishmania* para estimular o sistema imune, onde se obervou que a *L. tarentolae* é bom candidato a estimular o sistema imune voltado para a cura contra a LV (Taylor et al., 2010). Isso seria realmente de uma grande importância já que os macrófagos são as primeiras portas de defesa contra os parasitas e quando fagocitam as células liberando as proteínas antigênicas para serem reconhecidas pelo sistema imune celular. Nossos dados não puderam mostrar uma eficácia na resposta imune celular, pois seriam necessários estudos *in vitro* e *in vivo* para responder as questões voltadas para um modelo vacinal. Entretanto são passos iniciais que devem ser explorados visto que essas proteínas recombinantes têm eficácia na resposta imune, assim como a *Leishmania tarentolae* que já mostrou estimular o sistema imune de forma eficiente (Saljoughian et al., 2013).

REFERÊNCIAS

- Alvar, J., Vélez, I.D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., Jannin, J., de Boer, M., 2012. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. PLoS One 7. doi:10.1371/journal.pone.0035671
- Basile, G., Peticca, M., 2009. Recombinant Protein Expression in *Leishmania tarentolae*. Mol. Biotechnol. 43, 273–278. doi:10.1007/s12033-009-9213-5
- Brasil, M. da S., 2016. Guia de vigilância em Saúde 773.
- Brasil, M. da S., 2014. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral, Secretaria de Vigilância em Saúde.
- Breton, M., Tremblay, M.J., Ouellette, M., Papadopolou, B., 2005. Live nonpathogenic parasitic vector as a candidate vaccine against visceral leishmaniasis. Infect. Immun. 73, 6372–6382. doi:10.1128/IAI.73.10.6372-6382.2005
- Fritsche, C., Sitz, M., Weiland, N., Breitling, R., Pohl, H.D., 2007. Characterization of the growth behavior of *Leishmania tarentolae* - A new expression system for

recombinant proteins. J. Basic Microbiol. 47, 384–393.

doi:10.1002/jobm.200710111

Fritsche, C., Sitz, M., Wolf, M., Pohl, H.D., 2008. Development of a defined medium for heterologous expression in *Leishmania tarentolae*. J. Basic Microbiol. 48, 488–495. doi:10.1002/jobm.200700389

Joshi, S., Rawat, K., Yadav, N.K., Kumar, V., Siddiqi, M.I., Dube, A., 2014. Visceral leishmaniasis: Advancements in vaccine development via classical and molecular approaches. Front. Immunol. 5, 1–18. doi:10.3389/fimmu.2014.00380

Magalhães, F.B., Neto, A.L.C., Nascimento, M.B., Wagner, J., Santos, T., Medeiros, Z.M., Neto, A.S.L., Costa, D.L., Carlos, H., Costa, N., Santos, W.L.C., Carvalho, L.C.P. De, Geraldo, G., Oliveira, S., Neto, O.P.D.M., 2017. Evaluation of a new set of recombinant antigens for the serological diagnosis of human and canine visceral leishmaniasis. PLoS One 12, e0184867. doi:10.1371/journal.pone.0184867

Mizbani, A., Taheri, T., Zahedifard, F., Taslimi, Y., Azizi, H., Azadmanesh, K., Papadopoulou, B., Rafati, S., 2009. Recombinant *Leishmania tarentolae* expressing the A2 virulence gene as a novel candidate vaccine against visceral leishmaniasis. Vaccine 28, 53–62. doi:10.1016/j.vaccine.2009.09.114

Motazedian, H., Noyes, H., Maingon, R., 1996. *Leishmania* and *Sauroleishmania*: The use of random amplified polymorphic DNA for the identification of parasites from vertebrates and invertebrates. Exp. Parasitol. 83, 150–154. doi:10.1006/expr.1996.0059

Oliveira, G.G., Magalhaes, 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., Gomes, Y.M., Moreira Jr., E.D., Brito, M.E., Pontes de Carvalho, L.C., de Melo Neto, O.P., 2011. 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. 85, 1025–1034.

Pion, C., Courtois, V., Husson, S., Bernard, M.C., Nicolai, M.C., Talaga, P., Trannoy,

E., Moste, C., Sodoyer, R., Legastelois, I., 2014. Characterization and immunogenicity in mice of recombinant influenza haemagglutinins produced in *Leishmania tarentolae*. *Vaccine* 32, 5570–5576.
doi:10.1016/j.vaccine.2014.07.092

Raymond, F., Boisvert, S., Roy, G., Ritt, J.F., Légaré, D., Isnard, A., Stanke, M., Olivier, M., Tremblay, M.J., Papadopoulou, B., Ouellette, M., Corbeil, J., 2012. Genome sequencing of the lizard parasite *Leishmania tarentolae* reveals loss of genes associated to the intracellular stage of human pathogenic species. *Nucleic Acids Res.* 40, 1131–1147. doi:10.1093/nar/gkr834

Saljoughian, N., Taheri, T., Zahedifard, F., Taslimi, Y., Doustdari, F., Bolhassani, A., Doroud, D., Azizi, H., Heidari, K., Vasei, M., Namvar Asl, N., Papadopoulou, B., Rafati, S., 2013. Development of Novel Prime-Boost Strategies Based on a Tri-Gene Fusion Recombinant *L. tarentolae* Vaccine against Experimental Murine Visceral Leishmaniasis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7, 1–15.
doi:10.1371/journal.pntd.0002174

Taylor, V.M., Muñoz, D.L., Cedeño, D.L., Vélez, I.D., Jones, M.A., Robledo, S.M., 2010. *Leishmania tarentolae*: Utility as an in vitro model for screening of antileishmanial agents. *Exp. Parasitol.* 126, 471–475.
doi:10.1016/j.exppara.2010.05.016

Zahedifard, F., Gholami, E., Taheri, T., Taslimi, Y., Doustdari, F., Seyed, N., Torkashvand, F., Meneses, C., Papadopoulou, B., Kamhawi, S., Valenzuela, J.G., Rafati, S., 2014. Enhanced Protective Efficacy of Nonpathogenic Recombinant *Leishmania tarentolae* Expressing Cysteine Proteinases Combined with a Sand Fly Salivary Antigen. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8.
doi:10.1371/journal.pntd.0002751

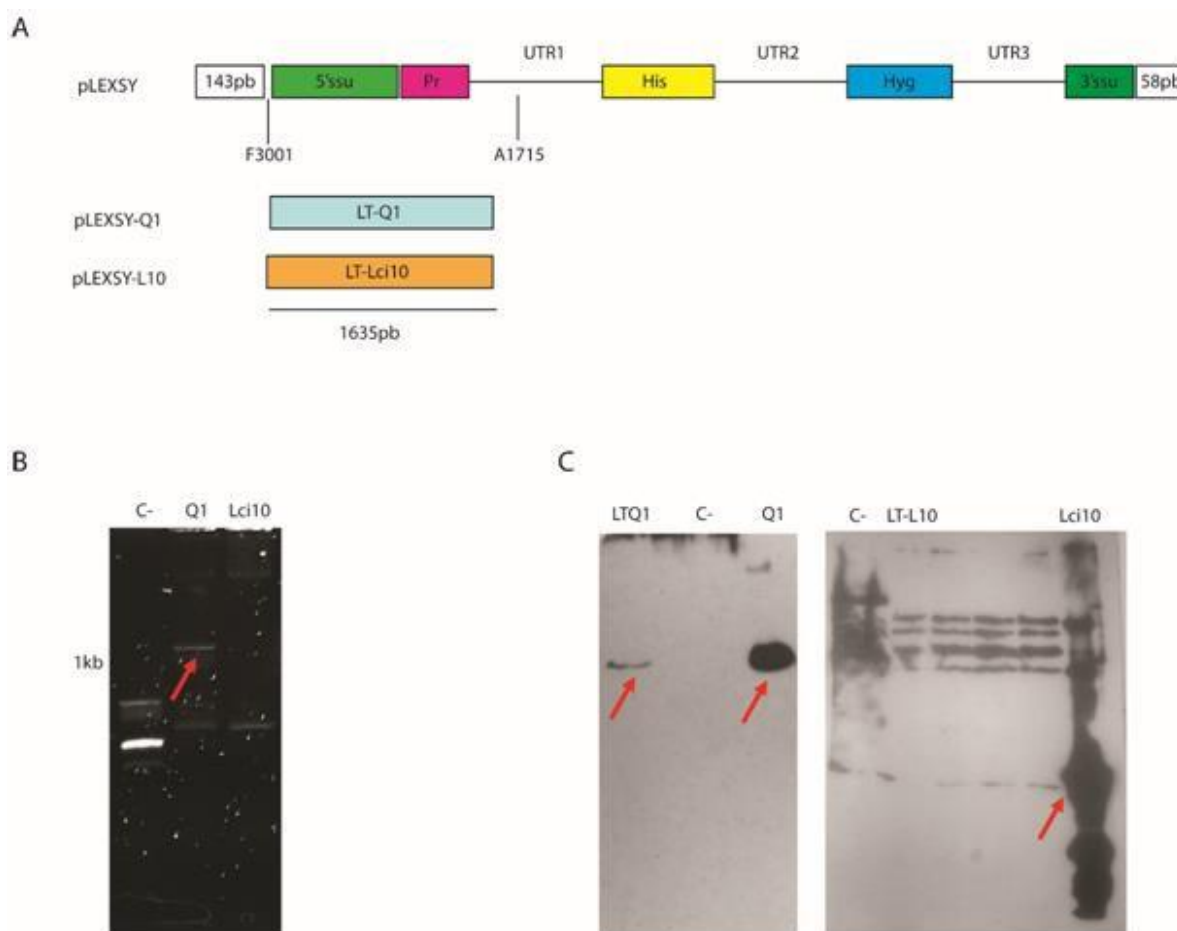


Figura 1. Cassete de construção dos genes, integração no genoma e avaliação da expressão. A: o cassete gênico mostra onde os genes devem integrar a transfecção, mostra também os primers 5' e 3' que foram utilizados para confirmar a integração. B: mostrando a integração no genoma da *Leishmania tarentolae* através da banda de 1635pb em gel de agarose. C: mostra os ensaios de WB com antígenos específicos para as proteínas recombinantes, porém não foi possível visualizar uma expressão eficiente no caso da Lci10.

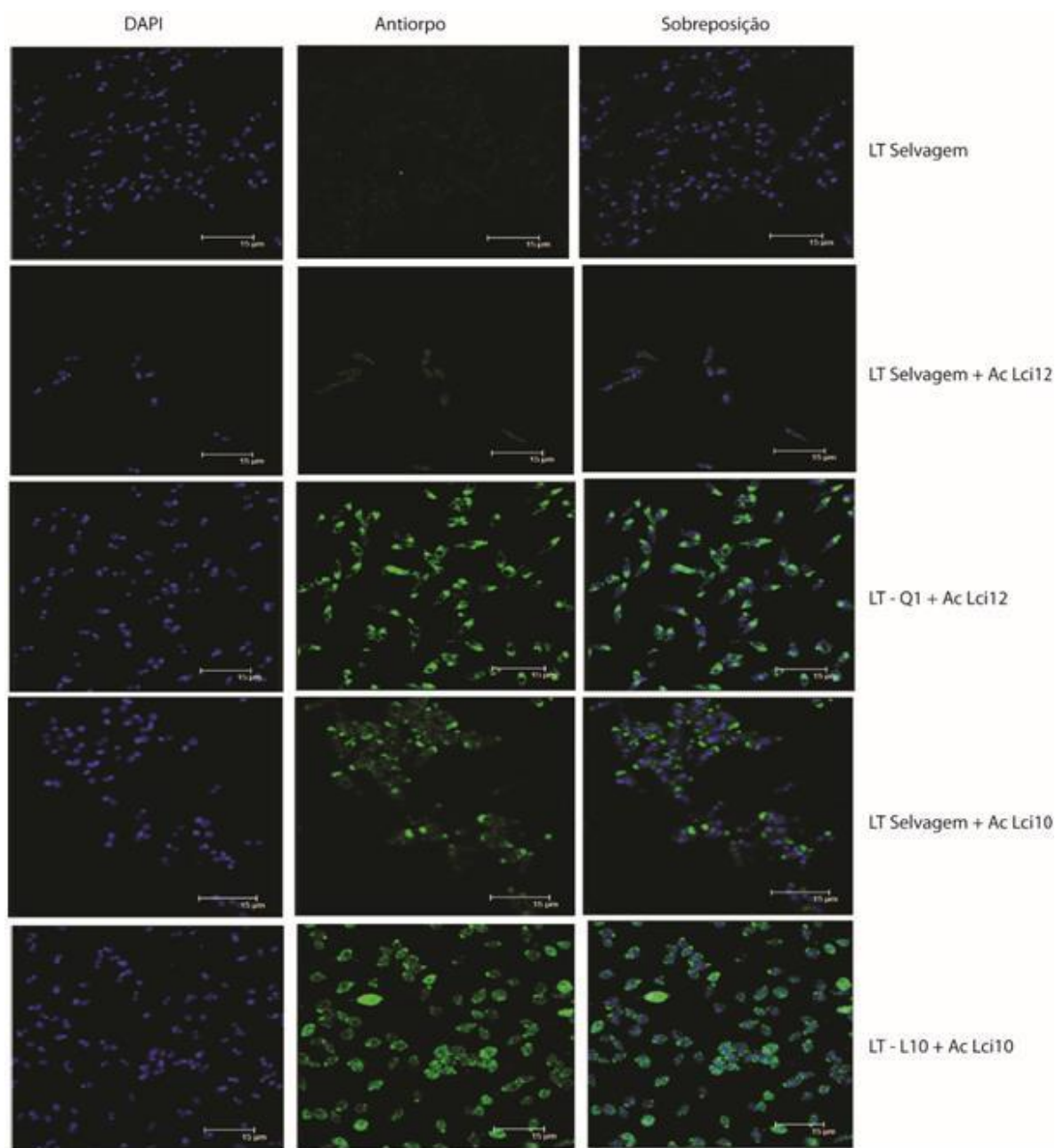


Figura 2. Imunofluorescência das construções na *Leishmania tarentolae*. A expressão no interior das células pode ser vista pela fluorescência em verde (nas construções) e nas células selvagens não há presença da marcação verde pelos anticorpos. Pode ser visto também em azul a marcação do núcleo e do cinetoplasto das *Leishmanias*, por fim, pode-se ver a sobreposição das duas primeiras imagens mostrando uma completa fluorescência da célula. LT=*Leishmania tarentolae*; Ac: Anticorpo.

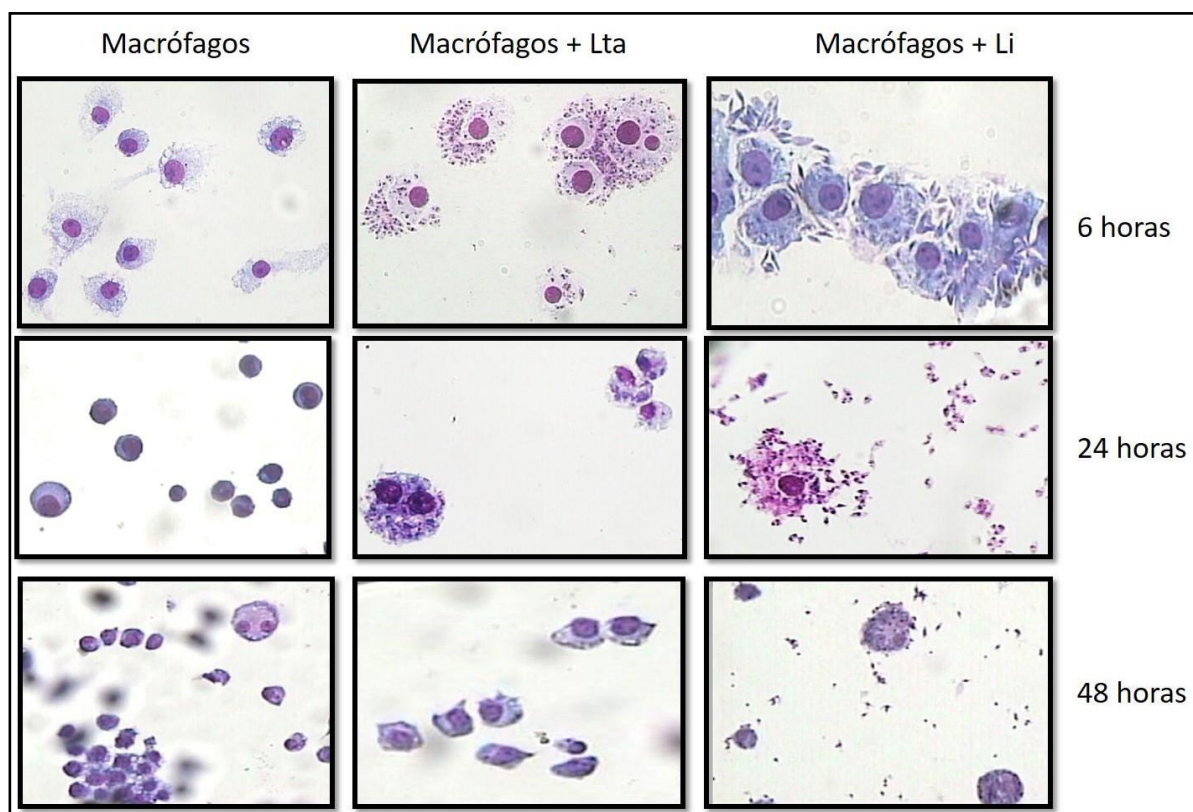


Figura 3. Cinética de infecção de *L. tarentolae* e *L. infantum* em macrófagos. A imagem mostra as infecções nos macrófagos pelas *Leishmania tarentolae* e *Leishmania infantum*. Podemos observar os macrófagos não infectados, macrófagos infectados com *L. tarentolae* e Macrófagos infectados com *L. infantum*, nos tempos de 6, 24 e 48 horas. Onde foi visto que no tempo de 6 horas as células de *L. tarentolae* estão dentro dos macrófagos.

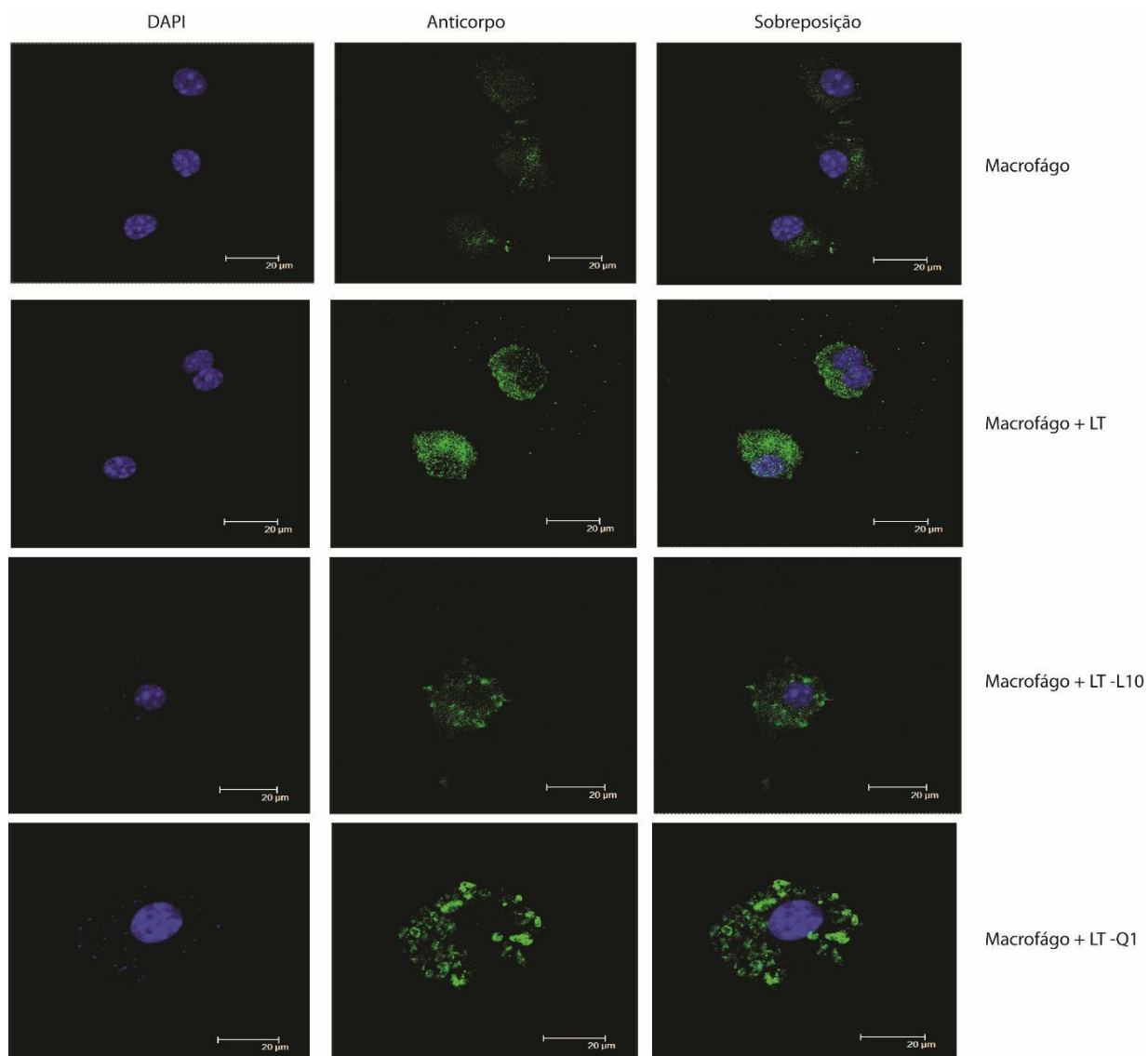


Figura 4. Imunofluorescência confocal de macrófago. Pode-se observar os pontos azuis no DAPI indicando o núcleo das amastigotas no interior dos macrófagos, como também em verde a expressão das proteínas pelas amastigotas infectando os macrófagos. Anticorpo Anti-Lci12; Anti-Lci10.

7. DISCUSSÃO GERAL

Os métodos de diagnóstico precoces para a Leishmaniose Visceral são de extrema importância, principalmente no caso dos cães que tem grande papel na epidemiologia da doença, não somente pelo fato do mesmo apresentar altas prevalências de infecção quando comparadas à espécie humana, mas também pelo elevado número de animais assintomáticos. (Dantas-Torres & Brandão-Filho 2006; Baneth et al. 2008; Paltrinieri et al. 2010). Os testes aplicados para o diagnóstico sorológico da Leishmaniose são baseados em sensibilidade, especificidade, viabilidade, aplicabilidade no campo (facilidade) e custo. Eles podem ser considerados vantajosos, como são minimamente invasivos e mais fáceis de realizar do que os métodos parasitológicos (COTA et al., 2012; LAGE et al., 2015).

Tendo em vista a aplicabilidade de testes sorológicos para a LV, estudos tem utilizado extrato bruto de *Leishmania infantum* como diagnóstico em testes de ELISA e esses testes tem mostrado sensibilidade e especificidade altos (MAIA; CAMPINO, 2008).

Uma problemática em utilizar extrato é com relação as reações cruzadas entre leishmaniose e com outras doenças parasitárias causada por determinantes antigênicos comuns, principalmente em regiões onde essas doenças são endêmicas, como mostra um estudo comparando antígenos recombinantes de *Leishmania infantum* (K26, K39 e A2) com o extrato bruto, e mostrando que o teste com extrato tem uma alta taxa de positividade (78%) com pacientes de Leishmaniose Tegumentar (PORROZZI et al., 2007). No presente trabalho foi possível verificar que o extrato bruto em ELISA apresentou reação cruzada com doença de Chagas também em outras plataformas de diagnóstico como: Imunofluorescência, Citometria de Fluxo e o DAT.

Um estudo semelhante também mostrou que o extrato para diagnóstico sorológicos de pacientes com LV tem sensibilidade e especificidade considerados eficientes nas plataformas de ELISA e na IF, porém estes testes apresentaram reatividade cruzada com outras doenças parasitárias principalmente a doença de Chagas (Pedras et al. 2008).

Observando as limitações dos estudos com extrato solúvel de *L. infantum*, pesquisas têm desenvolvido uma busca para melhorar a qualidade de antígenos recombinantes aplicados ao sorodiagnóstico tanto para utilização na LVC quanto na LVH (FARIA et al., 2015; FERNÁNDEZ COTRINA et al., 2018).

Estudos prévios mostraram que a utilização de antígenos recombinantes para diagnóstico para LV, identificados através de triagens em bibliotecas de expressão genômicas e de cDNA de *L. infantum* é de grande potencial para o diagnóstico da doença (BORJA et al., 2018; MAGALHÃES et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2011a). Outras proteínas recombinantes como: K9, K26, rK28 e KE16 foram avaliadas para o diagnóstico de LV com eficiência diagnóstica variável (MOHAPATRA et al., 2010; SIVAKUMAR et al., 2006).

Uma avaliação de dois testes rápidos *lateral flow* com o antígeno k28 em pacientes com LV forneceu altas sensibilidades no Sudão (95,9%) e em Bangladesh (98,1%) em comparação com o rK39 (PATTABHI et al., 2010). Sensibilidade e especificidade razoáveis (99,6% e 94,1% -100%, respectivamente) foram obtidos com a plataforma de ELISA, utilizando a rK28 para a detecção de anticorpos anti-Leishmania na Índia (Vaish, et al. 2012).

Visando o melhoramento dos testes diagnósticos e a identificação de antígenos recombinantes para LVH e LVC, nossos resultados utilizando soros de humanos e cães mostraram que uma mistura “Mix” de antígenos recombinantes obteve uma sensibilidade e especificidade considerada eficiente para os dois conjuntos de soros. Esta mistura, contudo, não foi melhor que antígenos individuais direcionados a uma ou outra forma da doença ou em relação a proteína utilizada atualmente em teste de diagnóstico comercial (k39) (MAGALHÃES et al., 2017).

A confecção de um único teste sorológico com misturas de antígenos recombinantes aumentaria os custos dos testes e dificultaria sua padronização. Portanto, buscou-se desenvolver uma única molécula que fosse capaz de aumentar a eficácia de ambos os testes, se possível simultaneamente. Identificou-se que a construção de proteínas quiméricas baseada na previsão de epítomos tem melhor desempenho nos resultados de ELISA que a utilização de antígenos individuais (CAMUSSONE et al., 2009).

Diante do exposto, este estudo identificou os melhores peptídeos das nossas proteínas individuais (Lci) e foi possível construir proteínas quiméricas baseadas nestes peptídeos que foram, em seguida, triadas com soros de cães e humanos infectados com LV, onde as quimeras Q1 e Q5 mostraram melhor eficiência no diagnóstico tanto da LVH quanto da LVC na plataforma de ELISA.

A construção de antígenos quiméricos, baseado em predição de peptídeos tem mostrado extrema eficácia para diagnóstico sorológico de doenças como, por exemplo, doença de Chagas e malária, onde foram vistos bons resultados de sensibilidade e especificidade na plataforma de ELISA (LU et al., 2015). Outra proteína quimérica (rCAg) desenvolvida e avaliada em teste *lateral flow* com soros de cães com LV, mostrou resultados de especificidade e sensibilidade eficientes no diagnóstico comparados com outros testes comerciais como: ELISA e IF (ANFOSSI et al., 2018). Já uma nova plataforma para o diagnóstico da LV utilizando proteína quimérica (LeQuiD) e fixada em látex também mostrou eficiência no diagnóstico da LVC (Valeria et al. 2017).

Um estudo utilizando uma proteína hipotética de *L. infantum* (LiHypA), foi avaliada por ELISA com soro de humanos com LV e LT e soro de cães com LV. Essa proteína apresentou resultados de sensibilidade e especificidade eficientes para diagnóstico tanto da forma humana quanto da canina em LV, além de diagnosticar pacientes com LT também, porém uma das limitações do teste é o quantitativo dos soros utilizados nos ensaios, onde foram utilizados apenas 45 soros de cães e 27 soros de pacientes com LT (CARVALHO et al., 2017). Nossos resultados corroboram a eficiência e potencial uso da nova proteína quimérica para o diagnóstico da LVH, e potencialmente da LVC, e são muito mais robustos justamente pela avaliação de um quantitativo bem mais elevado de soros caninos e humanos.

No Brasil a sensibilidade da recombinante k39 em TR e ELISA é alta, porém ainda há algumas variações na região onde esses testes são aplicados, sem falar no custo da produção desses testes, visto que esse antígeno é importado (LEMOS et al., 2003). Nossos dados de comparação da Q5 com soros de humanos nas duas plataformas mostram que a sensibilidade e especificidade do TR foi maior em comparação com o ELISA, e a Q5 consegue ser mais sensível

e específica que a k39 na plataforma de TR baseado nos resultados de sensibilidade. No caso dos soros de cães em nosso estudo, podemos mostrar uma sensibilidade menor no TR do que no ELISA para a Q5 e quando comparados com o teste DPP ela teve uma sensibilidade muito inferior, algo que precisa ser melhor compreendido. A diferença de sensibilidade nas plataformas pode ser explicada em estudos utilizando a k39, por exemplo, nas plataformas de TR e ELISA, onde o ELISA-k39 tem mais sensibilidade que o TR-k39 em soro de cães analisados (Maia e Campino 2008). Outro estudo utilizando a proteína quimera k28 em soros de humanos no Sudão mostrou uma variabilidade na sensibilidade em diferentes plataformas avaliadas (ELISA, TR e DPP), onde foi visto que a plataforma de DPP-k28 foi a melhor para identificar soros de humanos com LV (PATTABHI et al., 2010).

Com relação ao desenvolvimento de proteínas para a vacinação ou imunoterapia também se tem investido em estudos de predição de epítomos, mas nesse caso para células T, com a finalidade de melhorar a eficiência em relação as vacinas comerciais existentes (KASHYAP; JAISWAL; FAROOQ, 2017). O gene quimérico Q6 mostrou que os peptídeos inseridos em sua sequência têm forte ligação com os tipos I e II de MHC e ainda capacidade de estimular IL-4 e IFN- γ , o que seria de grande relevância na vacinação contra a Leishmaniose Tegumentar, quando os peptídeos isolados foram testados em linfoproliferação e estímulo de linfócitos T e pôde-se observar a presença de estímulo para Th1 (E SILVA et al., 2016; MARTINS et al., 2016).

Uma alternativa vacinal desenvolvida baseia-se na utilização de espécies não patogênicas á mamíferos e uma que tem se destacado pela proximidade evolutiva com as espécies de *Leishmania* de importância clínica é a *Leishmania tarentolae* (TAYLOR et al., 2010). Estudos têm mostrado que a *L. tarentolae* tem sido muito eficaz na expressão de antígenos recombinantes como estratégias de estimular o sistema imune. De fato, foi possível observar que este modelo estimula a maturação de células dendríticas, induz a proliferação de células T e a produção de interferon gama (IFN- γ), ocasionando no desvio de células T (CD4+) para uma resposta das células T auxiliares (Th1) (MIZBANI et al., 2009).

O uso de proteínas quiméricas para vacinação pode então ser utilizado para compor uma forma de vacinação atenuada utilizando a *Leishmania tarentolae*, onde nosso estudo mostrou uma expressão de proteínas quiméricas neste modelo de forma contínua nas fases promastigotas (extracelular) e amastigotas (intracelular).

Um outro estudo avaliou a eficácia de uma nova combinação de fusões de proteínas recombinantes expressas em *L. tarentolae* que foram inoculadas em animais (Balb/c) gerando uma imunidade protetora significativa contra a infecção por *L. major* (Zahedirfard et al, 2014). Avançado um pouco mais, já utilizando uma fusão de proteínas nesse modelo vacinal em cães, mostrou-se que apesar de ter induzido uma proteção parcial nos animais a *Leishmania tarentolae* é considerada uma boa proposta para vacina atenuada contra a LVC (SHAHBAZI et al., 2015).

Estes estudos justificam a continuidade dos trabalhos com o modelo de *L. tarentolae* e que, com as proteínas quiméricas avaliadas nesta Tese, podem realmente constituir uma alternativa válida para a indução de imunidade protetora contra a LV.

8. CONCLUSÕES

1. Foi observada uma alta sensibilidade do extrato total de *Leishmania infantum* para diagnóstico sorológico da LV, porém apresentando reação cruzada com outras parasitoses (Chagas e Leishmaniose Tegumentar).
2. Uma mistura de proteínas recombinantes (Lci1, Lci12 e Lci13) se mostrou melhor que proteínas individuais no diagnóstico de ambas as LVH e LVC, porém gera maior custo e dificuldade na padronização de um teste.
3. Proteínas quiméricas (Q1 e Q5) baseadas em antígenos previamente identificados, em ensaios de ELISA, tem alta capacidade de identificar tanto pacientes humanos quanto cães infectados com Leishmaniose Visceral.
4. A nova proteína quimérica Q5, desenvolvida neste trabalho, tem eficácia no diagnóstico da LV em humanos e cães em teste rápido.
5. De acordo com predições, as proteínas recombinantes Lci6 e Lci12, previamente caracterizadas, tem muitos peptídeos promissores com potencial de estimular uma resposta imune celular eficiente em humanos e a construção de uma proteína quimérica (Q6) pode ser uma alternativa como proposta vacinal, porem estudos mais robusto são necessários.
6. A *Leishmania tarentolae* foi capaz de expressar proteínas recombinantes e infectar macrófagos, gerando formas semelhantes a amastigota com expressão continuada destas proteínas, podendo ser utilizada como vacina para a LVC.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, E. R. et al. Leishmaniasis Direct Agglutination Test: Using Pictorials as Training Materials to Reduce Inter-Reader Variability and Improve Accuracy. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 12, p. 1–6, 2012.

ALVAR, J. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, 2012.

ANFOSSI, L. et al. A versatile and sensitive lateral flow immunoassay for the rapid diagnosis of visceral leishmaniasis. p. 4123–4134, 2018.

ARIANE BARATTA-MASINI, ANDRÉA TEIXEIRA-CARVALHO, LUIZ COSME COTTA MALAQUIAS, WILSON MAYRINK, O. A. M.-F. AND R. C.-O. Centro de Pesquisas René Rachou-FIOCRUZ, Belo Horizonte, MG, Brazil, 2 Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB, UFMG, Belo Horizonte, MG, Brazil, 3 Universidade Vale do Rio Doce, Governador Valadares, MG, Brazil, 4 Departamento de Parasitologia, ICB,. **In Vitro**, p. 839–849, 2007.

BABAKHAN, L. et al. Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: A comparative study using fast agglutination screening test (FAST) and direct agglutination test (DAT) in Iran. **Parasitology Research**, v. 105, n. 3, p. 717–720, 2009.

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, 2008.

BEVILACQUA, P. D.; ALVES, W. A. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 20, n. 1, p. 259–265, 2004.

BOELAERT, M. et al. A comparative study of the effectiveness of diagnostic tests for visceral leishmaniasis. **Am.J.Trop.Med.Hyg.**, v. 70, n. 1, p. 72–77, jan. 2004.

BOELAERT, M. et al. Diagnostic tests for kala-azar: a multi-centre study of the freeze-dried DAT, rK39 strip test and KAtex in East Africa and the Indian subcontinent. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 102, n. 1, p. 32–40, 2008.

BOGDAN, C.; RÖLLINGHOFF, M.; DIEFENBACH, A. The role of nitric oxide in innate immunity. **Immunological Reviews**, v. 173, n. 1, p. 17–26, 2000.

BONGIORNO, G. et al. Vaccination with LiESP/QA-21 (CaniLeish®) reduces the intensity of infection in *Phlebotomus perniciosus* fed on *Leishmania infantum* infected dogs-A preliminary xenodiagnosis study. **Veterinary Parasitology**, v. 197, n. 3–4, p. 691–695, 2013.

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, 2018.

BRASIL, M. DA S. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. [s.l.: s.n.].

BRASIL, M. DA S. Guia de vigilancia em Saúde. p. 773, 2016.

BRETON, M. et al. Live nonpathogenic parasitic vector as a candidate vaccine against visceral leishmaniasis. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 10, p. 6372–6382, 2005.

CAMUSSONE, C. et al. Comparison of recombinant *Trypanosoma cruzi* peptide mixtures versus multiepitope chimeric proteins as sensitizing antigens for immunodiagnosis. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 16, n. 6, p. 899–905, 2009.

CAÑAVATE, C. 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. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 84, n. 1, p. 102–106, 2011.

CARCELÉN, J. et al. The Chimerical Multi-Component Q protein from *Leishmania* in the absence of adjuvant protects dogs against an experimental *Leishmania infantum* infection. **Vaccine**, v. 27, n. 43, p. 5964–5973, 2009.

CARVALHO, A. M. R. S. et al. An ELISA immunoassay employing a conserved *Leishmania* hypothetical protein for the serodiagnosis of visceral and tegumentary leishmaniasis in dogs and humans. **Cellular Immunology**, v. 318, n. April, p. 42–48, 2017.

CHAPPUIS, F. et al. A meta-analysis of the diagnostic performance of the direct agglutination test and rK39 dipstick for visceral leishmaniasis. **BMJ (Clinical research**

ed.), v. 333, n. 7571, p. 723, 2006.

CHAPPUIS, F. et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 11, p. S7–S16, 2007.

COTA, G. F. et al. The diagnostic accuracy of serologic and molecular methods for detecting visceral leishmaniasis in HIV infected patients: Meta-analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 5, 2012.

DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Expansão geográfica da leishmaniose visceral no Estado de Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 4, p. 352–356, 2006.

DAVID SACKS AND SHADEN KAMHAWI. MOLECULAR ASPECTS OF PARASITE-VECTOR AND VECTOR-HOST INTERACTIONS IN LEISHMANIASIS. p. 173–213, 2001.

DAWN M. WALKER, STEVE OGHUMU, GAURAV GUPTA, BRADFORD S. MCGWIRE, MARK E. DREW, AND A. R. S. Mechanisms of cellular invasion by intracellular parasites. v. 71, n. 7, p. 1245–1263, 2015.

DHANDA, S. K. et al. Novel in silico tools for designing peptide-based subunit vaccines and immunotherapeutics. **Briefings in Bioinformatics**, v. 18, n. 3, p. 467–478, 2017.

DUTHIE, M. S.; REED, S. G. Not All Antigens Are Created Equally: Progress, Challenges, and Lessons Associated with Developing a Vaccine for Leishmaniasis. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 24, n. 7, p. e00108-17, 2017.

E SILVA, R. DE F. et al. Combination of in silico methods in the search for potential CD4+ and CD8+ T cell epitopes in the proteome of *Leishmania braziliensis*. **Frontiers in Immunology**, v. 7, n. AUG, 2016.

EVANS, K. J.; KEDZIERSKI, L. Development of vaccines against visceral leishmaniasis. **Journal of Tropical Medicine**, v. 2012, 2012.

FARIA, A. R. et al. Novel Recombinant Multiepitope Proteins for the Diagnosis of Asymptomatic *Leishmania infantum*-Infected Dogs. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 1, p. 13–16, 2015.

FERNÁNDEZ COTRINA, J. et al. A large-scale field randomized trial demonstrates safety and efficacy of the vaccine LetiFend® against canine leishmaniosis. **Vaccine**, v. 36, n. 15, p. 1972–1982, 2018.

FERRER-MIRALLES, N. et al. Microbial factories for recombinant pharmaceuticals. **Microbial Cell Factories**, v. 8, p. 1–8, 2009.

GOMES, Y. M. et al. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Biotechnological advances. **Veterinary Journal**, v. 175, n. 1, p. 45–52, 2008.

GONÇALVES, S. A. et al. Leishmaniose visceral : um desafio às políticas de saúde brasileiras Visceral leishmaniasis : a challenge to Brazilian health policy. **NBC-Periódico Científico do Núcleo de Biociências**, v. 03, n. 06, p. 1–21, 2013.

GONZALEZ-LOMBANA, C. et al. IL-17 Mediates Immunopathology in the Absence of IL-10 Following Leishmania major Infection. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 3, 2013.

GRIMALDI, G. 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, 2012.

GUSTAVO A. S. ROMERO, M. B. Control of Visceral Leishmaniasis in Latin America—A Systematic Review Gustavo. **Journal of Sports Medicine and Physical Fitness**, v. 20, n. 2, p. 181–188, 2010.

IKEDA-GARCIA, F. A. et al. Clinical and parasitological evaluation of dogs naturally infected by Leishmania (Leishmania) chagasi submitted to treatment with meglumine antimoniate. **Veterinary Parasitology**, v. 143, n. 3–4, p. 254–259, 2007.

JOSHI, S. et al. Visceral leishmaniasis: Advancements in vaccine development via classical and molecular approaches. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. AUG, p. 1–18, 2014.

KASHYAP, M.; JAISWAL, V.; FAROOQ, U. Prediction and analysis of promiscuous T cell-epitopes derived from the vaccine candidate antigens of Leishmania donovani binding to MHC class-II alleles using in silico approach. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 53, p. 107–115, 2017.

KATARA, G. K. et al. Analysis of localized immune responses reveals presence of Th17 and Treg cells in cutaneous leishmaniasis due to Leishmania tropica. n. II, 2013.

KORN, T. et al. IL-17 and Th17 Cells. **Annu. Rev. Immunol.**, 2009.

KUMAR, R.; PAI, K.; PATHAK, K. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Recombinant K39 Antigen in Diagnosis and Prognosis of Indian Visceral

Leishmaniasis. v. 8, n. 6, p. 1220–1224, 2001.

LAGE, D. P. et al. Prophylactic properties of a Leishmania-specific hypothetical protein in a murine model of visceral leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 37, n. 12, p. 646–656, 2015.

LARSEN, M. V. et al. An integrative approach to CTL epitope prediction: A combined algorithm integrating MHC class I binding, TAP transport efficiency, and proteasomal cleavage predictions. **European Journal of Immunology**, v. 35, n. 8, p. 2295–2303, 2005.

LEE, Y. K. et al. Developmental plasticity of Th17 and Treg cells. p. 274–280, 2009.

LEMOS, E. M. et al. Avaliação do teste rápido utilizando o antígeno recombinante k39 no diagnóstico da leishmaniose visceral no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36 Suppl 2, n. Suplemento II, p. 36–38, 2003.

LU, Y. et al. Chimeric peptide constructs comprising linear B-cell epitopes: Application to the serodiagnosis of infectious diseases. **Scientific Reports**, v. 5, n. July, p. 1–11, 2015.

M. AMEEN. Cutaneous leishmaniasis: advances in disease pathogenesis, diagnostics and therapeutics. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 71, n. 6, p. 2981–2982, 2010.

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, 2017.

MAIA, C.; CAMPINO, L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. **Veterinary Parasitology**, v. 158, n. 4, p. 274–287, 2008.

MANISHA VAISH, AJAY BHATIA, STEVEN G. REED, JAYA CHAKRAVARTY, AND SHYAM SUNDAR. Evaluation of rK28 antigen for Serodiagnosis of Visceral Leishmaniasis in India. v. 18, n. 1, p. 81–85, 2012.

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. 3–4, p. 649–652, 2013.

MARCONDES, M.; ROSSI, C. N. Leishmaniose visceral no Brasil. **Braz. J. Vet. Res.**

Anim. Sci., São Paulo, v. 50, n. 5, p. 341–352, 2013.

MARIANA JUNQUEIRA PEDRAS, LUCIANA DE GOUÊVA VIANA, EDWARD JOSÉ DE OLIVEIRA, A. R. Comparative evaluation of direct agglutination test , rK39 and soluble antigen ELISA and IFAT for the diagnosis of visceral leishmaniasis. p. 172–178, 2008.

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

MARTINS, V. T. et al. A recombinant fusion protein displaying murine and human MHC class I- and II-specific epitopes protects against *Leishmania amazonensis* infection. p. 1–11, 2016.

MATOS, G. I. et al. IFNG +874T/A polymorphism is not associated with American tegumentary leishmaniasis susceptibility but can influence *Leishmania* induced IFN- γ production. **BMC Infectious Diseases**, v. 7, p. 1–6, 2007.

METTLER, M. et al. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, an immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania* infections in dogs. **J.Clin.Microbiol.**, v. 43, n. 0095–1137 (Print), p. 5515–5519, nov. 2005.

MIZBANI, A. et al. Recombinant *Leishmania tarentolae* expressing the A2 virulence gene as a novel candidate vaccine against visceral leishmaniasis. **Vaccine**, v. 28, n. 1, p. 53–62, 2009.

MOHAPATRA, T. M. et al. Brief Original Article Comparative evaluation of rK9 , rK26 and rK39 antigens in the serodiagnosis of Indian visceral leishmaniasis. p. 2–5, 2010.

MORENO, J. et al. Use of a liesp/qa-21 vaccine (canileish) stimulates an appropriate th1-dominated cell-mediated immune response in dogs. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 6, 2012.

NASCIMENTO, MANUELA SALES LIMA, CARREGARO, V. et al. IL-17A ACTS SYNERGISTICALLY WITH IFN- γ TO PROMOTE PROTECTION AGAINST *Leishmania infantum* INFECTION. p. 1–14, 2014.

NOZZI, M. et al. Leishmaniasis and autoimmune diseases in pediatric age. **Cellular**

Immunology, v. 292, n. 1, p. 9–13, 2014.

NYLÉN, S.; GAUTAM, S. Immunological perspectives of leishmaniasis. **Journal of Global Infectious Diseases**, v. 2, n. 2, p. 135, 2010.

OLIVA, G. et al. A Randomised, Double-Blind, Controlled Efficacy Trial of the LiESP/QA-21 Vaccine in Naïve Dogs Exposed to Two *Leishmania infantum* Transmission Seasons. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 10, 2014.

OLIVEIRA, G. G. et al. Characterization of novel *Leishmania infantum* recombinant proteins encoded by genes from five families with distinct capacities for serodiagnosis of canine and human visceral leishmaniasis. **Am.J.Trop.Med.Hyg.**, v. 85, n. 1476–1645 (Electronic), p. 1025–1034, dez. 2011a.

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. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 85, n. 6, p. 1025–1034, 2011b.

PACHECO, A. D. et al. *Leishmania* sp. infection in dogs from Florianópolis. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci., São Paulo**, v. 50, n. 3, p. 220–225, 2013.

PALTRINIERI, S. et al. Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 236, n. 11, p. 1184–1191, 2010.

PALTRINIERI, S. et al. Laboratory tests for diagnosing and monitoring canine leishmaniasis. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 45, n. 4, p. 552–578, 2016.

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, 2010.

PAUL D READY. Epidemiology of visceral leishmaniasis. n. MAY 2014, p. 147–154, 2014.

PORROZZI, R. et al. Comparative Evaluation of Enzyme-Linked Immunosorbent Assays Based on Crude and Recombinant Leishmanial Antigens for Serodiagnosis of Symptomatic and Asymptomatic *Leishmania infantum* Visceral Infections in Dogs . v. 14, n. 5, p. 544–548, 2007.

QUINNELL, R. J. et al. Evaluation of rK39 Rapid Diagnostic Tests for Canine Visceral

Leishmaniasis: Longitudinal Study and Meta-Analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 1, 2013.

REGINA-SILVA, S. et al. Field randomized trial to evaluate the efficacy of the Leish-Tec® vaccine against canine visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. **Vaccine**, v. 34, n. 19, p. 2233–2239, 2016.

REITHINGER, R. et al. Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: Comparative study using an immunochromatographic dipstick test, enzyme-linked immunosorbent assay, and PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 7, p. 2352–2356, 2002.

ROBERTS, M. T. M. Current understandings on the immunology of leishmaniasis and recent developments in prevention and treatment. **British Medical Bulletin**, v. 75–76, n. 1, p. 115–130, 2006.

SANTARÉM, N. et al. Application of an improved enzyme-linked immunosorbent assay method for serological diagnosis of canine leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 5, p. 1866–1874, 2010.

SHAHBAZI, M. et al. Evaluation of live recombinant nonpathogenic *leishmania tarentolae* expressing cysteine proteinase and A2 genes as a candidate vaccine against experimental canine visceral leishmaniasis. **PLoS ONE**, v. 10, n. 7, p. 1–22, 2015.

SHAW, J. The leishmaniasis - Survival and expansion in a changing world. A mini-review. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 5, p. 541–546, 2007.

SIVAKUMAR, R. et al. Cloning , expression , and purification of a novel recombinant antigen from *Leishmania donovani* & , &&. v. 46, p. 156–165, 2006.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. Diagnostic Challenges in the Era of Canine *Leishmania infantum* Vaccines. **Trends in Parasitology**, v. xx, p. 1–12, 2017.

SRIVASTAVA, P. et al. **Diagnosis of visceral leishmaniasis** **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, , 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.trstmh.2010.09.006>>

SRIVASTAVA, S. et al. Possibilities and challenges for developing a successful vaccine for leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, p. 277, 2016.

SRIVIDYA, G. et al. Diagnosis of visceral leishmaniasis: Developments over the last

decade. **Parasitology Research**, v. 110, n. 3, p. 1065–1078, 2012.

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

SUNDAR, S.; RAI, M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. **Clin.Diagn.Lab Immunol.**, v. 9, n. 1071–412X (Print), p. 951–958, set. 2002.

TAYLOR, V. M. et al. Leishmania tarentolae: Utility as an in vitro model for screening of antileishmanial agents. **Experimental Parasitology**, v. 126, n. 4, p. 471–475, 2010.

TEWARY, P. et al. Immunostimulatory oligodeoxynucleotides are potent enhancers of protective immunity in mice immunized with recombinant ORFF leishmanial antigen. **Vaccine**, v. 22, n. 23–24, p. 3053–3060, 2004.

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. 1–13, 2018.

VALERIA S. GARCÍA, VERÓNICA D.G. GONZALEZ, LUIS GUGLIOTTA, ALEXIS BURNA, ANA DEMONTE, DIEGO G. ARIAS, MATÍAS S. CABEZA, S. A. G. Experimental Parasitology Development of a simple and economical diagnostic test for canine leishmaniasis. v. 182, 2017.

WOLK, K. et al. Deficient cutaneous antibacterial competence in cutaneous T-cell lymphomas: Role of Th2-mediated biased Th17 function. **Clinical Cancer Research**, v. 20, n. 21, p. 5507–5516, 2014.

ZAHEDIFARD, F. et al. Enhanced Protective Efficacy of Nonpathogenic Recombinant Leishmania tarentolae Expressing Cysteine Proteinases Combined with a Sand Fly Salivary Antigen. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 3, 2014.

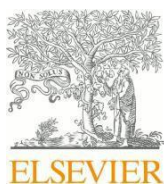
APÊNDICE A

Avaliação do desempenho de imunoglobulina G (IgG) anti-fixadas de *Leishmania infantum* detectada por citometria de fluxo como uma ferramenta de diagnóstico para leishmaniose visceral

Artigo anexo na página seguinte,

OBS: O autor desta tese foi co-autor deste artigo e ajudou na elaboração e desenvolvimento dos ELISAs com extrato total em pacientes com LV, bem como com a análise dos dados gerados.

Resumo dos principais resultados: O extrato solúvel de *L. infantum* foi utilizado para avaliar soros de pacientes com LV em algumas plataformas de diagnóstico sorológico. Ele mostrou sensibilidade (86%) e especificidade (67%) no ELISA, porém dependendo da técnica a qual era acoplado houve uma variação nos valores, além de mostrar relação cruzada com pacientes com a doença de Chagas.



Research paper

Performance evaluation of anti-fixed *Leishmania infantum* promastigotes immunoglobulin G (IgG) detected by flow cytometry as a diagnostic tool for visceral Leishmaniasis☆

Elis D. Silva ^{a, *}, Beatriz C. Oliveira ^a, Andresa P. Oliveira ^a, Wagner J.T. Santos ^a, George T. Diniz ^a, Osvaldo P. de Melo Neto ^a, Carlos H.N. Costa ^b, Mauro R.B. Silva ^c, Luiz D. Andrade ^a, Zulma M. Medeiros ^{a, d, 1}, Valéria R.A. Pereira ^{a, 1}

^a Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz-Pernambuco), Instituto Aggeu Magalhães, Recife, Pernambuco, Brazil

^b Instituto de Doenças Tropicais Natan Portella (IDTNP), Teresina, Piauí, Brazil

^c Universidade Estadual do Piauí, Teresina, Piauí, Brazil

^d Faculdade de Ciências Médicas, Universidade de Pernambuco, Recife, Brazil.

ARTICLE INFO

Keywords:

Flow cytometry

IgG

Serodiagnosis

Leishmania infantum

Visceral leishmaniasis

ABSTRACT

Visceral Leishmaniasis (VL) is a severe disease, caused by the protozoans *Leishmania infantum* and *L. donovani* that is widely diagnosed using serological tools. These, however, have limitations in performance that limit their use for the correct identification of the cases. This study aimed to evaluate the performance of flow cytometry with fixed parasites for VL diagnosis, comparing it with four other serological tests. Samples from two endemic VL regions in Brazil, diagnosed by direct examination (DG1) and by at least two or one standard serological test (DG2 and DG3, respectively), as well as patients with chronic Chagas' disease (CG1) and healthy controls (CG2) were used in this study. The flow cytometry results were expressed as levels of IgG reactivity, based on the percentage of positive fluorescent parasites (PPFP). Using a 1:4096 serum dilution, a ROC curve analysis of the serum titration on flow cytometry has indicated a PPFP of 2% as the cutoff point to segregate positive and negative results. In the present study, flow cytometry had the best performance for DG1 (sensitivity of 96%) while rK39 (immunochromatographic rapid test) and DAT (Direct agglutination test) were also associated with high sensitivity and specificity. The substantial agreement and kappa indexes observed suggested similar performances between these two tests and flow cytometry. IFAT (Immunofluorescent antibody test) and ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) had lower performances and the lower values of agreement with flow cytometry. Together, these findings suggest that although adjustments are needed in order to reduce cross reactivity with other trypanosomatids, flow cytometry has the potential to be a safe serological alternative for the diagnosis of VL.

1. Introduction

Visceral leishmaniasis (VL) is a neglected, highly lethal disease, which is endemic in 76 countries and found in 12 American countries, with Brazil having the highest endemicity and responsible for 96% of

the cases reported from the Americas. In this continent, the disease is caused by the protozoa *Leishmania infantum*, part of the *Leishmania donovani* complex (Organização Pan-Americana da Saúde., 2018).

The diagnosis of VL is based on clinical signs and symptoms of patients and is confirmed by laboratory tests (Chappuis et al., 2007). The difficulty in diagnosing patients delays the treatment and, therefore, increases the lethality of the disease (Coura-vital et al., 2014). Despite

Abbreviations: IFAT, Immunofluorescent antibody test; DAT, Direct agglutination test; DG, Diagnostic group; CG, Control group; FITC, Fluorescein isothiocyanate; PPFP, Percentage of positive fluorescent parasites; CI, Confidence interval; PPV, Positive predictive value; NPV, Negative predictive value; AC, Accuracy; VL, Visceral Leishmaniasis; CV, Coefficient of Variation.

* Journal of Immunological Methods

Corresponding author.

Email address: dionisio.elis@gmail.com (E.D. Silva)

¹ Co-senior authors.

<https://doi.org/10.1016/j.jim.2019.02.009>

Received 28 June 2018; Received in revised form 8 February 2019; Accepted 22 February

2019 Available online xxx

0022-1759/ © 2018.

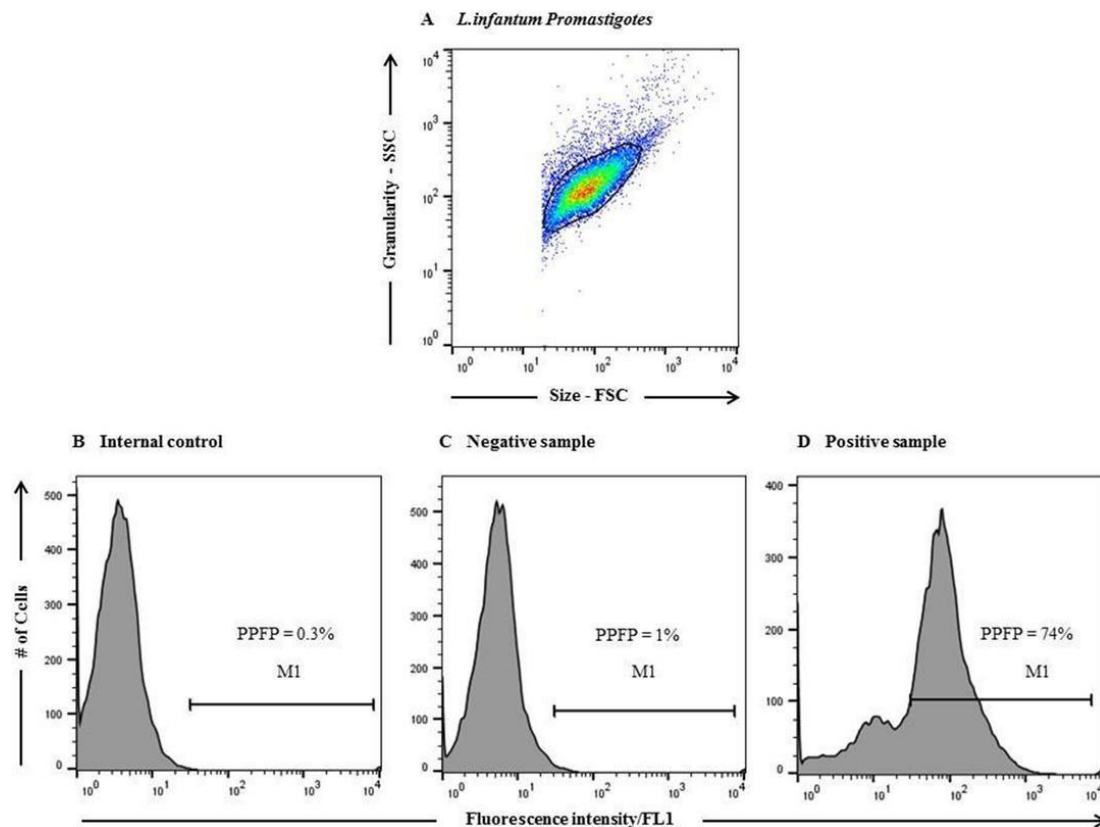


Fig. 1. Representative flow cytometry serology charts used to analyze IgG's reactivity anti-fixed *L. infantum* promastigotes in human serum samples. Promastigotes were selected on a dot plot based on their FSC (size) versus SSC (granularity). Fixed parasites were found to assume a homogeneous distribution (A). The relative FL1/FITC fluorescence intensity was quantified in the absence of human serum but in the presence of the FITC-conjugated anti-human IgG (internal control). This condition leads to the establishment of a maximum value of reactivity and determination of the marker M1 (positive region) (B). IgG's reactivity is provided in histograms for each serum samples as PPFP, which represents the frequency of parasite shift towards a higher fluorescence intensity, across M1. This marker was maintained to determine the reactivity in all data analyses performed in sera from both negative (C) and positive (D) samples for VL.

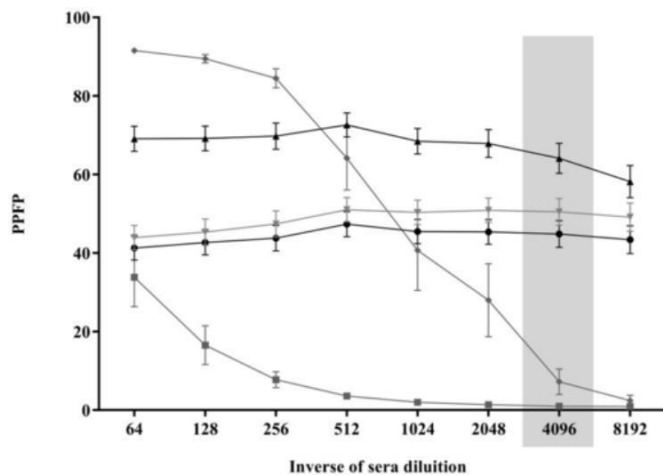


Fig. 2. IgG antibody titration curve detected by flow cytometry of Anti-fixed *Leishmania infantum* promastigotes stratified by groups. DG1 (▲) (n=51, DG2 (○) n=73, DG3 (●) n=82, CG1 (□) n=15, CG2 (◇) n=18. The gray rectangle corresponds to the titration of 1:4096 which was the region of greatest separation among the VL positive groups analyzed and both sets of controls. PPFP=Percentage of Positive Fluorescent Parasites. Bars show the 95% confidence intervals.

the availability of several tests, none can diagnose all cases and their effectiveness varies among different geographic regions (Boelaert et al., 2008; Cunningham et al., 2012; Abass et al., 2015). *Leishmania* identification in bone marrow aspirates is the gold standard for VL diagnosis, but its routine execution is hampered by the need for qualified profes-

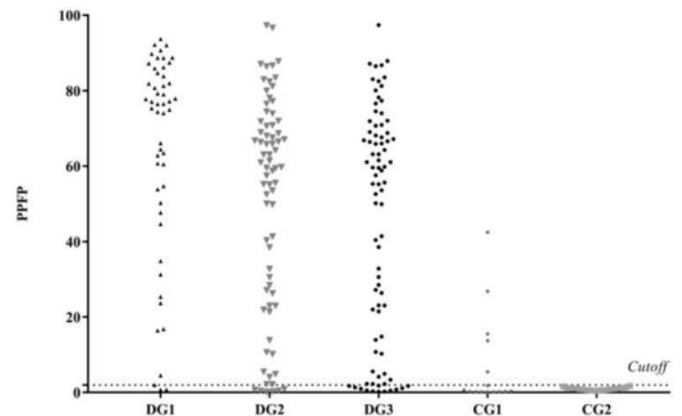


Fig. 3. Distribution of IgG reactivity of promastigote forms of *L. infantum* stratified by groups. DG1 (▲) n=51, DG2 (○) n=73, DG3 (●) n=82, CG1 (□) n=15, CG2 (◇) n=18. All groups are at the 1:4096 dilution and samples above the cutoff 2% PPFP (Percentage of Positive Fluorescent Parasites) are considered positive.

sionals and an appropriate collection environment (Maia et al., 2012). Serological tests are widely used for the diagnosis of VL, but they have limitations, such as a failure to discriminate between recent and late infections, which make it impossible to use them as cure criteria. In addition, they may cross-react with other parasites (Boelaert et al., 2004; Sakkas et al., 2016).

In this context, studies with flow cytometry have shown its capacity to diagnose VL (Andrade et al., 2007) and Chagas disease (Vitelli-Avelar et al., 2007). Flow cytometry has high sensitivity and specificity

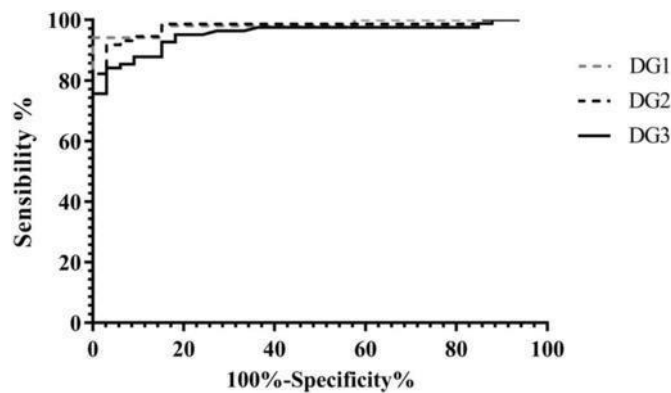


Fig. 4. ROC curve by performance indexes, sensitivity and specificity of flow cytometry for all groups analyzed. The ROC curve analysis was applied to establish the best cutoff point to discriminate PPFP values from positive and negative samples and indicate the area under the curve (AUC=global accuracy). ROC curve of samples at dilution 1:4096 indicating a cutoff point of 2%.

values, and could be used as a diagnosis and cure criterion of Chagas disease (Martins-Filho et al., 1995; Matos et al., 2011); cutaneous leishmaniasis (Rocha et al., 2002; Pereira et al., 2012); VL (Lemos et al., 2007; Garcia et al., 2009), and also for post-vaccine control of canine visceral leishmaniasis (Andrade et al., 2007; Ker et al., 2013).

The aims of this study were to evaluate the performance of flow cytometry and its comparison with four other serological tests for the diagnosis of visceral leishmaniasis. Additionally we have also evaluated the performance of flow cytometry to detect cross-reactivity in patients with chronic Chagas' disease.

2. Materials and methods

2.1. Serum samples and study population

The population was defined for convenience of sample size, with the serum samples from two VL endemic areas from northeastern Brazil (Pernambuco and Piauí) divided into three diagnostic (DG) and two control groups (CG). DG1, 2 and 3 were defined using the parasite identification in bone marrow aspirate and four serological tests (DAT, ELISA, rK39 rapid test and IFAT). The groups were: DG1-51 patients with positive VL according to the presence of *Leishmania* parasites in aspirates of bone marrow; DG2-73 patients with positive VL confirmed by at least two serological tests; DG3-82 patients with positive VL confirmed by at least one serological test; CG1-15 patients with chronic Chagas' disease; CG2-18 healthy individuals with no history of VL from non-endemic areas. All serum samples were collected in vacutainer tubes (BD Biosciences), processed by centrifugation (1000 g, 10min, room temperature), inactivated by heating for 30min at 56°C and centrifuged at 4°C, 1000 g for five minutes. After centrifugation, the supernatant was aliquoted and kept at -20°C until further use. All human serum was collected after approval of their use by the appropriate ethics committees from the Federal University of Piauí (0116/2005) and from IAM-FIOCRUZ (CAEE 51603115.7.0000.5190).

Table 1

Mean Intra-Assay and Inter-Assay Percentage Coefficients of Variation (CVs) and 95% Confidence Intervals (CIs) for high, medium and low controls across Multiple Assays of flow cytometer anti-IgG for *L. infantum*.

Intra-assay Inter-assay						
	No. of samples	Mean % PPFP (95% CI) _a	Mean % CV (95% CI)	No. of samples	Mean % PPFP (95% CI)	Mean % CV (95% CI)
High Control	5	75 (66–84)	4 (0.8–6.5)	27	71 (66–75)	13 (10–16)
Medium Controls	5	20 (7–27)	5 (3–7)	5	20 (13–26)	8 (3.5–12)
Low Controls	5	0.2 (0.1–0.2)	13(3–23)	5	0.2 (0.1–0.2)	10.5 (7–14)

^a CI=Confidence Interval.

2.2. Parasite preparation

The promastigote forms of *L. infantum* strain MHOM/BR/70/BH46 were cultured at 26°C *in vitro* in Schneider's medium associated with Novy-MacNeal-Nicolle (NNN) medium. Parasites were subjected to expansion and centrifuged at low speed (400 g, 10min, room temperature). For the ELISA assays, the pelleted promastigote cells were washed three times with a phosphate-buffered saline (PBS), pH7.2, 4°C, followed by resuspension in lysis buffer (50mM NaCl, 10mM EDTA, 50mM Tris-HCl, pH8.0) supplemented with 1mM of the protease inhibitors N-ethylmaleimide (NEM) and phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF). Lysis was performed by cycles of freeze-thawing, followed by centrifugation at 10.000 g for 15min at 4°C. The supernatant was collected and the protein content quantified by the Bradford assay following standard procedures. The crude soluble antigen was stored at -80°C until further use. For the immunofluorescent antibody test (IFAT), the promastigote pellet was washed once with PBS followed by resuspension in 2% formaldehyde (Merck Millipore Darmstadt, Germany) and storage at 4°C until use in the assays. For flow cytometry the same promastigote pellet was washed three times with PBS containing 10% Fetal Bovine Serum (FBS), at 4°C, followed by resuspension for fixation in 1% paraformaldehyde and incubation overnight. The fixed cells were then washed again with PBS plus 10% FBS and the final resuspension adjusted to 5×10⁶ promastigotes/mL, then used for the flow cytometry assay.

2.3. Direct parasite identification

Bone marrow (1ml) aspirates for parasitological analysis were obtained in order to detect *Leishmania* parasites, preparing the smears by slide apposition. The slides were stained with a panoptic stain (Rany-lab, Barbacena, Brazil) and evaluated under a light microscope (100×). At least three bone marrow smears were evaluated for each patient (Da Silva et al., 2005).

2.4. rK39 rapid test (IT LEISH)

The IT LEISH rapid test protocol was performed according to the manufacturer's instructions (Bio Rad Laboratories; Marnes-la-Coquette, France) using 10 µl of serum. Anti-*Leishmania*-specific antibodies are captured by a conjugate (protein A and colloidal gold) which reacts with the membrane-coated antigen (k39). After five minutes, a red line appears above indicating the presence of the IgG (control), which validates the kit. The appearance of another red line below indicates the presence of anti-rK39 IgG, representing a positive result.

2.5. Direct agglutination test (DAT)

DAT was carried out according to the manufacturer's instructions (Royal Tropical Institute, Amsterdam, NL). The test was performed on 96-well V-bottom plates (Greiner Bio One, Germany) with serial serum dilutions ranging from 1:50 to 1:51200. The results were read after

Table 2

Values of sensitivity, specificity, positive and negative predictive values, and accuracy of the serological tests used for the diagnosis of VL.

	DG1	DG2	DG3
Sensitivity% (95%CI)^a			
Flow Cytometry	96 (87–99)	92 (83–96)	85 (76–91)
DAT	94 (84–98)	94.5 (87–98)	91.5 (83–96)
rK39 rapid test	92 (81.5–97)	96 (87–99)	88 (79–93)
ELISA	86 (74–93)	88 (78–93)	78 (68–86)
IFAT	63 (49–75)	73 (61–81.5)	66 (55–75)
Specificity% (95%CI)			
Flow Cytometry	85 (69–93)	85 (69–93)	85 (69–93)
DAT	100 (82–100)	100 (82–100)	100 (82–100)
rK39 rapid test	100 (82–100)	100 (82–100)	100 (82–100)
ELISA	67 (50–80)	67 (50–80)	67 (50–80)
IFAT	100 (82–100)	100 (82–100)	100 (82–100)
PPV %₉₅ (95%CI)			
Flow Cytometry	91 (80–96)	93 (85–97)	93 (85–97)
DAT	100 (93–100)	100 (95–100)	100 (95–100)
rK39 rapid test	100 (92–100)	100 (95–100)	100 (92–100)
ELISA	80 (68–88)	85 (76–92)	85 (76–92)
IFAT	100 (89–100)	100 (93–100)	100 (93–100)
NPV%₉₅ (95%CI)			
Flow Cytometry	93 (79–98)	82 (66.5–92)	70 (55–82)
DAT	92 (78–97)	89 (75–96)	82.5 (68–91)
rK39 rapid test	89 (75–96)	92 (78–97)	77 (62–87)
ELISA	76 (58–88)	71 (53–82)	55 (40–69)
IFAT	63.5 (50–75)	62 (49–74)	54 (42–66)
Accuracy % (95%CI)			
Flow Cytometry	92 (84–96)	90 (82–94)	85 (78–91)
DAT	96 (90–99)	96 (91–98)	94 (88–97)
rK39 rapid test	95 (88–98)	97 (92–99)	91 (85–95)
ELISA	79 (69–86)	81 (73–87)	75 (66–82)
IFAT	77 (67–85)	81 (73–87)	76 (67–83)

^a CI=Confidence Interval.

PPV=Predictive Value Positive.

NPV = Predictive Value Negative.^b

overnight incubation at room temperature. The DAT titer is indicated by the highest dilution in which the agglutination is visible. Sera with titers from 1:6400 were considered positive (El Harith et al., 1988).

2.6. Immunofluorescent antibody test (IFAT)

The IFAT test was performed with an in house protocol developed by Immunology of Infectious and Parasitic Diseases Research Group at Instituto Aggeu Magalhães - FIOCRUZ, PE, using 10 µl of the antigenic suspension of *L. infantum* promastigotes applied to the region delimited on the IFAT slides (PERFECTLAB, São Paulo, Brazil) and leaving it to rest for two hours at 37°C. Subsequently, the slides were coated with 10 µl of the patients' serum samples in titers ranging from 1:20 to 1:320 in PBS, pH7.2. Two control sera (positive and negative) were incubated in a humid chamber for 30min at 37°C. After incubation, the excess of serum was removed from the slides by washing them three times through immersion in PBS, pH7.2, in intervals of 10min. Anti-human IgG conjugated to fluorescein isothiocyanate-FITC (Sigma Chemical Corp., St. Louis, MO) prepared in Evans blue (40mg) in PBS

Table 3

Comparison between flow cytometry and the serological tests used for the diagnosis of VL for all populations analyzed.

Group		Diagnostic Tests			
		DAT	rK39 rapid test	ELISA	IFAT
Agreement % (95%CI _a)	DG1	88 (79–93)	87 (78–92)	82 (73–89)	69 (58–78)
	DG2	91 (83.5–95)	89 (81–93)	85 (77–90)	76 (67.5–83)
	DG3	89 (82–93)	86 (79–91)	81(73–87)	74 (65–81)
Kappa Index (95%CI)	DG1	0.7(0.5–1.0)	0.7(0.5–1.0)	0.6(0.4–0.8)	0.4(0.2–0.6)
	DG2	0.8(0.6–1.0)	0.7(0.5–0.9)	0.6(0.4–0.8)	0.5(0.3–0.7)
	DG3	0.7(0.6–0.9)	0.7(0.5–0.9)	0.6(0.4–0.7)	0.5(0.3–0.6)

^a CI=Confidential interval.

buffer solution (previously diluted at 1:10 ratio in the same buffer) was added to the slides in a 1:50 dilution, incubating them under the same conditions as mentioned before. After the reaction, the slides were washed three times for 10min in PBS and left at room temperature. The assembly was made with buffered glycerin pH8.5 and the slides then observed under a fluorescence microscope, with a 100× objective. Sera were considered positive from the 1:40 dilution.

2.7. ELISA

The ELISA test was performed as described by Oliveira et al. (2011). Briefly, 96-well plates (Greiner Bio One, Germany) were sensitized with 600ng per well of crude *L. infantum* antigen and kept at 4°C overnight. Plates were aspirated, blocked for one hour at 37°C with 2% non-fat dried milk in PBS containing 0.05% Tween 20 (PBS-T) and washed four times with PBS-T. The sera were diluted at 1:900 in PBS-T containing 10% of non-fat dried milk and added to the wells in triplicates, and incubated for one hour at 37°C. After three washes with PBS-T, the per-oxidase-conjugated anti-IgG (Calbiochem, EMD Millipore, Billerica, MA) diluted at 1:2000 was added and the plates incubated for one more hour at 37°C. Plates were then washed three times and incubated with α -phenylenediamine (OPD) and H₂O₂. The reaction was quenched by adding 2M H₂SO₄ (50 µl/well) and the plates read at 490nm (Spectra Max 190, Molecular Devices, Sunnyvale, USA or MRX II, Dynex Technologies, Chantilly, USA). Positive and negative control sera were pre-sent on each plate in order to standardize readings and variations. The cutoff point between non-reagent and reagent readings was calculated as the mean of the negative controls plus two standard deviations.

2.8. Flow cytometry

The flow cytometry assay to detect antibodies against promastigote forms of *L. infantum* was performed according to Rocha et al. (2002). Briefly, the parasite suspension (2.5×10⁵ /well) was incubated in 96-well, U-bottom plates at 37°C for 30min in the presence of different serum dilutions (1:64 to 1:8192). After incubation, the parasites were washed twice with 150 µl of PBS, pH 7.2, plus 10% FBS and then incubated at 37°C for 30min, protected from light, with the anti-human IgG conjugated to fluorescein isothiocyanate-FITC (Sigma Chemical Corp, St. Louis, MO) diluted 1:200 in PBS- 10% FBS. After another wash, FITC labeled parasites were fixed with 200 µl of 1% paraformaldehyde and kept from light for 30min at 4°C until submitted to reading on the FACScalibur flow cytometer (Becton Dickinson San Jose, CA), using the software "Cell Quest Pro". The labeled parasites were submitted to the cytometer's acquisition with 10.000 events per sample. Promastigotes were identified based on their specific frontal (FSC) and lateral (SSC) light scattering properties. After FSC and SSC gain adjustments, the parasites assumed a characteristic distribution of these parameters and their fluorescence was evaluated. For each assay, in addition to the FITC-conjugated internal control, unlabeled

beled controls in quadruplicates as well as negative and positive controls were included to validate the assay. For these controls, instead of using a single representative negative or positive sample, we opted to prepare a pool of true negative or positive sera and used an aliquot of either as controls.

2.9. Intra- and inter-assay variations

To investigate intra-assay variation, triplicates of five different control samples were run in one assay. Inter-assay variation was evaluated comparing 27 high controls, 5 medium controls, and 5 low controls that were run in three independent assays. The Coefficient of Variation (CV) for the intra- and inter-assay variations was calculated using the formula:

$$CV = \frac{\text{Standard deviation}}{\text{mean}} \times 100.$$

2.10. Statistics

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism version 7.0 and the ROC curve, by Medcalc Software version 15.8. Each test performance was assessed by the following statistical indexes: Sensitivity = $[\text{true positives} \div (\text{true positives} + \text{false negatives})] \times 100$; specificity = $[\text{true negatives} \div (\text{true negatives} + \text{false positives})] \times 100$; positive predictive value — PPV = $[\text{true positives} \div \text{total positives}] \times 100$; negative predictive value — NPV = $[\text{true negatives} \div \text{total negatives}] \times 100$ and accuracy = $[(\text{true positives} + \text{true negatives}) \div (\text{true positives} + \text{true negatives} + \text{false positives} + \text{false negatives})]$ (Eusebi, 2013). Student's t-test was used for determining the differences between groups. The level of agreement for each of the tests (ELISA, IFI, DAT, rK39 rapid test) with flow cytometry were determined by percent agreement and the kappa index (κ) with 95% confidence interval and p values <0.05 were considered significant.

3. Results

3.1. Optimization of flow cytometry parameters for the identification of IgG anti-promastigote forms of *L. infantum*

To establish the flow cytometry assays and to define the IgG reactivity data against *L. infantum* with the best performance indexes, promastigotes incubated with FITC (fluorescein isothiocyanate) conjugated anti-human IgG were evaluated on the flow cytometer in the absence of human sera (internal control) and after incubation with VL positive or negative sera, with representative results shown in Fig. 1. After pro-mastigote identification (Fig. 1A), the relative FITC fluorescence intensity of each event was analyzed. A marker was set on the representation of the FITC-conjugated internal control (Fig. 1B) and used in all data analyzes reported here to determine for each sample the Percentage of Positive Fluorescent Parasites (PPFP). Fig. 1C and D illustrate the results for the fluorescence levels for a negative and positive control sera, respectively, with the derived PPFP values.

Next, to assess the optimal dilutions to be used with the sera in order to best define positive and negative samples, we plotted the average PPFP values obtained from five defined sera groups: DG1 - positive VL confirmed by *Leishmania* visualization; DG2 - positive VL confirmed by at least two serological tests; DG3 - positive VL confirmed by at least one serological test; CG1 - Chagas' disease; CG2 - healthy control sera. Fig. 2 then compares the average seroreactivity values for IgG for the different groups, expressed in PPFP, with different serum dilutions (titration curve ranging from 1:64 to 1:8192). From the graph shown, the serum titration of greatest difference in reactivity considering only the positive samples and the healthy controls was 1:512. This dilution

however is associated with high levels of cross-reactivity and false positive results with the sera from Chagas' disease individuals. Thus, we selected the dilution of 1:4096, as it showed a substantial reduction of the false positive results with minor decreases in fluorescence levels for the true positive samples.

3.2. Evaluating the performance of flow cytometry for VL diagnosis

The individual analysis through flow cytometry of all sera samples belonging to the five groups defined here using the 1:4096 dilution is shown in Fig. 3. Regarding the negative references (CG1+CG2), flow cytometry has given false positive results in five samples from individuals with Chagas disease, while nearly all of those who were confirmed through parasite visualization (DG1) were identified as positive. Intermediate values were observed for the other groups. Thus, the seropositivity for VL was 96% for DG1, 92% for DG2, 85% for DG3. ROC curves were then drawn individually evaluating the performance by flow cytometry of the three groups of positive sera (DG1, DG2 and DG3) in relation to the two sets of VL negative samples grouped together (CG1+CG2). The curves (Fig. 4) show that, for the selected serum dilution, the values for the area under the curve were 0.9 (95%, with a confidence interval [CI] between 0.90 and 0.99) for the DG1 group, 0.92 (95%, CI=0.85–0.97) for DG2 and 0.9 (95%, CI=0.83–0.95) for DG3. The ROC curves indicated that the 2% PPFP value would be the appropriate cutoff point for separating the VL groups from the negative individuals.

To evaluate potential analytical errors, we also performed intra- and inter-assays to determine the coefficients of variation (CVs), parameters widely used to quantify precision of biological measures. These were based on the values of PPFP to select high, medium, and low serum to use as *in house* controls. The intra-assay CVs ranged from 4% to 13% while inter-assay CVs ranged between 8% to 13% (Table 1), fitting within the range of variation considered acceptable, $\leq 20\%$. No statistically significant difference between the means of the controls ($P > 0.05$).

3.3. Comparison between flow cytometry and serological tests performances on the diagnosis of VL

Based on the previous results, we used the values expressed with the 1:4096 dilution for a comparison of flow cytometry with other currently used serological tests: DAT, ELISA and IFAT, all based on whole parasite cells or extracts; and the rapid test based on the recombinant rK39 antigen. Flow cytometry had the highest diagnostic performance with the DG1 group when compared to the other serological tests, with sensitivity of 96%, a positive predictive value of 91% and accuracy of 92% (Table 2). The rK39 rapid test was the best test in diagnosing the cases for group DG2, while for DG3 the best sensitivity was observed for DAT, with the rK39 rapid test having a better positive predictive value. The specificity was 85% for flow cytometry, 65% for ELISA and 100% for other tests.

The flow cytometry results were then compared with the other four serological tests in order to evaluate the agreement between different sets of results (Table 3). There was substantial agreement ($\kappa > 0.6$; Agreement >80%) between the DAT assay and rK39 rapid test when compared to flow cytometry for all groups, with lower values for the other tests. In fact, the IFAT had the lowest values of performance and only average agreement ($\kappa < 0.6$; Agreement <80%) for the three VL positive serum groups.

We then aimed to evaluate the clinical value of flow cytometry for the differential diagnosis between VL and Chagas' disease in comparison with the other serological tests. As stated above, the analysis of PPFP values using the 1:4096 serum dilution with a PPFP=2% as the cutoff point demonstrated that the percentage of cross reactivity for

flow cytometry was 33% (based on Fig. 3). As for the other tests, the one with the highest percentage of cross reactivity was ELISA (73%), while the other tests (DAT, rK39 and IFAT) did not show cross reactivity in our hands, at least with the serum available to us.

4. Discussion

Overall, the performance by the flow cytometry assay described here resulted in improved sensitivity - for VL diagnosis when compared to the four serological tests used in the clinical procedure. This is especially relevant considering the results for the DG1 group, where flow cytometry had the best performance, similar to the rK39 rapid test, since this is the only group with all positive samples confirmed only after para-site visualization. This finding corroborates the early results by Garcia et al. (2009) and Lemos et al. (2007) indicating a better performance of flow cytometry for the diagnosis of VL, now with a substantially increase in the number of samples evaluated and including the comparison with other serological methods. Flow cytometry then emerges as an alternative test to be used for the serological diagnosis of VL. In addition, it proved to be a safe and less invasive alternative when compared to bone marrow aspiration, allowing early treatment and reduction in lethality, but adjustments are still necessary to reduce cross reactivity with trypanosomatids.

The appropriate choice of antigen is still one of the major challenges for serological tests and many of those, including ELISA, IFAT and DAT tests, use whole antigen extract from promastigote forms. It is, therefore, common to find false-positive reactions due to cross-reactions with other diseases (Caballero et al., 2007). Adjustments in antigen preparation can be made to minimize the issue of cross-reactivity and strategies were developed for live and fixed *Leishmania* promastigotes for the cytometric diagnosis of tegumentary or cutaneous leishmaniasis (Pissinatti et al., 2008; Pereira et al., 2012; Oliveira et al., 2013). The use of live para-sites may reduce the binding of antibodies to intracytoplasmic structures seen for the fixed parasites (which increases the likelihood of cross-reactions). However, the manipulation risks when using live parasites is a limiting factor, especially considering that the observed performance was similar in both approaches (Lemos et al., 2007; Garcia et al., 2009), leading us to use fixed parasites in the present study. Despite these adjustments in the antigen preparation, it is still necessary to evaluate how variable this methodology is, but the intra and inter assays carried out here found a coefficient of variation within acceptable parameters (Reed et al., 2002). However, it is still necessary to evaluate laboratory-to-laboratory variability, specially between different regions, to validate whether the performance of the method remains reproducible. In addition, in the cross reactivity evaluation, a percentage of positivity was observed in the group with Chagas' disease, but due to its great versatility, strategies using flow cytometry have already been proposed that can minimize false positive or inconclusive results (Teixeira-Carvalho et al., 2015).

Considering other serological tests based on grown promastigote forms for VL diagnosis, IFAT is the most used in South America, being one of the available tests in public health services in Brazil (Machado de Assis et al., 2016; Sakkas et al., 2016). Studies show a moderate IFAT performance with 88–92% sensitivity and 83–88% specificity (Pedras et al., 2008; Machado de Assis et al., 2016), but our study showed an even lower sensitivity, despite a higher specificity. As for the parasitological diagnosis, the IFAT requires a complex infrastructure and trained technicians, thus limiting access and delaying diagnosis and treatment (Machado de Assis et al., 2012). DAT is one of the simplest and most inexpensive tests ever developed for the diagnosis of VL. A meta-analysis, evaluating the performance of DAT in patients with VL, presented estimates of sensitivity and specificity of 94.8% (Romero and Boelaert, 2010), corroborating with the high performance observed in our study. Despite its high levels of sensitivity and speci-

ficity, DAT is associated with problems in antigen quality control, refrigeration and lack of standardization of the test reading (Srivastava et al., 2011; Sundar and Rai, 2002). Therefore, in the present study, a commercial DAT kit was used to minimize this issue and indeed it displayed an efficient performance. Nevertheless, the possibility of quantification from PPFP through flow cytometry minimizes limitations such as the subjectivity of the readings, which is observed in agglutination tests such as DAT. As for the ELISA assay, it has the lowest performance among the different tests evaluated here.

An alternative to crude lysate in serological tests is the use of recombinant antigens, such as rK39 used for the rapid test, which is used in several countries and the rK28 rapid test, which was developed as a novel antigen for VL diagnosis in east Africa (Pattabhi et al., 2010; Pedral-Sampaio et al., 2016). Machado de Assis et al. (2016) showed that the rK39 test presented the best sensitivity and cost-benefit in the diagnosis of VL. However, in some endemic countries such as Sudan, the sensitivity of this test is unsatisfactory, which may be related to low amounts of antibodies produced by individuals or to the below-ideal test format (Abass et al., 2013). Flow cytometry, possibly associated with the use of recombinant antigens, may emerge then as an important alternative for the specific diagnosis of VL.

Despite its higher sensitivity, the costs associated with the flow cytometer are still a limitation, since it requires a medium-sized laboratory apparatus, in addition to the maintenance and training of personnel (Shapiro, 2003). However, that is minimized due to the assurance of higher sensitivity. The presence of photomultiplier detectors provides technical support for quantitative antibody analysis and provide the management of assays with such high serum dilutions, when compared to those usually tested by standard methodologies (Vitelli-Avelar et al., 2007). In addition, flow cytometry has already been used in clinical laboratories of developing countries to diagnose HIV/AIDS, cancer and anemia (Mandy et al., 2002; Pati and Jain, 2013; Denes et al., 2015; Pang et al., 2018). Therefore, its use for the serological diagnosis of VL is technically possible and can be scaled up with the possibility of using microtiter plates, which allow the diagnosis of several patients simultaneously (Rocha et al., 2006). The performance observed by flow cytometry in the present study strongly reinforces this possibility, as well as opening up new avenues of research with this technique such as the understanding the humoral response in VL and VL-HIV/AIDS patients. The possibility still exists to improve the technique still further with, for example, the use of recombinant antigens associated with beads.

Acknowledgments

This work was supported by a Brazilian grant from MCTI/CNPq/MS-SCTIE - DECIT N° 40/2012 – Research in Neglected Diseases, and by scholarships from the Brazilian funding agency CAPES. We would like to thank Camila Queiroz from Instituto Aggeu Magalhães – FIOCRUZ/ PE for the *L. infantum* strain and Walter Lins Barbosa Junior for reviewing this manuscript.

Conflict of interest

The authors report no conflict of interest.

References

- Abass, E., Bollig, N., Reinhard, K., Camara, B., Mansour, D., Visekruna, A., Lohoff, M., Steinhoff, U., 2013. rKLO8, a novel *Leishmania donovani* - derived recombinant immunodominant protein for sensitive detection of visceral leishmaniasis in Sudan. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7, <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002322>.
- Abass, E., Kang, C., Martinkovic, F., Semiao-Santos, S.J., Sundar, S., Walden, P., Piarroux, R., El Harith, A., Lohoff, M., Steinhoff, U., 2015. Heterogeneity of *Leishmania donovani* parasites complicates diagnosis of visceral leishmaniasis: comparison of different serological tests in three endemic regions. *PLoS One* 10, 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116408>.

- Andrade, R.A., Reis, A.B., Gontijo, C.M.F., Braga, L.B., Rocha, R.D.R., Araújo, M.S.S., Vianna, L.R., Martins-Filho, O.A., 2007. Clinical value of anti-Leishmania (Leishmania) chagasi IgG titers detected by flow cytometry to distinguish infected from vaccinated dogs. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 116, 85–97. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2007.01.002>.
- Boelaert, M., Rijal, S., Regmi, S., Singh, R., Karki, B., Jacquet, D., Chappuis, F., Campino, L., Desjeux, P., Le Ray, D., Koirala, S., Van der Stuyt, P., 2004. A comparative study of the effectiveness of diagnostic tests for visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 70, 72–77.
- Boelaert, M., El-Safi, S., Hailu, A., Mukhtar, M., Rijal, S., Sundar, S., Wasunna, M., Asseffa, A., Mbui, J., Menten, J., Desjeux, P., Peeling, R.W., 2008. Diagnostic tests for kala-azar: a multi-centre study of the freeze-dried DAT, rK39 strip test and KAtex in East Africa and the Indian subcontinent. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 102, 32–40. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2007.09.003>.
- Caballero, Z.C., Sousa, O.E., Marques, W.P., Saez-Alquezar, A., Umezawa, E.S., 2007. Evaluation of serological tests to identify *Trypanosoma cruzi* infection in humans and to determine cross-reactivity with *Trypanosoma rangeli* and *Leishmania* spp. *Clin. Vaccine Immunol.* 14, 1045–1049. <https://doi.org/10.1128/CI.00127-07>.
- Chappuis, F., Sundar, S., Hailu, A., Ghalib, H., Rijal, S., Peeling, R.W., Alvar, J., Boelaert, M., 2007. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 873–882. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1748>.
- Coura-Vital, W., de Araújo, V.E.M., Reis, I.A., Amancio, F.F., Reis, A.B., Carneiro, M., 2014. Prognostic factors and scoring system for death from visceral leishmaniasis: an historical cohort study in Brazil. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8, e3374. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003374>.
- Cunningham, J., Hasker, E., Das, P., El Safi, S., Goto, H., Mondal, D., Mbuchi, M., Mukhtar, M., Rabello, A., Rijal, S., Sundar, S., Wasunna, M., Adams, E., Menten, J., Peeling, R., Khanal, B., Das, M., Oliveira, E., de Assis, T.M., Bhaskar, K.R., Huda, M.M., Hassan, M., Abdoun, A.O., Awad, A., Osman, M., Prajapati, D.K., Gidwani, K., Tiwary, P., Pani-ago, A.M.M., Sanchez, M.C.A., Celeste, B.J., Jacquet, D., Magiri, C., Muia, A., Kesusu, J., Ageed, A.F., Galal, N., Osman, O.S., Gupta, A.K., Bimal, A.S., Das, V.N.R., 2012. A global comparative evaluation of commercial immunochromatographic rapid diagnostic tests for visceral leishmaniasis. *Clin. Infect. Dis.* 55, 1312–1319. <https://doi.org/10.1093/cid/cis716>.
- Da Silva, M.R.B., Stewart, J.M., Costa, C.H.N., 2005. Sensitivity of bone marrow aspirates in the diagnosis of visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 72, 811–814.
- Denes, V., Lakk, M., Makarovskiy, A., Jakso, P., Szappanos, S., Graf, L., Mandel, L., Karadi, I., Geck, P., 2015. Metastasis blood test by flow cytometry: in vivo cancer spheroids and the role of hypoxia. *Int. J. Cancer* 136, 1528–1536. <https://doi.org/10.1002/ijc.29155>.
- El Harith, A., Kolk, A.H.J., Leewenburg, J., Muigai, R., Huigen, E., Jelsma, T., Kager, P., 1988. Improvement of a direct agglutination test for field studies of visceral Leishmaniasis. *J. Clin. Microbiol.* 26, 1321–1325.
- Eusebi, P., 2013. Diagnostic accuracy measures. *Cerebrovasc. Dis.* 267–272. <https://doi.org/10.1159/000353863>.
- Garcia, L.M., Coelho-Dos-Reis, J.G.A., Peruhype-Magalhães, V., Teixeira-Carvalho, A., Rocha, R.D.R., Araújo, M.S.S., Gomes, I.T., Carvalho, S.F.G., Dietze, R., Lemos, E.M., Andrade, M.C., Martins-Filho, O.A., 2009. Anti-fixed Leishmania chagasi promastigotes IgG antibodies detected by flow cytometry (FC-AFPA-IgG) as a tool for serodiagnosis and for post-therapeutic cure assessment in American visceral leishmaniasis. *J. Immunol. Methods* 350, 36–45. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2009.07.004>.
- Ker, H.G., Coura-Vital, W., Aguiar-Souares, R.D.D.O., Roatt, B.M., das Dores Moreira, N., Carneiro, C.M., Machado, E.M.D.M., Teixeira-Carvalho, A., Martins-Filho, O.A., Giunchetti, R.C., Araújo, M.S.S., Coelho, E.A.F., da Silveira-Lemos, D., Reis, A.B., 2013. Evaluation of a prototype flow cytometry test for serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Clin. Vaccine Immunol.* 20, 1792–1798. <https://doi.org/10.1128/CI.00575-13>.
- Lemos, E.M., Gomes, I.T., Carvalho, S.F.G., Rocha, R.D.R., Pissinate, J.F., Martins-Filho, O.A., Dietze, R., 2007. Detection of anti-leishmania (Leishmania) chagasi immunoglobulin G by flow cytometry for cure assessment following chemotherapeutic treatment of American visceral leishmaniasis. *Clin. Vaccine Immunol.* 14, 569–576. <https://doi.org/10.1128/CI.00354-06>.
- Machado de Assis, T.S., Rabello, A., Werneck, G.L., 2012. Latent class analysis of diagnostic tests for visceral leishmaniasis in Brazil. *Tropical Med. Int. Health* 00, 1–6. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2012.03064.x>.
- Machado de Assis, T.S., Azeredo-da-Silva, A.L.F., Werneck, G.L., Rabello, A., 2016. Cost-effectiveness analysis of diagnostic tests for human visceral leishmaniasis in Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 110, 464–471.
- Maia, Z., Lirio, M., Mistro, S., Mendes, C.M.C., Mehta, S.R., Badaro, R., 2012. Comparative study of rK39 Leishmania antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis: systematic review with meta-analysis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6, <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001484>.
- Mandy, F., Nicholson, J., Autran, B., Janossy, G., 2002. T-cell subset counting and the fight against AIDS: reflections over a 20-year struggle. *Clin. Cytom.* 50, 39–45. <https://doi.org/10.1002/cyto.10097>.
- Martins-Filho, O. a, Pereira, M.E., Carvalho, J.F., Cançado, J.R., Brener, Z., 1995. Flow cytometry, a new approach to detect anti-live trypomastigote antibodies and monitor the efficacy of specific treatment in human Chagas' disease. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2, 569–573.
- Matos, C.S., Coelho-dos-Reis, J.G.A., Rassi, A., Luquetti, A.O., Dias, J.C.P., Elói-Santos, S.M., Gomes, I.T., Vitelli-Avelar, D.M., Wendling, A.P.B., Rocha, R.D.R., Teixeira-Carvalho, A., Peruhype-Magalhães, V., Andrade, M.C., Martins-Filho, O.A., 2011. Applicability of an optimized non-conventional flow cytometry method to detect anti-*Trypanosoma cruzi* immunoglobulin G for the serological diagnosis and cure assessment following chemotherapeutic treatment of Chagas disease. *J. Immunol. Methods* 369, 22–32. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2011.03.007>.
- Oliveira, G.G.S., Magalhães, F.B., Teixeira, M.C.A., Pereira, A.M., Pinheiro, C.G.M., San-tos, L.R., Nascimento, M.B., Bedor, C.N.G., Albuquerque, A.L., Dos-Santos, W.L.C., Gomes, Y.M., Moreira, E.D., Brito, M.E.F., Pontes De Carvalho, L.C., De Melo Neto, O.P., 2011. 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.* 85, 1025–1034. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2011.11-0102>.
- Oliveira, A.P., de Castro, M.C.A.B., de Almeida, A.F., Souza, M. de A., de Oliveira, B.C., Reis, L.C., Goto, H., de Brito, M.E.F., Celeste, B.J., Martins-Filho, O.A., Pereira, V.R.A., 2013. Comparison of flow cytometry and indirect immunofluorescence assay in the diagnosis and cure criterion after therapy of American tegumentary leishmaniasis by anti-live *Leishmania* (Viannia) braziliensis immunoglobulin G. *J. Immunol. Methods* 387, 245–253. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2012.11.002>.
- Organização Pan-Americana da Saúde, 2018. Leishmanioses: Informe Epidemiológico nas Américas. Organização Pan-Americana da Saúde, Washington www.paho.org/leishmaniasis.
- Pang, K., Xie, C., Yang, Z., Suo, Y., Zhu, X., Wei, D., Weng, X., Wei, X., Gu, Z., 2018. Monitoring circulating prostate cancer cells by in vivo flow cytometry assesses androgen deprivation therapy on metastasis. *Cytom. Part A*. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.23369>.
- Patil, H.P., Jain, S., 2013. Flow cytometry in hematological disorders. *Indian J. Pediatr.* 80, 772–778. <https://doi.org/10.1007/s12098-013-1152-2>.
- Pattabhi, S., Whittle, J., Mohamath, R., El-Safi, S., Moulton, G.G., Guderian, J.A., Colom-barra, D., Abdoon, A.O., Mukhtar, M.M., Mondal, D., Esfandiari, J., Kumar, S., Chun, P., Reed, S.G., Bhatia, A., 2010. Design, development and evaluation of rK28-based point-of-care tests for improving rapid diagnosis of visceral leishmaniasis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4, <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000822>.
- Pedral-Sampaio, G., Alves, J.S., Schrieffer, A., Magalhães, A., Meyer, R., Glesby, M.J., Car-valho, E.M., Carvalho, L.P., 2016. Detection of IgG anti-leishmania antigen by flow cytometry as a diagnostic test for cutaneous leishmaniasis. *PLoS One* 11, 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162793>.
- Pedras, M.J., de Gouvêa Viana, L., de Oliveira, E.J., Rabello, A., 2008. Comparative evaluation of direct agglutination test, rK39 and soluble antigen ELISA and IFAT for the diagnosis of visceral leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 102, 172–178. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2007.11.004>.
- Pereira, V.R.A., Reis, L.D.C., Souza, M.D.A., de Oliveira, A.P., de Brito, M.E.F., Lage, P.S., Andrade, M.C., Rocha, R.D.R., Martins-Filho, O.A., 2012. Evaluation of anti-live and anti-fixed *Leishmania* (Viannia) braziliensis promastigote IgG antibodies detected by flow cytometry for diagnosis and post-therapeutic cure assessment in localized cutaneous leishmaniasis. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 74, 292–298. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2012.06.025>.
- Pissinate, J.F., Gomes, I.T., Peruhype-Magalhães, V., Dietze, R., Martins-Filho, O.A., Lemos, E.M., 2008. Upgrading the flow-cytometric analysis of anti-Leishmania immunoglobulins for the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. *J. Immunol. Methods* 336, 193–202. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2008.04.018>.
- Reed, G.F., Lynn, F., Meade, B.D., 2002. Use of coefficient of variation in assess in Variability of quantitative assays. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 9, 1235–1239. <https://doi.org/10.1128/CDLI.9.6.1235>.
- Rocha, R., Gontijo, C.M.F., Elói-Santos, S.M., Carvalho, A.T., Corrêa-Oliveira, R., Marques, M.J., Genaro, O., Mayrink, W., Martins-Filho, O.A., 2002. Anticorpos antipromastigotes vivas de *Leishmania* (Viannia) braziliensis, detectados pela citometria de fluxo, para identificação da infecção ativa na leishmaniose tegumentar americana. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 35, 551–562. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822002000600002>.
- Rocha, R.D.R., Gontijo, C.M.F., Elói-Santos, S.M., Teixeira-Carvalho, A., Corrêa-Oliveira, R., Ferrari, T.C.A., Marques, M.J., Mayrink, W., Martins-Filho, O.A., 2006. Clinical value of anti-live *Leishmania* (Viannia) braziliensis immunoglobulin G subclasses, detected by flow cytometry, for diagnosing active localized cutaneous leishmaniasis. *Trop. Med. Int. Heal.* 11, 156–166. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2005.01552.x>.
- Romero, G. a S., Boelaert, M., 2010. Control of visceral leishmaniasis in latin america-a systematic review. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4, e584. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000584>.
- Sakkas, H., Gartzonika, C., Levidiotou, S., 2016. Laboratory diagnosis of human visceral Leishmaniasis. *J. Vector Borne Dis.* 53, 8–16.
- Shapiro, H.M., 2003. Practical Flow Cytometry, fourth ed. New York.
- Srivastava, P., Dayama, A., Mehrotra, S., Sundar, S., 2011. Diagnosis of visceral leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 105, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2010.09.006>.
- Sundar, S., Rai, M., 2002. Laboratory Diagnosis of Visceral Leishmaniasis 9. 951–958. <https://doi.org/10.1128/CDLI.9.5.951>.
- Teixeira-Carvalho, A., Campos, F.M.F., Geiger, S.M., Rocha, R.D.R., Araújo, F.F., Vitelli Avelar, D.M., Andrade, M.C., Araújo, M.S.S., Lemos, E.M., Freitas Carneiro Proietti, A.B., Sabino, E.C., Caldas, R.G., Freitas, C.R.C., Campi-Azevedo, A.C., Elói-Santos, S.M., Martins-Filho, O.A., 2015. FC-TRIPLEX Chagas/Leish IgG1: a multiplexed flow cytometry method for differential serological diagnosis of chagas disease and leishmaniasis. *PLoS One* 10, e0122938. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122938>.
- Vitelli-Avelar, D.M., Sathler-Avelar, R., Wendling, A.P.B., Rocha, R.D.R., Teixeira-Carvalho, A., Martins, J., Dias, J.C.P., Rassi, A., Luquetti, A.O., Elói-Santos, S.M., Martins-Filho, O.A., 2007. Non-conventional flow cytometry approaches to detect anti-*Trypanosoma cruzi* immunoglobulin G in the clinical laboratory. *J. Immunol. Methods* 318, 102–112. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2006.10.009>.

APÊNDICE B

Avaliação de um novo conjunto de antígenos recombinantes para o diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral humana e canina

Artigo anexo na página seguinte,

OBS: O autor desta tese foi co-autor deste artigo e ajudou na elaboração e desenvolvimento dos ELISA com antígenos recombinantes comparados com o antígeno comercial k39 em pacientes com LV humanos e caninos como a análise dos dados gerados.

Resumo dos principais resultados: A triagem de antígenos recombinantes mostrou ser eficiente no diagnóstico da LV tanto em humanos como em cães e a mistura de alguns desses antígenos no ELISA se mostrou mais sensível que alguns dos antígenos individuais como também quando comparada ao k39.

RESEARCH ARTICLE

Evaluation of a new set of recombinant antigens for the serological diagnosis of human and canine visceral leishmaniasis

Franklin B. Magalhães¹✉, Artur L. Castro Neto²✉, Marília B. Nascimento², Wagner J. T. Santos², Zulma M. Medeiros², Adelino S. Lima Neto³, Dorcas L. Costa³, Carlos H. N. Costa³, Washington L. C. dos Santos⁴, Lain C. Pontes de Carvalho⁴, Geraldo G. S. Oliveira⁴, Osvaldo P. de Melo Neto^{2*}

1 Associação Caruaruense de Ensino Superior e Técnico, Caruaru, Pernambuco, Brazil, **2** Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz-Pernambuco), Recife, Pernambuco, Brazil, **3** Instituto de Doenças Tropicais Natan Portella (IDTNP), Teresina, Piauí, Brazil, **4** Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz-Bahia), Salvador, Bahia, Brazil

✉ These authors contributed equally to this work. * opmn@cpqam.fiocruz.br



OPEN ACCESS

Citation: Magalhães FB, Castro Neto AL, Nascimento MB, Santos WJT, Medeiros ZM, Lima Neto AS, et al. (2017) Evaluation of a new set of recombinant antigens for the serological diagnosis of human and canine visceral leishmaniasis. PLoS ONE 12(9): e0184867. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184867>

Editor: Henk D. F. H. Schallig, Academic Medical Centre, NETHERLANDS

Received: April 5, 2017

Accepted: September 3, 2017

Published: September 28, 2017

Copyright: © 2017 Magalhães et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: The *L. infantum* and *Leishmania* major genomes are available from the TriTrypDB (<http://tritrypdb.org/tritrypdb/>) and GeneDB (www.genedb.org) databases. The final sequence has been deposited to GenBank and received the accession number KX018626.

Funding: The work in Dr. de Melo Neto's laboratory was more recently funded with grants provided by the Brazilian funding agency CNPq and the Brazilian Ministry of Health (Grant MCTI/CNPq/MS-SCTIE)

Abstract

Current strategies for the control of zoonotic visceral leishmaniasis (VL) rely on its efficient diagnosis in both human and canine hosts. The most promising and cost effective approach is based on serologic assays with recombinant proteins. However, no single antigen has been found so far which can be effectively used to detect the disease in both dogs and humans. In previous works, we identified *Leishmania infantum* antigens with potential for the serodiagnosis of VL. Here, we aimed to expand the panel of the available antigens for VL diagnosis through another screening of a genomic expression library. Seven different protein-coding gene fragments were identified, five of which encoding proteins which have not been previously studied in *Leishmania* and rich in repetitive motifs. Poly-histidine tagged polypeptides were generated from six genes and evaluated for their potential for diagnosis of VL by ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) with sera from infected humans and dogs. None of those was valid for the detection of human VL (26±52% sensitivity) although their performance was increased in the canine sera (48±91% sensitivity), with one polypeptide useful for the diagnosis of canine leishmaniasis. Next, we assayed a mixture of three antigens, found to be best for human or canine VL, among 13 identified through different screenings. This ^aMix^o resulted in similar levels of sensitivity for both human (84%) and canine (88%) sera. With improvements, this validates the use of multiple proteins, including antigens identified here, as components of a single system for the diagnosis of both forms of leishmaniasis.

No.: 404259/2012). The work in Dr. C. H. N. Costa's lab was funded by CNPq (Grant 554797).

Fellowships and studentships for the graduate students (FBM, ALCN, MBN, WJTS and ASLN) were provided by CNPq, FACEPE or CAPES. The work carried out at Fiocruz-BA was funded by the Brazilian Ministry of Science and Technology (Program RENORBIO). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Introduction

Visceral leishmaniasis (VL) is a systemic and chronic disease caused by an intracellular proto-zoan parasite of the genus *Leishmania* and transmitted via sand flies. It is usually characterized by long duration fever, weight loss, weakness, lethargy, splenomegaly, and pancytopenia, among other manifestations [1±4]. In epidemiological terms, VL is classified into anthroponotic and zoonotic types, with the predominant causal agent for the anthroponotic type being *Leishmania donovani* and for the zoonotic type being *Leishmania infantum*, previously known as *Leishmania chagasi* in Latin America [1,5]. In Brazil, this disease is a public health problem with high transmission and case fatality rates [6,7].

The domestic dog is considered to be the main reservoir of *L. infantum*, whereas the possibility remains for wild animals such as foxes and marsupials acting as sylvatic reservoirs [8,9]. In general, the clinical signs of the canine leishmaniasis and its diagnosis in sick dogs are relatively clear, although the same cannot be said of animals displaying few signs or those which are apparently healthy [10]. Afflicted animals can display signs of the disease soon after infection or remain subclinically infected for significant lengths of time, but both are infectious to the sandfly vector [11].

Detection of the parasite through direct microscopic visualization or culturing from biological samples derived from infected individual is the gold standard of VL diagnosis but this is not practical on a large scale. Early serological methods used for VL serodiagnosis (e.g. the direct agglutination test or DAT and immunofluorescence-based tests), relied on the use of whole extracts and fixed parasites. Diagnostic tests based on the detection of the parasite DNA by PCR have also been implemented and they have the advantage of being able to discriminate an active infection from those in which the parasite has been eliminated. All, however, have cost related issues, require a more complex infrastructure and cannot be implemented in the field [11±15].

An alternative for improving the serological techniques used for VL diagnosis is the use of specific molecules that are readily recognized by most sera from infected individuals. For this purpose several recombinant antigens have been tested and the most promising antigen for VL diagnosis so far, is the rK39 [15,16]. This antigen is based on a 39 amino acid repeat derived from a *L. infantum* kinesin-related polypeptide [17] and early studies indicated its potential for the diagnosis of human VL and the evaluation of its progression [18]. Extensive field tests have been carried out since then using this antigen in different formats and an rK39 strip test, readily applicable in the field, has been shown to be a sensitive and a reliable indicator of VL in human patients. In a meta-analysis study evaluating the data from independent studies using this rK39 strip test, the results were overall seen to be quite uniform with very high sensitivity and specificity [19]. In Eastern Africa, however, its performance was seen to be inferior to what was observed elsewhere [16±21] and in general it was seen to be positive in a significant proportion of healthy individuals from endemic regions and for extended periods after cure of the disease [14,22]. Another relevant aspect is that tests made in the field focusing on the diagnosis of VL in dogs did not show equivalent results to those seen with human samples and suggest that a rK39-based test may not be suitable for the identification of infected dogs on its own [23±25].

The humoral immune responses generated during an infection by *L. infantum* in infected dogs and humans are quite distinct and the antigens most suitable for the diagnosis of VL in humans are not necessarily valid to use with canine samples [26]. In a previous study our group identified and evaluated five antigens obtained through the screening of a *L. infantum* cDNA library for their potential for the diagnosis of both human and canine VL. Although some of the antigens displayed high sensitivity and specificity to one or the other species, none

of them were effective for the serodiagnosis in both humans and dogs [23]. Within this context, we aimed at expanding the panel of available antigens for the diagnosis of VL through the evaluation of newly selected antigens, as well as a mixture of some of the best among those evaluated, for the diagnosis of both canine and human forms of the disease.

Materials and methods

Parasites

Leishmania infantum (MHOM/BR2000/Merivaldo2, 2240) promastigotes were maintained at 26°C in modified LIT medium, pH 7.2 [0.2% sucrose (w/v), 0.36% liver broth (w/v), 0.1% tryptose (w/v), 0.002% haemin (w/v)], or Schneider medium, pH 7.2 (Sigma-Aldrich), containing 10% fetal bovine serum, ampicillin (10 U/ml) and streptomycin (10 µg/ml). Parasites were kept on log phase growth by passaging to new culture media every 3 to 4 days. Total parasite lysate (LAg) was obtained by sonication of log-phase parasites. The protein content of the lysate was quantified by the Bradford method.

Sera

The human sera panel was composed of: 50 clinically and parasitologically diagnosed VL patients obtained from an endemic area in Piauí State, Brazil, independently of sero-reactivity; 50 negative sera samples obtained from healthy individuals of various ages from Pernambuco State, also endemic for VL; 26 parasitologically confirmed cutaneous leishmaniasis patients; 40 serologically confirmed patients with chronic Chagas' disease. The canine serum samples were obtained from: 46 dogs with parasitologically confirmed VL, from the endemic area of Jequiê (Bahia state, Brazil); 15 healthy young dogs of various ages and breeds from non-endemic areas; and sera from 31 dogs afflicted with other infectious diseases (4 with babesiosis, 20 with ehrlichiosis, and 7 with demodicosis) were also used.

Ethical approval

All dogs were handled in agreement with the Oswaldo Cruz Foundation guidelines for experimentation on animals and the collection of the sera used in this study was approved by the ethics committee for the use of animals in research (CPqGM-FIOCRUZ, Ceua, license N.040/ 2005). All human sera were collected after approval of their use by the appropriate ethics committees, as follows: use of the sera from VL patients was approved by the ethics committee from the Federal University of Piauí (0116/2005); the negative control sera were included in the study approved by the ethics committee of the Brazilian Ministry of Health (25000.119007/ 2002-03); sera from patients with cutaneous leishmaniasis were included in the project CAEE 0014.0.095.000±05, approved by the ethics committee from CPqAM-FIOCRUZ (03/08/2008); and the samples from chagasic patients used in this study were obtained from the serum bank at the Reference Laboratory for Chagas Disease at CPqAM-FIOCRUZ. Written informed consent was obtained from all adults or legal guardians of children before blood was collected.

Leishmania infantum genomic library and serological screening

A *L. infantum* genomic library was constructed with reagents from the Stratagene Corporation (La Jolla, USA) using total *L. infantum* DNA partially digested with Tsp5091 and ligated into the λ-ZAP Express bacteriophage, previously digested with EcoRI. Library amplification and screening was carried out as previously described [27], using a pool of six sera from patients with VL, at a 1:1000 dilution, to screen approximately 30,000 clones. The inserts were sequenced and compared with sequences from the *L. infantum* and *Leishmania major*

genomes available at the TriTrypDB (<http://tritrypdb.org/tritrypdb/>) and GeneDB (www.genedb.org) databases. Sequences obtained from the ends of each insert were then used for BLAST searches against genomic nucleotide sequences of *L. infantum* available at TriTrypDB. For the 5' ends of nearly all selected clones (except Lci9), sequences identical in nearly 100% of the nucleotides were found within regions predicted as protein coding regions whereas the corresponding 3' ends matched nearby sequences within the same open reading frame or within the neighboring intergenic regions. For Lci9, not found within the available *L. infantum* databases, the sequence for the whole 2.4 kb insert was generated by direct sequencing. The final sequence has been deposited to GenBank and received the accession number **KX018626**.

Subcloning strategies

For recombinant protein expression, a distinct strategy was used for each insert, depending on the occurrence of internal restriction sites compatible with the subcloning strategy into the expression plasmids of the pRSET series (A, B or C) (Invitrogen), as follows: the Lci6 insert (3.8 Kb) was recovered after digestion with BamHI/KpnI and the insert ligated into the same sites of pRSET C; Lci7 (2.4 Kb) was recovered using BamHI/SalI and the insert was ligated into the BamHI/XhoI sites of the pRSET B; Lci9 (2.4 Kb) was recovered with BamHI/XhoI and ligated into the same sites of pRSET B; Lci10 (0.9 Kb) was also recovered with BamHI/XhoI but the insert was ligated into the same sites of pRSET C; Lci11 (1.9 Kb) was first recovered using the enzymes BamHI/NotI and subcloned into the same sites of the vector pET21a (Nova-gen), followed by a second subcloning event where the Lci11 fragment was recovered from the resulting plasmid using BamHI/XhoI and the insert ligated into the same sites of pRSET A; Lci12 (2.8 Kb) was subcloned in pRSET B after digestion with the enzymes BamHI/PstI. In all cases, the resulting constructs encode for fusion proteins containing a common 32 amino acid segment at their N-terminuses, derived from the pRSET vector and which includes a polyhistidine tract (MRGSHHHHHHGMASMTGGGQMGRDLYDDDDKD) plus, eventually, a few further amino acids encoded by the vector's multiple cloning sites immediately before and after the antigen coding segment. For Lci13 it was generated after two sets of subcloning reactions, where first a 1 Kb PstI fragment from the previously described Lc2.2 clone [28] was sub-cloned into the PstI site of the pTZ18R vector, with its 5' end facing the vector's T7 promoter. For the second subcloning reaction, the insert was recovered from the pTZ18R vector through digestion with BamHI/HindIII and subcloned into the same sites of pRSET A. For Lci1, the plasmid used for its expression has been described before [23].

Expression and purification of recombinant proteins

For the expression of His-tagged recombinant proteins, *Escherichia coli* BL21(DE3) pLysS (Invitrogen) bacteria were transformed with the pRSET derived plasmids, grown in LB medium and expression induced by IPTG. Induced cells were harvested, resuspended in 0.15 M phosphate buffered saline, pH 7.2 (PBS) and lysed by sonication. Protein purification was performed with Ni-NTA Agarose (Qiagen). Protein products were analysed by 15% polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE), followed by staining of the proteins with Coomassie blue R-250. For estimation of the recombinant proteins concentrations, the densities of their stained bands in Coomassie bluestained gels were compared with those of known concentrations of bovine serum albumin (BSA).

ELISA

The ELISA assays were essentially carried out as previously described at [23]. Briefly, ~400 ng of the individual recombinant proteins or mixes of three proteins consisting of 300 ng of each

protein were added to each well of ELISA plates. The wells were then incubated with the selected sera at a dilution of 1:200 (canine sera) or 1:900 (human sera), followed by incubation with the secondary antibody, namely peroxidase-conjugated goat anti-dog IgG (1:1200) or anti-human IgG (1:10000), depending on the tested sera. For the rK39 ELISA assays, the commercial recombinant rK39 antigen was purchased from Rekom Biotech (Granada, Spain) and the assays were carried out following the manufacturer's specifications.

Statistical analysis

The cutoff values for the ELISAs were defined as means of results obtained with serum samples from 50 healthy donors plus three standard deviations. The ROC curves and the sensitivity and specificity values were generated with the Medcalc Software version 15.8. The graphs were generated by the GraphPad Prism 3.

Results

Serological screening and identification of novel *Leishmania infantum* antigens

A total of 60 positive clones from a genomic *L. infantum* expression library were identified after an immunoscreening with a pool of six sera from Brazilian VL patients. Inserts from 50 clones were sequenced and seven different protein-coding gene fragments were identified and their protein products named as Lci6, Lci7, Lci8, Lci9, Lci10, Lci11, and Lci12, to avoid confusion with the five antigens previously described by us from *L. infantum* [23]. Thirty-three clones were found to contain fragments of the Lci6 gene, three encoded Lci7, two encoded Lci8 and the remaining genes (encoding Lci9, Lci10, Lci11 and Lci12) were represented by one clone each. When compared with *L. infantum* and *L. major* sequences, five of the identified antigens (Lci6, Lci8, Lci9, Lci10 and Lci12) are either annotated as hypothetical or have not been properly studied in *Leishmania*. Lci11 has been previously described from *Leishmania amazonensis* as a phosphoprotein which binds specifically to a homologue of the translation initiation factor eIF4E, named as Leish4E-IP (for 4E interacting protein) [29]. This is a hydrophilic protein conserved in *L. infantum* and *L. major* but with limited conservation in *Trypanosoma* spp and which is very rich in the amino acids proline, glutamine, alanine and serine. The seventh polypeptide, Lci7, is the *L. infantum* orthologue of the stress-inducible protein sti1, originally described in *L. major* [30]. Table 1 lists the *L. infantum* accession numbers from TriTrypDB for the genes encoding most of the identified proteins. For Lci9, its gene hasn't been properly annotated within the *L. infantum* genomic sequences, although sequences resembling parts of this gene can be found split within two distinct segments of chromosome 28, suggesting an assemblage error perhaps due to the shotgun nature of the sequencing of this

Table 1. TriTrypDb accession numbers for the newly identified antigenic proteins.

Protein	Accession number in TriTrypDB
Lci6	LinJ.26.1950
Lci7	LinJ.08.1020
Lci8	LinJ.32.2420
Lci9	LmjF.28.3010
Lci10	LinJ.34.2360
Lci11	LinJ.35.4030
Lci12	LinJ.29.0110

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184867.t001>

genome [31]. An orthologue for the Lci9 gene is clearly identifiable in *L. major*, however, and its accession number is also listed in [Table 1](#).

Sequence analysis of the novel *L. infantum* antigens

All five novel *Leishmania* antigens identified in the *L. infantum* screening (Lci6, Lci8, Lci9, Lci10 and Lci12) have in common the presence of tracts of *in tandem* repetitive motifs ([Fig 1](#)). Most of these (Lci6, Lci8, Lci10 and Lci12) are predicted to be large proteins. The length of their repeats varies significantly, from only 8 (Lci12) to more than 50 (Lci6 and Lci10) amino acid residues, but little similarity in sequence between the repeats is observed, with the exception of those from Lci8 and Lci12, which seem to be related. Lci6 is composed by a non-repetitive N-terminal region (450 residues long), followed by 21 non-identical repeats of variable length (varying from 95 to 135 residues) and a very short C-terminus. It is the *L. infantum* orthologue of a microtubule-associated protein, described from *Trypanosoma brucei* as GB4 [32]. Lci8 consists of 61 identical repeats of 10 amino acid residues, flanked by short N and C-terminal regions of 331 and 242 residues in length, respectively. It is an orthologue of a *T. brucei* membrane associated protein possibly involved with vesicular transport, Tb-291 [33]. Based upon the gene sequence of its *L. major* orthologue, the full-length Lci9 is shorter than the other antigens discussed here and consists of two sets of related repeats of 25 (14 copies) and 34 (11 copies) residues, flanked by very short N and C-terminal regions (169 and 97 residues long, respectively). This is the orthologue of the protein named nucleoporin (TbNup140) [34]. Lci10 encodes a hypothetical protein that has orthologues in other *Leishmania* species but is absent from *Trypanosoma*, although it might be related to a protein found within the flagellar attachment zone in *T. brucei*. The sequence available from the *L. infantum* genome appears to be incomplete but the Lci10 clone contains multiple related repetitive motifs of different sizes (varying from 68 to 198 residues) which follow a non-repetitive N-terminal region. Lci12, also defined as a hypothetical protein, is the *Leishmania* orthologue of the membrane-associated protein Tb-292 from *T. brucei*, related to the Lci8 orthologue Tb-291 [33]. The

L. infantum protein was also identified in a bioinformatic screening for proteins with tandem repeat domains [35]. It is composed by an N-terminal region containing approximately 160 amino acids, followed by a region containing 30 repeats of an 8 amino acids-long motif and a carboxi-terminal region containing the *trans*-membrane segments.

Recombinant antigen expression

With the exception of Lci8, all the other antigens identified here were efficiently expressed in *E. coli* and purified by affinity chromatography on nickel columns. Results of representative analysis by SDS-PAGE of the various recombinant proteins are shown in [Fig 2a](#). For Lci6, based on the subcloned fragment, the recombinant protein would encompass residues 246 to 1548 of the original polypeptide with a predicted molecular weight of 286 kDa. However, a single band of ~40 kDa (a likely result of internal proteolytic cleavage) is seen after expression and purification; it includes the His-tag at the N-terminus and approximately the first one-third of the protein. The Lci7 subcloned fragment encodes for a polypeptide consisting of most of the protein (residues 69 to 547), generating a 54 kDa recombinant protein. For Lci9, the recombinant polypeptide consists of 799 residues and includes all elements identified within its *L. major* orthologue, expressed as a 71 kDa band. Lci10 was only expressed as a polypeptide encompassing residues 404 to 717 of the full-length protein and a predicted molecular weight of ~35 kDa ([Fig 1d](#)). The recombinant protein, nevertheless, migrates with an apparent molecular weight greater than 50 kDa. Recombinant Lci11 encompasses residues 47 to 688 of the original protein with a predicted molecular weight of 63 kDa, but also migrates in gel with

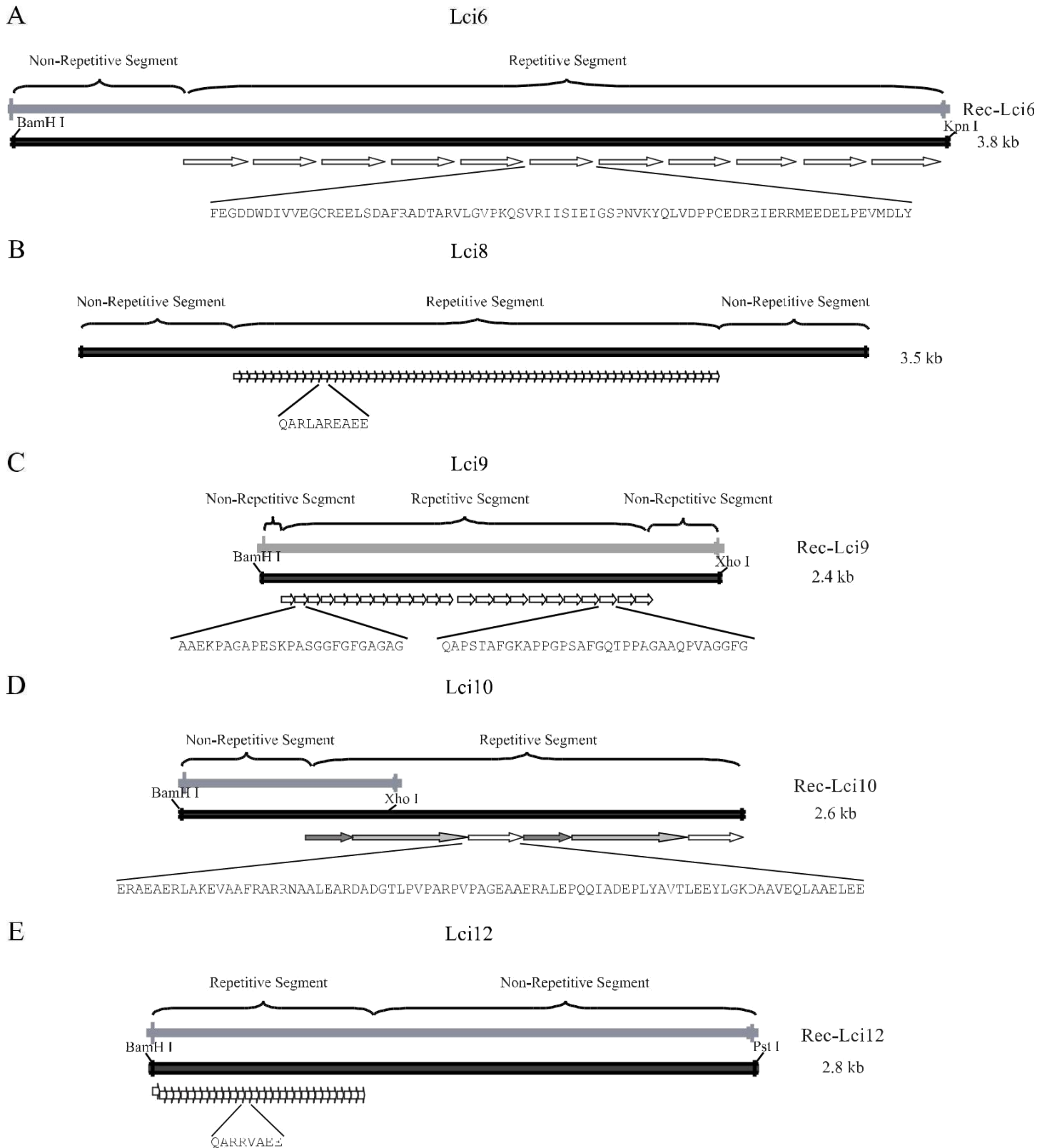


Fig 1. Schematic representation of the various gene fragments and corresponding deduced recombinant proteins evaluated in this study. The maps were derived from the sequences produced after direct sequencing or from the coding genomic sequences available at TriTrypDb.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184867.g001>

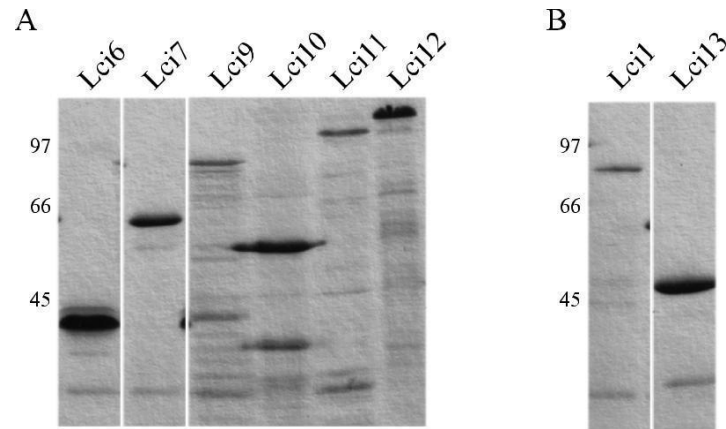


Fig 2. Polyacrilamide gel electrophoresis showing the affinity purified polypeptides evaluated in this study. (A) His-tagged, recombinant fragments of Lci6, Lci7, Lci9, Lci10, Lci11 and Lci12 in denaturing 15% SDS-PAGE stained with Coomassie Blue. All lanes shown are from a single gel but selected regions were removed for clarity. For some of these polypeptides, especially the larger ones, bands of lower molecular weight can be generally seen, but these are likely degradation products due to proteolysis within the bacteria that vary in intensity between different batches of purification. (B) The same for Lci1 and Lci13. The numbers on the left indicate the sizes of molecular weight markers.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184867.g002>

an apparent molecular weight higher than predicted, ~100 kDa. For Lci12, the recombinant polypeptide expressed comprises residues 153 to 1081 of the full-length protein, with a pre-dicted size of ~106 kDa and a compatible migration in gel.

Two other proteins obtained in previous works were added to this study for comparative purposes and shown in Fig 2b. Lci1 encodes a *L. infantum* homologue of the cytoplasmic heat shock protein HSP70 [23] and the recombinant protein migrates with an apparent molecular weight of ~80 kDa. The second protein, named Lci13 here for clarity, encodes part of the *L. infantum* mitochondrial HSP70. The recombinant fragment evaluated was described before [28] and migrates in gel with an apparent molecular weight of ~45 kDa. Despite the fact that both Lci1 and Lci13 belong to the family of HSP70 proteins, the identity between the two in terms of amino acid sequence is less than 50% and a rabbit polyclonal serum produced against recombinant Lci13 does not recognize Lci1 (unpublished data).

Recognition of the *L. infantum* recombinant proteins by human sera

To evaluate the antigenicity of the recombinant antigens selected for this study, we performed ELISA assays with serum from humans infected with *L. infantum* and with VL diagnosis con-firmed through parasitological tests (Fig 3 and Table 2). With the exception of Lci1, previously tested [23], none of the others recombinant polypeptides had been evaluated before in similar assays. The different antigens produced ELISA reactions with variable intensities but the sensi-tivity values for the novel antigens were low, varying between 26 and 48%, and much inferior to the performance seen with Lci1 (72%), also insufficient, or with either the total parasite lysate (LAg± 96%) or the commercial recombinant rK39 antigen (84%). As before [23], and in order to minimize the possibility of false positive results and increase specificity, for these experiments we opted to define a cutoff based on the mean plus three standard deviations of the results generated with control sera from healthy individuals. Indeed, most of the antigens did not produce false positive reactions and the specificity values calculated based on these sera were equal to or very close to 100% (the data also summarized in Fig 3 and Table 2). The various antigens were also tested with sera from patients with cutaneous leishmaniasis and

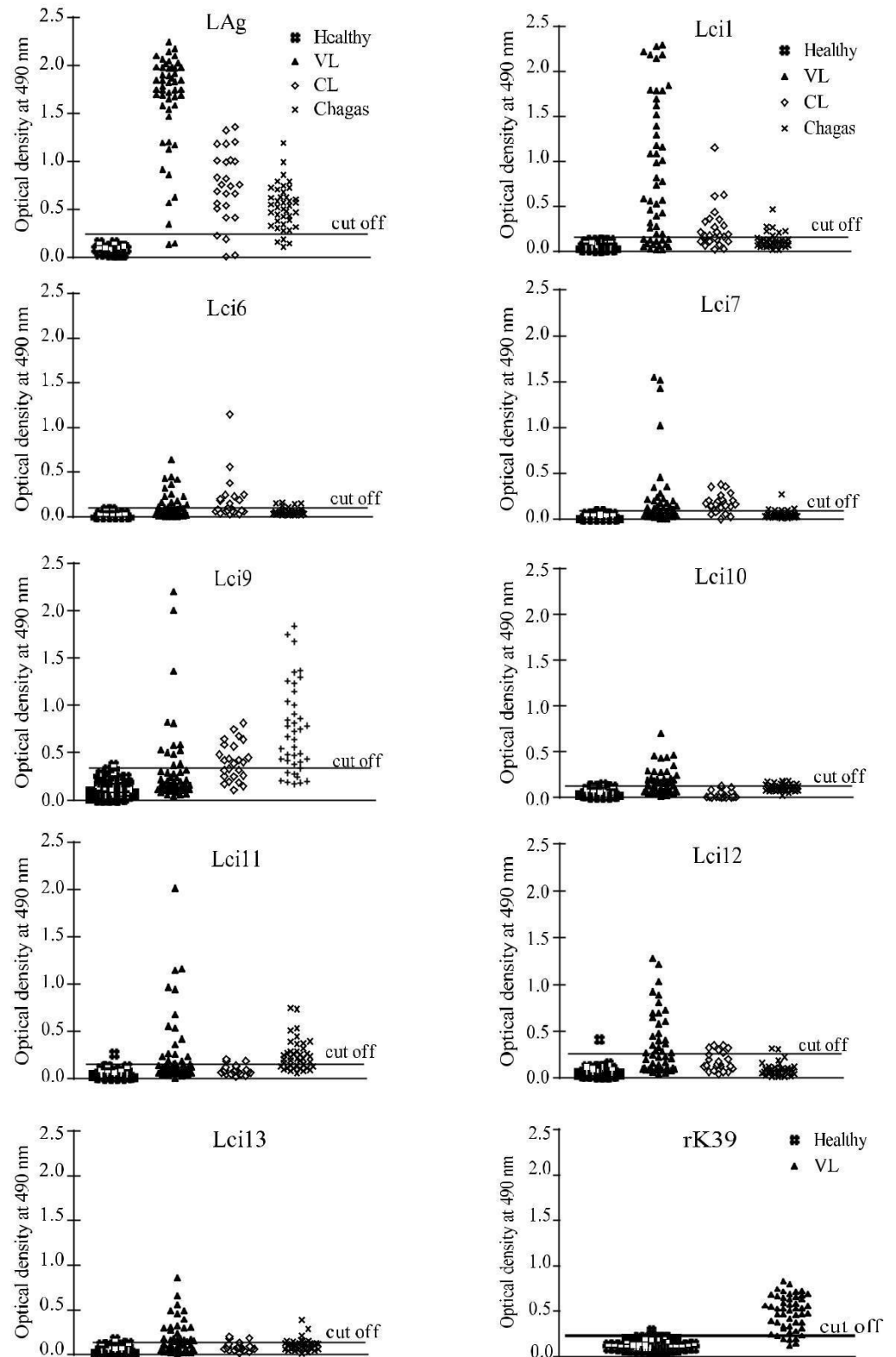


Fig 3. Evaluation of the novel *Leishmania infantum* recombinant antigens for the diagnosis of visceral leishmaniasis in humans. A panel of human sera derived from individuals with confirmed visceral leishmaniasis was tested through an Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) with the recombinant

antigens produced in this study, the rK39 and the total *L. infantum* lysate (LAg). The panel was composed of 50 serum samples from individuals with visceral leishmaniasis (VL), 50 serum samples from healthy individuals (Healthy), 23 serum samples from individuals with cutaneous leishmaniasis (CL) and 40 serum samples from individuals with Chagas disease (Chagas). Each symbol corresponds to the result obtained with an individual serum. The horizontal lines indicate cutoff values, calculated by the means of results obtained with serum samples from healthy donors plus three standard deviations.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184867.g003>

Chagas' disease in order to evaluate their cross-reactivity for VL diagnosis. Remarkably, Lci9 produced very strong cross-reactions with sera from Chagas' disease patients and only Lci10 and Lci12 did not display cross-reactions to sera from either cutaneous leishmaniasis or Chagas' disease individuals. With the exception of Lci9 (60%), the specificity values calculated based on these sera were all above 95%. Overall, among the new recombinant polypeptides tested, antigens Lci1 and Lci7 produced a better performance (greater sensitivity with very high specificity), but their low sensitivity compromises their use as single antigens for the diagnosis of human VL ([Table 2](#)).

Recognition of the *L. infantum* recombinant proteins by canine sera

Next, we assayed the same set of antigens for their potential to identify positive sera from dogs with parasitologically confirmed leishmaniasis. Again, only Lci1 had been previously been tested in similar assays [[23](#)]. In general, these antigens had a performance with the canine sera better than that seen for the positive human samples. The ELISA's sensitivity varied between 49 and 91%, for the novel antigens described here, and 93 and 97%, for Lci1 and Lci13,

Table 2. Summary of the ELISA assays carried out with human sera in order to evaluate the performance of the recombinant antigens for the identification of positive cases of human VL. LAg represents the total *L. infantum* lysate used as positive control. C.I. stands for confidence interval. NE/Not Evaluated.

Recombinant antigens	Sera from confirmed VL infected humans		Sera from related diseases (% of cross-reactive sera with positive results)		
	% of sensitivity (99% C.I.)	% of specificity/ healthy sera (99% C.I.)	Cutaneous Leishmaniasis	Chagas' disease	% of specificity/ related diseases (99% C.I.)
LAg	96% (86.3%±99.5%)	100% (92.9%±100%)	52%	20%	74% (62.7%±82.6%)
Lci1	72% (57.5%±83.8%)	100% (92.9%±100%)	26%	2.5%	94% (87.65%±97.47%)
Lci6	48% (33.7%±62.6%)	100% (92.9%±100%)	13%	0%	97% (92.4%±99.4%)
Lci7	52% (37.4%±66.3%)	100% (92.9%±100%)	17%	2.5%	96% (89.98%±98.55%)
Lci9	26% (14.6%±40.3%)	98% (89.2%±100%)	56%	77.5%	60% (50.4%±69%)
Lci10	48% (33.7%±62.6%)	100% (92.89%±100%)	0%	0%	100% (92.9%±100%)
Lci11	32% (19.5% -46.7%)	98% (89.2%±100%)	25%	7.5%	90% (82.5%±94.5%)
Lci12	46% (31.8% -60.7%)	100% (92.9%±100%)	0%	0%	99% (95.2%±100%)
Lci13	44% (30% -58.8%)	98% (89.4%±100%)	12.5%	12.5%	93% (86.5%±96.9%)
Mix (Lci1, Lci12 and Lci13)	84% (70.9%±92.8%)	98% (86.8%±99.9)	NE	NE	NE
rK39	84% (70.9%±92.8%)	100% (92.89%±100%)	NE	NE	NE

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184867.t002>

respectively, comparable to that from the total parasite lysate ($LA_{93\pm 93\%}$). In contrast, the sensitivity for the commercial rK39 was 68%. Again no false positive results were seen when sera from healthy control dogs were evaluated, with the specificity values calculated based on these equal to 100% for the different polypeptides tested. When sera from dogs afflicted with other infectious diseases (ehrlichiosis, babesiosis or demodicosis) were evaluated, however, some positive cross-reactions, with moderate intensity were observed, leading to reduced specificity values calculated with these sera ($76\pm 100\%$) (Fig 4 and Table 3). Lci13 displayed the best performance between the various antigens tested, with 97% sensitivity and very high specificity. Its performance was even superior to the one seen with the assays using total parasite lysate (Lag), which displayed some false negative results as well as strong cross-reactions with the sera from dogs with other infectious diseases. Other antigens also produced strong reactions with the positive dogs' sera (Lci1 and the novel antigen Lci12), but their performance was inferior to Lci13. Nevertheless, with the dog sera at least, all three antigens performed much better than the commercial recombinant rK39 and can be potentially useful as part of novel tests for the diagnosis of canine leishmaniasis.

Evaluation of a mix of three recombinant proteins against both human and canine sera

When the results from the ELISA assays with the VL positive human sera were analyzed in more detail, all were seen to recognize at least one of the recombinant antigens evaluated (data not shown). This led us to test in similar assays, with the VL positive sera from humans and dogs, a mix of recombinant proteins with complementary reactivities (Lci1, Lci12, Lci13). This ^aMix° consists of the best three proteins evaluated here in terms of sensitivity and specificity with human and/or canine sera. The results from the assays with the human sera are shown in Fig 5a. The ^aMix° produced a strong reaction with the positive sera, displaying a greater sensitivity when compared with the individual antigens (84% sensitivity also shown in Table 2), and an overall performance more similar to the total parasite lysate or to recombinant rK39 when the results were analyzed through a ROC curve (Fig 5b). A great number of cross-reactive reactions, however, were seen with the sera from Chagas' disease and cutaneous leishmaniasis individuals. The assays using the canine sera also resulted in a significant proportion of positive results for the animals with confirmed leishmaniasis (88% sensitivity Fig 5c and Table 2). The ^aMix°, however, produced a lower performance than the one observed for Lci13 and the total parasite lysate, although no significant difference was seen when these results were analyzed through a ROC curve (Fig 5d), with all three samples showing strong sensitivity and specificity for the diagnosis of the canine leishmaniasis. In comparison with rK39, however, the ^aMix° still behaved much better than the commercially produced recombinant protein when tested with the dog sera.

Discussion

An early and accurate diagnosis of VL is of great importance to the administration of an effective treatment, screening of endemic areas and consequent interruption of the parasite life cycle [15,16]. In this study, a panel of novel *L. infantum* antigens was evaluated for their potential use for the diagnosis of both human and canine forms of VL. ELISA was chosen for this evaluation since it is a preferred choice for the serodiagnosis of the disease in the laboratory [36] and it has been shown to be more reliable and sensitive than other rapid tests [37]. Several of the antigens tested showed very good potential for the canine form, with one of them (Lci13), demonstrating a better capacity to detect the canine leishmaniasis than the total parasite lysate. This protein is a promising antigen, since some recent studies did not find a single

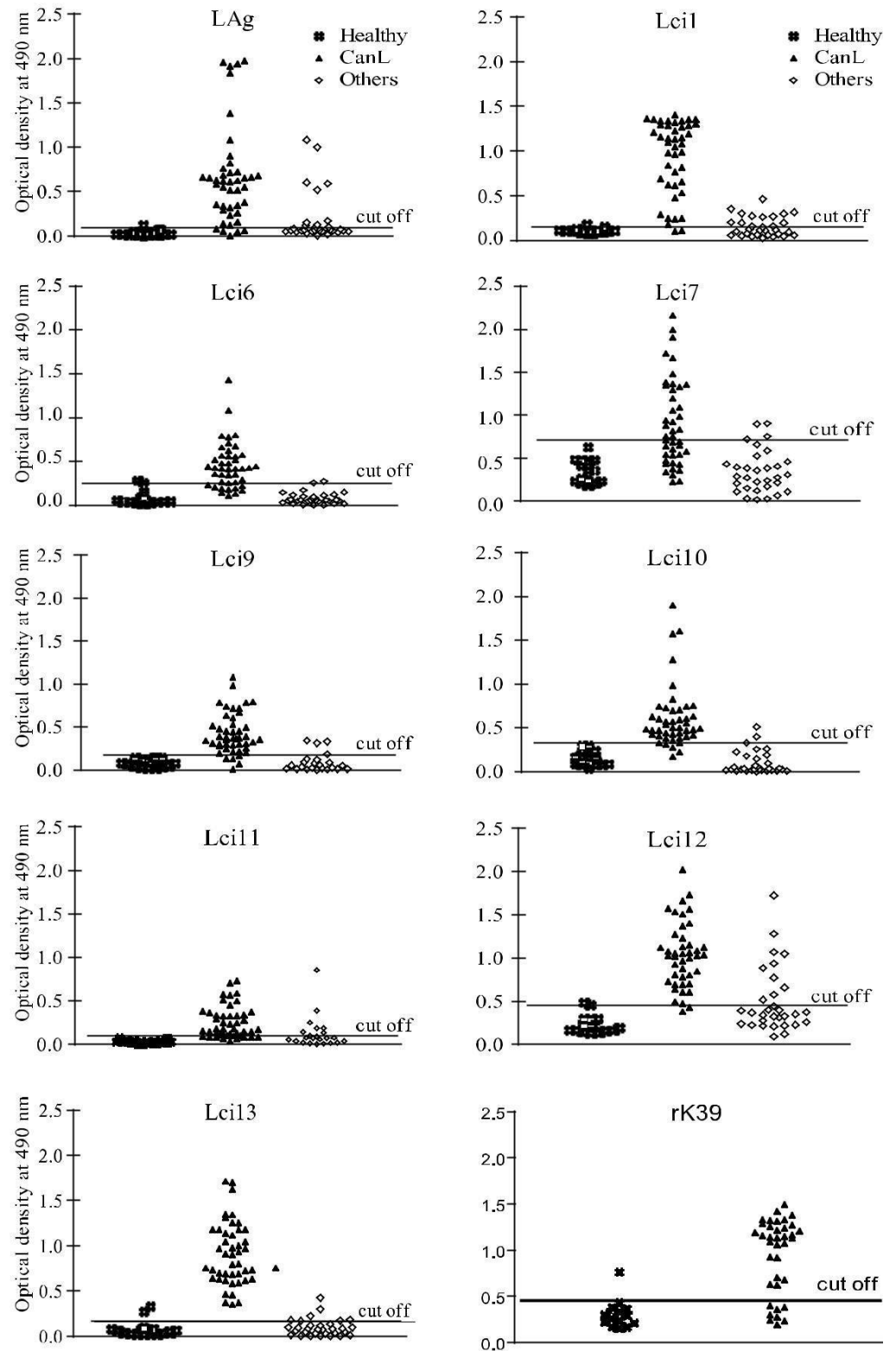


Fig 4. Evaluation of the novel *Leishmania infantum* recombinant antigens for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. The ELISA assay described in the previous Figure was performed also with a panel of canine sera from animals confirmed with visceral leishmaniasis. Serum samples from 46 dogs with

leishmaniasis confirmed through parasitological tests (CanL& canine leishmaniasis), 31 dogs with other infections (4 with babesiosis, 20 with ehrlichiosis, and 7 with demodicosis&Others) and 15 healthy control animals (Healthy) were assayed with the recombinant antigens, the rK39 and the total *L. infantum* lysate (LAg). Each symbol corresponds to the result obtained with an individual serum. The horizontal lines indicate cutoff values, calculated as described in Materials and Methods.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184867.g004>

protein capable of such diagnostic efficiency in dogs [38,39]. In contrast, none of the antigens tested were as effective for human VL, highlighting the differences in immune response between the two different disease targets, as highlighted previously [23,26]. In the assays described here, the commercial rK39 antigen was included in order to facilitate the comparison of the newly identified antigens with other previously described and also to evaluate the immune response level from the sera selected for this study. The results for the rK39 were indeed consistent with what has been reported in the literature and confirming that it is effective for the diagnosis of human VL but performs much less satisfactorily with the canine form of the disease [19,24].

Most of the antigens tested here were proteins bearing repetitive motifs. Such proteins have been reported in the literature to be present in various organisms, from viruses to humans, and are characterized by the presence of at least two or more copies of an amino acid sequence. Several studies show that they are particularly antigenic and it is believed that this occurs due to stimulation of B cells by binding these repetitive antigens, by a route independent of the T-lymphocyte stimulation [40–43]. For these reasons, these proteins are strong candidates for the development of serological assays and vaccine targets. Here, the evaluated proteins bearing repetitive motifs did not show good sensitivity in humans. However, when tested against dog

Table 3. Performance of the recombinant antigens with dog sera. LAg represents the total *L. infantum* lysate used as positive control. C.I. stands for confidence interval. NE=Not Evaluated.

Recombinant antigens	Sera from dogs with confirmed leishmaniasis		Sera from related diseases (% of cross-reactive sera with positive results)			
	% of sensitivity (99% C.I.)	% of specificity/ healthy sera (99% C.I.)	Ehrlichia	Babesiosis	Demodicosis	% of specificity/ related diseases (99% C.I.)
LAg	93% (80.9%±98.5%)	100% (76.8%±100%)	15%	50%	0%	89% (76.4%±96.4%)
Lci1	93% (80.9%±98.5%)	100% (76.8%±100%)	50%	0%	14%	76% (61.2%±87.4%)
Lci6	67% (51.5%±80.9%)	100% (76.8%±100%)	0%	0%	0%	100% (76.8%±100%)
Lci7	49% (33.3%±64.6%)	100% (76.8%±100%)	15%	0%	0%	94% (82.1%±98.6%)
Lci9	85% (71.1%±93.7%)	100% (76.8%±100%)	10%	0%	14%	92% (78.6%±98.3%)
Lci10	77% (61.4%±88.2%)	100% (76.8%±100%)	15%	0%	14%	91% (79.2%±97.6%)
Lci11	83% (68.6%±92.2%)	100% (76.8%±100%)	30%	0%	28%	79% (62.7%±90.4%)
Lci12	91% (77.9%–97.4%)	100% (76.8%±100%)	35%	50%	0%	80% (66.1%±90.6%)
Lci13	97% (85.8%±99.9%)	100% (76.8%±100%)	5%	0%	0%	98% (88.5%±99.9%)
Mix (Lci1, Lci12 and Lci13)	88% (72.6%±96.7%)	100% (76.8%±100%)	NE	NE	NE	NE
rK39	68% (50.2%±82%)	100% (78.2%±100%)	NE	NE	NE	NE

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184867.t003>

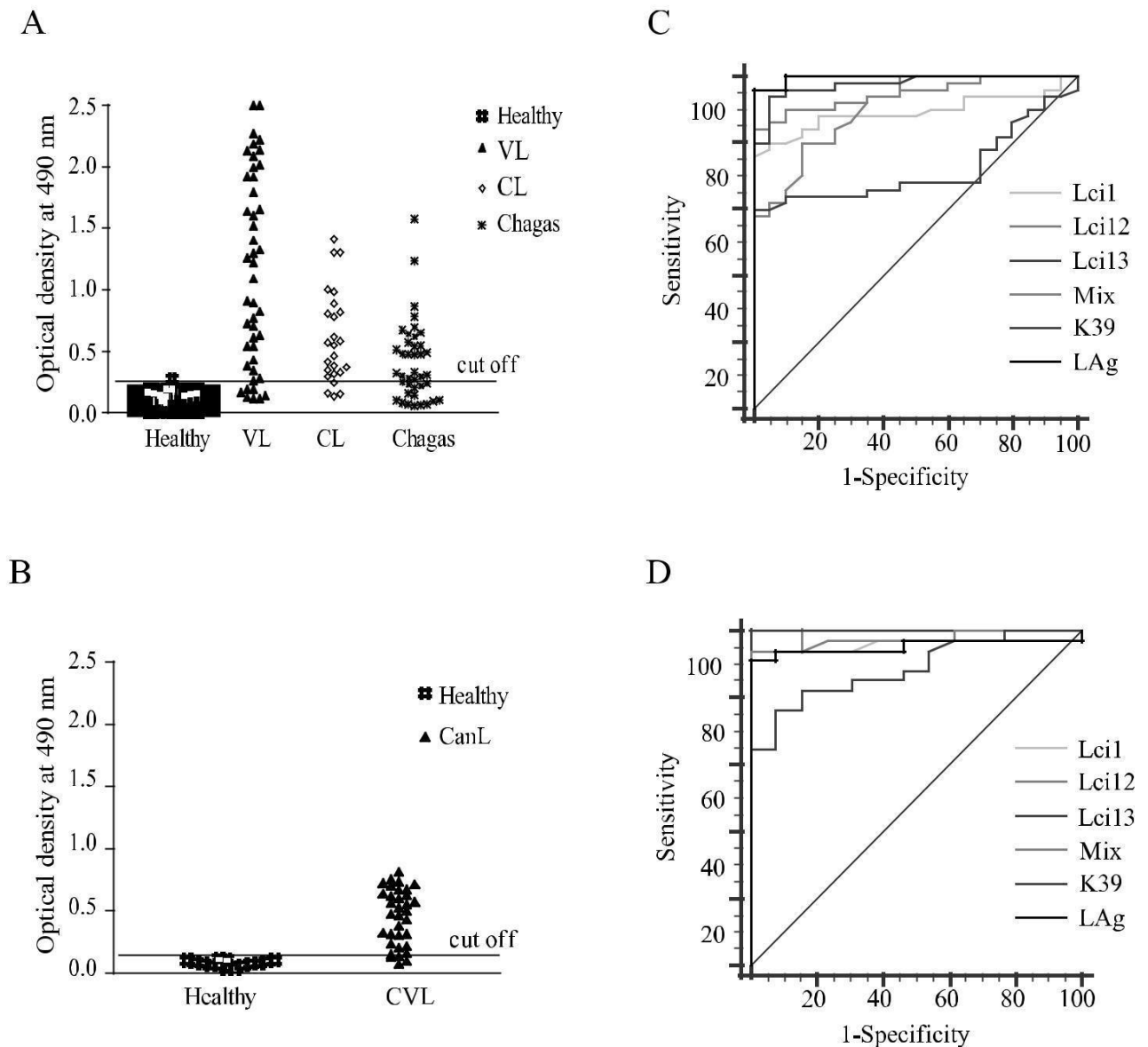


Fig 5. Reactivity of an antigenic mix with human and canine sera positive for visceral leishmaniasis. (A) Reactivity of an antigenic mix with human sera from individuals with confirmed visceral leishmaniasis (VL), cutaneous leishmaniasis (CL), Chagas' disease (Chagas) and healthy controls (Healthy). (B) ROC curves displaying the performance with the human sera of the protein ^aMix^o, the individual recombinant proteins that were included in the ^aMix^o, rK39 and the total *L. infantum* lysate (LAg). (C) Serum reactivity of dogs with canine leishmaniasis (CanL) and healthy control animals (Healthy) with the same protein ^aMix^o. (D) SROC curve showing the performance with the canine sera of the protein ^aMix^o, the individual recombinant proteins that were included in the ^aMix^o, rK39 and the total *L. infantum* lysate.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184867.g005>

sera, they displayed high sensitivity, corroborating previously published data where a repetitive protein showed higher sensitivity than non-repetitive proteins with canine samples [44].

The tested recombinant antigens displayed major differences in sensitivity when tested in human and dog sera, as previously seen by us and others using different recombinant polypeptides in the same type of assay [23,26]. This variance may be due to the differentiated way that the vertebrate hosts react to the parasite, mainly regarding the recognition and presentation of the distinct antigens studied to the immune system or, as has been proposed [26], this response

may be due to different mechanisms for parasite survival in each host (man and dog). On the other hand, since it has been shown that variations in sensitivity may be due to the symptomatic and asymptomatic phases of the disease, the symptomatic phase displaying the best sensitivity performance in the serological tests [45], these differences may, to some extent, reflect the stage of the disease in the individuals from whom the sera were collected. In general, the differential recognition of the studied proteins by the sera from the two hosts highlights the differences in the immune responses elicited by the parasite and the need to optimize the current serological tests.

In order to improve the diagnosis of VL in humans, we proposed the evaluation of an antigen ^aMix^o, composed by antigens which already had produced good performance with the dog samples. These antigens were chosen in order to combine the high sensitivity and specificity found in dog sera and improve the tests made with the individual proteins to detect the disease in dog and humans, resulting in a promising serological test. Recombinant Lci1 had been evaluated before with a good performance for VL immunodiagnosis in dogs [23] and it was selected as one of the three proteins (with Lci12 and Lci13) included in the ^aMix^o. The use of this ^aMix^o led to a substantial increase in the sensitivity for the human disease, with a minor decrease in performance for the canine leishmaniasis, when compared with Lci13 alone and total *Leishmania* lysate, with no false positive results seen when assayed against the healthy control sera. The ^aMix^o was therefore a significant improvement as a tool to detect the disease in both humans and dogs, although further optimization would still be required in antigen representation in order to increase sensitivity prior to any considerations regarding a commercial test. Nevertheless, these results contrast with a recent report where a similar mix of three antigens did not lead to an increase in their diagnostic performance when it was compared with the individual proteins alone [39]. Lack of significant improvement attempted by a mixture of proteins may be explained by the decrease of the antigenicity of each individual protein, due to the presence of the antigenic peptide in lower concentration in the solid phase. An alternative serological method that could be used to deal with the limitations presented by the protein mixture is the development of chimeric proteins, containing the regions of the proteins that presented the best performance in serological evaluations. Some studies in this area have already been done and they showed a significant improvement in the sensitivity of the serological test [46–49].

In summary, the recombinant antigens tested individually in this study in human and dog sera, displayed different sensitivities for the serodiagnosis of VL, with a better performance in dogs. In fact, Lci13 displayed a sensitivity for the dog sera higher than the current field tests, which demonstrates the potential for this recombinant antigen to detect CVL on its own. The goal of identifying a single natural antigen valid for the diagnosis of both forms of the disease does not seem viable. Recently, the use of chimeric proteins based on multiple antigenic peptides for the diagnosis of the canine leishmaniasis has been tried with promising results. The performance seen with the protein mix tested here indicates that, with improvement, the inclusion of selected epitopes from these antigens into novel chimeric proteins could be a good option to obtain serological tests with higher sensitivity and which would simultaneously be effective for both species.

Acknowledgments

We thank members of Dr. O. P. de Melo Neto's laboratory for helpful discussions and support. We also would like to thank Dr. Marli T. Cordeiro for the human sera used as negative control, Dr. Maria Edileuza F. Brito for the sera from patients with cutaneous leishmaniasis and Dr. Yara M. Gomes for the sera from chagasic patients. The authors thank the Program for

Technical Development of Health Inputs-PDTIS-FIOCRUZ for the use of its facility, the auto-matic sequencing facility RPT01C, at the Fiocruz-PE.

Author Contributions

Conceptualization: Lain C. Pontes de Carvalho, Geraldo G. S. Oliveira, Osvaldo P. de Melo Neto.

Formal analysis: Franklin B. Magalhães, Artur L. Castro Neto, Marília B. Nascimento, Wagner J. T. Santos, Washington L. C. dos Santos.

Funding acquisition: Lain C. Pontes de Carvalho, Osvaldo P. de Melo Neto.

Investigation: Franklin B. Magalhães, Artur L. Castro Neto, Marília B. Nascimento, Wagner J. T. Santos, Washington L. C. dos Santos.

Methodology: Geraldo G. S. Oliveira.

Resources: Zulma M. Medeiros, Adelino S. Lima Neto, Dorcas L. Costa, Carlos H. N. Costa.

Supervision: Franklin B. Magalhães, Zulma M. Medeiros, Lain C. Pontes de Carvalho, Geraldo G. S. Oliveira, Osvaldo P. de Melo Neto.

Writing ± original draft: Osvaldo P. de Melo Neto.

Writing ± review & editing: Lain C. Pontes de Carvalho, Osvaldo P. de Melo Neto.

References

1. Guerin PJ, Olliaro P, Sundar S, Boelaert M, Croft SL, Desjeux P, et al. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. *Lancet Infect Dis.* 2002; 2: 494±501. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(02\)00347-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(02)00347-X)
2. Harhay MO, Olliaro PL, Vaillant M, Chappuis F, Lima MA, Ritmeijer K, et al. Who is a typical patient with visceral leishmaniasis? Characterizing the demographic and nutritional profile of patients in Brazil, East Africa, and South Asia. *AmJTropMedHyg.* 2011; 84: 543±550.
3. Shakya N, Bajpai P, Gupta S. Therapeutic switching in leishmania chemotherapy: a distinct approach towards unsatisfied treatment needs. *JParasitDis.* 2011; 35: 104±112.
4. Singh N, Kumar M, Singh RK. Leishmaniasis: current status of available drugs and new potential drug targets. *Asian PacJTropMed.* 2012; 5: 485±497.
5. Desjeux P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *TransRSocTropMedHyg.* 2001; 95: 239±243.
6. Maia-Elkhoury ANS, Alves WA, De Sousa-Gomes ML, De Sena JM, Luna E a. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. *CadSaude Publica.* 2008; 24: 2941±2947. <https://doi.org/10.1590/S0102-311X2008001200024>
7. Martins-Melo FR, Lima MS, Alencar CH, Ramos AN Jr., Heukelbach J. Epidemiological patterns of mortality due to visceral leishmaniasis and HIV/AIDS co-infection in Brazil, 2000±2011. *TransRSocTrop-MedHyg.* 2014; 108: 338±347.
8. Quinnell RJ, Courtenay O. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. *Parasitology.* 2009; 136: 1915±1934. <https://doi.org/10.1017/S0031182009991156> PMID: 19835643
9. Roque ALR, Jansen AM. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. *IntJParasitolParasitesWildl.* 2014; 3: 251±262. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2014.08.004> PMID: 25426421
10. Noli C, Saridomichelakis MN. An update on the diagnosis and treatment of canine leishmaniosis caused by *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*). *Vet J. Elsevier Ltd;* 2014; 202: 425±35. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.09.002> PMID: 25266647
11. Gomes YM, Paiva CM, Lira RA, Abath FG, Alves LC. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: biotechnological advances. *VetJ.* 2008; 175: 45±52.
12. Maia C, Campino L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *VetParasitol.* 2008; 158: 274±287.

13. Romero GA, Boelaert M. Control of visceral leishmaniasis in latin america-a systematicreview. *PLoS-NeglTropDis*. 2010; 4: e584.
14. Srivastava P, Dayama A, Mehrotra S, Sundar S. Diagnosis of visceral leishmaniasis. *TransRSocTrop-MedHyg*. 2011; 105: 1±6.
15. Srividya G, Kulshrestha A, Singh R, Salotra P. Diagnosis of visceral leishmaniasis: developments over the last decade. *ParasitolRes*. 2012; 110: 1065±1078.
16. Singh OP, Sundar S. Developments in diagnosis of visceral leishmaniasis in the elimination era. *Journal of Parasitology Research*. 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/239469> PMID: [26843964](#)
17. Burns JM Jr., Shreffler WG, Benson DR, Ghalib HW, Badaro R, Reed SG, et al. Molecular characteriza-tion of a kinesin-related antigen of *Leishmania* chagasi that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. *ProcNatlAcadSciUSA*. 1993; 90: 775±779. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.2.775>
18. Singh S, Gilman-Sachs A, Chang KP, Reed SG. Diagnostic and prognostic value ofK39 recombinant antigen in Indian leishmaniasis. *JParasitol*. 1995; 81: 1000±1003.
19. Maia Z, Lirio M, Mistro SS, Mendes CMC, Mehta SR, Badaro R, et al. Comparative study of rK39 *Leishmania* antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis: Systematic review with meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012; 6: e1484. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001484> PMID: [22303488](#)
20. Houghton RL, Petrescu M, Benson DR, Skeiky YA, Scalone A, Badaro R, et al. A cloned antigen (recombinant K39) of *Leishmania* chagasi diagnostic for visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus type 1 patients and a prognostic indicator for monitoring patients undergoing drug therapy. *JInfectDis*. 1998; 177: 1339±1344.
21. Boelaert M, El-Safi S, Hailu A, Mukhtar M, Rijal S, Sundar S, et al. Diagnostic tests for kala-azar: a multi-centre study of the freeze-dried DAT, rK39 strip test and KAtex in East Africa and the Indian sub-continent. *TransRSocTropMedHyg*. 2008; 102: 32±40.
22. Singh S, Kumari V, Singh N. Predicting kala-azar disease manifestations in asymptomatic patients with latent *Leishmania* donovani infection by detection of antibody against recombinant K39 antigen. *Clin-DiagnLab Immunol*. 2002; 9: 568±572.
23. Oliveira GG, Magalhaes FB, Teixeira MC, Pereira AM, Pinheiro CG, Santos LR, et al. Characterization of novel *Leishmania infantum* recombinant proteins encoded by genes from five families with distinct capacities for serodiagnosis of canine and human visceral leishmaniasis. *AmJTropMedHyg*. 2011; 85: 1025±1034.
24. Quinnell RJ, Carson C, Reithinger R, Garcez LM, Courtenay O. Evaluation of rK39 rapid diagnostic tests for canine visceral leishmaniasis: longitudinal study and meta-analysis. *PLoSNeglTropDis*. 2013; 7: e1992.
25. Peixoto HM, de Oliveira MR, Romero GA. Serological diagnosis of canine visceral leishmaniasisin Bra-zil: systematic review and meta-analysis. *TropMedIntHealth*. 2015; 20: 334±352.
26. Goto Y, Howard RF, Bhatia A, Trigo J, Nakatani M, Netto EM, et al. Distinct antigen recognition pattern during zoonotic visceral leishmaniasis in humans and dogs. *VetParasitol*. 2009; 160: 215±220. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.10.097> PMID: [19059724](#)
27. Teixeira MC, Oliveira GG, Silvany MA, cantara-Neves NM, Soares MB, 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. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2006.01.005> PMID: [16580229](#)
28. Campos RM, Nascimento M, Ferraz JC, Pereira MM, Rocha PO, Thompson GM, et al. Distinct mito-chondrial HSP70 homologues conserved in various *Leishmania* species suggest novel biological func-tions. *MolBiochemParasitol*. 2008; 160: 157±162.
29. Zinoviev A, Leger M, Wagner G, Shapira M. A novel 4E-interacting protein in *Leishmania* is involved in stage-specific translation pathways. *Nucleic Acids Res*. 2011; 39: 8404±8415. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr555> PMID: [21764780](#)
30. Webb JR, Kaufmann D, Campos-Neto A, Reed SG. Molecular cloning of a novel protein antigen of *Leishmania* major that elicits a potent immune response in experimental murine leishmaniasis. *JImmu-nol*. 1996; 157: 5034±5041.
31. Peacock CS, Seeger K, Harris D, Murphy L, Ruiz JC, Quail MA, et al. Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. *NatGenet*. 2007; 39: 839±847.
32. Rindisbacher L, Hemphill A, Seebeck T. A repetitive protein from *Trypanosoma brucei* which caps the microtubules at the posterior end of the cytoskeleton. *MolBiochemParasitol*. 1993; 58: 83±96. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(93\)90093-D](https://doi.org/10.1016/0166-6851(93)90093-D)

33. Lee MG, Russell DG, D'Alessandro PA, Van der Ploeg LH. Identification of membrane-associated proteins in *Trypanosoma brucei* encoding an internal, EARLRAEE amino acid repeat. *JBiolChem*. 1994; 269: 8408±8415.
34. DeGrasse JA, DuBois KN, Devos D, Siegel TN, Sali A, Field MC, et al. Evidence for a shared nuclear pore complex architecture that is conserved from the last common eukaryotic ancestor. *MolCell Proteo-mics*. 2009; 8: 2119±2130.
35. Goto Y, Coler RN, Reed SG. Bioinformatic identification of tandem repeat antigens of the *Leishmania donovani* complex. *InfectImm*. 2007; 75: 846±851.
36. Elmahallawy EK, Sampedro MA, Rodriguez-Granger J, Hoyos-Mallecot Y, Agil A, Navarro Mari JM, et al. Diagnosis of leishmaniasis. *JInfectDevCtries*. 2014; 8: 961±972. <https://doi.org/10.3855/jidc.4310> PMID: [25116660](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25116660/)
37. Abass E, Kang C, Martinkovic F, Semiao-Santos SJ, Sundar S, Walden P, et al. Heterogeneity of *Leishmania donovani* parasites complicates diagnosis of visceral leishmaniasis: comparison of different sero-logical tests in three endemic regions. *PLoSOne*. 2015; 10: e0116408.
38. Fraga DB, Da Silva ED, Pacheco L V, Borja LS, de O I, Coura-Vital W, et al. A multicentric evaluation of the recombinant *Leishmania infantum* antigen-based immunochromatographic assay for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *ParasitVectors*. 2014; 7: 136.
39. Fonseca AM, Faria AR, Rodrigues FTG, Nagem RAP, Magalhães RDM, Cunha JLR, et al. Evaluation of three recombinant *Leishmania infantum* antigens in human and canine visceral leishmaniasis diagnosis. *Acta Trop*. 2014; 137: 25±30. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.04.028> PMID: [24801885](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24801885/)
40. Vos Q, Lees A, Wu ZQ, Snapper CM, Mond JJ. B-cell activation by T-cell-independent type 2 antigens as an integral part of the humoral immune response to pathogenic microorganisms. *ImmunolRev*. 2000; 176: 154±170.
41. Goto Y, Carter D, Reed SG. Immunological dominance of *Trypanosoma cruzi* tandem repeat proteins. *InfectImm*. 2008; 76: 3967±3974.
42. Goto Y, Carter D, Guderian J, Inoue N, Kawazu S, Reed SG. Upregulated expression of B-cell antigen family tandem repeat proteins by *Leishmania* amastigotes. *InfectImm*. 2010; 78: 2138±2145.
43. Valiente-Gabioud AA, Veaute C, Perrig M, Galan-Romano FS, Sferco SJ, Marcipar IS. Effect of repetitiveness on the immunogenicity and antigenicity of *Trypanosoma cruzi* FRA protein. *ExpParasitol*. 2011; 127: 672±679. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2010.11.011> PMID: [21118687](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21118687/)
44. Rosati S, Ortoffi M, Profiti M, Mannelli A, Mignone W, Bollo E, et al. Prokaryotic expression and antigenic characterization of three recombinant *Leishmania* antigens for serological diagnosis of canine leishmaniasis. *ClinDiagnLab Immunol*. 2003; 10: 1153±1156.
45. Mettler M, Grimm F, Capelli G, Camp H, Deplazes P. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, an immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania* infections in dogs. *JClinMicrobiol*. 2005; 43: 5515±5519.
46. Boarino A, Scalone A, Gradoni L, Ferroglio E, Vitale F, Zanatta R, et al. Development of recombinant chimeric antigen expressing immunodominant B epitopes of *Leishmania infantum* for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *ClinDiagnLabImmunol*. 2005; 12: 647±653. <https://doi.org/10.1128/CDLI.12.5.647-653.2005>
47. Camussone C, Gonzalez V, Belluzo MS, Pujato N, Ribone ME, Lagier CM, et al. Comparison of recombinant *Trypanosoma cruzi* peptide mixtures versus multiepitope chimeric proteins as sensitizing antigens for immunodiagnosis. *ClinVaccinImmunol*. 2009; 16: 899±905.
48. Castro-Junior JG, Freire ML, Campos SP, Scopel KK, Porrozzi R, Da Silva ED, et al. Evidence of *Leishmania (Leishmania) infantum* infection in dogs from Juiz de Fora, Minas Gerais State, Brazil, based on immunochromatographic dual-path platform (DPP(R)) and PCR assays. *RevInstMedTrop Sao Paulo* 2014; 56: 225±229.
49. Faria AR, de Castro Veloso L, Coura-Vital W, Reis AB, Damasceno LM, Gazzinelli RT, et al. Novel Recombinant Multiepitope Proteins for the Diagnosis of Asymptomatic *Leishmania infantum*-Infected Dogs. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015; 9: 13±16. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003429> PMID: [25569685](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25569685/)

ANEXO I

Normas da revista a qual será publicado o artigo *“Gene design, protein expression optimization and preliminary evaluation of a new chimeric protein for the serological diagnosis of both human and canine visceral Leishmaniasis”*

Obs. Anexo I em meio digital

ANEXO II

Normas da revista a qual será publicado o artigo *“Avaliação e validação de um novo teste rápido e ELISA viável para o diagnóstico das formas humana e canina da leishmaniose visceral”*.

Obs. Anexo II em meio digital

ANEXO III

Normas da revista a qual será publicado o artigo *“Predição in silico de peptídeos para células CD4 e CD8 a partir de proteínas antigênicas de Leishmania infantum e avaliação como proposta vacinal”*

Obs. Anexo III em meio digital

ANEXO IV

Normas da revista a qual será publicado o artigo *“Expressão de proteínas recombinantes em modelo eucarioto através de Leishmania tarentolae”*

Obs. Anexo IV em meio digital