

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
Instituto de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Parasitologia

Bruna Rodrigues de Almeida

**Diagnóstico sorológico da Leishmaniose Tegumentar  
utilizando peptídeos sintéticos como antígenos**

Belo Horizonte  
2024

Bruna Rodrigues de Almeida

**Diagnóstico sorológico da Leishmaniose Tegumentar  
utilizando peptídeos sintéticos como antígenos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como um dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Dra. Héli da Monteiro de Andrade

Área de concentração: Protozoologia

Belo Horizonte  
2024

043

Almeida, Bruna Rodrigues de.

Diagnóstico sorológico da Leishmaniose Tegumentar utilizando peptídeos sintéticos como antígenos [manuscrito] / Bruna Rodrigues de Almeida. – 2024. 89 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Dra. Héli da Monteiro de Andrade.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Parasitologia.

1. Parasitologia. 2. Leishmaniose Tegumentar Difusa. 3. Testes Sorológicos. 4. Vacinas Sintéticas. I. Andrade, Héli da Monteiro de. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 576.88/.89



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

**TÍTULO: "DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR UTILIZANDO PEPTÍDEOS SINTÉTICOS COMO ANTÍGENOS"**

**ALUNA: BRUNA RODRIGUES DE ALMEIDA**

**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: PROTOZOOLOGIA**

**DISSERTAÇÃO: 468/2024/06**

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia **vinte e oito de agosto de 2024**, pela Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais constituída pelos seguintes doutores:

**Daniel Menezes Souza**

UFMG

**Vanessa Gomes Fraga**

UFMG

**Hélida Monteiro de Andrade** - Orientadora

UFMG

Belo Horizonte, 28 de agosto de 2024.



Documento assinado eletronicamente por **Helida Monteiro de Andrade, Coordenador(a)**, em 02/09/2024, às 14:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

Folha de Aprovação 3407120 SEI 23072.241356/2024-39 / pg. 1



Documento assinado eletronicamente por **Vanessa Gomes Fraga, Servidor(a)**, em 06/09/2024, às 14:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Daniel Menezes Souza, Subcoordenador(a)**, em 08/10/2024, às 20:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **3407120** e o código CRC **BB12228E**.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de expressar minha profunda gratidão à minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Hélia Monteiro de Andrade. Agradeço por toda a orientação e apoio durante todos esses anos. Seus conselhos e ensinamentos são valiosos e contribuem não apenas para o meu desenvolvimento acadêmico, mas também para meu crescimento pessoal. Sinto-me privilegiada em aprender com uma pesquisadora tão dedicada e experiente, por quem nutro uma profunda admiração.

A todos do Laboratório de Leishmanioses e aos colaboradores, Elaine, Dri, Thábata, Ramonzinho, Bárbara, Dra. Simone, Giulia e Laís, gratidão pela parceria ao longo destes anos, pelos momentos de distração que foram essenciais para tornar a jornada do mestrado mais leve e enriquecedora.

Gostaria de expressar minha profunda gratidão ao Dr. Edward Oliveira, pesquisador do Instituto René Rachou, pela orientação valiosa durante minha Iniciação Científica em 2019, juntamente com a admirável Mes. Juliana. Agradeço também pela contribuição significativa neste trabalho, disponibilizando os soros de pacientes atendidos no Ambulatório da Fiocruz Minas.

As doutoras Bruna Soares e Jordanna, pelos trabalhos de doutorados que deram início ao projeto dessa dissertação.

Agradeço os meus colegas de turma do mestrado, em especial Amanda e Ana Luísa, pela amizade, dentro e fora da sala de aula.

Agradeço a todos os membros do Departamento de Parasitologia, incluindo todos os brilhantes professores, e, em especial, às secretárias Sumara e Sibebe.

Dedico esta dissertação à minha família, com especial gratidão a minha mãe, Ana Paula, e meu pai, Euilson, pelo amor incondicional e pelo suporte imprescindível ao longo de toda a minha trajetória escolar e acadêmica. Agradeço também a Wanessa pelo apoio emocional e moral, que esteve sempre presente durante os períodos mais desafiadores da minha vida.

Por fim, agradeço as agências de fomento, FAPEMIG e CNPq pelo financiamento deste projeto.

## RESUMO

A Leishmaniose Tegumentar apresenta uma ampla diversidade clínica com variabilidade no espectro de gravidade, o que dificulta o diagnóstico clínico. O tratamento efetivo e o controle das leishmanioses dependem de um diagnóstico acurado e precoce, de maneira a evitar o desenvolvimento de doenças crônicas e/ou de lesões desfigurantes. Diferentes métodos de diagnóstico são usados para a confirmação da doença, entretanto, o diagnóstico utilizando os métodos disponíveis, apresentam dificuldades seja na coleta do material, execução da técnica ou ainda na conclusão do resultado. Nesse contexto antígenos purificados sintéticos ou recombinantes têm sido identificados com objetivo de melhorar o diagnóstico dessa parasitose. No presente trabalho, realizamos a seleção e síntese de peptídeos para serem testados em diagnóstico sorológico da LT. Os peptídeos foram selecionados por mapeamento de epitopos para células B detectados simultaneamente por dois softwares, BCPreds e ABCpred, em 6 proteínas identificadas por nosso grupo como promissoras para diagnóstico da LT. Dessa forma 20 sequências foram sintetizadas e procedemos a triagem dos antígenos com “pool” de soros positivos e negativos e selecionamos 9 peptídeos com um índice de reatividade (IR) superior a 1,5. Os métodos ELISA e CLIA utilizando esses 9 peptídeos foram avaliados quanto a sensibilidade (S), especificidade (E), valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e área sob a curva (AUC) com soro de pacientes com LT (n=30) e saudáveis (n=29). Avaliamos também reações cruzadas utilizando soros de pacientes com leishmaniose visceral (n=30), paracoccidomicose (n=8) e esporotricose (n=10). A reação de ELISA com o peptídeo BT7 apresentou os melhores resultados, com elevada AUC= 0,934, S=88%, E= 97%, VPP =97%, VPN =88% (p <0,0001), e baixo índice de reação com LV (3%) e ausência de reação com soro de pacientes com paracoccidomicose e esporotricose. O melhor resultado no CLIA foi obtido com o peptídeo HS3 que apresentou elevada AUC= 0,909, S= 94%, E= 77%, VPP =75%, VPN =94% (p <0,0001) e, apesar do elevado índice de reação com LV (96%), não apresentou reação cruzada com paracoccidomicose e baixo índice de reatividade com esporotricose (12%). Além disso, a combinação dos peptídeos BT7 e EL1 aumentou a eficácia dos testes, sendo que essa combinação no ELISA mostrou superioridade ao CLIA, com AUC de 0,971, sensibilidade de 96%, especificidade de 88%, VPP de 92% e VPN de 94%. No CLIA, a combinação dos antígenos BT7 e EL1 não apenas melhorou a especificidade, mas também manteve a AUC obtida com os antígenos isolados. Esses resultados sugerem novos potenciais antígenos para diagnóstico sorológico da LT.

**Palavras-chave:** Leishmaniose Tegumentar; Diagnóstico sorológico; Peptídeo sintético

## ABSTRACT

Cutaneous leishmaniasis presents a broad clinical spectrum with variability in severity, which complicates the clinical diagnosis. Effective treatment and control of leishmaniasis rely on accurate and early diagnosis to prevent the development of chronic conditions and/or disfiguring lesions. Various diagnostic methods are used to confirm the disease; however, these methods often encounter difficulties in material collection, technique execution, and result interpretation. In this context, synthetic or recombinant purified antigens have been explored to enhance the diagnosis of this parasitosis. In this study, we selected and synthesized peptides for testing in the serological diagnosis of cutaneous leishmaniasis (CL). Peptides were chosen by mapping epitopes for B cells detected simultaneously using two software programs, BCPreds and ABCpred, across six proteins identified by our group as promising for CL diagnosis. Consequently, 20 sequences were synthesized, and the antigens were screened with a pool of positive and negative sera. We selected 9 peptides with a reactivity index (RI) greater than 1.5. We evaluated the sensitivity (S), specificity (E), positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV), and area under the curve (AUC) of the ELISA and CLIA methods using these 9 peptides. Additionally, we assessed cross-reactions with sera from patients with visceral leishmaniasis (n=30), paracoccidioidomycosis (n=8), and sporotrichosis (n=10). In the ELISA assay, the BT7 peptide exhibited the best performance, with a high AUC of 0.934, sensitivity of 88%, specificity of 97%, PPV of 97%, and NPV of 88% ( $p < 0.0001$ ). It showed a low reaction rate with leishmaniasis (3%) and no reaction with sera from patients with paracoccidioidomycosis and sporotrichosis. The best result in the CLIA method was achieved with the HS3 peptide, which demonstrated a high AUC of 0.909, sensitivity of 94%, specificity of 77%, PPV of 75%, and NPV of 94% ( $p < 0.0001$ ). Despite a high reaction rate with leishmaniasis (96%), this peptide showed no cross-reactivity with paracoccidioidomycosis and a low reactivity rate with sporotrichosis (12%). Furthermore, combining the BT7 and EL1 peptides improved test efficacy. The combination in ELISA showed superior performance compared to CLIA, with an AUC of 0.971, sensitivity of 96%, specificity of 88%, PPV of 92%, and NPV of 94%. In CLIA, the combination of BT7 and EL1 antigens not only improved specificity but also maintained the AUC achieved with the individual antigens. These results suggest new potential antigens for the serological diagnosis of cutaneous leishmaniasis.

**Keywords:** Cutaneous Leishmaniasis; Serological Diagnosis; Synthetic Peptide

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1:** Absorbância da reação do ELISA utilizando peptídeos como antígeno em diferentes concentrações de revestimento de placa.

**Figura 2:** Absorbância da reação de ELISA utilizando peptídeos como antígeno na concentração 0,5g/well. Soro diluído 1:100 nas placas de Poliestireno-Costar®(A) e PVC-Falcon® (B), e soro diluído 1:50 nas placas de Costar® (C) e Falcon® (D).

**Figura 3:** Ensaio ELISA dos peptídeos usando conjugado em duas diluições 1:3000 (A) e 1:6000 (B).

**Figura 4:** Absorbância da reação de ELISA utilizando peptídeos como antígeno na concentração de 0,5 µg/well, na placa de poliestireno (Costar®), com pool de soros positivos (n=10) e negativos (n=10) para LV, diluídos 1:50, e conjugado diluído 1:3000.

**Figura 5:** Unidades Relativas de Luz (URL) do CLIA com antígenos a 0,1µg/well (A) e 0,5µg/well (B). Em placa de poliestireno (Costar®), pool de soro diluído na proporção 1:50 e conjugado a 1:3000.

**Figura 6:** Unidades Relativas de Luz (URL) do CLIA com antígenos a 0,5µg/well em placa de poliestireno (Costar®), pool de soro diluído na proporção 1:50 e 1:100.

**Figura 7:** Diagrama de Venn representando os resultados dos peptídeos selecionados, com Índice de Reatividade (IR) igual ou superior a 1,5, obtidos a partir da triagem das reações ELISA e CLIA-ELISA. No centro do gráfico, os peptídeos que se destacaram em ambas as reações.

**Figura 8:** Resultados obtidos em ELISA e CLIA dos peptídeos **HS1**(A, B), **HS3**(C, D) **HS5** (E, F), **EL1**(G, H), **EL2**(I, J), **EL3** (K, L), **BT4** (M, N), **BT7** (O, P), **PEP** (Q, R).

**Figura 9:** Avaliação dos peptídeos frente aos soros de pacientes com LT proveniente de duas regiões do Brasil (Sudeste e Centro-oeste). Amostras do Centro-oeste caracterizadas quanto ao agente etiológico em *L. amazonensis* ou subgênero *L. (Viannia)*.

**Figura 10:** Comparação do desempenho do antígeno BT7+EL1 na reação ELISA-(A) e CLIA (B) frente aos soros de pacientes com LT originado de duas regiões do país.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1:** Categoria de resultado de um teste diagnóstico em uma população de infectados e não infectados.

**Tabela 2:** Peptídeos resultantes da predição de epítomos de célula B selecionados para síntese.

**Tabela 3:** Índice de reatividade (IR) entre pools de soros positivos e negativos para LT em placas PVC (Falcon®) e poliestireno (Costar®), sensibilizadas com 0,5 µg/poço de cada peptídeo. Os soros foram diluídos 1:50 e o conjugado utilizado foi diluído 1:3.000. Peptídeos com  $IR \geq 1,5$  estão destacados em negrito.

**Tabela 4:** Índice de reatividade (IR), indicando a razão entre as absorbâncias nos pools positivos e negativos para LV na placa de poliestireno (Costar®), sensibilizadas com 0,5 µg/well de cada peptídeo. Os soros foram diluídos 1:50, e o conjugado utilizado diluído 1:3.000. Peptídeos com  $IR \geq 1,5$  estão destacados em negrito.

**Tabela 5:** Valores do IR de cada peptídeo no ELISA com os diferentes grupos de soros. Em negrito peptídeos com  $IR \geq 1,5$ .

**Tabela 6:** Índice de reatividade (IR) indicando a razão das absorbâncias no CLIA entre os pools positivos e negativos para LT na placa de poliestireno (Costar®), sensibilizadas com 0,5 µg/well de cada peptídeo, soros diluídos 1:50, e conjugado diluído 1:3.000.

**Tabela 7:** Desempenho global dos antígenos no diagnóstico Leishmaniose Tegumentar em ELISA convencional e quimioluminescente (CLIA). Valores de sensibilidade, especificidade, acurácia (AUC), Valor de p, Valor Preditivo Positivo (VPP) e Valor preditivo Negativo (VPN).

**Tabela 8:** Percentual de reação cruzada para cada peptídeo nas reações ELISA e CLIA.

**Tabela 9:** Tabela comparativa dos antígenos isolados e grupados nas reações ELISA convencional e reação CLIA.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CLIA: *Chemiluminescent enzyme-linked immunosorbent assay*

CN: Controle Negativo

DPP: *Dual Path Platform*

ELISA: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

HIV: vírus da Imunodeficiência Humana

HSP70: proteína de choque térmico de 70 kilodáltons

IDRM: Reação Intradérmica de Montenegro

IR: Índice de Reatividade

LCD: Leishmaniose Cutânea Difusa

LCDB: Leishmaniose Cutânea Disseminada

LCL: Leishmaniose Cutânea Localizada

LT: Leishmaniose Tegumentar

LV: Leishmaniose Visceral

OPD: Ortho-Phenylenediamine

PBS: Phosphate-Buffered Saline

PCR: *Polymerase Chain Reaction*

PCR-RFLP: *Polymerase Chain Reaction -Restriction Fragmente Length Polymorphism*

PVC: Policloreto de Vinila

ROC: *Receiver Operating Characteristic*

SPSS: *Solid Phase Peptide Synthesis*

VPN: valor preditivo negativo

VPP: valor preditivo positivo.

## Sumário

UFMG .....	13
I-INTRODUÇÃO.....	12
Leishmanioses e <i>Leishmania</i> .....	12
Manifestações clínicas.....	13
Diagnósticos da Leishmaniose Tegumentar.....	17
Objetivo geral.....	23
Objetivos específicos .....	23
III- METODOLOGIA .....	24
III.1 Predição de epítomos e síntese dos peptídeos .....	24
III.2-Soros.....	24
III.2.1- Padronização das técnicas e triagem dos peptídeos.....	24
III.2.2- Avaliação das reações ELISA e CLIA.....	25
III.2.3- Reações cruzadas .....	25
III.2.4 –Avaliação com outras regiões geográficas.....	25
III. 3- Padronização das reações de ELISA e triagem dos peptídeos .....	25
III.4 - Padronização do CLIA.....	26
III. 5- Avaliação do desempenho do ELISA e do CLIA .....	27
IV- RESULTADOS .....	30
IV.1 - Identificação e síntese dos peptídeos .....	30
IV.2 -ELISA .....	31
IV-2.1– Padronização da técnica.....	31
IV-2.2– Testes com outros grupos de soros .....	36
IV.3-CLIA.....	39
IV.3.1 – Padronização da técnica .....	39
IV.4 -Avaliação do diagnóstico sorológico de LT por ELISA e CLIA com peptídeos sintéticos .....	42
IV. 5- Reações Cruzadas .....	50
IV.6 - Avaliação da sorologia com peptídeos sintéticos e soros de LT de diferente região geográfica...51	
V- DISCUSSÃO .....	57
VI- CONCLUSÕES .....	66
VI- REFERÊNCIA.....	67
VII- ANEXOS.....	82

## I-INTRODUÇÃO

### **Leishmanioses e *Leishmania***

As leishmanioses são doenças infecciosas negligenciadas, classificadas entre as principais endemias globais, com maior incidência no sul da Ásia, leste da África, região mediterrânea e América Latina. Estima-se que afetem cerca de 14 milhões de pessoas anualmente, com 2 milhões de novos casos registrados por ano (OMS, 2020). A doença, vem sendo descrita em vários municípios brasileiros, em média, cerca de 3.500 casos são registrados anualmente e o coeficiente de incidência é de 2,0 casos/100.000 habitantes (BRASIL, 2024).

São causadas por parasitos do gênero *Leishmania*, pertencentes à ordem Kinetoplastida (Ross, 1903, Honigberg, 1963). Dividido nos subgêneros *Leishmania (Leishmania)*, *L. (Viannia)*, *L. (Souroleishmania)* e *L. (Mundinia)* (Lainson e Shaw, 1987; Epinosa *et al.*, 2018) o gênero *Leishmania* compreende cerca de 35 espécies, destas, aproximadamente 20 são patogênicas para os seres humanos (Ashford, 2000). Esses protozoários são transmitidos por meio da picada de fêmeas do inseto vetor, dípteros da família Psychodidae, subfamília Phlebotominae (Lainson & Shaw 1978), pertencentes aos gêneros *Lutzomyia*, nas Américas e *Phlebotomus*, no Velho Mundo (Alexander *et al.*, 2002). Nas américas cerca de 54 espécies de vetores estão potencialmente envolvidas na transmissão (Desjeux, 1996).

Os flebotomíneos, ao se alimentarem em um hospedeiro infectado, ingerem o sangue contendo células com as formas arredondadas e sem flagelo livre, denominada amastigota. Uma vez no intestino médio do vetor, os protozoários se multiplicam e se diferenciam em promastigotas metacíclicas, assumindo a forma de células móveis e flageladas. Posteriormente, essas promastigotas metacíclicas migram para a probóscide do inseto e em uma nova alimentação sanguínea em animais vertebrados, são regurgitadas juntamente com a saliva do vetor (Bates *et al.*, 2003). Diversas pesquisas têm indicado elementos que contribuem para a capacidade infectante do flebotomíneo enquanto vetor. A saliva do artrópode, bem como as substâncias secretadas pelo próprio parasito, desempenham um papel fundamental ao facilitar a sobrevivência e estabelecimento do protozoário no hospedeiro (Abdeladhim, 2014, Serafim *et al.*, 2021). Além disso, a segunda refeição de sangue aumenta a presença das formas promastigotas metacíclicas no

intestino médio de flebotomíneos infectados por *Leishmania*, potencialmente aumentando a infecciosidade do vetor (Serafim *et al.*, 2016).

As formas promastigotas, ao serem fagocitadas por células do sistema fagocítico-mononuclear, como os macrófagos, demonstram capacidade de persistir nessas células devido a mecanismos que as permitem evadir as respostas imunológicas do hospedeiro, as quais visam controlar a progressão do parasito e o estabelecimento da doença. Através de processos bioquímicos, as promastigotas sofrem transformações morfológicas e se convertem em formas amastigotas (Scott e Noveis, 2016). Essas formas parasitárias são internalizadas em um vacúolo parasitóforo, formado pela fusão com o lisossomo, resultando na formação do fagolisossomo (Dermine *et al.*, 2000). Uma vez dentro dos macrófagos, as formas amastigotas proliferam e se espalham para outras células do mesmo tipo, dependendo de diversos fatores relacionados tanto ao parasito quanto ao hospedeiro (Liu e Uzonna, 2012; Duque e Descoteaux, 2015). Quando um hospedeiro infectado é picado por outro flebotomíneo, os amastigotas presentes em seu organismo são ingeridos juntamente com o sangue (Bates *et al.*, 2003). Após o desenvolvimento desses amastigotas em promastigotas, conforme descrito anteriormente, as formas promastigotas migram para a região bucal do flebotomíneo e são injetadas em um novo hospedeiro, dando continuidade ao ciclo da doença.

### **Manifestações clínicas**

As leishmanioses podem se manifestar em diversas formas clínicas. Um dos principais determinantes do tipo de patologia é a espécie e virulência do parasito, juntamente com a resposta imunológica e a susceptibilidade genética do hospedeiro. As leishmanioses são tradicionalmente categorizadas em duas formas: Leishmaniose Visceral (LV) e Leishmaniose Tegumentar (LT), cada uma causada por espécies diferentes do parasito (Kwang-Poo Chang., 2002).

Leishmaniose Visceral é causada pelas espécies do complexo *L. donovani*. Sua forma antroponótica é provocada pela espécie *Leishmania (L) donovani*, ao passo que a forma zoonótica da doença é causada pelas espécies *L. (L.) infantum* e *L. (L.) chagasi*, atualmente consideradas sinônimas (Lainson & Shaw, 1987; Maurício *et al.*, 2001). Na área urbana, os cães (*Canis familiaris*) exercem um papel de extrema relevância na epidemiologia da LV zoonótica, identificados como o principal reservatório do parasito para humanos. Essa relação decorre de sua alta suscetibilidade à infecção, intenso parasitismo cutâneo e alta proximidade com o homem

(Gontijo *et.al* 2004; Dantas-Torres *et al.*, 2006). Além de atuarem como reservatórios, os cães podem desenvolver a leishmaniose visceral canina (LVC), uma enfermidade que progride lentamente e pode ser desafiadora de diagnosticar por sintomas clínicos, necessitando de exames laboratoriais específicos (Abranches. *et al.*, 2014.). Em humanos, trata-se de uma doença sistêmica grave, com taxa de fatalidade superior a 95% se não diagnosticada e tratada adequadamente (WHO, 2022). A forma típica dessa doença em humanos é caracterizada por febre, perda de peso com um parasitismo intenso e disseminado em órgãos como fígado, baço e medula óssea (Desjeux, 2004). Após a infecção por *Leishmania*, os pacientes podem permanecer assintomáticos por vários anos até que a doença se manifeste, frequentemente em decorrência da imunossupressão. Aproximadamente 20% dos pacientes com leishmaniose visceral apresentam coinfeção com o HIV (Wilhelm, 2019). O risco de desenvolver leishmaniose visceral aumenta de 100 a 2.320 vezes em virtude da infecção pelo vírus (Van Griensven *et al.*, 2014). O diagnóstico é fundamentado em parâmetros clínicos e epidemiológicos que podem resultar em ambiguidade, podendo ser confundido com as doenças linfoproliferativas e esquistossomose. Por essa razão, é essencial empregar associação de métodos parasitológicos, sorológicos e imunológicos, para estabelecer com maior precisão o diagnóstico dessa doença (Reimão *et al.*, 2020).

A Leishmaniose Tegumentar é uma doença endêmica em 88 países, e dentre eles, Brasil, Colômbia, Peru, Nicarágua e Bolívia são os que apresentaram o maior registro de casos. Atualmente no Brasil a doença está em um notável processo de expansão geográfica, abrangendo novas áreas do território nacional. Em 2022, o Brasil contabilizou mais de 13.000 casos da doença, sendo que Minas Gerais registrou mais de 1.000 casos (OMS, 2020; SINAN, 2023). Anteriormente, a LT era limitada a áreas de vegetação primária, fundamentalmente uma zoonose de animais silvestres, acometendo humanos em contato com esse ambiente. No entanto, atualmente tem sido observada em áreas rurais quase totalmente desmatadas, regiões periurbanas e urbanas (Ursine *et al.*, 2022). Esse avanço pode ser atribuído a fatores como migração populacional, ocupação de encostas e a formação de aglomerados em centros urbanos associados a matas secundárias ou remanescentes (Jacobson, 2011; Confalonieri *et al.*, 2014) No Brasil, as principais espécies envolvidas na transmissão dos parasitos que causam a LT são: *Lutzomyia flaviscutellata*, *Lu. whitmani*, *Lu. umbratilis*, *Lu. intermedia*, *Lu. wellcomei* e *Lu. migonei* (Killick-Kendrick, 1999). Em áreas endêmicas é muito comum a sobreposição de espécies potenciais vetores para diferentes espécies de *Leishmania* (Margonari *et al.*, 2010 ; Saraiva *et al.*, 2015).

As espécies que constituem os agentes etiológicos da Leishmaniose Tegumentar no Brasil são *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lindenbergi*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) shawi* e *L. (Leishmania) amazonensi* (Figueira et al., 2017; Basano e Camargo, 2004; Laison et al., 2010;). Essas espécies causam manifestações que se dividem nas seguintes formas clínicas: leishmaniose cutânea localizada (LCL), leishmaniose cutânea difusa (LCD), leishmaniose mucocutânea (LMC), leishmaniose cutânea disseminada (LCDB). A LCL, é a forma mais comum da LT, com a formação de uma úlcera no local de entrada do parasito em formato circulares ou ovais, com base eritematosa, infiltrada, firme, avermelhada e granulosa e borda elevada bem delimitada, quando típicas (Scorza et al., 2017) variante mais severa da infecção provocada pela *Leishmania amazonensis* é reconhecida como leishmaniose cutânea difusa (Hashiguchi et al., 2016; Christensen et al., 2019). Essa manifestação é menos comum e ocorre em pacientes uma deficiência na resposta específica ao antígeno da espécie. Inicia-se de forma insidiosa, apresentando uma única lesão e pouca resposta ao tratamento. Ao longo do tempo, a doença progride caracterizada pela formação de placas e múltiplas nodulações não ulceradas que se espalham por grande extensão da pele com abundância de formas amastigotas. Além dessa forma grave, *L. amazonensis* também pode causar a forma mais comum, a LCL (Goto & Lindoso, 2010). Na leishmaniose mucosa (LMC), as lesões têm o potencial de danificar parcial ou completamente a mucosa das áreas nasal, oral e faríngea. Essa condição ocorre principalmente nas Américas como uma consequência da falta de tratamento adequado para a leishmaniose cutânea, frequentemente associada à espécie *L. braziliensis* (Abadías-Granado, 2021; Silveira et al., 2004). Essa forma clinica associa-se a elevados níveis de anticorpos circulantes, como IgG1 e, principalmente, IgG3 (Junqueira Pedras et al., 2003). Em alguns indivíduos, é observada a manifestação disseminada da infecção cutânea (LCDB), em que é possível identificar tanto as lesões primárias quanto as secundárias na pele. A propagação ágil do parasito caracteriza esses casos, os quais estão vinculados principalmente às espécies *L. braziliensis* e *L. amazonensis* (Silveira et al. 2004). Além das formas clínicas típicas, a literatura descreve casos de leishmaniose tegumentar atípica, nas quais as lesões exibem características incomuns e não se encaixam nas formas clínicas tradicionalmente definidas da doença. Essas lesões apresentam alterações histológicas que resultam em uma variedade de manifestações clínicas, incluindo pápulas, lesões verrucosas, queloides, bem como placas crostosas e ulceradas (Quaresma et al., 2018).

Observa-se que a Leishmaniose Tegumentar é uma doença de grande complexidade imunológica, na qual o perfil da resposta imune à infecção por *Leishmania* sp. influencia significativamente na gravidade e no desenvolvimento da doença (Auria *et al.*, 2019). De maneira geral, a resposta imunológica em pacientes infectados apresenta um equilíbrio entre as respostas Th1 e Th2, o que pode resultar em danos teciduais crônicos e na persistência do parasito (Castellano *et al.*, 2009). A patologia do tecido associada às infecções tegumentares por *Leishmania spp.* é relacionada a uma resposta imune vigorosa do tipo 1 aos antígenos do parasito, sendo que uma resposta imune eficaz contra a infecção está ligada à ativação de Th1, mediada por citocinas pró-inflamatórias que promovem a ativação dos macrófagos e a eliminação dos parasitos (Rossi e Fasel, 2018). O tamanho da lesão se correlaciona diretamente com a magnitude da produção de TNF estimulada por antígenos de *Leishmania*. Por outro lado, a suscetibilidade e a progressão da doença são frequentemente mediadas pela resposta do tipo 2, que favorece a replicação e a persistência dos parasitos (Castellano *et al.*, 2009). Assim, a doença clinicamente evidente pode surgir quando o equilíbrio entre fatores pró e anti-inflamatórios se torna distorcido, incluindo leishmaniose cutânea localizada (LCL) e manifestações atípicas mais extremas.

Na imunidade humoral, estudos realizados com modelos murinos demonstram que os anticorpos secretados pelas células B desempenham um papel crucial na neutralização, opsonização e ativação do sistema complemento (SC). A ativação do SC é destacada como uma importante primeira linha de defesa contra o parasito no hospedeiro vertebrado (Mauri e Bosma, 2012; Gurung e Kanneganti, 2015). A intensidade dessa resposta humoral parece estar diretamente relacionada à carga parasitária e à cronicidade da infecção, sendo observados títulos significativos de anticorpos em todas as manifestações clínicas da LT (Conde *et al.*, 2022).

A leishmaniose tegumentar exerce um impacto significativo na saúde pública, não apenas devido à sua ampla distribuição geográfica, mas também em virtude dos profundos efeitos psicossociais que provoca. As formas clínicas crônicas da doença, associadas a cicatrizes faciais marcantes, contribuem para a estigmatização e dificuldades na integração social. Essas lesões podem limitar oportunidades de emprego e exacerbar a pobreza e as desigualdades sociais enfrentadas por muitas pessoas afetadas, ampliando a gravidade da doença (Wijerathna *et al.*, 2018; Carvalho *et al.*, 2023).

Considerando as diversas formas clínicas e as variantes atípicas da doença, bem como os efeitos socioeconômicos associados, é imprescindível que o diagnóstico seja rápido e preciso para

a detecção precoce da doença ativa. Isso permite uma avaliação epidemiológica exata, evita possíveis reações cruzadas com outras condições e contribui para a redução da gravidade da doença, possibilitando o início oportuno do tratamento específico (Aronson *et al.*, 2017; Gurel *et al.*, 2020; Shrestha *et al.*, 2024).

### **Diagnósticos da Leishmaniose Tegumentar**

O diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar é realizado através de critérios clínicos e epidemiológicos em conjunto com exames laboratoriais (Reimão *et al.*, 2020). A avaliação considerando as características da lesão e os dados epidemiológicos é de grande importância para suspeitar da doença. No entanto, devido à constante expansão geográfica, bem como às diversas formas de lesões e semelhanças com outras doenças, como esporotricose, hanseníase, paracoccidioidomicose, torna-se essencial a confirmação por meio de metodologias de diagnóstico diferencial (Nascimento *et al.*, 2019). Atualmente os métodos laboratoriais incluem técnicas parasitológicas, moleculares, histopatológicas e imunológicas (Vries *et al.*, 2022).

O método parasitológico direto é considerado o de primeira escolha, envolvendo a identificação das formas amastigotas em esfregaços lesionais obtidos de biópsias, raspagens ou de impressão, corados pelo método de Giemsa. Com o auxílio de um microscópio óptico, os parasitos são identificados como estruturas com diâmetro de 2–4  $\mu\text{m}$ , exibindo núcleo e cinetoplasto distintivos. Este método é reconhecido por sua simplicidade, custo acessível e alta especificidade (Sousa *et al.*, 2014). Contudo, a sensibilidade do teste pode ser afetada pela experiência do profissional, evolução da doença e tipo de amostra (De Mello *et al.*, 2011). Por outro lado, o método parasitológico indireto envolve o cultivo *in vitro*, onde o material biológico é inoculado em meio de cultura. Após o desenvolvimento dos parasitos, verifica-se a presença de formas promastigotas no meio de cultura. Esta técnica apresenta desafios significativos devido ao potencial de contaminação por fungos e bactérias, e pode exigir até 30 dias para alcançar um resultado conclusivo (Rasti *et al.*, 2016). Além disso, a sensibilidade da técnica é relativamente baixa, variando de 50% a 70% (Pourmohammadi *et al.*, 2010).

Entre os métodos moleculares empregados rotineiramente em centros diagnósticos, destaca-se a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR, do inglês *Polymerase chain reaction*), devido à sua alta sensibilidade e especificidade, em comparação com os métodos diagnósticos atuais para LT, com a possibilidade de diferenciação das espécies através da PCR-RFLP. A PCR é indicada

quando há lesão atípica de leishmaniose cutânea e baixa carga parasitária, ou quando o método parasitológico direto é negativo. A partir da reação é possível detectar o parasito em diferentes tipos de amostras biológicas, como esfregaço sanguíneo, *swab*, aspirado e biópsia de lesão (Al-Jamebreh *et al.*, 2006, Ertabaklar *et al.*, 2015). Diversos estudos têm destacado a alta sensibilidade desse método na análise do esfregaço sanguíneo, apontando-o como uma promissora opção para diagnóstico menos invasivo em comparação ao método parasitológico direto, que necessita de biópsia (Mesa *et al.*, 2020). Com os avanços tecnológicos, a técnica evoluiu para PCR quantitativa, que simplifica a necessidade de utilizar múltiplas técnicas para identificar os resultados, sendo atualmente recomendada para monitorar a resposta ao tratamento da doença (Ramírez *et al.*, 2023)

Embora a técnica de PCR demonstre alto desempenho, é complexa, tem custo elevado e requer padronização, uma vez que não há protocolos definidos. Portanto, seu uso atual é principalmente restrito a centros de referência e pesquisa, o que limita a expansão dessa técnica em países em desenvolvimento. Por outro lado, como alternativa para simplificar os requisitos da PCR, plataformas de diagnóstico isotérmicas foram recentemente desenvolvidas e avaliadas. Entre elas, destaca-se a amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP), que oferece um diagnóstico rápido e eficiente, mantendo alta especificidade e sensibilidade para a detecção da LT (Adams *et al.*, 2018; Erber *et al.*, 2022). Alguns ensaios utilizando esse método demonstraram a capacidade de identificar o DNA de espécies como *L. donovani*, *L. tropica* e *L. major* (Verma *et al.*, 2017). A visualização dos resultados pode ser realizada de maneira simples, com muitos ensaios exibindo mudança de cor ou turbidez, permitindo a leitura do sinal a olho nu ou com o uso de câmeras de luz UV simples, dispensando equipamentos de alta tecnologia (Celeste *et al.* 2019, Nzelu *et al.*, 2019).

Uma outra alternativa para um diagnóstico mais acessível é o método histopatológico, que também é empregado rotineiramente. É realizado a partir da biópsia da borda da lesão, sendo o tecido parafinado e corado com hematoxilina-eosina, e posteriormente analisado por microscopia óptica em busca de formas amastigotas, além da avaliação dos processos inflamatórios típicos da doença, como o infiltrado inflamatório rico em histiócitos, plasmócitos e linfócitos, com presença de granuloma e hiperplasia epidérmica. Assim como no método parasitológico direto, a identificação das formas amastigotas é uma prática complexa, e o diagnóstico pode ser ainda mais inconclusivo devido às características histopatológicas que variam conforme o tempo da lesão e a

interação parasito-hospedeiro. Nesse sentido, a técnica de imuno-histoquímica possibilita aprimorar essa identificação e localização de antígenos em cortes histológicos, utilizando anticorpos específicos que, quando revelados, geram coloração visível ao microscópio óptico (Al-dhalimi e Jasim, 2023). Recentemente, Freire *et al.* (2020) empregaram anticorpo monoclonal anti-mTXNPx (mAb) recombinante de *Leishmania* para avaliar a viabilidade da marcação de amastigotas por imuno-histoquímica (IHQ). O estudo foi conduzido em biópsias de pele de hamsters experimentalmente infectados com *Leishmania amazonensis*, *Leishmania braziliensis* e *Leishmania guyanensis*, demonstrando sensibilidades superiores na IHQ variando de 85,7% a 79,6%, em comparação com 77,6% no exame direto e 65,3% no histopatológico. A especificidade foi superior a 90%, e o foi demonstrado que o tem capacidade de identificar pacientes com leishmaniose cutânea independentemente da carga parasitária. A utilização da imuno-histoquímica no diagnóstico da leishmaniose cutânea contribui para melhorar a sensibilidade em relação aos métodos histopatológicos evidenciando eficácia na detecção do parasito mesmo em lesões atípicas (Marques *et al.*, 2017; Shirion *et al.*, 2014).

Introduzida na prática médica em 1926 por Montenegro, a intradermorreação de Montenegro (IDRM) foi historicamente o método mais utilizada no diagnóstico laboratorial da leishmaniose tegumentar, tanto na forma cutânea quanto na mucosa. Esse teste traduz a resposta de hipersensibilidade tardia mediada por células T aos antígenos de *Leishmania*, é realizado por meio da injeção intradérmica de uma suspensão de promastigotas mortas de *Leishmania braziliensis* no antebraço do paciente. A positividade da reação é indicada pela formação de vesícula, pápula ou área de infiltração perceptível ao toque, sendo considerados resultados positivos os diâmetros de 5 mm ou maiores (Melo *et al.*, 1977). A sensibilidade do teste varia de 77% a 95,4%, enquanto a especificidade varia de 57% a 77,4%, evidenciando um desempenho satisfatório inclusive na detecção da infecção em amostras com baixa carga parasitária que resultam negativas em métodos moleculares (Pinheiro *et al.*, 2020). Contudo, o teste não diferencia pacientes com sintomas agudos daqueles curados ou em tratamento (Viana *et al.*, 2011). Devido à sua execução simples e baixo custo, a IDRM foi amplamente adotada no Brasil. No entanto, a produção do antígeno de Montenegro foi interrompida a partir de 2016 devido à falta de infraestrutura adequada no Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos, onde o antígeno era fabricado no país (Braz, 2019).

Dentre os métodos imunológicos de diagnóstico de infecções, os testes sorológicos baseiam-se na avaliação da resposta imunológica humoral do hospedeiro através da detecção de anticorpos. Contudo, sua eficácia é frequentemente limitada, especialmente devido à presença de baixos níveis de anticorpos específicos em pacientes com LC. O enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), dentre as reações sorológicas, destaca-se pela alta sensibilidade e especificidade, dependentes do antígeno utilizado (Souza *et al.*, 2015; Medeiros *et al.*, 2022; Sato *et al.*, 2016). Este método desempenha um papel crucial no diagnóstico das leishmanioses, superando métodos invasivos que detectam diretamente parasitos em esfregaços de tecido. Além disso, sua praticidade permite o teste simultâneo de várias amostras, proporcionando rapidez na execução e custo reduzido (Freire *et al.*, 2021). O emprego frequente do antígeno total, proveniente do lisado de promastigotas de *Leishmania* spp., pode ocasionalmente induzir a resultados falsos positivos em certas situações, devido principalmente às variabilidades na sensibilidade, decorrentes das distintas metodologias (Zanetti *et al.*, 2019). Atualmente, há um interesse crescente na identificação e caracterização de antígenos purificados, recombinantes ou mesmo peptídeos sintéticos, com o objetivo de aprimorar a sensibilidade e a especificidade dos testes sorológicos utilizados no diagnóstico da leishmaniose tegumentar.

Com o avanço da proteômica, uma variedade de técnicas foi desenvolvida para a separação, identificação e quantificação de proteínas, viabilizando estudos com diversas aplicações na área biológica. Isso inclui o aprimoramento de testes diagnósticos pela identificação de novas moléculas bioativas e marcadores biológicos que podem ser utilizados tanto para diagnóstico quanto para prognóstico de doenças, além de servirem como candidatos a imunógenos em vacinas. Além disso, a utilização de ferramentas de bioinformática é uma poderosa estratégia para identificação e obtenção de novos antígenos como a predição de epítomos de células B, resultando na geração de um grande número de novos candidatos antigênicos para diagnóstico sorológico (Resende *et al.*, 2012). Os antígenos obtidos por meio desses métodos podem consistir em diversas proteínas recombinantes que são potencialmente combinadas em diferentes testes sorológicos, contribuindo significativamente para o aumento da especificidade no diagnóstico da leishmaniose tegumentar (Souza *et al.*, 2015, Vale *et al.*, 2022, Medeiros *et al.*, 2022).

Recentemente, proteínas recombinantes empregadas como antígenos em ensaios imunoenzimáticos, como o ELISA, demonstraram alta reatividade em amostras positivas para Leishmaniose Tegumentar (LT). Sato *et al.* (2017) investigaram o uso de uma proteína

recombinante de *L. brasiliensis* (rLb6H) como antígeno no ELISA, analisando 500 soros que incluíam indivíduos saudáveis, pacientes positivos para LT e com outras doenças infecciosas. O teste apresentou sensibilidade de 100% e especificidade de 98,5% (em relação aos controles saudáveis) na detecção de anticorpos em soros de pacientes com LT. Apenas uma minoria das amostras de pacientes com doença de Chagas apresentava anticorpos contra rLb6H (17%), e não houve reação com soro de pacientes com histoplasmose, malária, paracoccidiodomicose, toxoplasmose e tuberculose. Posteriormente, em 2024, Valencia-Portillo e colaboradores validaram o teste rLb6H-ELISA utilizando amostras de diferentes regiões do Brasil (74,3% apresentaram a forma cutânea e 25,7% a forma mucosa) alcançando uma sensibilidade de 98,6% (IC 95%: 92,3–99,9) e uma especificidade de 100% (IC 95%: 94,8–100,0).

Há um crescente interesse na utilização de peptídeos como antígenos para o diagnóstico sorológico da leishmaniose tegumentar, uma vez que a produção não requer a manutenção do parasito, estabilidade e permite a combinação de diferentes antígenos, além de conferir aumento da sensibilidade dos testes diagnósticos e redução de reações não específicas (Link *et al.*, 2017; Pandey *et al.*, 2021). Recentemente, Medeiros *et al.* (2022) compararam diferentes antígenos em ensaios ELISA, incluindo uma proteína recombinante de *L. brasiliensis* (rTryP), um peptídeo altamente antigênico dessa proteína (MNEPAPP) e antígenos solúveis *Leishmania brasiliensis* (ASLb), também realizaram ensaios de imunofluorescência (IFI). No ELISA, a utilização do peptídeo MNEPAPP como antígeno apresentou uma acurácia superior em comparação com os outros antígenos testados e com os ensaios de Imunofluorescência, (rTryP 89,29%, ASLb com 65,00%, e IFI com 37,14%) Para os autores, esse resultado sugere que o uso de uma porção menor da proteína pode levar a um aumento na ligação específica entre antígeno e anticorpo, refletindo uma reação mais eficaz e precisa.

A utilização de antígenos mais específicos em métodos de baixo custo, fácil execução e com resultados rápidos é altamente desejável para aprimorar o diagnóstico da LT. Uma inovação na reação de ELISA vem sendo testada pelo nosso grupo de pesquisa com o uso de proteínas recombinantes e peptídeos sintéticos, o *Chemiluminescente enzyme-linked immunosorbent assay* (CLIA) utiliza uma molécula luminescente como marcador da reação resultando em uma análise quantitativa mais precisa em comparação com a medida de absorbância da reação convencional (Fonseca *et al.*, 2019; Leite, 2019). Isso oferece uma vantagem ao proporcionar uma medição absoluta na análise, além de rápida obtenção dos resultados (Cinquanta *et al.*, 2017). Leite (2019)

comparou o desempenho do CLIA e ELISA para diagnóstico da LT, utilizando como antígenos proteínas recombinantes (PQ, PQ20 e C9) que já haviam apresentado bons resultados no diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral humana. Os resultados do estudo mostraram que o teste CLIA apresentou maiores valores de acurácia em comparação ao ELISA para todos os antígenos testados. Os valores AUC no CLIA por antígeno foram: PQ10 = 0,71, PQ20 = 0,91, e C9 = 0,94, este último antígeno, C9, demonstrou o melhor desempenho, apresentando sensibilidade de 92%, especificidade de 83% e ausência de reatividade cruzada com soro de pacientes com outras infecções dermatológicas.

Pelo exposto, observa-se que a Leishmaniose Tegumentar apresenta uma ampla diversidade na sua manifestação clínica, mostrando um polimorfismo significativo e uma variabilidade no espectro de gravidade dos sinais e sintomas, o que dificulta o diagnóstico clínico. O tratamento efetivo e o controle das leishmanioses dependem de um diagnóstico acurado e precoce, de maneira a evitar o desenvolvimento de doenças crônicas e/ou de lesões desfigurantes. Diferentes métodos de diagnóstico são usados para a confirmação da doença, entretanto, o diagnóstico utilizando os métodos disponíveis, apresentam dificuldades seja na coleta do material, execução da técnica ou ainda na conclusão do resultado. Nesse contexto, em nosso grupo de pesquisa Lima e colaboradores (2017) identificaram proteínas antigênicas frente a soros de pacientes humanos com Leishmaniose Tegumentar mas não naqueles com Leishmaniose Visceral, as quais são também mais abundantes nas espécies *Leishmania amazonensis* e *L. braziliensis*, causadoras de LT, em relação a *L. infantum*, agente de LV. Em outro estudo do grupo (Celeste 2019), utilizando soro de hamster infectado experimentalmente com as três espécies acima, identificou proteínas reativas exclusivamente na infecção por *L. amazonenses*. A partir dessas proteínas anteriormente identificadas, por meio da predição de epítomos de células B e da síntese de peptídeos, torna-se viável explorar potenciais regiões de interação dessas proteínas com o soro de pacientes com LT.

No presente trabalho, realizamos a seleção e síntese de peptídeos para serem testados em diagnóstico sorológico da LT. Os peptídeos foram selecionados por mapeamento de epítomos para células B detectados simultaneamente por dois softwares, BCPreds e ABCpred, em 6 proteínas identificadas por nosso grupo como promissoras para diagnóstico da LT, e avaliados como antígenos pelos métodos de ELISA e CLIA. Foi possível demonstrar que alguns desses peptídeos apresentam potencial para melhorar significativamente o diagnóstico sorológico desta doença.

## II-OBJETIVOS

### Objetivo geral

Identificar novos antígenos para diagnóstico sorológico de Leishmaniose Tegumentar.

### Objetivos específicos

- Mapear epitopos para células B em proteínas identificadas pela imuno proteômica como imunogênicas e diferencialmente abundantes em *L. amazonensis*.
- Padronizar sorologia por CLIA e ELISA e realizar a triagem dos melhores peptídeos para diagnóstico da LT;
- Avaliar o desempenho do CLIA no diagnóstico de LT com os antígenos selecionados.
- Avaliar o desempenho do ELISA no diagnóstico de LT com os antígenos selecionados.
- Investigar a ocorrência reação cruzada nas reações padronizadas do ELISA e do CLIA
- Investigar o desempenho dos peptídeos frente a soro provenientes de diferentes regiões do país nas reações ELISA E CLIA.

### III- METODOLOGIA

#### III.1 Predição de epítomos e síntese dos peptídeos

As proteínas imunorreativas identificadas por Lima *et al.*, 2017 a partir do soro de pacientes com LT e LV e as proteínas reativas ao soro de hamster infectado com *L. amazonensis* identificadas por Celeste 2019 foram utilizadas para o mapear epítomos de célula B. Para isso, foram utilizados dois softwares: BCPreds, disponível em <http://ailab.cs.iastate.edu/bcpreds/> e ABCPred, disponível em <http://www.imtech.res.in/raghava/abcpred/>. Os epítomos gerados por ambos os softwares foram comparados, permitindo selecionar aqueles resultantes da sobreposição das predições pelos dois softwares simultaneamente. Previamente foi determinado que o tamanho ideal desses peptídeos deve variar entre 9 e 14 aminoácidos, pois a fenda dos anticorpos, onde os epítomos se ligam, apresentam uma abertura que acomoda cerca de 10 aminoácidos (Lopes, 2006). Os peptídeos selecionados foram adquiridos comercialmente por meio do serviço de síntese de peptídeos do Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos do Depto de Parasitologia ICB/UFMG.

#### III.2-Soros

Em cada etapa do trabalho foram utilizadas diferentes amostras de soros que estão descritas a seguir quanto a procedência, número e critério diagnóstico.

##### III.2.1- Padronização das técnicas e triagem dos peptídeos

Durante a fase inicial da padronização das reações ELISA e CLIA e triagem dos peptídeos, foram utilizados *pools* de soros de Minas Gerais, caracterizadas como de pacientes com LV, LT e CN (controle negativo), todas provenientes do ambulatório do Instituto René Rachou (FIOCRUZ-MG) e gentilmente doadas pelo pesquisador Edward Oliveira. Os soros de pacientes com LT com a forma cutânea localizadas (n=30) e LV (n=30) foram confirmados pelo diagnóstico parasitológico direto por método de *imprint* e diagnóstico sorológico DAT respectivamente, e os soros CN (n=29) foram confirmados por ELISA- RK 39. Cada *pool* foi preparado com igual volume de cada 10 amostras, totalizando 3 *pools* por grupo de amostra: LT, LV e CN. A autorização

ética foi obtida junto ao conselho institucional da FIOCRUZ e ao comitê nacional de ética em pesquisa na Plataforma Brasileira CAAE: 30429114.1.3001.5091.

### **III.2.2- Avaliação das reações ELISA e CLIA**

Na avaliação das reações de ELISA e CLIA realizadas com os peptídeos após triagem, foram utilizados os soros de pacientes de Minas Gerais com LT (n=30), e controle negativo (n=29), descritas acima e gentilmente cedidas pelo Dr. Edward Oliveira.

### **III.2.3- Reações cruzadas**

Para avaliar o potencial de reatividade cruzada dos antígenos testados no ELISA e no CLIA, foram utilizadas amostras de pacientes com esporotricose (n=10) e paracoccidioidomicose (n=8), gentilmente cedidas pelo Dr. Bodo Wanke da FIOCRUZ-RJ (*in memoriam*). Além de soro humano de pacientes com LV (n=30) e controle negativo (n=29) descritas acima e gentilmente cedidas pelo Dr. Edward Oliveira.

### **II.2.4 –Avaliação com outras regiões geográficas**

Para avaliar o desempenho dos peptídeos como antígeno para diagnóstico sorológico por ELISA e CLIA em pacientes de outras regiões geográficas, foram utilizadas amostras positivas para LT de pacientes da região Centro-oeste do país, especificamente de Goiânia- Goiás (n = 15), cedidas pela Dr. Fátima Ribeiro Dias (UFG), diagnosticados por exames histopatológicos e PCR. Essas amostras também haviam sido previamente caracterizadas como originadas de infecções causadas por parasitos do subgênero *Leishmania (Viannia)* (n=12), e pela espécie *L. amazonensis* (n=3) por meio da técnica *Polymerase Chain Reaction -Restriction Fragment Length Polymorphism* (PCR- RFLP).

### **III. 3- Padronização das reações de ELISA e triagem dos peptídeos**

A triagem dos peptídeos foi iniciada pela padronização a fim de indicar as melhores diluições para soro, conjugado e peptídeos, além de eleger o tipo de placa as quais os peptídeos melhor aderem.

Com esse propósito, o primeiro ensaio foi conduzido para determinar a concentração ótima do antígeno 0,5µg/well, 1µg/well e 10µg/well, e o tipo de placa flexível, de PVC (Falcon®) ou rígida, de poliestireno (Costar®). Em seguida, foram testadas diferentes diluições do *pool* de soro,

1:50 e 1:100 e de conjugado anti - IgG marcado com peroxidase (SIGMA-ALDRICH®) nas diluições 1:3000 e 1:6000.

O protocolo de ELISA foi realizado sensibilizando as placas com os antígenos diluídos em tampão bicarbonato por 16-18h à 37°C. Em seguida, as placas foram lavadas três vezes com solução PBS/Tween 0,05%. Adicionou-se a solução de bloqueio (leite desnatado 5% e PBS/Tween) e incubou-se por 1 hora em estufa a 37°C. Após nova lavagem com PBS/Tween, foram adicionados os soros diluídos em PBS com 0,5% leite em pó desnatado e 0,05% Tween e mantido por 1 h a 37°C. Em seguida, a placa foi lavada três vezes com solução de PBS/Tween 0,05% e foi adicionado um conjugado anti-IgG marcado com peroxidase, diluído na mesma solução utilizada para a diluição do soro. A incubação foi realizada por um período de 1 hora. Após três lavagens (PBS/Tween 0,05%) fez-se a adição de solução cromógena, obtida pela solubilização de tabletes contendo OPD e peróxido de hidrogênio (SIGMAFAST® OPD TABLETS, Sigma), e incubação das placas por 30 minutos, no escuro. A reação foi interrompida com ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 4N e a absorbância da reação foi medida em espectrofotômetro utilizando filtro de 492 nm (Multiskan Go).

Todas as reações foram realizadas em duplicata de *pool* de soros negativos e *pool* de soros positivos. Além disso, foram incluídos poços sem soro (branco) para avaliar a especificidade das interações entre o peptídeo e o anticorpo secundário.

A definição dos melhores parâmetros foi baseada na maior amplitude entre a média das absorbâncias dos *pools* de soros positivos para LT dividida pela média das absorbâncias dos *pools* de soros negativos. Essa razão gera o índice de reatividade (IR) e definiu-se que peptídeos com  $IR \geq 1,5$  apresenta diferenciação entre os *pools* positivos e negativos e assim, indica a melhor condição da técnica.

#### **III.4 - Padronização do CLIA**

A padronização da reação quimioluminescente seguiu procedimentos semelhantes ao utilizado no ELISA com algumas alterações. O primeiro ensaio determinou a concentração do antígeno (0,5 e 0,1 ug/well) e, em seguida, foram testadas diferentes diluições do *pool* de soros (1:150, 1:100). A escolha da concentração do conjugado e da placa baseou-se nos resultados obtidos durante a padronização da reação de ELISA. As placas foram sensibilizadas com os antígenos por 16-18h à 4°C. Em seguida, as placas foram lavadas três vezes com solução

PBS/Tween 0,05%. Adicionou-se a solução de bloqueio (leite desnatado 5% e PBS/ Tween) incubando-se por 30min em estufa a 37°C. Após nova lavagem com PBS/Tween foram adicionados os soros diluídos em PBS com 0,5% leite em pó desnatado e 0,05% Tween e mantido por 30 min a 37°C. Posteriormente as placas foram lavadas três vezes (PBS/Tween 0,05%) e acrescidas de conjugado anti-IgG marcado com peroxidase diluído na mesma solução em que se diluiu o soro. Após três lavagens com solução de lavagem foi acrescentado 40ul de substrato quimioluminescente (CYANAGEN) para cada poço da placa e realizou-se a leitura imediata em aparelho ImagemQuant LAS 500, com exposição automática. A definição dos melhores parâmetros da reação foi a partir dos mesmos critérios descritos no item anterior.

### **III. 5- Avaliação do desempenho do ELISA e do CLIA**

Após a padronização, na qual definiu-se as condições ideais para o experimento, e da seleção dos peptídeos com  $IR \geq 1,5$ , foram então utilizados soros dos pacientes com LT (n=30) e CN (n=29) (item IV.2.2), para avaliar o desempenho dos peptídeos nas reações de ELISA e CLIA pelos parâmetros: Sensibilidade (S), Especificidade (E), Valor Preditivo Positivo (VPP), Valor Preditivo Negativo (VPN), calculados como mostra a Tabela 1 e considerando o exame parasitológico como padrão-ouro.

**Tabela 1:** Categoria de resultado de um teste diagnóstico em uma população de infectados e não infectados

		Presença de infecção		TOTAL
		Presente	Ausente	
Teste	POSITIVO	Verdadeiro positivo (A)	Falso positivo (B)	(A+B)
	NEGATIVO	Falso negativo (C)	Verdadeiro negativo (D)	(C+D)
TOTAL		(A+B)	(B+D)	(A+B+C+D)

$$\text{Especificidade} - E = D / (B+D)$$

$$\text{Sensibilidade} - S = A / (A+C)$$

$$\text{Valor Preditivo Positivo} - VPP = A / (A+B)$$

$$\text{Valor Preditivo Negativo} - VPN = D / (C+D)$$

As categorias de resultados de um teste significam: verdadeiro positivo= presença de infecção e teste positivo, falso positivo = ausência de infecção e teste positivo, falso negativo = presença de infecção e teste negativo, verdadeiro negativo= ausência de infecção e teste negativo.

O ponto de corte para os ensaios foi definido por meio da construção da *Receiver Operating Characteristic* (ROC). A curva ROC é composta por um gráfico que representa a sensibilidade (verdadeiro -positivo) no eixo vertical e o complemento da especificidade (taxa de falso-positivo) no eixo horizontal. Essa curva fornece uma representação visual direta do desempenho de um teste, com base em todas as possíveis respostas (Evans,1981: Vaz, 2009). A presença da infecção será determinada pelo teste diagnóstico considerado padrão-ouro (parasitológico direto). O cálculo de especificidade determina a probabilidade de um teste dar negativo na ausência da doença, isto é, avalia a capacidade de um teste em identificar corretamente os verdadeiros negativos. Por outro lado, a sensibilidade determina a probabilidade de um teste resultar positivo na presença da doença, ou seja, a capacidade de detectar corretamente a existência da doença quando presente no indivíduo. O valor preditivo positivo (VPP) é a proporção de verdadeiros positivos entre todos os indivíduos com teste positivo, esse valor expressa a probabilidade de um paciente com teste positivo ter a doença. O valor preditivo negativo (VPN) é a proporção de verdadeiros negativos entre todos os indivíduos com teste negativo e por isso, expressa a probabilidade de um paciente

com teste negativo não ter a doença. Além disso, a acurácia (AUC), determinada sobre a área da curva ROC, indica a proporção de todos os resultados corretos, ou seja, “verdadeiros-positivos” e os verdadeiros-negativos”. Quanto maior a AUC, o que significa ser mais próximo de 1, melhor é o desempenho do método avaliado. Conforme sugere Swets (1988) , em função do valor da AUC podemos classificar o teste de diagnóstico como : sem valor ( $AUC=0,5$ ), de baixa acurácia ( $0,5 < AUC \leq 0,7$ ) de moderada acurácia ( $0,7 < AUC \leq 0,9$ ) e como teste perfeito ( $AUC=1$ ).

Para avaliar possíveis reações cruzadas com outras infecções cutâneas, utilizamos soros de pacientes com paracoccidiodomicose (n=8) e esporotricose (n=10). Além disso, para verificar a reatividade cruzada com a forma visceral da leishmaniose, considerando áreas de sobreposição de espécies causadoras, empregamos soros de pacientes com LV (n=30) e indivíduos saudáveis (n=29).

## IV- RESULTADOS

### IV.1 - Identificação e síntese dos peptídeos

As sequências completas de aminoácidos das proteínas anteriormente identificadas como promissoras para diagnóstico sorológico da LT (Lima *et al.*, 2017 e Celeste, 2019) foram analisadas utilizando-se os softwares ABCPred e BCPreds, originando 20 epítomos preditos. A listagem de todos esses epítomos, de acordo com o programa que os gerou, está disponível no Anexo 1. Apenas foram selecionados para síntese aqueles peptídeos que atendiam aos requisitos de tamanho (entre 9 e 14 aminoácidos) e de sobreposição (predição comum a ambos os softwares). Os 20 peptídeos selecionados conforme esses critérios estão listados na Tabela 2 e foram sintetizados comercialmente pelo Laboratório de Malária e Genômica de Parasitos do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, utilizando a metodologia de *Solid Phase Peptide Synthesis* (SPSS).

**Tabela 2:** Peptídeos resultantes da predição de epítomos de célula B e sintetizados

Nome do peptídeo	Proteína de origem	Sequência sintetizada	Massa molecular
HS1	HSP70	KDCHLLGTFDLSGIPPAPRG	209,09
HS2		NDLVVQSDMKHW	1469,71
HS3		PVISVQYRGEEK	1402,76
HS4		NQPGVHIQVFEG	1322,67
HS5		GTFDLSGIPP	1001,52
BT1	B- Tubulina	RFPGQLNSDLRN	1414,74
BT2		RINVYFDESAGGRY	1644,80
BT3		RAVLMDLEPGTMDSVRA	1858,94
BT4		KGHYTEGAELIDSVLVDCRK	2231,14
BT5		ADEHGVDPTGSYQG	1430,61
BT6		VYFDESAGGR	1098,51
BT7		PYNTTLSVHQ	1157,58
BT8		AKNMMQAADPRHGR	1580,78
BT9		VTFIGNNTCIQE	1337,64
MP1	Metalopeptidase	GIAPPNRTFQ	1098,59
ENO1	Enolase	GDEGGFAPPIK	1085,55
EL1	Fator de alongação 2	VSPVVRVAVEAKNP	1462,86
EL2		FVKTLQNVNVVV	1357,81
EL3		GAPLKISEPVVS	1194,70
PEP1	Peptidase m20	AIASLQRHGVPHG	1340,74

## IV.2 -ELISA

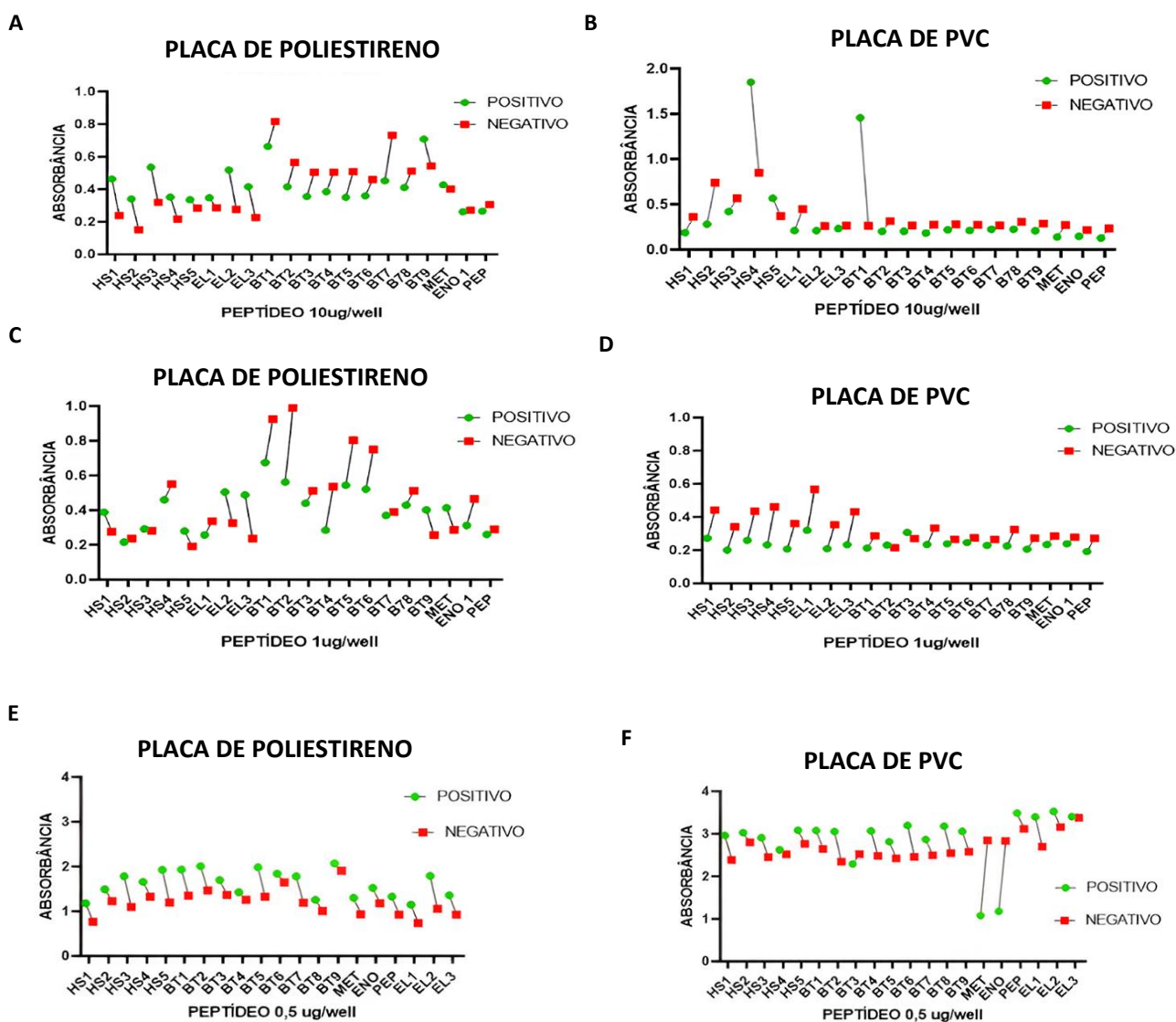
### IV-2.1– Padronização da técnica

Inicialmente foram comparadas as placas de PVC (Falcon®) e de poliestireno (Costar®), tendo as mesmas sido sensibilizadas com os 20 peptídeos nas concentrações 10 ug/well, 1 ug/well e 0,5 ug/well. A concentração de 0,5 ug/well de antígeno foi considerada a que permite melhor diferenciação entre positivos e negativos (Figura 1) nos dois tipos de placas testados.

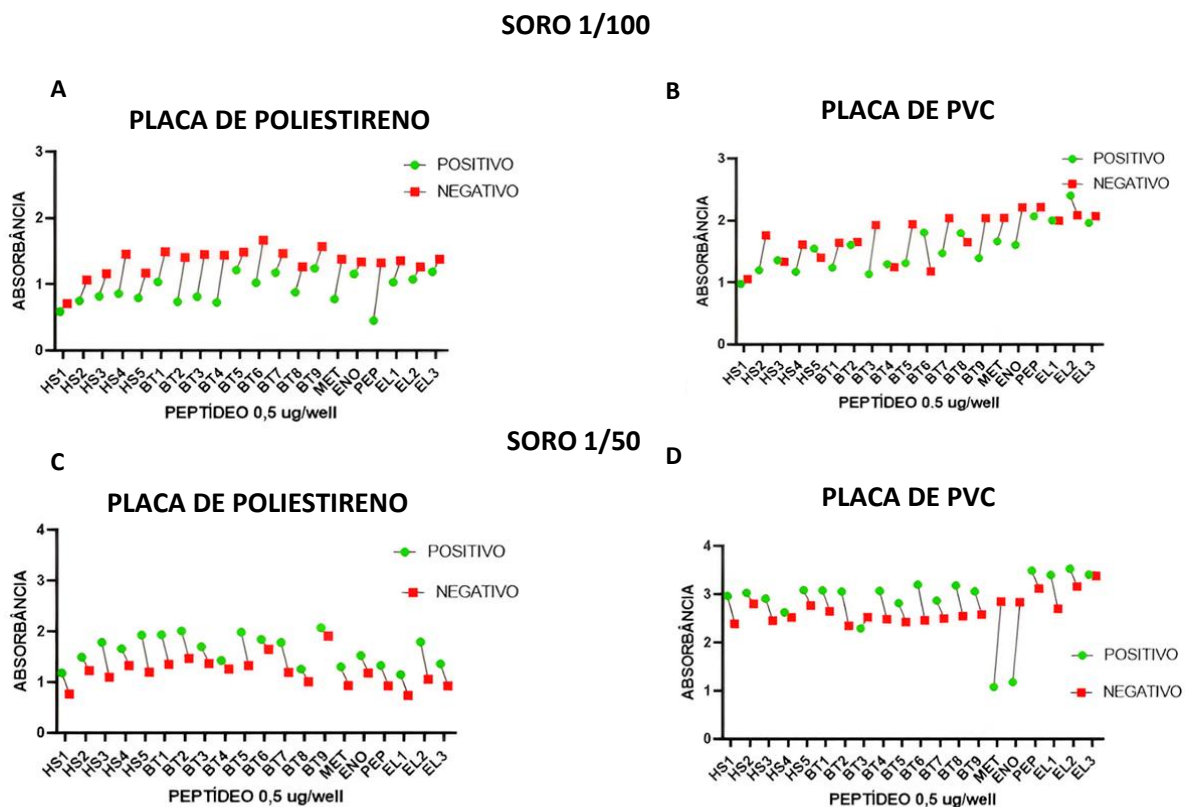
Em relação a concentração do soro, que foi utilizado em *pool* de pacientes com LT (n=10) e *pool* de indivíduos não infectados (n=10), optou-se pela diluição 1:50, pois essa condição proporcionou melhor diferenciação entre positivos e negativos (Figura 2).

Após a determinação das concentrações de peptídeo e soro, foi realizada uma avaliação comparativa entre os materiais das placas utilizadas. A seleção da placa mais adequada baseou-se no Índice de Reatividade (IR), o qual representa a relação entre as reações com *pool* de soros positivos e negativos em cada placa. Apesar das menores absorvâncias observadas na placa de poliestireno (Costar®) em comparação com a placa de PVC (Falcon®), esta apresentou valores mais altos de IR mostrados na Tabela 3.

**Figura 1.** Absorbância da reação do ELISA utilizando peptídeos como antígeno em diferentes concentrações (A) 10 µg/well em placa de Poliestireno-Costar®, (B) 10 µg/well em placa de PVC-Falcon®, (C) 1 µg/well em placa de Costar®, (D) 1 µg/well em placa de Falcon®, (E) 0,5 µg/well em placa de Costar®, e (F) 0,5 µg/well em placa de Falcon®. Todas as reações foram realizadas utilizando pool de soros positivos e negativos para LT diluídos 1:50.



**Figura 2.** Absorbância da reação de ELISA utilizando peptídeos como antígeno na concentração de 0,5 µg/well. Soro diluído 1:100 nas placas de Poliestireno-Costar® (A) e PVC-Falcon® (B), e soro diluído 1:50 nas placas de Costar® (C) e Falcon® (D).

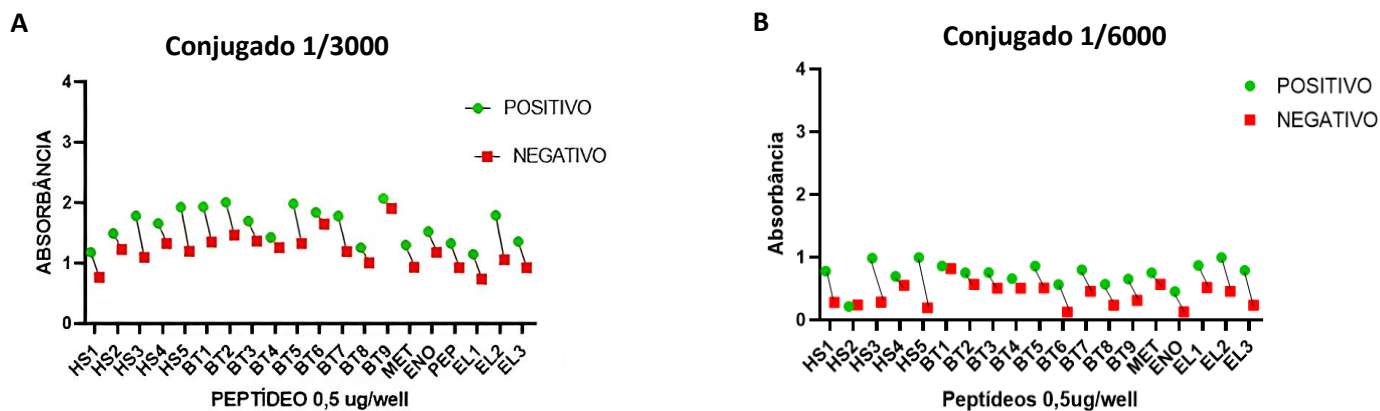


**Tabela 3.** Índice de reatividade (IR) entre pools de soros positivos e negativos para LT em placas PVC (Falcon®) e poliestireno (Costar®), sensibilizadas com 0,5 µg/poço de cada peptídeo. Os soros foram diluídos 1:50 e o conjugado utilizado foi diluído 1:3.000. Peptídeos com  $IR \geq 1,5$  estão destacados em negrito.

Peptídeo	IR (LT/CN)	
	PVC (Falcon®)	Poliestireno (Costar®)
<b>HS1</b>	1,2401	<b>1,5308</b>
HS2	1,0828	1,2154
<b>HS3</b>	1,1855	<b>1,6277</b>
HS4	1,0442	1,2471
<b>HS5</b>	1,1158	<b>1,6118</b>
BT1	1,1634	1,4328
BT2	1,3009	1,3693
BT3	0,9090	1,2448
BT4	1,2368	1,1385
BT5	1,1613	1,4921
BT6	1,3020	1,1173
<b>BT7</b>	1,1490	<b>1,4952</b>
BT8	1,2482	1,2548
BT9	1,1882	1,0878
MP1	1,0794	1,3978
ENO1	1,1794	1,2944
PEP1	1,1205	1,4382
<b>EL1</b>	1,1205	<b>1,5556</b>
<b>EL2</b>	1,1164	<b>1,6980</b>
EL3	1,1164	1,4694

Para determinar a diluição ideal do conjugado, foram conduzidas reações em condições uniformes de concentração de peptídeo, soro e tipo de placa, utilizando duas diluições a partir das recomendações do fabricante (1:3000 e 1:6000). As absorbâncias da reação, ao empregar a concentração de conjugado 1:3000, demonstraram valores superiores em relação à diluição menos concentrada, 1:6000 além de apresentar maior amplitude entre as reações positivas e negativas em cada peptídeo (Figura 3). Finalmente, os parâmetros padronizados consistiram em 0,5ug/poço de peptídeo, diluição do soro em 1:50, utilização de placa poliestireno (Costar®) e diluição do conjugado de 1:3000.

**Figura 3.** Ensaio ELISA dos peptídeos usando conjugado em duas diluições 1:3000 (A) e 1:6000 (B).

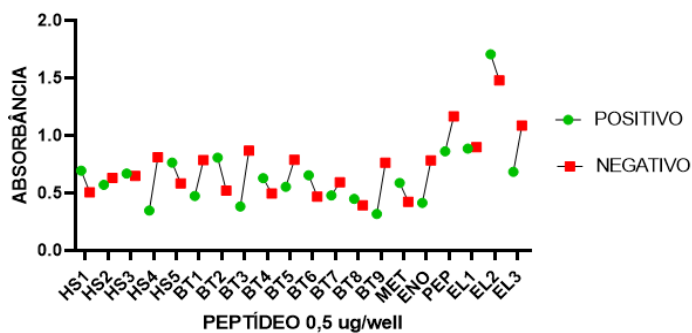


#### IV-2.2– Testes com outros grupos de soros

Nas condições definidas anteriormente, placas poliestireno (Costar®), sensibilizadas com antígeno na concentração 0,5ug/well, o soro na diluição 1/50 e conjugado na diluição 1/3000, todos os peptídeos foram testados com *pool* de soros: Humano LV (10), Humano CN (n=10).

**Soro humano com LV** – Com esse tipo de soro, as absorbâncias dos positivos e negativos ficaram semelhantes indicando que não houve diferenciação significativa entre eles. Apenas o peptídeo BT2 apresentou  $IR \geq 1,5$  nesse ensaio (Figura 4, Tabela 4).

**Figura 4** - Absorbância da reação de ELISA utilizando peptídeos como antígeno na concentração de 0,5  $\mu\text{g/well}$ , na placa de poliestireno (Costar®), com *pool* de soros positivos (n=10) e negativos (n=10) para LV, diluídos 1:50, e conjugado diluído 1:3000.



**Tabela 4** – Índice de reatividade (IR), obtido pela razão entre as absorbâncias nos pools positivos e negativos para LV na placa de poliestireno (Costar®), sensibilizadas com 0,5 µg/well de cada peptídeo. Os soros foram diluídos 1:50, e o conjugado utilizado diluído 1:3.000. Peptídeos com  $IR \geq 1,5$  estão destacados em **negrito**.

PEPTÍDEO	IR (LV/CN)
HS1	1,3743
HS2	0,9035
HS3	1,0315
HS4	0,4277
HS5	1,3079
BT1	0,6041
BT2	<b>1,5507</b>
BT3	0,4415
BT4	1,2708
BT5	0,7020
BT6	1,3965
BT7	0,8078
BT8	1,1408
BT9	0,4167
MP1	1,3841
ENO1	0,5299
PEP1	0,7408
EL1	0,9857
EL2	1,1540
EL3	0,6302

Comparando o IR dos 20 peptídeos nos ensaios de ELISA realizados com *pools* de soros de pacientes com LT e LV e seus respectivos controles negativos, observou-se que 6 peptídeos foram considerados promissores por apresentarem  $IR \geq 1,5$  somente para LT, mas não para LV (Tabela 6). Assim, com esses peptídeos: HS1, HS3, HS5, BT7, EL1 e EL2 foi dado prosseguimento para avaliação como antígenos para o diagnóstico sorológico de LT.

**Tabela 5** – Valores do IR de cada peptídeo no ELISA com os diferentes grupos de soros. Em negrito peptídeos com  $IR \geq 1,5$  somente em soros LT.

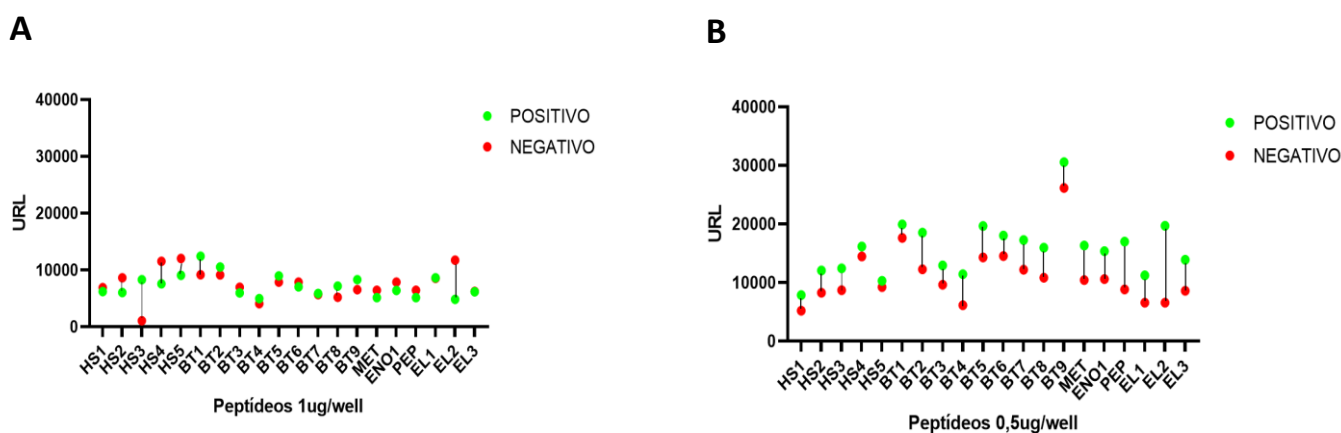
Peptídeos	IR dos Grupo de Soros positivos /CN	
	LTA- HUMANO	LV- HUMANO
<b>HS1</b>	<b>1,530</b>	<b>1,3747</b>
HS2	1,2154	0,9035
<b>HS3</b>	<b>1,6277</b>	<b>1,0315</b>
HS4	1,2471	0,4277
<b>HS5</b>	<b>1,6118</b>	<b>1,3079</b>
BT1	1,4328	0,6041
BT2	1,3693	1,5507
BT3	1,2448	0,4415
BT4	1,1385	1,2708
BT5	1,4921	0,7020
BT6	1,1173	1,3965
<b>BT7</b>	<b>1,4952</b>	<b>0,8078</b>
BT8	1,2548	1,1408
BT9	1,0878	0,4167
MET	1,3978	1,3841
ENO	1,2944	0,5299
PEP	1,4382	0,7408
<b>EL1</b>	<b>1,5556</b>	<b>0,9857</b>
<b>EL2</b>	<b>1,6980</b>	<b>1,1540</b>
EL3	1,4694	0,6302

### IV.3-CLIA

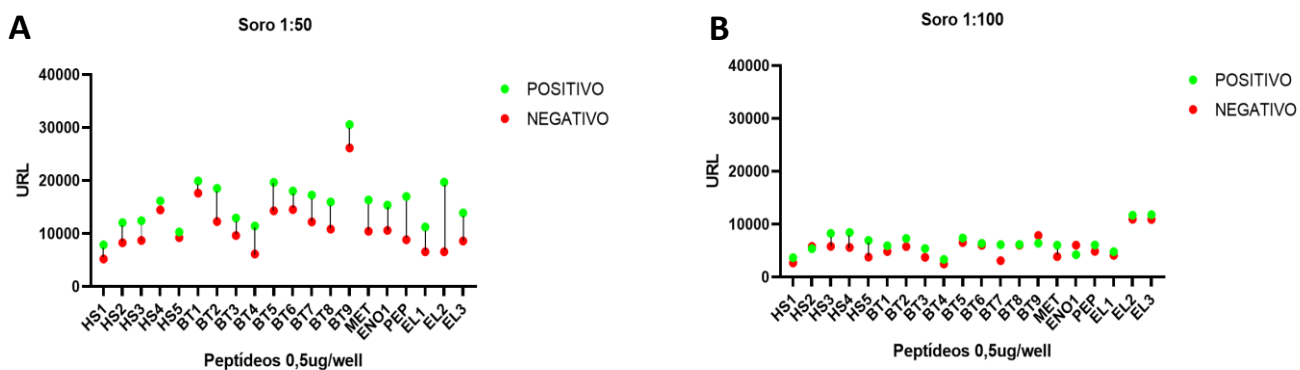
#### IV.3.1 – Padronização da técnica

Semelhante ao que foi realizado na reação de ELISA e considerando os resultados já obtidos, a reação de ELISA quimioluminescente ou CLIA foi padronizada utilizando *pool* soros de paciente com LT (n=10) e de não infectados CN (n=10) sob condições previamente estabelecidas, ou seja, utilizando placa de poliestireno (Costar®) e conjugado a 1:3000. Quanto ao antígeno e ao soro, foram avaliadas as concentrações de 1 µg/poço e 0,5 µg/poço para o antígeno, e o soro foi diluído a 1:50 e 1:100. Os resultados mais satisfatórios foram alcançados com a concentração de antígeno de 0,5 µg/poço e diluição de soro 1:50, evidenciando uma melhor diferenciação entre as reações positivas e uma maior amplitude entre reações positivas e negativas (Figuras 6 e 7).

**Figura 5.** Unidades Relativas de Luz (URL) do CLIA com antígenos a 0,1µg/well (A) e 0,5µg/well (B). Em placa de poliestireno (Costar®), pool de soro diluído na proporção 1:50 e conjugado a 1:3000.



**Figura 6.** Unidades Relativas de Luz (URL) do CLIA com antígenos a 0,5 $\mu$ g/well em placa de poliestireno (Costar®), pool de soro diluído na proporção 1:50 e 1:100.

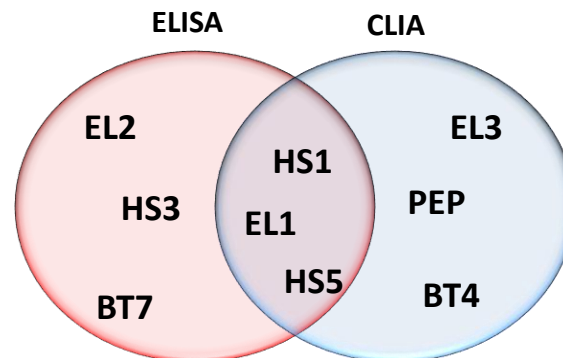


Considerando os valores de  $IR \geq 1,5$  foram selecionados seis peptídeos promissores para CLIA: HS1 ( $IR = 1,51$ ), HS5 ( $IR = 1,62$ ), EL1 ( $IR = 1,63$ ), EL3 ( $IR = 1,54$ ), PEP ( $IR = 1,68$ ) e BT4 ( $IR = 1,60$ ) (Tabela 8). É relevante notar que os peptídeos HS1, EL1 e HS5 já haviam sido apontados também como promissores no ELISA (Tabela 6). Para representar os peptídeos selecionados em cada reação, bem como aqueles que são comuns às duas reações, foi elaborado um diagrama de Venn (Figura 8).

**Tabela 6:** Índice de reatividade (IR) indicando a razão das absorvâncias no CLIA entre os pools positivos e negativos para LT na placa de poliestireno (Costar®), sensibilizadas com 0,5 µg/well de cada peptídeo, soros diluídos 1:50, e conjugado diluído 1:3.000.

Peptídeo	(IR) LT/CN
<b>HS1</b>	<b>1,510</b>
HS2	1,340
HS3	1,440
HS4	1,290
<b>HS5</b>	<b>1,620</b>
BT1	1,280
BT2	1,440
BT3	1,290
<b>BT4</b>	<b>1,600</b>
BT5	1,430
BT6	1,260
BT7	1,460
BT8	1,360
BT9	1,120
MET	1,480
ENO	1,370
<b>PEP</b>	<b>1,680</b>
EL1	1,630
EL2	1,460
EL3	1,540

**Figura 7:** Diagrama de Venn apresentando os resultados dos peptídeos selecionados, com Índice de Reatividade (IR) igual ou superior a 1,5, obtidos a partir da triagem das reações ELISA e CLIA. No centro do gráfico, os peptídeos que se destacaram em ambas as reações.

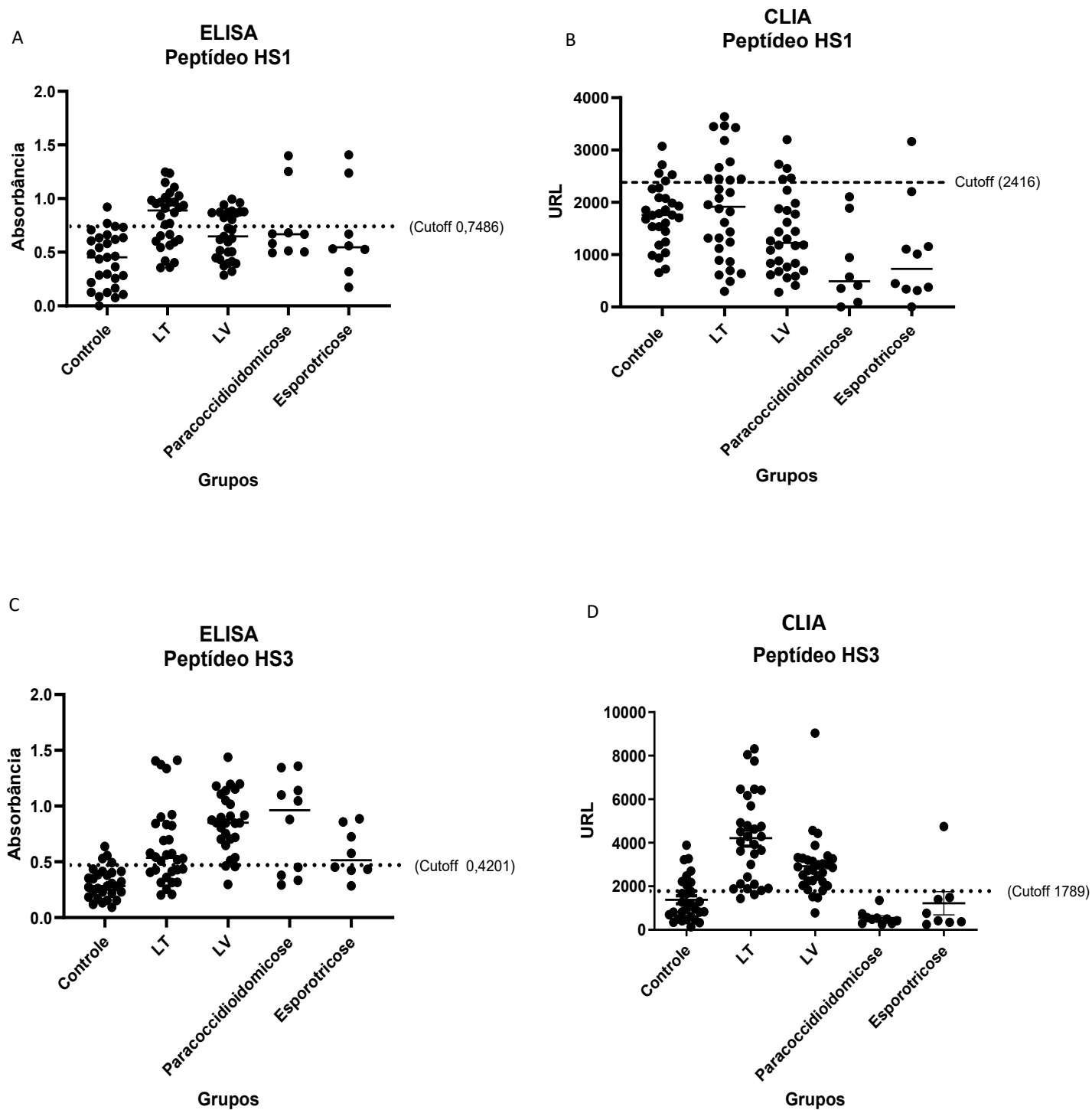


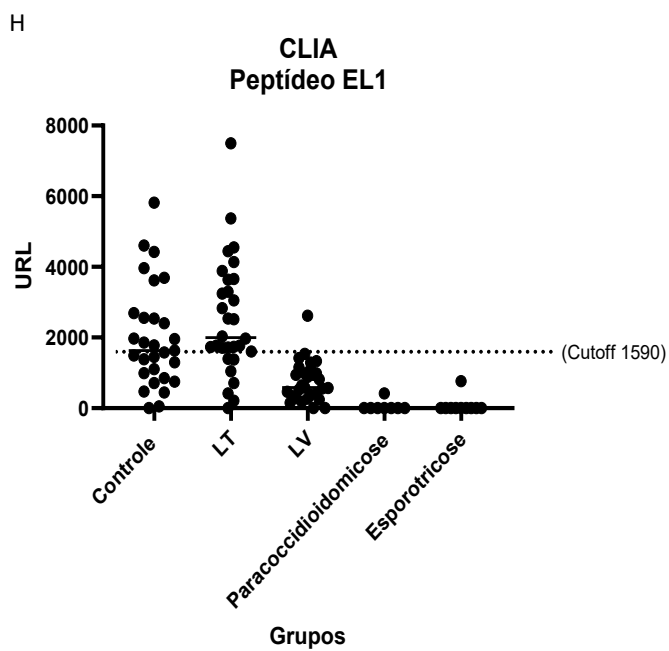
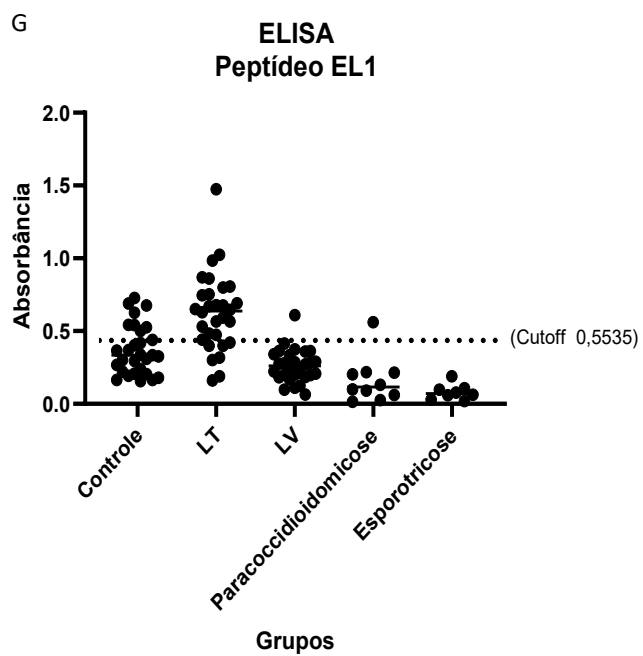
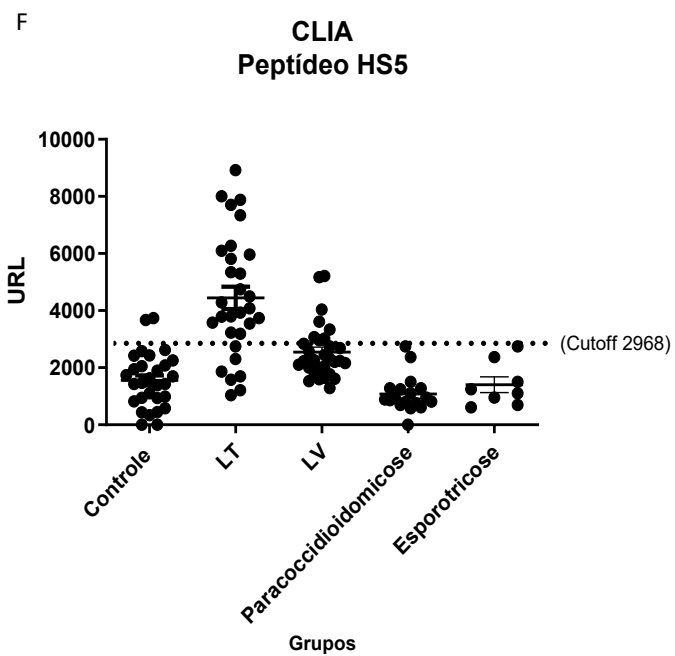
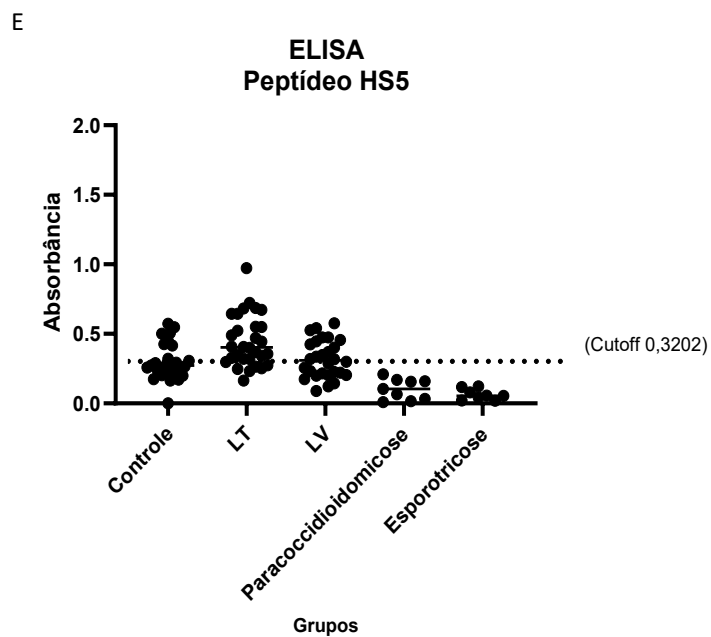
#### IV.4 -Avaliação do diagnóstico sorológico de LT por ELISA e CLIA com peptídeos sintéticos

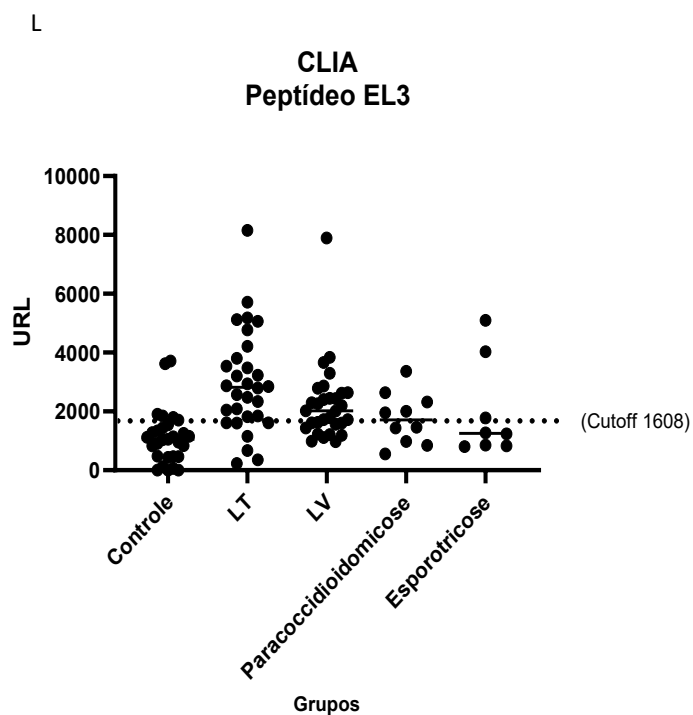
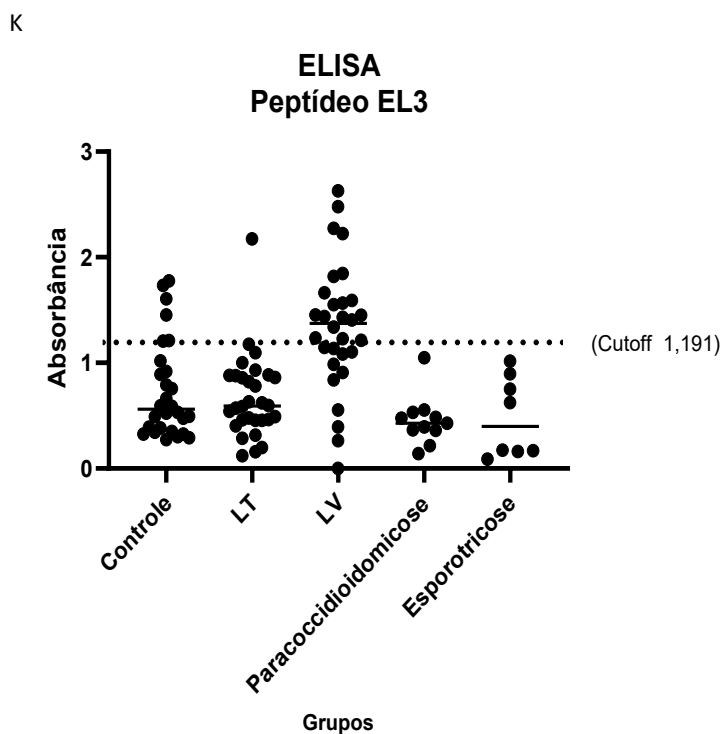
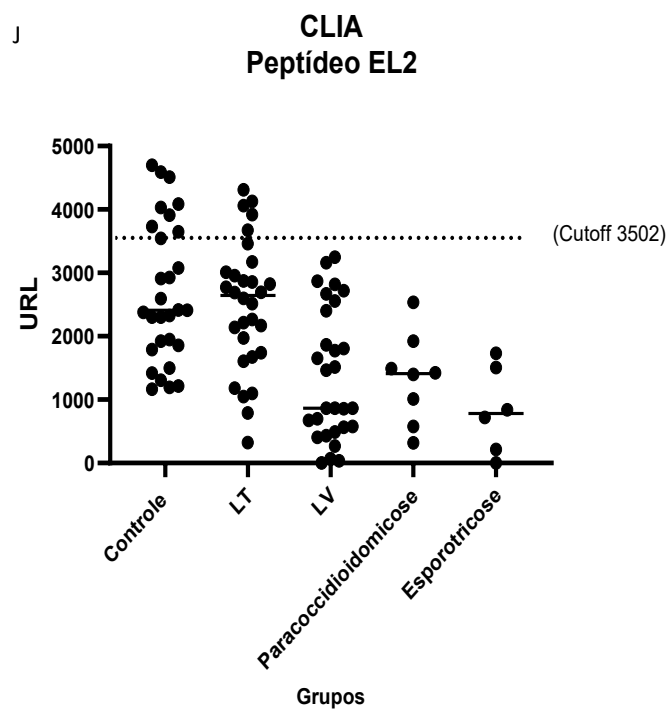
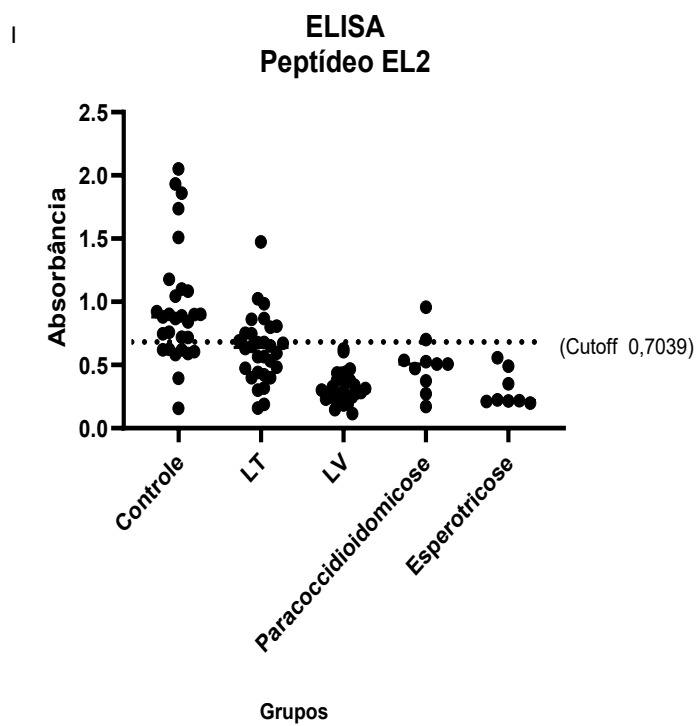
Conforme já descrito, os peptídeos com valores de  $IR \geq 1,5$  no ELISA (HS1, HS3, HS5, BT7, EL1 e EL2) e no CLIA (HS1, HS5, EL1, EL3, PEP e BT4) foram utilizados para ambas as reações de ELISA e CLIA. Assim, 9 peptídeos foram utilizados nos dois métodos com soros de pacientes com LT (n=30) e controle negativo (n=29) nas condições previamente padronizadas, ou seja: placa de poliestireno, 0,5ug/well de antígeno, soros diluídos 1:50 e conjugado anti-IgG.

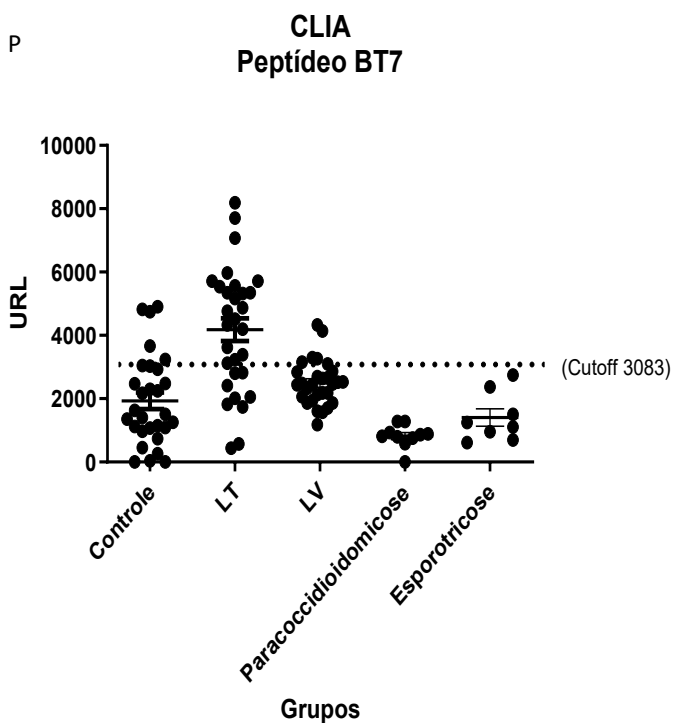
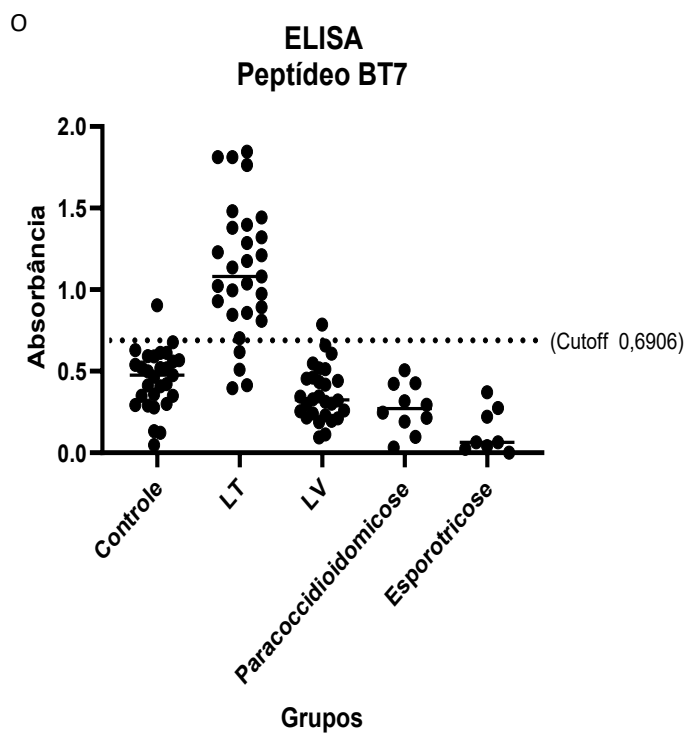
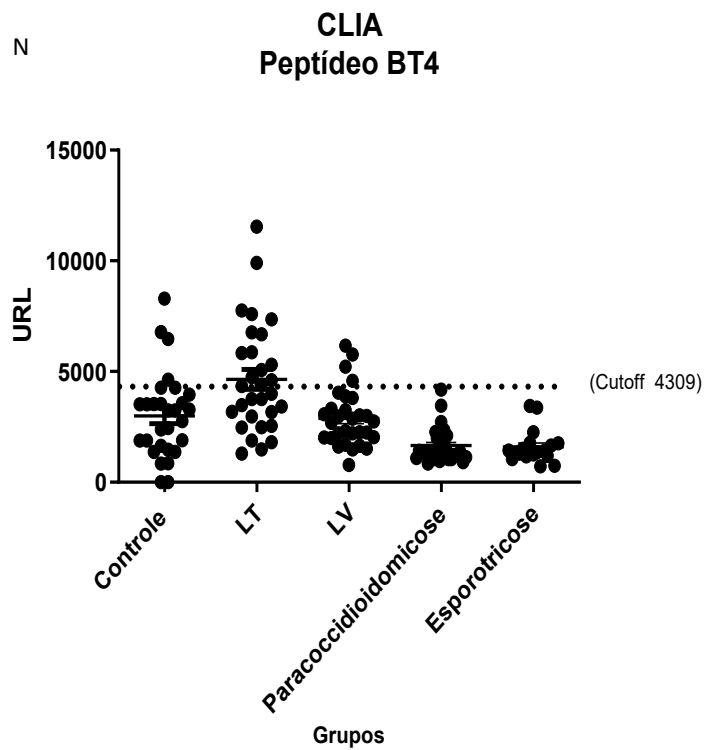
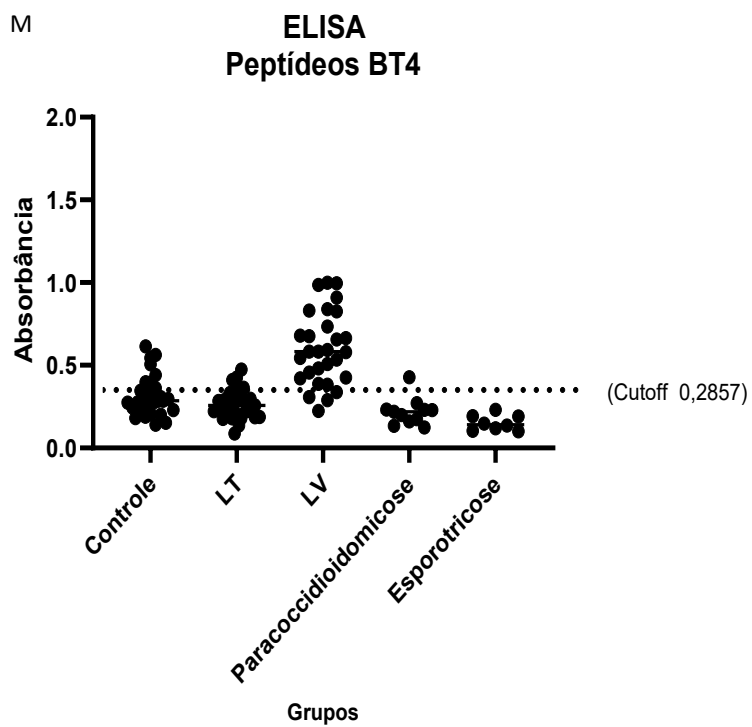
Para cada reação, o *cutoff* foi estabelecido com base na curva ROC (ANEXO II), identificando o ponto de máxima sensibilidade e especificidade. Observou-se que o desempenho dos peptídeos como antígeno para diferenciação entre infectados e controles varia entre os testes sorológicos. Os gráficos de dispersão das absorbâncias dos ELISA e dos valores de URL do CLIA para cada peptídeo, mostram que os peptídeos HS1, EL1 e BT7 apresentam melhor capacidade de diferenciação entre infectados e controles na reação de ELISA, enquanto os peptídeos HS3, HS5, EL3 e PEP apresentam melhor capacidade de diferenciação entre infectados e controle na reação CLIA, e os peptídeos EL2 e BT4 não são bons antígenos em nenhuma das reações utilizadas (Figura 9).

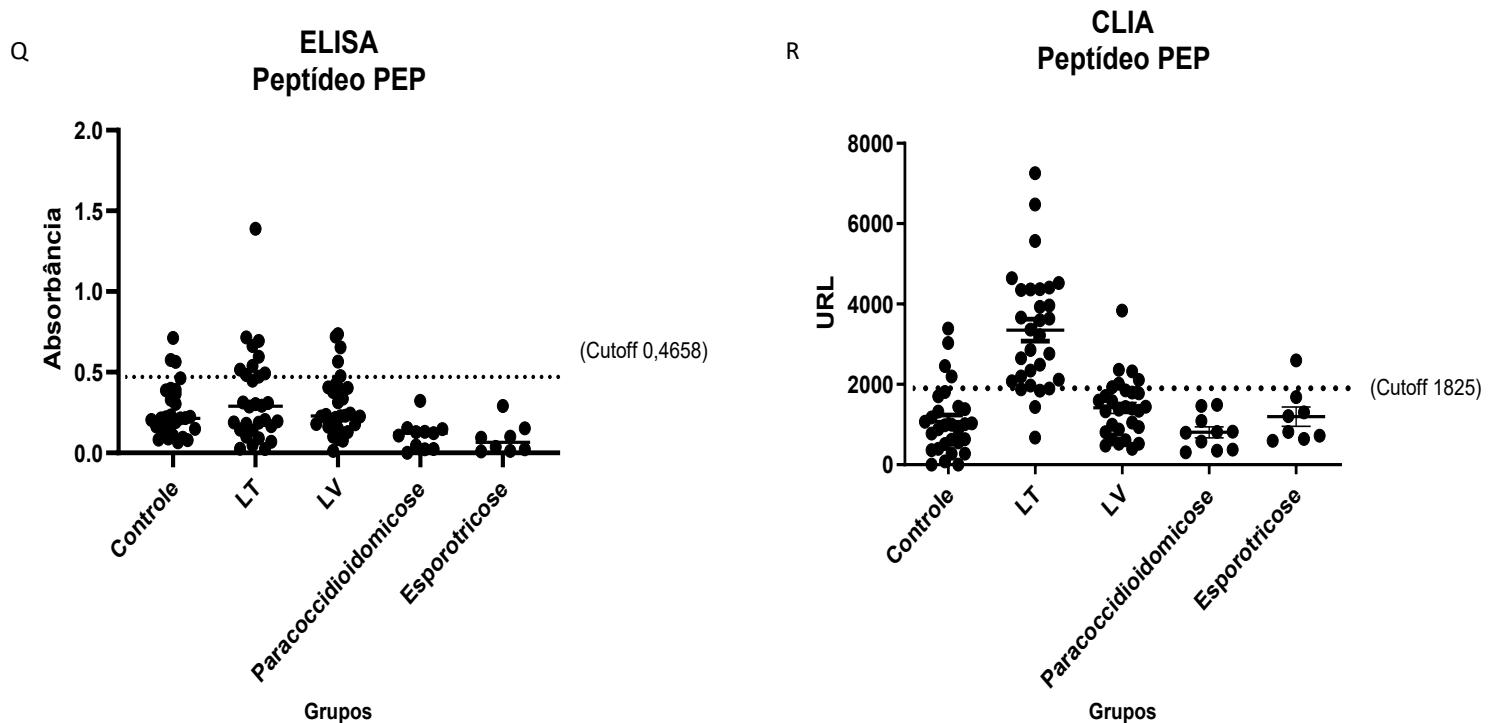
**Figura 8.** Resultados obtidos em ELISA e CLIA utilizando os peptídeos como antígeno dos peptídeos **HS1**(A, B), **HS3**(C, D) **HS5** (E, F), **EL1**(G, H), **EL2**(I, J), **EL3** (K, L), **BT4** (M, N), **BT7** (O, P), **PEP** (Q, R).











Para cada um dos peptídeos em ambos os métodos foram calculados, utilizando a curva ROC, os valores de AUC, Sensibilidade (S), Especificidade (E), valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) (Tabela 8). O parâmetro AUC da curva ROC é uma métrica mais confiável para comparar o desempenho de diferentes métodos diagnósticos.

Para a reação de ELISA, os valores de especificidade variaram de 59%, para o peptídeo BT4, até valores superiores a 90% com os peptídeos HS1, BT7 e PEP. Observou-se que 4 peptídeos apresentaram valores de sensibilidade superiores a 80%: HS3, HS5, EL1 e BT7 sendo o pior valor de 52% com o peptídeo EL3. Além disso, para os peptídeos BT7 e PEP os valores de VPP foram de 97% e 91% respectivamente e VPN de 88% para o peptídeo BT7. Nessa reação o peptídeo BT7 apresentou AUC superior a 0,9 e os peptídeos HS1 e HS3, AUC de 0,878 e 0,825 respectivamente.

Os mesmos peptídeos quando usados na reação de CLIA, apresentam valores de especificidade variando de 66% (peptídeos EL1) até 93,5% (peptídeo HS5) e 5 peptídeos, HS1,

EL3, BT4, BT7 e PEP apresentaram valores de especificidade entre 88% e 80%. Em relação sensibilidade, 5 peptídeos, HS3, HS5, EL3, BT4 e PEP apresentaram valores acima de 80%, com HS3 e PEP alcançando a maior sensibilidade na reação CLIA de 93,7%. Nessa reação os peptídeos PEP e HS3 apresentaram  $AUC > 0,9$ , o HS5,  $AUC = 0,895$ , os peptídeos EL3,  $AUC = 0,849$  e BT7,  $AUC = 0,819$ . Vale destacar que 6 dos 9 peptídeos tem valores de VPP superiores a 81%, sendo que os peptídeos HS5 alcança VPP de 94% e VPN de 83%, além disso, PEP tem VPP= 88% e VPN= 93%.

*Tabela 7: Desempenho global dos antígenos no diagnóstico Leishmaniose Tegumentar em ELISA e CLIA. Valores de sensibilidade, especificidade, acurácia (AUC), Valor de p, Valor Preditivo Positivo (VPP) e Valor preditivo Negativo (VPN).*

<b>Antígeno</b>	<b>Método</b>	<b>Sensibilidade</b>	<b>Especificidade</b>	<b>AUC</b>	<b>Valor P</b>	<b>VPP</b>	<b>VPN</b>
HS1	ELISA	0,697	0,966	0,843	<0,0001	0,697	0,690
	CLIA	0,612	0,878	0,535	0,6383	0,857	0,604
HS3	ELISA	0,833	0,769	0,825	<0,0001	0,750	0,828
	CLIA	0,937	0,769	0,909	<0,0001	0,750	0,935
HS5	ELISA	0,81	0,783	0,748	<0,0015	0,789	0,833
	CLIA	0,81	0,935	0,895	<0,0001	0,937	0,833
EL1	ELISA	0,882	0,725	0,796	<0,0001	0,731	0,878
	CLIA	0,789	0,659	0,602	0,1786	0,681	0,805
EL2	ELISA	0,666	0,725	0,749	<0,0010	0,731	0,537
	CLIA	0,545	0,783	0,534	0,6492	0,769	0,537
EL3	ELISA	0,517	0,828	0,512	0,8732	0,833	0,517
	CLIA	0,882	0,828	0,849	<0,0001	0,833	0,878
BT4	ELISA	0,652	0,591	0,313	0,1375	0,600	0,659
	CLIA	0,882	0,828	0,703	<0,0073	0,882	0,617
BT7	ELISA	0,882	0,966	0,934	<0,0001	0,967	0,878
	CLIA	0,769	0,805	0,819	<0,0001	0,810	0,763
PEP	ELISA	0,625	0,906	0,562	0,4156	0,909	0,604
	CLIA	0,937	0,878	0,924	<0,0001	0,882	0,935

#### IV. 5- Reações Cruzadas

Entre os 9 peptídeos avaliados foram identificados alguns com resultados promissores que sugerem potencial utilidade como antígenos no contexto do diagnóstico sorológico da Leishmaniose Tegumentar. Em virtude disso, esses 9 peptídeos foram submetidos a uma análise abrangente quanto à possível ocorrência de reações cruzadas com soros provenientes de indivíduos com a forma visceral da doença, bem como de indivíduos portadores de infecções fúngicas que podem introduzir confusão no diagnóstico clínico, como paracoccidiodomicose e esporotricose.

Mais uma vez, foram realizadas as reações de ELISA e CLIA, utilizando além dos soros controle (n=29) e infectados por LT (n=30), soros de pacientes com LV (n=30), paracoccidiodomicose (n= 10) e esporotricose (n=8).

A figura 10 mostra a dispersão dos valores de absorbância no ELISA e da URL do CLIA com os diferentes peptídeos e os grupos de soros acima citados, como os respectivos “cutoff” de cada reação. A reação cruzada mais frequente foi com soros de paciente com LV, exceto com o peptídeo EL2, os demais peptídeos em diferentes proporções foram reativos a este grupo de soros em ambas as reações. De maneira inversa, para paracoccidiodomicose, a maioria dos peptídeos, não reagiram com esse grupo de soros, onde observou-se que 8 dos 9 antígenos (HS1, HS3, HS5, EL1, EL2, BT7, BT4 e PEP), não apresentaram reação cruzada no CLIA, e 4 dos 9 (HS5, EL3, BT7, PEP) não apresentaram reação cruzada no ELISA, e ainda os peptídeos EL1 e EL2 nesse método apresentaram reação cruzada somente com uma mesma amostra de soro. Também para esporotricose, os peptídeos testados apresentaram baixos valores de reação cruzada, sendo que no ELISA, 7 dos 9 (HS5, EL1, EL2, EL3, BT4, BT7 e PEP) peptídeos não reagiram com soros desse grupo e no CLIA 5 dos 9 (HS5, EL1, EL2, BT4, BT7) peptídeos não apresentaram reação cruzada, porém 3 peptídeos (HS1, HS3 e PEP) reagiram com somente uma mesma amostra de soro.

Juntando os resultados da análise de reação cruzada, o peptídeo BT7 se destaca, com reatividade cruzada reduzida com o grupo LV (3% no ELISA; 17% no CLIA) e nenhuma detecção de amostras consideradas positivas dentro dos grupos de doenças fúngicas em ambos os métodos. Enquanto os peptídeos HS1 e HS3 ambos derivados da proteína HSP70, apresentaram as maiores frequências de reação cruzada, principalmente com LV (Tabela 9).

**Tabela 8.** Percentual de reação cruzada para cada peptídeo nas reações ELISA e CLIA.

Peptídeo	Reação cruzada					
	LV		Paracoccidioidomicose		Esporotricose	
	ELISA	CLIA	ELISA	CLIA	ELISA	CLIA
<b>HS1</b>	40%	16,6%	22%	0%	25%	12,5%
<b>HS3</b>	96%	90%	70%	0%	87,5%	12,5%
<b>HS5</b>	50%	26,6%	0%	0%	0%	0%
<b>EL1</b>	16,6%	3%	10%	0%	0%	0%
<b>EL2</b>	0%	0%	10%	0%	0%	0%
<b>EL3</b>	63,3%	56,6%	0%	50%	0%	37,5%
<b>BT4</b>	96,6%	13,3%	10%	0%	0%	0%
<b>BT7</b>	3,3%	20%	0%	0%	0%	0%
<b>PEP</b>	16,6%	20%	0%	0%	0%	12,5%

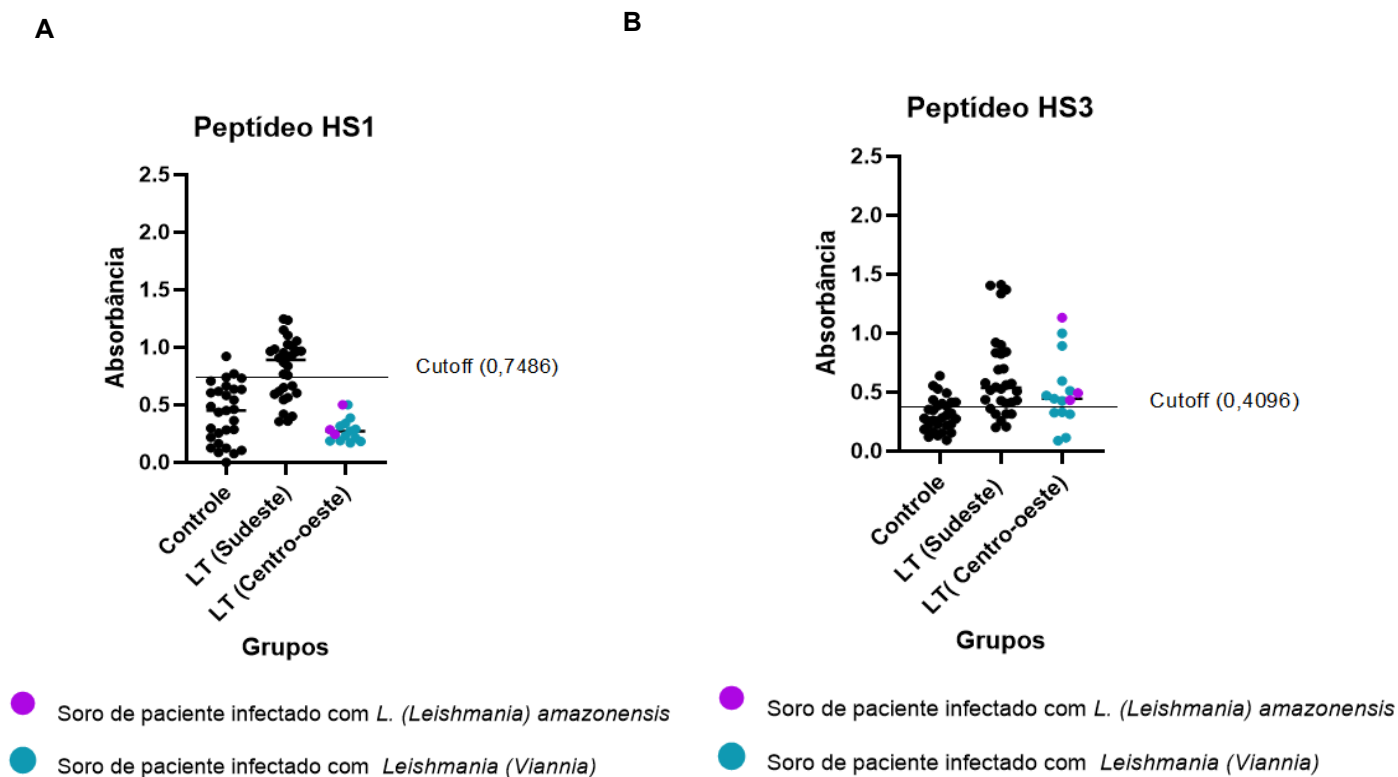
#### IV.6 - Avaliação da sorologia com peptídeos sintéticos e soros de LT de diferente região geográfica

Diversos elementos podem influenciar o desfecho de um teste sorológico, sendo um deles a presença de várias cepas e espécies de *Leishmania*, responsáveis pela forma tegumentar, em diferentes áreas geográficas, além da diversidade genética dos hospedeiros. Diante dessas variáveis, este estudo se propôs a investigar a eficácia dos peptídeos utilizando soros de pacientes de outra localidade do país, do estado de Goiás (GO) situado no centro-oeste brasileiro.

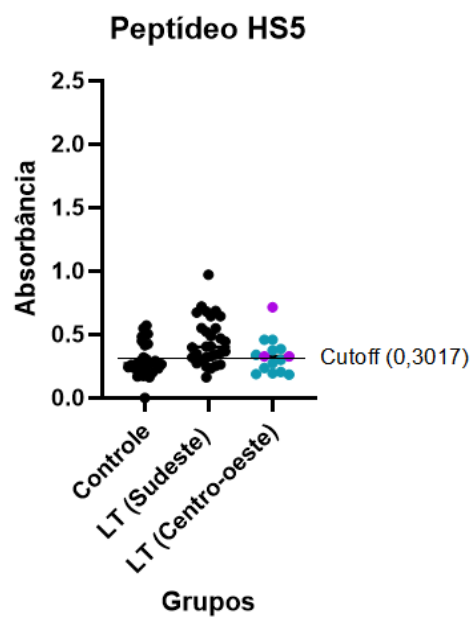
Foram conduzidas reações de ELISA utilizando os nove peptídeos previamente selecionados e amostras de pacientes com LT (n = 15) provenientes da região Centro-oeste do país. Conforme já descrito no item III.2.4, os pacientes haviam sido diagnosticados da infecção por *Leishmania* por exames histopatológicos e PCR, além disso, amostras de DNA dos parasitos isolados desses pacientes haviam sido caracterizadas por PCR-RFLP, e 12 foram identificadas como pertencentes ao subgênero *Leishmania (Viannia)* e as outras 3 da espécie *L. (Leishmania) amazonensis*.

Surpreendentemente, o ELISA com peptídeo EL1, que tem VPP de 73% (Tabela 10), foi positivo para todas as amostras de Goiás enquanto a reação com o peptídeo HS1, VPP de 97%, não detectou nenhuma dessas amostras. De forma geral, com as amostras de GO, o ELISA com todos os peptídeos, exceto EL1 e EL3, apresentou valores de positividade abaixo dos VPPs calculados com amostras de MG.

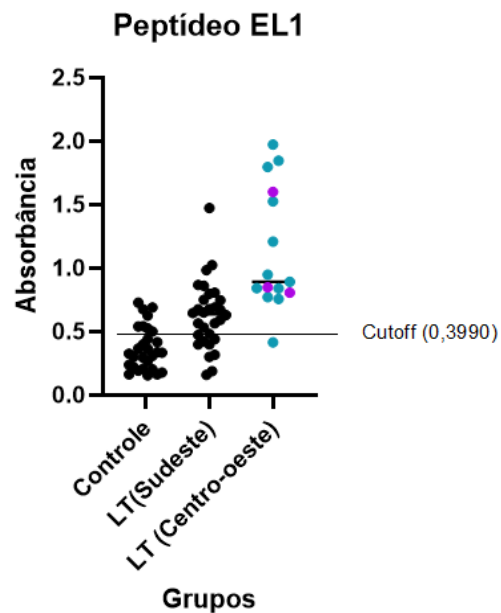
**Figura 9.** Avaliação dos peptídeos frente aos soros de pacientes com LT proveniente de duas regiões do Brasil (Sudeste-em preto e Centro-oeste- colorido). Amostras do Centro-oeste caracterizadas quanto ao agente etiológico em *L. amazonensis* ou subgênero *L. (Viannia)*.



C



D



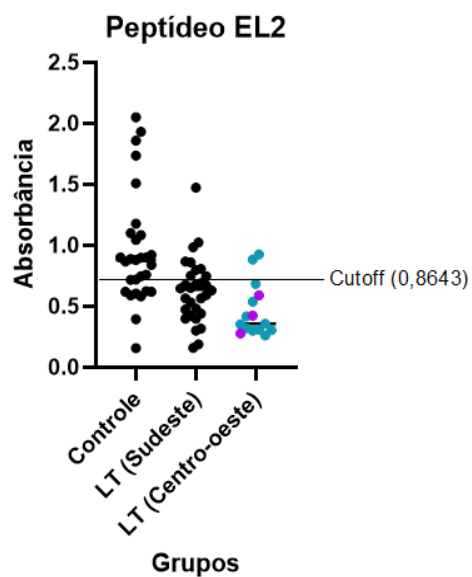
● Soro de paciente infectado com *L. (Leishmania) amazonensis*

● Soro de paciente infectado com *Leishmania (Viannia)*

● Soro de paciente infectado com *L. (Leishmania) amazonensis*

● Soro de paciente infectado com *Leishmania (Viannia)*

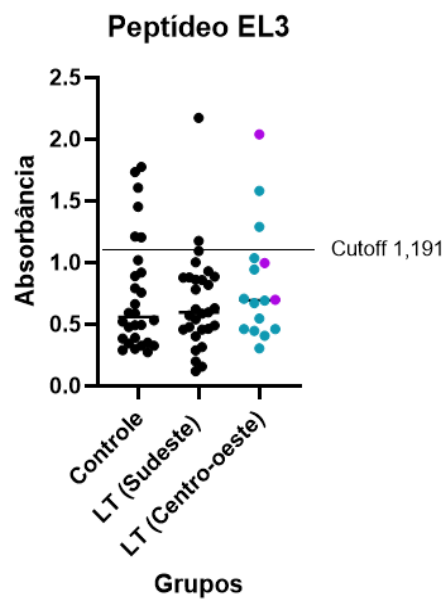
E



● Soro de paciente infectado com *L. (Leishmania) amazonensis*

● Soro de paciente infectado com *Leishmania (Viannia)*

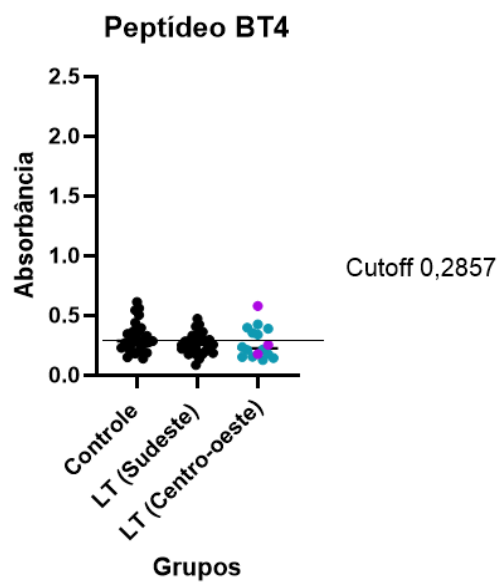
F



● Soro de paciente infectado com *L. (Leishmania) amazonensis*

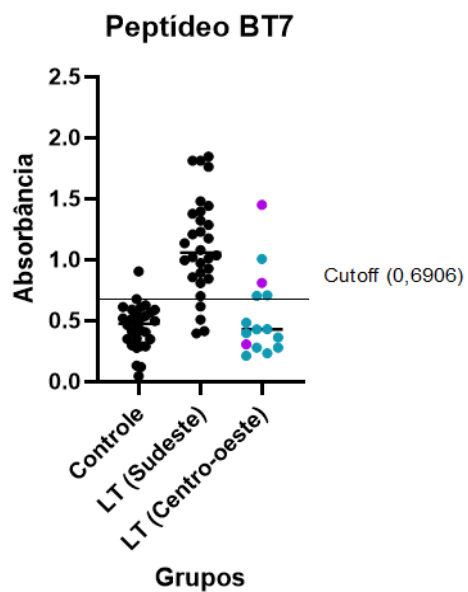
● Soro de paciente infectado com *Leishmania (Viannia)*

G



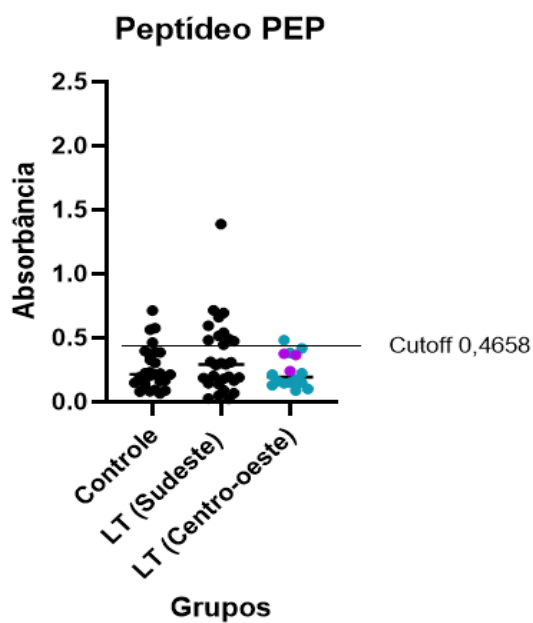
- Soro de paciente infectado com *L. (Leishmania) amazonensis*
- Soro de paciente infectado com *Leishmania (Viannia)*

H



- Soro de paciente infectado com *L. (Leishmania) amazonensis*
- Soro de paciente infectado com *Leishmania (Viannia)*

I



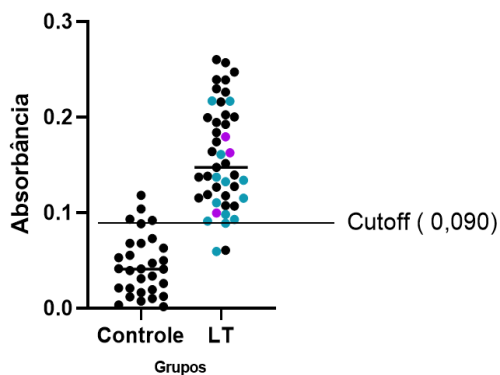
- Soro de paciente infectado com *L. (Leishmania) amazonensis*
- Soro de paciente infectado com *Leishmania (Viannia)*

Considerando os resultados do ELISA com peptídeo EL1 observados com amostras de GO (Figura 13D) e o que os melhores parâmetros do ELISA com amostras de MG haviam sido observados com peptídeo BT7, AUC= 0,934, S= 88%, E= 96,6%, VPP = 97% e VPN = 88% (Tabela 9), decidiu-se por realizar ELISA e CLIA com os peptídeos BT7 e EL1 como antígenos, em uma concentração final de 0,5 µg/well, com as amostras de soros CN (n=29), LT- MG (n=30) e LT-GO (n=15) (Figura 15).

**Figura 10:** Comparação do desempenho dos antígenos BT7+EL1 na reação ELISA (A) e CLIA (B) frente aos soros de pacientes com LT de duas regiões do país (MG em preto e GO colorido).

A

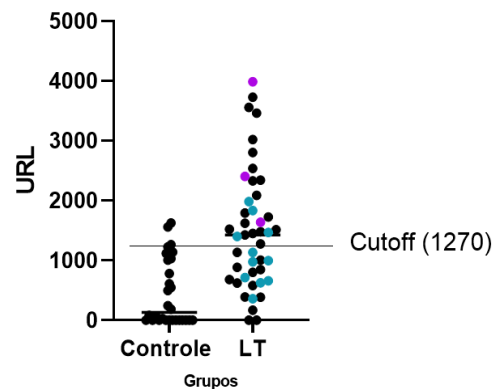
Peptídeos BT7+EL1 soro de LT e controle



- Soro de paciente infectado com *L. (Leishmania) amazonensis*
- Soro de paciente infectado com *Leishmania (Viannia)*

B

Peptídeos BT7+EL1 soro de LT e controle  
CLIA



- Soro de paciente infectado com *L. (Leishmania) amazonensis*
- Soro de paciente infectado com *Leishmania (Viannia)*

A partir desse resultado, foram calculados os valores de S, E, AUC, VPP e VPN do ELISA e do CLIA com a mistura dos peptídeos BT7 e EL1. Observou-se que com essa mistura de antígenos, o ensaio de ELISA foi superior ao CLIA com S= 96%, E= 88%, AUC de 0,93, VPP= 92% e VPN 94% e alcançou as maiores AUC, sensibilidade e VPN dentre todos os ensaios

realizados neste trabalho. Em relação ao CLIA, a mistura de antígenos proporcionou aumento na especificidade e manteve a AUC, com redução da sensibilidade em relação a cada antígeno utilizado isoladamente (Tabela 10).

**Tabela 9:** Tabela comparativa dos antígenos isolados e grupados nas reações ELISA convencional e reação CLIA-ELISA.

Antígeno	Técnica	Sensibilidade	Especificidade	AUC	Valor P	VPP	VPN
BT7	ELISA	0,882	0,966	0,934	<0,0001	0,967	0,878
	CLIA	0,769	0,805	0,819	<0,0001	0,810	0,763
EL1	ELISA	0,882	0,725	0,796	<0,0001	0,731	0,878
	CLIA	0,789	0,659	0,602	0,1786	0,681	0,805
BT7 + EL1	ELISA	0,957	0,878	0,971	<0,0001	0,918	0,935
	CLIA	0,692	0,935	0,818	<0,0001	0,957	0,591

## V- DISCUSSÃO

A Leishmaniose Tegumentar, classificada entre as 17 doenças tropicais negligenciadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS), apresenta um importante desafio de saúde pública, especialmente em regiões endêmicas com sistemas de saúde vulneráveis (WHO, 2023). O diagnóstico precoce e preciso dessa doença é um dos principais obstáculos para enfrentá-la devido à diversidade de manifestações clínicas e à ausência de um teste diagnóstico com altas sensibilidade e especificidade que atenda os países subdesenvolvidos que apresentam, muitas vezes, escassez de recursos. Atualmente, o diagnóstico da doença é efetuado predominantemente por meio da avaliação clínica do paciente e da realização de exames parasitológicos (Reimão *et al.*, 2020). Apesar de ser relativamente acessível em termos de custo, esse exame é considerado invasivo, demandando um ambiente ambulatorial e a intervenção de profissionais de saúde para a realização da biópsia (De Mello *et al.*, 2011). Ademais, a especificidade do teste pode variar devido à habilidade do profissional responsável pela busca do parasito, bem como ao tempo de duração da lesão, quando lesões mais antigas tendem a ter menor carga parasitária (Sousa *et al.*, 2014).

Nesse contexto, os métodos sorológicos se mostram como uma ferramenta poderosa para auxiliar no diagnóstico da LT. Esses métodos são menos invasivos em comparação ao parasitológico, possibilitam a análise de um grande número de amostras ao mesmo tempo, além de apresentarem custo viável, dependendo da complexidade do método. Tanto o ELISA convencional quanto o quimioluminescente apresentam essas características. Apesar dos níveis baixos de anticorpos durante o desenvolvimento da doença, diversas pesquisas destacaram a relevância desses métodos imunológicos no diagnóstico de LT, utilizando antígenos que proporcionam alta sensibilidade nos testes, em procedimentos altamente padronizados (Menezes *et al.*, 2014; Sato *et al.*, 2017; Dias *et al.*, 2018; Medeiros *et al.*, 2022). O ELISA, frequentemente utilizado com antígeno total na reação, pode apresentar reações cruzadas devido à complexidade imunogênica do parasito completo, que compartilha determinantes antigênicos com outros microrganismos (Carvalho *et al.*, 2017; Barroso-Freitas *et al.*, 2009). Portanto, há uma investigação contínua em diferentes grupos de pesquisa sobre o uso de antígenos purificados e recombinantes para aprimorar o diagnóstico sorológico desta parasitose.

A identificação e caracterização de epítomos de células B desempenham um papel crucial no desenvolvimento de vacinas, testes de imunodiagnóstico e produção de anticorpos. O uso de

ferramentas computacionais tem crescido significativamente para prever de maneira confiável epítomos lineares de células B. Dentre os métodos de predição mais comuns para epítomos lineares, destacam-se duas abordagens principais: a escala de propensão, que utiliza características físico-químicas como área de superfície exposta, polaridade, flexibilidade, acessibilidade, hidrofobicidade e escala antigênica; e o aprendizado de máquina, no qual algoritmos de classificação como máquinas de vetores de suporte, redes neurais e algoritmos de “floresta aleatória”. Estudos prévios demonstraram que métodos fundamentados em escalas de propensão apresentam suas próprias limitações (Blythe & Flower, 2005). Esses métodos, inclusive aqueles que incorporam todas as propriedades físico-químicas, frequentemente exibem desempenho insatisfatório. Para superar essas limitações, pesquisadores têm adotado técnicas de aprendizado de máquina para desenvolver modelos preditivos mais robustos (Wang e Pai, 2014; Jain *et al.*, 2011).

No presente estudo, foram empregados dois softwares, ABCpred e BCPreds, para a predição de epítomos de células B que utilizam métodos de aprendizagem de máquina. A escolha de sobrepor os resultados de ambos os *softwares* foi embasada na experiência do grupo, conforme evidenciado por Faria *et al.* (2011), que demonstraram que a combinação de pontuações padrão de diferentes programas de predição pode ser mais eficaz do que depender do índice (*score*) de um único método de predição. Aqui, a estratégia empregada demonstrou resultados positivos, uma vez que a predição de epítomos exibiu uma eficiência significativa na identificação de peptídeos potencialmente relevantes para discriminar soros de pacientes com LT dos soros de indivíduos não afetados pela doença. Durante os testes iniciais, ao realizar a triagem dos peptídeos usando *pools* de soro dos dois grupos, observou-se que o índice de reatividade de todos os peptídeos foi superior a 1 tanto no ELISA quanto no CLIA. Isso sugere uma reatividade maior no soro de pacientes com LT em comparação ao grupo de controle, permitindo assim a distinção entre pacientes positivos e negativos.

Neste estudo, na fase de triagem dos peptídeos utilizou-se o Índice de Reatividade (IR) para tal finalidade, um parâmetro aplicável em diferentes contextos e áreas do conhecimento, cuja interpretação varia conforme o campo específico dos testes imunológicos. Este índice representa quantitativamente a resposta imunológica a um determinado antígeno, geralmente calculado como a relação entre a intensidade do sinal observado em um teste para um dado antígeno, em comparação com um controle (Linnet *et al.*, 2012). O IR foi determinado pela diferença entre a

média das absorvâncias ou URL dos *pools* de soros positivos para LT, dividido pela média correspondente dos *pools* de soros negativos. Um IR igual ou superior a 1,5 foi estabelecido como critério para selecionar os peptídeos a serem submetidos à avaliação do ELISA e CLIA subsequentes. Este critério mostrou-se consistente, uma vez que peptídeos selecionados na triagem para um método específico (EL2, HS3 e BT7 para ELISA e EL3, PEP e BT4 para CLIA) apresentaram um desempenho satisfatório durante a avaliação subsequente do mesmo método. Apenas o teste utilizando peptídeo HS3, que apresentou um IR maior na fase de triagem pelo ELISA (IR= 1,6277, IR do CLIA = 1,440), demonstrou resultados satisfatórios em ambas as técnicas, com valores superiores no CLIA, alcançando AUC de 0,909 durante a fase de avaliação. Surpreendentemente, o teste utilizando o peptídeo BT7, que inicialmente apresentou um IR limítrofe na triagem para o ensaio ELISA (IR=1,4952), alcançou o maior valor de acurácia (AUC=0,934) entre todos os resultados descritos na avaliação do ELISA. Além disso, o teste demonstrou um desempenho satisfatório na análise do CLIA, apresentando uma AUC de 0,819. Este resultado indica que o antígeno tem um potencial promissor para uso no diagnóstico, independentemente da metodologia empregada para a detecção do sinal da reação.

Outro critério adotado no trabalho foi a determinação do ponto de corte (*cutoff*) de cada reação pela curva ROC. Essa curva descreve a interdependência entre especificidade e sensibilidade para um teste de índice quantitativo. Contudo, essas duas grandezas são inversamente proporcionais (Eusebi, 2013). A escolha de uma alta sensibilidade em um teste geralmente resulta em uma perda de especificidade, e o mesmo se aplica ao optar por alta especificidade (Linnet et al., 2012). Portanto, considerando que os testes avaliados neste estudo são propostos para compor o diagnóstico de triagem, optou-se por estabelecer o ponto de corte o valor que maximizava a soma estimada de especificidade e sensibilidade, utilizando os dados da curva ROC de cada reação. A partir desse ponto, foi possível determinar os soros que foram classificados como positivos (acima do *cutoff*) e negativos (abaixo do *cutoff*) no teste. Comparando com o resultado do teste padrão, foram identificados os falsos positivos, falsos negativos, verdadeiros negativos e verdadeiros positivos, permitindo assim o cálculo dos parâmetros de desempenho do teste (especificidade, sensibilidade, VPP e VPN).

Diante dos resultados aqui obtidos, serão discutidos os dados referentes aos testes que apresentaram elevada AUC ( $\geq 0,90$ ) nos métodos ELISA e CLIA: no ELISA o MIX dos peptídeos BT7 e EL1 apresentou o teste de maior acurácia do estudo, com uma AUC de 0,97, seguido pela

reação com o peptídeo BT7 com uma AUC de 0,93. Adicionalmente, no CLIA, os peptídeos PEP e HS3 com acurácias de 0,92 e 0,91, respectivamente.

Os antígenos frequentemente utilizados para o diagnóstico sorológico das leishmanioses, como ELISA, incluem proteínas recombinantes, antígeno total e peptídeos. A predição de epítomos de células B realizada por *softwares* pode ser utilizado para selecionar vários peptídeos a serem posteriormente testados individualmente como nesse trabalho, ou ainda é possível compor uma proteína quimérica para aumentar a chance de ligação entre o antígeno e o anticorpo. Galvani e colaboradores (2022) seguiram essa abordagem e observaram resultados promissores ao utilizar um teste sorológico com a proteína quimérica recombinante “ChimLeish”. Utilizando as sequências de quatro proteínas que já demonstraram bom desempenho em testes para leishmaniose visceral, os epítomos foram preditos com o auxílio de um dos programas empregados neste trabalho, o ABC Pred. Posteriormente, oito epítomos foram selecionados e suas sequências de aminoácidos foram utilizadas para construir o gene codificador da proteína quimérica. Ao utilizar essa proteína como antígeno no ELISA, observaram uma sensibilidade de 100% e uma especificidade de 98% com soros de pacientes com formas mucosa (n = 30) e cutânea (n = 25), bem como de indivíduos saudáveis (n = 25). O excelente desempenho desse teste é corroborado pelo valor da AUC, que apresentou uma acurácia igual a 1, caracterizando-o como um “teste perfeito”, superior ao valor da maior acurácia obtida no presente teste (BT7 e EL1 AUC =0,971).

Embora alguns peptídeos sintéticos utilizados individualmente tenham mostrado um desempenho diagnóstico satisfatório no estudo de Galvani e colaboradores, os valores de sensibilidade e especificidade dos testes foram inferiores aos obtidos com o uso da ChimLeish como antígeno, especialmente para a detecção de casos de leishmaniose cutânea (CL), que frequentemente apresentam níveis mais baixos de anticorpos anti-Leishmania. Quando os peptídeos foram avaliados, constatou-se que o estudo obteve o melhor resultado no teste ao utilizar o peptídeo 5, que apresentou uma acurácia de 0,983. Este resultado é notavelmente próximo ao valor da melhor acurácia registrada no estudo atual, que foi obtido com o peptídeo individual BT7, cujo valor de acurácia foi 0,934. Além disso, o estudo de Galvani revelou uma baixa reatividade cruzada com soros de pacientes com outras infecções, como doença de Chagas, hanseníase, malária, tuberculose, histoplasmose, aspergilose, e com indivíduos infectados pelo HIV. No entanto, o estudo apresentou limitações significativas, como a ausência de soros de pacientes com infecções fúngicas dermatológicas, bem como de amostras de pacientes com LT provenientes de

diversas regiões do país. Essas amostras, que foram incluídas no presente estudo, poderiam ter fornecido uma perspectiva mais abrangente e relevante para avaliar a eficácia e a aplicabilidade do teste em diferentes contextos geográficos e clínicos.

Foi demonstrado que o ELISA utilizando o peptídeo BT7 apresentou ótimo desempenho neste estudo, com sensibilidade de 88%, especificidade de 97% e Área sob a Curva de 0,934. Este peptídeo é derivado da  $\beta$ -tubulina, uma proteína componente do citoesqueleto do parasito. A  $\beta$ -tubulina desempenha um papel crucial na manutenção da estrutura celular, na divisão celular e é essencial para o movimento intracelular (Ambit *et al.*, 2011). Por ser altamente conservada como uma proteína estrutural, a  $\beta$ -tubulina recombinante tem sido investigada como candidata a antígeno em testes diagnósticos para LT. Duarte e colaboradores (2015), ao utilizar a proteína recombinante como antígeno para ELISA, obtiveram resultados com 100% de sensibilidade e 82,5% de especificidade no diagnóstico de leishmaniose tegumentar. Esses resultados são consistentes com os descritos por Lima e colaboradores (2018) que, ao empregar a B-tubulina na forma recombinante, o teste de ELISA alcançou uma sensibilidade de 100% e uma especificidade de 97,78%. Ambos os estudos empregaram soro de pacientes com leishmaniose tegumentar, incluindo formas cutâneas e mucosas, e demonstraram resultados superiores em comparação ao uso do antígeno total de *L. braziliensis*. Embora os estudos anteriores tenham investigado a reação cruzada com pacientes chagásicos, não avaliaram a possível interação cruzada com pacientes com leishmaniose visceral. Esta avaliação é crucial para a aplicação dos resultados em estudos epidemiológicos em áreas com sobreposição das formas tegumentar e visceral da doença. No presente estudo, ao utilizar os peptídeos BT4 e BT7, derivados da proteína  $\beta$ -tubulina, como antígenos no ensaio ELISA, foram observadas reações cruzadas distintas com o soro de pacientes com LV. O peptídeo BT4 com uma taxa de reação cruzada de 96,6%, enquanto o BT7 apenas 3,3%. Esses resultados destacam a importância de se avaliar a ocorrência de reações cruzadas com soro de pacientes com LV ao investigar a proteína  $\beta$ -tubulina.

Os testes com peptídeos sintéticos têm apresentado resultados mais promissores devido à capacidade de pequenos fragmentos contendo determinantes antigênicos minimizarem reações não específicas. Recentemente, Medeiros e colaboradores (2022) identificaram, por meio de estratégias imunoproteômicas, a proteína Tryparedoxin Peroxidase (TryP) como uma candidata promissora para diagnóstico de LT. Eles investigaram essa proteína como antígeno para diagnóstico sorológico no método ELISA, tanto na forma recombinante quanto utilizando peptídeos lineares (Peptídeo:

MNEPAPP) derivados dela comparando seu desempenho com o antígeno total de *L. brasiliensis* e a imunofluorescência. Entre os antígenos testados por ELISA, o antígeno total demonstrou acurácias significativamente mais baixas ( $AUC = 0,65$ ), superando apenas o resultado do ensaio de imunofluorescência ( $AUC = 0,37$ ). Em contraste, quando se utilizou a proteína recombinante (rTryp) como antígeno, o teste alcançou uma acurácia moderada de 0,89. Por outro lado, o peptídeo isolado apresentou uma acurácia elevada de 0,94, bastante próxima à observada no presente trabalho com o peptídeo BT7 ( $AUC = 0,94$ ), mas inferior a acurácia alcançada com a combinação dos peptídeos BT7 e EL1 ( $AUC = 0,97$ ). Esta evidencia sugere que a estratégia de utilizar múltiplos peptídeos, como demonstrado no atual estudo, pode ser uma abordagem eficaz para aprimorar a acurácia dos testes diagnósticos. Em relação aos parâmetros de sensibilidade e especificidade, o estudo de Medeiros e colaboradores observou que o ELISA utilizando o peptídeo TryP apresentou uma sensibilidade e especificidade de 94,29%. Esses valores são comparáveis aos encontrados no presente trabalho, onde observou-se para o peptídeo BT7 sensibilidade de 88% especificidade de 96%, enquanto a combinação dos peptídeos BT7 e EL1 registrou-se sensibilidade de 96% e especificidade de 88%. O estudo de Medeiros não abordou a investigação de reações cruzadas com outras doenças que possam gerar confusão no diagnóstico clínico, ao contrário do presente trabalho.

Na análise por CLIA, o melhor desempenho foi observado com os peptídeos PEP, apresentando uma Área sob a Curva ( $AUC$ ) de 0,924, e HS3, com uma  $AUC$  de 0,909. Esses resultados são consistentes com os encontrados em estudo anterior conduzido por Leite em 2019, que comparou o desempenho de três proteínas utilizando os métodos ELISA e CLIA para diagnóstico de leishmaniose tegumentar. No trabalho de Fonseca e colaboradores (2019), a avaliação das proteínas PQ10 e PQ20 proteínas no ELISA para diagnóstico de LV mostrou resultados promissores. Com base nesses achados, as proteínas analisadas, juntamente com a proteína C9, foram escolhidas para uma avaliação comparativa no ELISA e no CLIA para diagnóstico de LT no estudo de Leite em 2019. A análise revelou que a utilização do CLIA proporcionou um desempenho superior, apresentando maior sensibilidade, especificidade e acurácia para todos os antígenos testados. Especificamente, quando utilizando a proteína C9 no CLIA, foram obtidos valores de sensibilidade de 92% e especificidade de 83%. Embora esses valores sejam relativamente próximos, ainda ficaram abaixo dos resultados obtidos com o peptídeo PEP ( $S = 94\%$  e  $E = 88\%$ ) e foram superiores aos resultados do peptídeo HS3 ( $S = 94\%$  e  $E =$

77%). Além disso, não foram identificadas reações cruzadas com soro de pacientes com toxoplasmose, esporotricose e paracoccidiodomicose quando foi utilizada a proteína C9. No entanto, observou-se presença de reação cruzada ao utilizar os peptídeos PEP e HS3 com soro de pacientes com esporotricose, com taxas de 12,5% e também com soro de pacientes LV, com taxas de 20% com o antígeno PEP e 90% com o antígeno HS3.

A observação de reações cruzadas identificadas tanto no CLIA quanto no ELISA com todos os três antígenos derivados da proteína HSP70 (HS1, HS3 e HS5) pode estar atribuída às características intrínsecas da proteína da qual o peptídeo foi derivado. A HSP70 é uma proteína altamente conservada no genoma de diversas espécies do parasito, conforme relatado por Maresca *et al.* (1994). Esta alta conservação pode levar a reações cruzadas, uma vez que a presença de HSP70 em múltiplas espécies pode causar a interação com anticorpos direcionados a antígenos semelhantes em diferentes contextos. Quando as proteínas de choque térmico (HSPs) são empregadas como antígenos em testes sorológicos para LT, os testes demonstram uma eficácia significativa (Souza *et al.* 2014). No entanto, a alta reação cruzada com soro de pacientes com outras doenças, observada neste estudo, também foi relatada em pesquisas anteriores. Souza *et al.* (2013) utilizaram a proteína HSP70 na forma recombinante e, apesar de obterem resultados promissores com uma acurácia de 0,827, observaram altas taxas de reatividade cruzada com todas as doenças testadas no estudo. O teste obteve maior reatividade com soros de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LES) (20%) e doença de Chagas (10%), além de, tuberculose (4,5%) e hanseníase (3,3%).

Dependendo das espécies e cepas de *Leishmania sp.* envolvidas, assim como do tamanho do inóculo e de fatores intrínsecos ao indivíduo, a leishmaniose tegumentar pode manifestar-se de maneiras distintas, com variadas respostas imunológicas (Masmoudi *et al.*, 2013). Levando em consideração essas variações, o presente estudo investigou o desempenho de peptídeos em ensaios ELISA utilizando soros de pacientes de provenientes de dois estados do Brasil. Observou-se que com o peptídeo BT7 o ELISA apresentava alta eficácia nas amostras de Minas Gerais, enquanto que com o peptídeo EL1 se destacava nas amostras de Goiás, a partir daí, foi realizado ELISA e CLIA com a combinação desses peptídeos. Essa combinação resultou em um excelente desempenho, detectando amostras positivas de ambas as regiões e alcançando uma acurácia de 92% no ELISA e 96% no CLIA. Uma investigação recente conduzida por Valencia-Portillo em 2024 avaliou o desempenho de um teste sorológico utilizando o método ELISA com a proteína

recombinante rLb6H, em 393 soros de pacientes de cinco centros de 3 estados do Brasil e demonstraram elevados índices de sensibilidade (98,6%) e especificidade (100%). Além disso, foi realizada uma análise de reação cruzada com 141 soros de pacientes com diversas doenças, incluindo doenças autoimunes, doença de Chagas, histoplasmose, malária, mononucleose infecciosa, paracoccidiodomicose, sífilis, toxoplasmose e tuberculose, bem como amostras positivas para fator reumatoide. A especificidade do teste apresentou diminuição em áreas de alta endemicidade para a forma visceral de leishmaniose, possivelmente devido à reação cruzada com anticorpos de pacientes com essa forma clínica. Observou-se, ainda, as maiores taxas de reação cruzada com soros de pacientes com paracoccidiodomicose (23,3%), malária (36,4%) e tuberculose (40%).

Estudos como o de Valencia-Portillo e o presente trabalho, que investigam metodologias sorológicas para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar utilizando amostras de soros de diferentes regiões, ainda são escassos na literatura. Essa escassez compromete a aplicabilidade de testes com capacidade para identificar pacientes de diversas regiões do país. Portanto, é fundamental que os testes sorológicos incluam amostras de diferentes regiões do Brasil, especialmente das regiões Norte e Nordeste, onde há alta prevalência e circulação de diversas espécies do parasito (De Melo *et al.*, 2024). Esta abordagem é crucial para o controle e o mapeamento epidemiológico da doença.

A busca pela Propriedade Intelectual é uma área que tem crescido significativamente nos últimos anos, e as patentes são um dos principais meios para alcançar esse objetivo, além de servirem como indicadores do desenvolvimento tecnológico de um país ou região (OMPI, 2019). O Brasil lidera com uma participação de 90,9% nos registros de patentes para diagnóstico da leishmaniose tegumentar. Este protagonismo do Brasil no panorama tecnológico reflete o interesse em desenvolver novas tecnologias que facilitem o diagnóstico desta forma clínica prevalente nas Américas (Albuquerque *et al.*, 2023). Os resultados preliminares deste estudo possibilitaram a submissão de um pedido de patente ao INPI (Instituto Nacional de Propriedade Intelectual) para um novo kit diagnóstico de leishmaniose tegumentar, contribuindo assim para as inovações tecnológicas do país (ANEXO III).

Atualmente as invenções brasileiras de alto desempenho como novos métodos imunodiagnósticos para LT, assim como no atual trabalho, são de peptídeos sintéticos (Albuquerque *et al.*, 2023). Estes kits diagnósticos conferem alta sensibilidade e especificidade no

diagnóstico de Leishmaniose Tegumentar incluindo a forma mucocutânea e cutânea localizada (Coelho et al., 2017; Coelho et al., 2018). Outra característica compartilhada com essas invenções é a utilização de ELISA. Esses testes diagnósticos consideraram essa metodológica mais viável, destacando-se pela coleta menos invasiva de material biológico, pela capacidade de realizar o teste com várias amostras simultaneamente, pela execução simplificada e pelo custo médio inferior em comparação a outros métodos imunológicos (Carvalho *et al.*, 2017; Pena *et al.*, 2020).

Embora o número de registros de kits diagnósticos na área da leishmaniose tegumentar esteja crescendo e os resultados sejam promissores, as invenções apresentam limitações significativas do ponto de vista metodológico, o que constitui barreiras para a implementação desses novos métodos sorológicos na prática clínica da LT. As principais limitações identificadas incluem: a ausência ou não referência ao método padrão-ouro como diagnóstico de referência, amostras de tamanho reduzido ou não mencionadas no documento e a não inclusão de pacientes com sinais clínicos que podem se assemelhar à LT, como esporotricose, paracoccidioidomicose e outras doenças dermatológicas (Albuquerque *et al.*, 2023, Freire *et al.*, 2021).

## VI- CONCLUSÕES

Após mapeamento de epítomos para células B em proteínas já identificadas como promissoras para diagnóstico de LT, a triagem dos 20 peptídeos permitiu selecionar nove (45%) deles como promissores para a utilização como antígenos nos métodos ELISA e CLIA. Com esses antígenos os testes sorológicos distinguiram presença ou ausência da infecção, sendo que, três peptídeos apresentaram desempenho superior no método ELISA, três exclusivamente no método CLIA e outros três demonstrando melhor desempenho em ambos os métodos.

Na avaliação do método ELISA, os melhores resultados foram com o peptídeo BT7 nas amostras de MG, com elevada AUC de 0,934, sensibilidade de 88%, especificidade de 97%, valor preditivo positivo de 97%, e valor preditivo negativo de 88%. Além disso, observou-se baixa reatividade cruzada com a forma visceral da doença (3%) e nenhuma reação com doenças dermatológicas que podem interferir no diagnóstico clínico da LT.

Na avaliação do CLIA, ao utilizar o peptídeo HS3 como antígeno, o teste apresentou elevada AUC de 0,909, sensibilidade de 94%, especificidade de 77%, valor preditivo positivo de 75%, valor preditivo negativo 94% e, apesar do elevado índice de reação com LV (89%), não apresentou reação cruzada com paracoccidomicose e baixo índice de reatividade com esporotricose (12%).

A combinação dos peptídeos EL1 e BT7 como antígeno nas reações melhorou significativamente a eficácia dos testes, alcançando a maior acurácia do estudo (97%) no ELISA, além de apresentar alta especificidade e sensibilidade tanto no CLIA (S=69% E= 94%), quanto no ELISA (S=96%, E= 88%). Além de permitir a detecção de soros positivos de pacientes de regiões diferentes.

## VI- REFERÊNCIA

ABDELADHIM M, KAMHAWI S, VALENZUELA JG. What's behind a sand fly bite? The profound effect of sand fly saliva on host hemostasis, inflammation and immunity. *Infect Genet Evol.* 2014 Dec;28:691-703. doi: 10.1016/j.meegid.2014.07.028. Epub 2014 Aug 10. PMID: 25117872; PMCID: PMC4562216.

ABRANCHES, P., SILVA-PEREIRA, M. C. D., Conceição-Silva, F. M., Santos-Gomes, G. M., & Janz, J. G. (1991). Canine Leishmaniasis: Pathological and Ecological Factors Influencing Transmission of Infection. *\*The Journal of Parasitology\**, 77(4), 557-561. Allen Press. 2014;107(1):7-14

ADAMS ER, SCHOONE G, VERSTEEG I, GOMEZ MA, DIRO E, MORI Y, PERLEE D, DOWNING T, SARAVIA N, ASSAYE A, HAILU A, ALBERTINI A, NDUNG'U JM, SCHALLIG H .Development and evaluation of a novel loop-mediated isothermal amplification assay for diagnosis of cutaneous and visceral Leishmaniasis. *J Clin Microbiol.*2018 56(7).

ALBUQUERQUE, LWN, Ferreira SCA, Thomaz Dos Santos Varjão M, da Silva AE, Duarte AWF, Silva GT, Alexandre-Moreira MS, de Queiroz AC. New immunodiagnostic methods for human tegumentary leishmaniasis in the last 10 years: Technological prospecting. *Acta Trop.* 2023 Jun;242:106903. doi: 10.1016/j.actatropica.2023.106903. Epub 2023 Mar 24. PMID: 36967062.

AL-DHALIMI MA, JASIM SH. Dermoscopic evaluation of cutaneous leishmaniasis. *Arch Dermatol Res.* 2023 Apr;315(3):531-540.

ALEXANDER B.; DE CARVALHO R.L.; MCCALLUM H.; PEREIRA M.H. Role of the domestic chicken (*Gallus gallus*) in the epidemiology of urban visceral leishmaniasis in Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, v.8, n.12, p.1480-1485, 2002.

AMBIT A, WOODS KL, CULL B, COOMBS GH, MOTTRAM JC. Morphological events during the cell cycle of *Leishmania major*. *Eukaryot Cell.* 2011 Nov;10(11):1429-38. Epub 2011 Sep 16. PMID: 21926331; PMCID: PMC3209043.

ASHFORD, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int J Parasitol*, v.30, p.1269-1281, 2000.

ÁUREA, G.; VALÉRIO-, A.B.; PALMA J.M.; MOURATA, P.M.; RUAS, P.; DIAS, T.G.; SANTOS-GOMES, G. Cutaneous leishmaniasis: the complexity of host's effective immune response against a polymorphic parasitic disease. *Journal of Immunology Research*. 2019.

BARROSO-FREITAS, A. P. T. et al. Accuracy of an ELISA and indirect immunofluorescence for the laboratory diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 103, n. 4, p. 383– 389, 2009.

BARROSO-FREITAS, A.P.F.; PASSOS, S.R.; MOUTA, E.C. et al. Accuracy of an ELISA and indirect immunofluorescence for the laboratory diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v.103, p.383-389, 2009.

BASANO, S. A., CAMARGO, L. M. A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. *Rev. Bras. Epidemiol.*, v. 7, n. 3, p. 328 -337, 2004.

BATES PA. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int J Parasitol*. 2007 Aug;37(10):1097-106. doi: 10.1016/j.ijpara.2007.04.003. Epub 2007 Apr 18. PMID: 17517415; PMCID: PMC2675784.

BERMAN JD 2005. Recent Developments in Leishmaniasis: Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. *Curr Infect Dis Rep* 7:33-38.

BRASIL. Ministério da Saúde. Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN). Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/cnv/ltabr.def> Acesso em: 21/03/2024.

BRASIL. Ministério da Saúde. Guia de Vigilância epidemiológica. 6ª ed. Secretaria de Vigilância em Saúde, Brasília, p. 444-466, 2005. Disponível em: [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/doencas\\_infecciosas\\_parasitaria\\_guia\\_bo Iso.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/doencas_infecciosas_parasitaria_guia_bo Iso.pdf). Acesso em: 01/02/2024

BRAZ, Lucia Maria Almeida. Tegumentary leishmaniasis diagnosis: what happened with MST (Montenegro Skin Test) in Brazil? Letter to the Editor. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 61, 2019.

CARVALHO CDP, Luz JGG, Carvalho AG, Carvalho RDP, Pires HHR, Dias JVL. "It's not all about the disease": do treatment and socioeconomic status affect perceived impact and satisfaction of patients treated for cutaneous leishmaniasis? *Rev Soc Bras Med Trop*. 2023 Feb 20;56:e0253. doi: 10.1590/0037-8682-0253-2022. PMID: 36820654; PMCID: PMC9957146.

CARVALHO EM, CORREA-FILHO D, BARCELAR O, ALMEIDA, RP, LESS H, ROCHA H 1995. Characterization of the immune response in subjects with self-healing cutaneous leishmaniasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 53: 273-277.

CARVALHO, A. M. 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, p. 42–48, ago. 2017.

CARVALHO, E. M. et al. Cell mediated immunity in American cutaneous and mucosal leishmaniasis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, v. 135, n. 6, p. 4144–8, 1985.

CASTELLANO LR, FILHO DC, ARGIRO L, DESSEIN H, PRATA A, DESSEIN A, RODRIGUES V. Th1/Th2 immune responses are associated with active cutaneous leishmaniasis and clinical cure is associated with strong interferon-gamma production. *Hum Immunol*. 2009 Jun;70(6):383-90. doi: 10.1016/j.humimm.2009.01.007. Epub 2009 Jan 20. PMID: 19480861.

CELESTE JLL, CALDEIRA RL, PIRES SDF, SILVEIRA KD, SOARES RP, DE ANDRADE HM. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of *Leishmania amazonensis* in skin samples. *Exp Parasitol*. 2019 Aug;203:23-29. doi: 10.1016/j.exppara.2019.05.006. Epub 2019 May 28. PMID: 31150654.

CELESTE, JORDANNA LUÍZA DE LIMA. Desenvolvimento de métodos moleculares e sorológicos para diagnóstico específico de infecções por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. 2019. Tese de Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2019.

CHANG, KP., MCGWIRE, B.S. Molecular determinants and regulation of *Leishmania* virulence. *Kinetoplastid Biol Dis* 1, 1 (2002).

CHRISTENSEN, STEPHEN M. Host and parasite responses in human diffuse cutaneous leishmaniasis caused by *L. amazonensis*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, [S. l.], v. 13, n. 3, p. e0007152, 2019.

CINQUANTA, L.; FONTANA, D.E.; BIZARRO, N. Chemiluminescent immunoassay technology: what does it change in autoantibody detection? *Auto Immun Highlights*, v.8,2017.

COELHO, E.A.F., TAVARES, C.A.P., COSTA, L.E., GONCALVES, D.U., SOUZA, D.M., SALLES, B.C.S., FILHO, L.R.G., & VAZ, E.R. (2017). Synthetic peptides, method and kit for diagnosing human mucosal leishmaniasis, and use there. WO2017109763A1.

COELHO, E.A.F., TAVARES, E.A.P., DUARTE, C.C., PIMENTA, M.C., & SOUZA, D.M. Serological diagnosis kit for leishmaniasis, based on immunoproteomics and use. BR102015010519A2. (2018).

COLOMBO, A. L., CAMARGO, L. F. A., FISCHMAN, O. G., & CASTELO, A. (1992). Parâmetros clínicos relevantes para o diagnóstico diferencial entre leishmaniose cutâneo-mucosa e paracoccidiodomicose. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 25(3), 000-000.

CONDE L, MACIEL G, DE ASSIS GM, FREIRE-DE-LIMA L, NICO D, VALE A, FREIRE-DE-LIMA CG, MORROT A. Humoral response in Leishmaniasis. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022 Dec 12;12:1063291. doi: 10.3389/fcimb.2022.1063291. PMID: 36579347; PMCID: PMC9791258.

COSTA LE, SALLES BC, ALVES PT, DIAS AC, VAZ ER, RAMOS FF, MENEZES-SOUZA D, DUARTE MC, ROATT BM, CHÁVEZ-FUMAGALLI MA, TAVARES CA, GONÇALVES DU, ROCHA MO, GOULART LR, COELHO EA. New serological tools for improved diagnosis of human tegumentary leishmaniasis. *J Immunol Methods*. 2016 Jul;434:39-45. doi: 10.1016/j.jim.2016.04.005. Epub 2016 Apr 19. PMID: 27090730.

DAMON, D.E.; 2D wax-printed paper substrates with extended solvent supply capabilities allow enhanced ion signal in paper spray ionization. Issue 12, 2016. *Analyst*, v. 141, n. 22, p. 6443-6449, 2016.

DE MELLO CX, DE OLIVEIRA SCHUBACH A, DE OLIVEIRA RV, CONCEIÇÃO-SILVA F, PIMENTEL MI, LYRA MR, E VASCONCELLOS EC, DE FÁTIMA MADEIRA M. Comparison

of the sensitivity of imprint and scraping techniques in the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis in a referral centre in Rio de Janeiro, Brazil. *Parasitol Res.* 2011 Sep;109(3):927-33. doi: 10.1007/s00436-011-2335-2. Epub 2011 May 18. PMID: 21590269.

DE MELLO, C. X. Comparison of the sensitivity of imprint and scraping techniques in the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis in a referral centre in Rio de Janeiro, Brazil. *Parasitology Research*, v. 109, n. 3, p. 927–933, 2011.

DE MELO SN, SOEIRO BARBOSA D, CÂMARA DCP, CÉSAR SIMÕES T, BUZANOVSKY LP, SOUSA DUARTE AG, MAIA-ELKHOURY ANS, CARDOSO DT, EDEL DONATO L, WERNECK GL, BRUHN FRP, SILVA BELO V. Tegumentary leishmaniasis in Brazil: priority municipalities and spatiotemporal relative risks from 2001 to 2020. *Pathog Glob Health.* 2024 Jun 21:1-11

DE VRIES, H.J.C., Schallig, H.D. Cutaneous Leishmaniasis: A 2022 Updated Narrative Review into Diagnosis and Management Developments. *Am J Clin Dermatol* **23**, 823–840 (2022).

DERMINE JF, Scianimanico S, Privé C, Descoteaux A, Desjardins M. Leishmania promastigotes require lipophosphoglycan to actively modulate the fusion properties of phagosomes at an early step of phagocytosis. *Cell Microbiol.* 2000 Apr;2(2):115-26.

DESJEUX, P. Leishmaniasis. Public health aspects and control. *Clin. Dermatol.* 14: 417– 423. 1996

DIAS DS, RIBEIRO PAF, SALLES BCS, SANTOS TTO, RAMOS FF, LAGE DP, COSTA LE, PORTELA ASB, CARVALHO GB, CHAVEZ-FUMAGALLI MA, CALIGIORNE RB, OLIVEIRA JS, MAGALHÃES-SOARES DF, SILVA ES, GALDINO AS, MENEZES -SOUZA D, DUARTE MC, GONÇALVES DU, COELHO EAF . Diagnóstico sorológico e prognóstico da leishmaniose tegumentar e visceral utilizando uma proteína hipotética conservada *de Leishmania* . *Parasitol Int* 67(3):344–350. 2018.

DUARTE MC, PIMENTA DC, MENEZES-SOUZA D, MAGALHÃES RD, DINIZ JL, COSTA LE, CHÁVEZ-FUMAGALLI MA, LAGE PS, BARTHOLOMEU DC, ALVES MJ, FERNANDES AP, SOTO M, TAVARES CA, GONÇALVES DU, ROCHA MO, COELHO EA. Proteins Selected in *Leishmania (Viannia) braziliensis* by an Immunoproteomic Approach with Potential Serodiagnosis Applications for Tegumentary Leishmaniasis. *Clin Vaccine Immunol.* 2015 Nov;22(11):1187-96.

EL-MANZALAWY Y, DOBBS D, HONAVAR V 2008. Predicting linear B-cell epitopes using string kernels. *J Mol Recog* 21, 4: 243 – 255.

ERBER AC, SANDLER PJ, DE AVELAR DM, SWOBODA I, COTA G, WALOCHNIK J. Diagnosis of visceral and cutaneous leishmaniasis using loop-mediated isothermal amplification (LAMP) protocols: a systematic review and meta-analysis. *Parasit Vectors*. 2022 Jan 24;15(1):34. doi: 10.1186/s13071-021-05133-2. PMID: 35073980; PMCID: PMC8785018.

ESPINOSA OA, SERRANO MG, CAMARGO EP, TEIXEIRA MMG, SHAW JJ. An appraisal of the taxonomy and nomenclature of trypanosomatids presently classified as *Leishmania* and *Endotrypanum*. *Parasitology*. 2018 Apr;145(4):430-442.

EUSEBI, PAOLO. Diagnostic Accuracy Measures. *Cerebrovasc Dis*, v. 36, n. 4, p. 267-272, out. 2013. Evaluation of the clinical effectiveness of HIV antigen/antibody screening using a chemiluminescence microparticle immunoassay,

EVANS, A. L. The evaluation fo medical images. In: *Medical Physics Handbooks*. Bristol, England: Adam Hilger Ltd, v.10, 1981.

FARIA, Angélica R. *et al*. High-throughput analysis of synthetic peptides for the immunodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 5, n. 9, p. e1310, Sep. 2011.

FIGUEIRA, L. *et al*. New human case reports of cutaneous leishmaniasis by *Leishmania* (*Viannia*) *naiffi* in the Amazon region, Brazil. *Acta Amazonica*, v. 47, n. 1, p. 47–52, 2017.

Fonseca THS, Faria AR, Leite HM, da Silveira JAG, Carneiro CM, Andrade HM. Chemiluminescent ELISA with multi-epitope proteins to improve the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Vet J*. 2019 Nov;253:105387.

FURTADO, T. Critérios para diagnóstico de LTA. *Anais Brasileiros de Dermatologia* n.65, p.51-86, 1980.

GALVANI, N.C; Machado, A.S; Lage, D.P, Martins, V.T; de Oliveira. D;, Freitas CS, Vale DL, Fernandes BB, Oliveira-da-Silva JA, Reis TAR, Santos TTO, Ramos FF, Bandeira RS, Ludolf F, Tavares GSV, Guimarães NS, Tupinambás U, Chávez-Fumagalli MA, Humbert MV, Gonçalves DU, Christodoulides M, Machado-de-Ávila RA, Coelho EAF. Sensitive and specific serodiagnosis

of tegumentary leishmaniasis using a new chimeric protein based on specific B-cell epitopes of *Leishmania* antigenic proteins. *Microb Pathog.* 2022 Jan;162:105341. doi: 10.1016/j.micpath.2021.105341. Epub 2021 Dec 6. PMID: 34883228.

GONTIJO CMF, MELO MN. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Rev. bras. epidemiol.* Set2004;7(3):338-49

GUREL MS e TEKIN B, UZUN S. Cutaneous leishmaniasis: A great imitator. *Clin Dermatol.* 2020 Mar-Apr;38(2):140-151. doi: 10.1016/j.clindermatol.2019.10.008. Epub 2019 Oct 24. PMID: 32513395.

Gurung P., Kanneganti T. D. Innate immunity against leishmania infections. *Cell Microbiol.* (2015). 17 (9), 1286–1294.

HAJJARAN H, VASIGHEH F, MOHEBALI M, REZAEI S, MAMISHI S, CHAREDAR S. Direct diagnosis of *Leishmania* species on serosity materials punctured from cutaneous leishmaniasis patients using PCR-RFLP. *J Clin Lab Anal.* 2011;25(1):20-4.

HASHIGUCHI Y, GOMEZ EL, KATO H, MARTINI LR, VELEZ LN, UEZATO H. Diffuse and disseminated cutaneous leishmaniasis: clinical cases experienced in Ecuador and a brief review. *Trop Med Health.* 2016 Mar 14;44:2.

JACKSON, SIERRA; LEE, SUJI; BADU-TAWIAH, Abraham K. Automated immunoassay performed on a 3D microfluidic paper-based device for malaria detection by ambient mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, v. 94, n. 12, p. 5132-5139, 16 mar. 2022.

JACOBSON RL. Leishmaniasis in an era of conflict in the Middle East. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2011 Mar;11(3):247-58. doi: 10.1089/vbz.2010.0068. Epub 2010 Sep 16. PMID: 20846030.

JAIN N, Jhunthra S, Garg H, Gupta V, Mohan S, Ahmadian A, Salahshour S, Ferrara M. Prediction modelling of COVID using machine learning methods from B-cell dataset. *Results Phys.* 2021 Feb;21:103813.

JUNQUEIRA PEDRAS M, ORSINI M, CASTRO M, PASSOS VM, RABELLO A. Antibody subclass profile against *Leishmania braziliensis* and *Leishmania amazonensis* in the diagnosis and follow-up of mucosal leishmaniasis. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2003 Nov;47(3):477-85.

KRISTIAN LINNET, Patrick MM Bossuyt, Karel GM Moons, Johannes B Reitsma, Quantifying the accuracy of a diagnostic test or marker. *Química Clínica*, Volume 58, Edição 9, 1 de setembro de 2012, Páginas 1292–1301.

LAINSON, R. Espécies neotropicais de Leishmania: uma breve revisão histórica sobre sua descoberta, ecologia e taxonomia. *Rev. Pan-Amaz. de Saúde*, v.1, n.2, 2010.

LAINSON, R., SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: PETERS, W; KILLICK-KENDRICK, R. The leishmaniasis in biology and medicine. Biology and epidemiology. Academic Press: London, v. 1, p. 1- 120, 1987.

LEE, Suji; CHINTALAPUDI, Kavyasree; BADU-TAWIAH, Abraham K. Clinical chemistry for developing countries: mass spectrometry. *Annual Review of Analytical Chemistry*, v. 14, p. 437-465, jul. 2021.

LEE, SUJI; KULYK, DMYTRO S.; AFRIYIE, STEPHEN OPOKU; BADU, KINGSLEY; BADU-TAWIAH, ABRAHAM K. Malaria diagnosis using paper-based immunoassay for clinical blood sampling and analysis by a miniature mass spectrometer. *Analytical Chemistry*, v. 94, n. 41, p. 14377-14384, 4 out. 2022.

LEITE, HM. FARIA, AR. ANDRADE HM. Elisa Quimioluminescente com Proteínas Recombinantes para o Diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana. Dissertação (Dissertação em Parasitologia). UFMG. Minas Gerais, pág 32. 2019.

LIMA BSS, PIRES SF, FIALHO LC, OLIVEIRA EJ, MACHADO-DE-ÁVILA RA, CHÁVEZ-OLÓRTEGUI C, CHAPEAUROUGE AD, PERALES J, ANDRADE HM. A Proteomic Road To Acquire An Accurate Serological Diagnosis For Human Tegumentary Leishmaniasis. *Journal of Proteomics*. 2017.

LIMA MP, COSTA LE, DUARTE MC, MENEZES-SOUZA D, SALLES BCS, DE OLIVEIRA SANTOS TT, RAMOS FF, CHÁVEZ-FUMAGALLI MA, KURSANCEW ACS, AMBRÓSIO RP, ROATT BM, MACHADO-DE-ÁVILA RA, GONÇALVES DU, COELHO EAF. Evaluation of a hypothetical protein for serodiagnosis and as a potential marker for post-treatment serological evaluation of tegumentary leishmaniasis patients. *Parasitol Res*. 2017 Apr;116(4):1197-1206. doi: 10.1007/s00436-017-5397-y. Epub 2017 Feb 1. PMID: 28150041.

LIMA MP, COSTA LE, LAGE DP, DIAS DS, RIBEIRO PA, MACHADO AS, RAMOS F, SALLES BC, FAGUNDES MI, CARVALHO GB, FRANKLIN ML, CHÁVEZ-FUMAGALLI MA, MACHADO-DE-ÁVILA RA, MENEZES-SOUZA D, DUARTE MC, TEIXEIRA AL, GONÇALVES DU, COELHO EA. Diagnostic application of recombinant *Leishmania* proteins and evaluation of their *in vitro* immunogenicity after stimulation of immune cells collected from tegumentary leishmaniasis patients and healthy individuals. *Cell Immunol* 2018 334: 61-69.

LINNET K, BOSSUYT PM, MOONS KG, REITSMA JB. Quantifying the accuracy of a diagnostic test or marker. *Clin Chem. Sep*;58(9):1292-301, 2012

LIU D, UZONNA JE. The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. *Front Cell Infect Microbiol*. 2012 Jun 12;2:83.

M.L. FREIRE, *et al.* Potential antigenic targets used in immunological tests for diagnosis of tegumentary leishmaniasis: A systematic review. *PLoS One*, 16 (5) (2021).

MARESCA B, KOBAYASHI GS. Hsp70 in parasites: as an inducible protective protein and as an antigen. *Experientia*. 1994 Nov 30;50(11-12):1067-74. doi: 10.1007/BF01923463.

MARZOCHI, M. C. A. Leishmanioses no Brasil: as leishmanioses tegumentares. *J B M*, v.63, p.82-104, 1992.

MASMOUDI A, Hariz W, Marrekchi S, Amouri M, Turki H. Old World cutaneous leishmaniasis: diagnosis and treatment. *J Dermatol Case Rep*. 2013 Jun 30;7(2):31-41. doi: 10.3315/jdcr.2013.1135. PMID: 23858338; PMCID: PMC3710675.

MAURI C., Bosma A. (2012). Immune regulatory function of b cells. *Annu. Rev. Immunol*. 30, 221–241. doi: 10.1146/annurev-immunol-020711-074934. MCGWIRE BS, SATOSKAR AR. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. *QJM*.

MEDEIROS, Rutyanne Maria Tonelli Elisei *et al.* Mapping linear B-cell epitopes of the Tryparedoxin Peroxidase and its implications in the serological diagnosis of tegumentary leishmaniasis. *Acta Tropica*, v. 232, p. 106521, 2022.

MELBY PC, Andrade-Narvaez F, Darnell BJ, *et al.*: Expressão *in situ* de interleucina-10 e interleucina-12 na leishmaniose cutânea humana ativa. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 1996; 15 ( 2-3 ):101–7

MELO, M. N., Mayrink, W., da Costa, C. A., Magalhães, P. A., Dias, M., Williams, P., Araujo, F. G., Coelho, M. V., & Batista, S. M. (1977). Padronização do antígeno de Montenegro. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 19(3), 161-164.

MENDES APO, Oliveira BC, Pereira AMS, et al. American tegumentary leishmaniasis diagnosis using *L. (V.) braziliensis* fixed promastigotes: a comparative performance of serological tests and spontaneous cure identification. *BMC Infectious Diseases*. 2019 Nov;19(1):1015. DOI: 10.1186/s12879-019-4642-7. PMID: 31783798; PMCID: PMC6884772.

MENEZES-SOUZA D, de Oliveira Mendes TA, de Araújo Leão AC, de Souza Gomes M, Fujiwara RT, Bartholomeu DC. Linear B-cell epitope mapping of MAPK3 and MAPK4 from *Leishmania braziliensis*: implications for the serodiagnosis of human and canine leishmaniasis. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2015 Feb;99(3):1323-36. doi: 10.1007/s00253-014-6168-7. Epub 2014 Oct 31. PMID: 25359475.

MESA LE, Manrique R, Muskus C, Robledo SM. Test accuracy of polymerase chain reaction methods against conventional diagnostic techniques for Cutaneous Leishmaniasis (CL) in patients with clinical or epidemiological suspicion of CL: Systematic review and meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2020 Jan 21;14(1):e0007981. doi: 10.1371/journal.pntd.0007981. PMID: 31961871; PMCID: PMC6994169.

NAIFF, R. D. A scarifier for obtaining specimens for diagnosis of leishmaniasis and other skin infections. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 92, n.1, p.87, 1997.

NASCIMENTO, J. J.; CARVALHO, P. L. B.; ROCHA, F. J. S. Differential histopathological diagnosis between leprosy and American tegumentary leishmaniasis in patients of a public hospital in Recife-PE. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, v. 51, n. 2, 2019.

NICOLIS, G. D. A clinical and histological study of cutaneous leishmaniasis. *Acta 97 dermatovenereologica*, v. 58, n. 6, p. 521–5, 1978.

NZELU CO, Kato H, Peters NC. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): An advanced molecular point-of-care technique for the detection of *Leishmania* infection. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019 Nov 7;13(11):e0007698. doi: 10.1371/journal.pntd.0007698. PMID: 31697673; PMCID: PMC6837287.

OLIVEIRA GG, Magalhães FB, Teixeira MC, Pereira AM, Pinheiro CG, Santos LR, Nascimento MB, Bedor CN, Albuquerque AL, dos-Santos WL, Gomes YM, Moreira ED Jr, Brito ME, Pontes de Carvalho LC, de Melo Neto OP (2011) Caracterização de novas proteínas recombinantes de *Leishmania infantum* codificadas por genes de cinco famílias com capacidades distintas para sorodiagnóstico de leishmaniose visceral canina e humana. *Am J Trop Med Hyg* 85(6):1025–1034.

OPAS/OMS. Informe Epidemiológico das Américas. Disponível em:[http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/34857/LeishReport6\\_por.pdf;jsessionid=9110DB75E4F43A1FA7BCD93A4497CD79?sequence=5](http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/34857/LeishReport6_por.pdf;jsessionid=9110DB75E4F43A1FA7BCD93A4497CD79?sequence=5) Acesso em: 09/05/2024 .

PANDEY S, Malviya G, Chottova Dvorakova M. Role of Peptides in Diagnostics. *Int J Mol Sci*. 2021 Aug 17;22(16):8828. doi: 10.3390/ijms22168828. PMID: 34445532; PMCID: PMC8396325.

PINHEIRO ABS, Kurizky PS, Ferreira MF, Mota MAS, Ribeiro JS, Oliveira Filho EZ, Souza CA, Barroso DH, Sampaio RNR, Gomes CM. The accuracy of the Montenegro skin test for leishmaniasis in PCR-negative patients. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2020;53:e20190433. doi: 10.1590/0037-8682-0433-2019. Epub 2020 Apr 27. PMID: 32348430; PMCID: PMC7198066

POURMOHAMMADI B, Motazedian M, Hatam G, Kalantari M, Habibi P, Sarkari B. Comparison of three methods for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Iran J Parasitol*. 2010 Dec;5(4):1-8. PMID: 22347259; PMCID: PMC3279850.

RAMÍREZ JD, CAO L, CASTILLO-CASTAÑEDA AC, PATINO LH, AYALA MS, CORDON-CARDO C, SORDILLO EM, PANIZ-MONDOLFI A. Clinical performance of a quantitative pan-genus *Leishmania* Real-time PCR assay for diagnosis of cutaneous and visceral leishmaniasis. *Pract Lab Med*. 2023 Oct 5;37:e00341

RASTI, S., Ghorbanzadeh, B., Kheirandish, F., Mousavi, SG, Pirozmand, A., Hooshyar, H. e Abani, B. (2016), Comparison of Molecular, Microscopic, and Culture Methods for the Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis. *J. Clin. Lab. Anal.*, 30: 610-615.

REIMÃO JQ, Coser EM, Lee MR, Coelho AC. Laboratory Diagnosis of Cutaneous and Visceral Leishmaniasis: Current and Future Methods. *Microorganisms*. 2020 Oct 22;8(11):1632. doi: 10.3390/microorganisms8111632. PMID: 33105784; PMCID: PMC7690623.

RESENDE DM, Rezende AM, Oliveira NJ, Batista IC, Correa-Oliveira R, Reis AB, Ruiz JC. Uma avaliação sobre métodos de predição de epítomos para genomas de protozoários. *BMC Bioinformática* 13:309,2012.

ROSS, R. Further notes on leishmania's bodies. *British Medical Journal*, v.2. p. 1401, 1903.

ROSSI M, Fasel N. How to master the host immune system? Leishmania parasites have the solutions! *Int Immunol*. 2018 Mar 10;30(3):103-111. doi: 10.1093/intimm/dxx075. PMID: 29294040; PMCID: PMC5892169.

SANCHES LC, MARTINI C, NAKAMURA A, SANTIAGO MB, LIMA BD, LIMA VM 2016. Natural canine infection by *Leishmania infantum* and *Leishmania amazonensis* and their implications for disease control. *Braz J Vet Parasitol* 25(4): 465-469.

SANTOS MR, KRIGNL CJ, NAVAA, REIK CMS, SILVA FEB, ROMAN SS. Avaliação do efeito cumulativo do antimonialto de meglumina sobre a prole de camundongo swiss: ensaio biológico. *Rev. Assoc. Med. Bras.* 2008;54(1):13-6

SATO CM, SANCHEZ MC, CELESTE BJ, DUTHIE MS, GUDERIAN J, REED SG, DE BRITO ME, CAMPOS MB, DE SOUZA ENCARNÇÃO HV, GUERRA J, DE MESQUITA TG, PINHEIRO SK, RAMASAWMY R, SILVEIRA FT, DE ASSIS SOUZA M, GOTO H. Use of Recombinant Antigens for Sensitive Serodiagnosis of American Tegumentary Leishmaniasis Caused by Different Leishmania Species. *J Clin Microbiol*. 2017 Feb;55(2):495-503,2016.

SCORZA BM, CARVALHO EM, WILSON ME. Cutaneous Manifestations of Human and Murine Leishmaniasis. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017; 18(6):1296.

SCOTT P. and NOVAIS F.O., Cutaneous Leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. *Nature reviews Immunology*, 2016.

SERAFIM TD, COUTINHO-ABREU IV, DEY R, KISSINGER R, VALENZUELA JG, OLIVEIRA F, KAMHAWI S. Leishmaniasis: the act of transmission. *Trends Parasitol*. 2021 Nov;37(11):976-987.

SERAFIM TD, COUTINHO-ABREU IV, OLIVEIRA F, MENESES C, KAMHAWI S, VALENZUELA JG 2018. Sequential blood meals promote *Leishmania* replication and reverse metacyclogenesis augmenting vector infectivity. *Nature Microbiol* 3:548–555.

SHRESTHA A, MISHRA A, MISHRA A, SHRESTHA R, SHRESTHA R. Uncommon presentation of cutaneous leishmaniasis: late-onset facial involvement after a decade-a rare case report. *Oxf Med Case Reports*. 2024 Jan 27;2024(1):omad141.

SILVEIRA FT, LAINSON R, CORBETT C. Clinical and Immunopathological Spectrum of American Cutaneous Leishmaniasis with Special Reference to the Disease in Amazonian Brazil – A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99(3): 239-251. 2004

SMITH, Barry Lee .Ambient ion focusing for paper spray ionisation. *International Journal of Mass Spectrometry*, v. 471, January 2022, p. 116737.

SOUSA AQ, POMPEU MM, FRUTUOSO MS, LIMA JW, TINEL JM, PEARSON RD. Press imprint smear: a rapid, simple, and cheap method for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Am J Trop Med Hyg*. 2014 Nov;91(5):905-7. doi: 10.4269/ajtmh.14-0160. Epub 2014 .

SOUSA AQ, POMPEU MM, FRUTUOSO MS, LIMA JW, TINEL JM, PEARSON RD. Press imprint smear: a rapid, simple, and cheap method for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Am J Trop Med Hyg*. 2014 Nov;91(5):905-7. doi: 10.4269/ajtmh.14-0160. Epub 2014 Aug 11. PMID: 25114007; PMCID: PMC4228884.

SOUZA CM, SILVA ED, ANO BOM AP, BASTOS RC, NASCIMENTO HJ, DA SILVA JUNIOR JG. Avaliação de um ELISA para imunodiagnóstico de leishmaniose canina utilizando proteínas recombinantes. *Parasito Immunol* 34(1):1–7. 2012

SOUZA NA, LEITE RS, SILVA SO, PENNA MG, VILELA LF, MELO MN, ANDRADE AS. Detection of mixed *Leishmania* infections in dogs from an endemic area in southeastern BRAZIL. *Acta Trop* 193: 12-17. 2019.

SOUZA AP, Soto M, Costa JML, Boaventura VS, de Oliveira CI, et al. (2013) Towards a More Precise Serological Diagnosis of Human Tegumentary Leishmaniasis Using *Leishmania* Recombinant Proteins. *PLOS ONE* 8(6): e66110.

STRAZZULLA A, et al. Mucosal leishmaniasis: an underestimated presentation of a neglected disease. *Biomed Res Int.*, p. 805108, 2013.

THÉVENOT, D. R.; TOTH, K.; DURST, R. A.; WILSON, G. S. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Biosensors and Bioelectronics*, jan. 2001;16(1-2):121-31.

TOLEDO-MACHADO CM, BUENO LL, MENEZES-SOUZA D, MACHADO-DE-AVILA RA, NGUYEN C, GRANIER C, BARTHOLOMEU DC, CHÁVEZ-OLÓRTEGUI C, FUJIWARA RT. Use of Phage Display technology in development of canine visceral leishmaniasis vaccine using synthetic peptide trapped in sphingomyelin/cholesterol liposomes. *Parasit Vectors*. 2015.

URSINE R. L., ROCHA. M. F., NETO.F.C., LEITE.M. E., FALCÃO.L. D., GORLA D.E.S., CARVALHO S. F. G, Thallyta Maria VIEIRATM, Influence of anthropic changes and environmental characteristics on the occurrence of Tegumentary Leishmaniasis in Montes Claros, Minas Gerais, Brazil, between 2012 and 2019, *Acta Tropica*, Volume 238, 2023.

VALENCIA-PORTILLO RT, LINDOSO JA, CELESTE BJ, BITTENCOURT AA, DE BRITO MEF, DUTHIE MS, GUDERIAN J, GUERRA J, OLIVEIRA ALL, REED S, ROCHA MC, SANTOS NT, SILVEIRA FT, GOTO H, SANCHEZ MCA. ELISA with recombinant antigen Lb6H validated for the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. *PLoS One*. 2024 Jun 5;19(6):e0304268.

VAN Griensven J, Carrillo E, López-Vélez R, Lynen L, Moreno J. Leishmaniasis in immunosuppressed individuals. *Clin Microbiol Infect*. 2014 Apr;20(4):286-99. doi: 10.1111/1469-0691.12556. Epub 2014 Feb 20. PMID: 24450618.

VAZ, J.C.L. Regiões de Incerteza para a Curva ROC em Testes Dianóstico. Universidade de São Carlos, 2009. Volume 214,

VERMA S, SINGH R, SHARMA V, BUMB RA, NEGI NS, RAMESH V, SALOTRA P Development of a rapid loop-mediated isothermal amplification assay for diagnosis and assessment of cure of *Leishmania* infection. *BMC Infect Dis* (2017) 17(1):223.

VIANA, G.M.C. NASCIMENTO, J.A. DINIZ NETO, E.M.F. RABELO, J.R. BINDA JÚNIOR, O.M. SANTOS JÚNIOR,. Anti-leishmania titers and positive skin tests in patients cured of kala-azar Braz. *J. Med. Biol. Res.*, 44 (2011), pp. 62-65

WANG HW, PAI TW. Machine learning-based methods for prediction of linear B-cell epitopes. *Methods Mol Biol.* 2014;1184:217-36.

WIJERATHNA T, GUNATHILAKA N, GUNAWARDENA K. The Economic Impact of Cutaneous Leishmaniasis in Sri Lanka. *Biomed Res Int.* 2018 Oct 11;2018:3025185.

ZANETTI ADS, SATO CM, LONGHI FG, FERREIRA SMB, ESPINOSA OA. Diagnostic accuracy of Enzyme-Linked Immunosorbent Assays to detect anti-Leishmania antibodies in patients with American Tegumentary Leishmaniasis: a systematic review. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2019 Aug 19;61:e42.

## VII- ANEXOS

## Anexo I

Mapeamento de epítomos para células B em proteínas identificadas pela imuno proteômica como imunogênicas e diferencialmente abundantes em *L. amazonenses*.

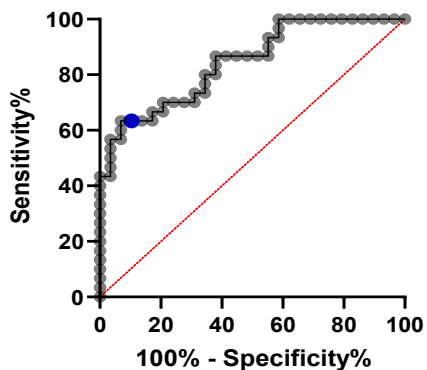
PROTEINA	GI	EPITOPOS	
		M – PREDITO PELO BCPREDS	M – PREDITO PELO ABCPRED
Beta-tubulina	13569565		<p>MREIVSCQAGQCGNQIGSKFWEVIAD<del>EHGVD</del>PTGSYQGDSDLQLERIN<del>VYFDES</del>SAGGRYVPRAVLMDLEP            GTMDSVRAGPYGQLFRPDNFI<del>FGQ</del>SGAGNNWAK<del>GHYTEGAEL</del>IDSVLDVCRKEAESCDCLQGFQLSHSLG            GGTGSGMGTLLISKLREEY<del>PDRIMTFSVIPS</del>PRVSDTVVE<del>PYNTT</del>LSVHQLVENSDESMCIDNEALYDI            CFR<del>TLKLT</del>TPTFGDLNHLVA<del>AVMS</del>GVTCCLRFPGQLNSDLRNRLAVNLV<del>PF</del>PRLHFFMMGFAPLTSRGSQ            EYRQGLSVADV<del>TQOMF</del>DAKNMMQAADPRHGRYL<del>TASALFR</del>GRMSTKEVDEQMLNVQKNSSYFI<del>EWIPNN</del>            IKSSICDIPPKGLKMS<del>VTFIGNNTCIQEM</del>FRRVGEQFTGMFRRKRFLHWYTG<del>EGMDEMEFTEAES</del>NMNDL            VSEYQQYQDATVEEE<del>E</del>GEFDEEEAY</p>
Proteína do choque térmico 70 kDa (HSP70)	10626		<p>MTFDGAIGIDLGT<del>TYSCVGVW</del>QNDRVEI<del>IANDQGNRTTP</del>SYVAFTD<del>SERL</del>IGDAAKNQVAMNPHNTV<del>FDA</del>            KRLIGRKF<del>NDLVVQSDMKHW</del>PFKVTTKGD<del>DPVI</del>SVQYRGE<del>EKTFT</del>PEKISSMVL<del>L</del>KMKETA<del>EAYL</del>GKQV            KKA<del>VVTVP</del>PAYFNDSQRQATK<del>DAGTIS</del>GLEVLRI<del>INEPTAAAI</del>AYGLDKGDDGKERNVLI<del>FDL</del>GGGT<del>FDVT</del>            LLTIDGGIFEVKA<del>TNGD</del>THLGGED<del>FDNR</del>LVTFF<del>TEEF</del>KRKNKGK<del>NLASS</del>HRSLRRLRTACERAKRTLSSA            TQATIEIDAL<del>FDNVDFQATIN</del>RARFEELCGDL<del>FRSTIQP</del>VERVLQDAKMDKRSVH<del>DVVL</del>VGGSTRIPKVQ            SLVSDFFGGKE<del>LNKSINP</del>DEAVAYGA<del>AVQAF</del>ILTTGGKSKQTEGL<del>LLLDVTP</del>PLTLGIETAGGV<del>MTAL</del>IKRN            TTIPTKKSQIFST<del>YADN</del>QPGVHIQVFEGERAMTK<del>CHLLGTF</del>DL<del>SGIPP</del>APRGV<del>PQIE</del>VTFDL<del>DANGILN</del>            VSAAEKGTGKR<del>NQITIT</del>TNDKGR<del>L</del>SKDEIERMVNDAMKYE<del>ADDKAQ</del>ADRVEAKNGLENYAYS<del>SMKNTL</del>GDSN            VSGK<del>LD</del>DDTDKSTLNKE<del>IEAA</del>LEWLSS<del>NQ</del>EATKEEYEHKQ<del>KELE</del>NV<del>CNP</del>IMMTKMYQ<del>SMGGG</del>AGGMAGMPDM            SSMS<del>G</del>ARPAGGASSGPKV<del>EEVD</del></p>
elongation factor 2	322490597		<p>MVNFTVDQVRE<del>ELMDY</del>PDQIRNMSVIA<del>HVD</del>HGKSTLSDSLVGAAGI<del>IKMEE</del>AGDKRIMD<del>TRADEI</del>ARGITIT            KSTAI<del>SMHYHVP</del>KEMIGDLDDDKR<del>DFLIN</del>ILIDSPGHVDF<del>SSEV</del>TAAALRVTDGALV<del>VDC</del>VEGVCVQ<del>TETV</del>            LRQAL<del>TERIR</del>PVVFINKVDRAILELQ<del>LDPEEA</del>YQGFV<del>FKTLQNVNVVV</del>VATYND<del>PSMGD</del>VQVSPEKGTVAIG            SGLQAWAFSLTRFANMYAAK<del>FGVDEL</del>RMRE<del>RLWGD</del>NFFDAKNKKWIKQ<del>ETNAD</del>GERVRRAF<del>CFCLD</del>PIY            QIFDAVMNEK<del>KDKVDKML</del>KSLHVTLTAEEREQV<del>PKLL</del>LKTVM<del>MKFL</del>PA<del>ETLL</del>QMIVAHL<del>PSPKKA</del>QAYR            AEMLYS<del>GEAS</del>PEDKYFMGIK<del>NC</del>DPAA<del>PLML</del>YISKMVPTAD<del>RGRFF</del>AFGRIFSGK<del>VRS</del>GQKVRIMGN<del>NYVY</del>            GKKQDL<del>YED</del>KPVQRSVLM<del>MGRY</del>QEAVE<del>DMPC</del>GNV<del>VGL</del>VGV<del>DKY</del>IVKSATI<del>TDD</del>GESPH<del>PLRDM</del>KYSV<del>SPV</del>            VRVAVEAK<del>NP</del>SDL<del>PKL</del>VEGLK<del>RLAK</del>SDPLV<del>VCS</del>IEESGEHIVAGAGEL<del>HLEIC</del>LKDLQED<del>FMN</del>GAP<del>LKIS</del>            EPVVS<del>FRET</del>VTDVSSQ<del>CLS</del>KSANKHN<del>RLFCR</del>GAPL<del>TEEL</del>ALAMEEGAAG<del>PEAD</del>PKVRARLLAD<del>NYE</del>WDV            QEARKIWCY<del>GP</del>DN<del>RGN</del>V<del>VVD</del>VTKGVQNM<del>GEMKDS</del>FVA<del>AWQ</del>WATREGVLC<del>DEN</del>MRGVRV<del>NVED</del>VTMHADA            IHRGGGQI<del>IPTARRVF</del>YACCLTAS<del>PRLME</del>PMFV<del>VDI</del>Q<del>TVE</del>HAMGGIY<del>GV</del>LTRRRGVIIGEENR<del>PGTPI</del>YN            VRAYLPVSE<del>SFG</del>TADL<del>RAGT</del>GGQA<del>F</del>PQCV<del>FDHW</del>Q<del>EY</del>PGD<del>PLE</del>PKSLANAT<del>T</del>LAIRTRKGLKADIPGLDQ            FMDKL</p>
metallo-peptidase, Clan MA(E), Family M3	322492700		<p>MAATSIFADISTVGKCAALFPK<del>TVA</del>ACEDLVKAAKHRAE<del>QSLGKIYGI</del>APPNRT<del>FQNT</del>AKSIDMASIELE            VSASLLSVIASVSPSKEVRDEATNRVVELETFSIDN<del>FESNR</del>QLYSALKEVCATPAYEAVYASGKAPREYT            YWMEEQ<del>LADY</del>RRKGMELPEEE<del>FQ</del>KVQLQKELASLCTV<del>FQ</del>QNI<del>SEDKTE</del>VHFTVDAL<del>KGV</del>PESVLSALQR            TEAGECT<del>V</del>KMDYPT<del>YFAV</del>MKNCEVASTRQ<del>AVAQ</del>AFTN<del>RAY</del>PVND<del>NV</del>LKDIIEKR<del>HQ</del>LAVLLGYP<del>SFAHLY</del></p>

		<p>ISDKMAKKPEMAQAFVENLIPKVQKKWATEAELLKHKHLHPSCSLSPAGEIQAYDIPFMINQIKKTLNVS  ETEIQEYFPMDATVKALFDIYQSFFDITFLQVDNGSELWHSEVKTLEVKDKKSGCMLGYIILDLPREGK  YSHACCHSVVPPVLLKEDGNDFFSPALAVVIANFPGATADRPALFLHDDVETFFHEFGHAIHSLMGRTRMA  TFAGTRVVRDFVELPSQMLEEWLWEPEILQITITSHYKTKEPLPRALIDAKVASKNAFSGRDTLRQLQFAT  YSLQIFGLPFSTQPRDSLNTTQLFYDLEPRVMPGVQYEHNTHFESAFGHLTGYGAGYYGYMWSKV FALDL  FEYIRSHNGLLDPKMGCRYVDCIIGVGGSQDPNDMLVKFLGREPNNEAFLRSIGV</p>
Enolase	134068394	<p>MPIQKVYAREVLDSRRGNPTVEVELMTEAGVFRSAVPSGASTGVHEACELRDGDKARYCGAGCTQAVKNVN  EILAPALVGKDESDQAGLDKMMCELDGTKNKSCLGANAILGCSMAISKAAAAGVPLYRYIAGLAGTKD  IRLPVPCFNVINGGKHA GNVLPFQEFMIAPT KATSFREALRMGSEVYHALKVI IKSQYQDA VNVGDEGG  FAPPIKHIDE PLPILMEAI EKAGHKGKFAICMDCAASE AYDAERKMYNLT FKNPEPTYVSAELQATYER  WVAEYPLVSIEDPFAEDNFDEFSAITMALAGKAQIVGDDLTVTNVERVKMAIEKSACNSLLLKINQIGTI  SESIAAAKLCMENGWSVMVSHRSGETEDTYIADLSVGLGTGQIKTGAPCRGERTAKLNQLLRIEEEIGST  ATYGYPGWA</p>
peptidase m20/	322493954	<p>MSAGWTQVRQTVSEWEKTIVPAISAYIEVNPQSPQFDPEWATNGLQEKAFGILIDWMSAQNVQGLTYDY  LTADGRTPFLLVEIAGTEPTKNTVLMYGHMDKQPPLRPWAEGLDPHKAVVRDGKLYGRGGADDGYALFAA  VTAIASLQRHGVPVPHGRVVIMIEGGEESGSPDLDYMERCKERIGKVDLMVCLDSGSMNYSQVWLTTSLRG  VAMGELTVQTLTESMHSGVAGGVVPDTFRITRELLSRIEDCKTGEVLFPEAHCEMPAYAVKAAESMKTVP  FKEQFAMAAGVATVPGDNVELAIQNFWKPSLTVTGANLPDPQIAGNVIRTHTTVKLSMRLPPL</p>

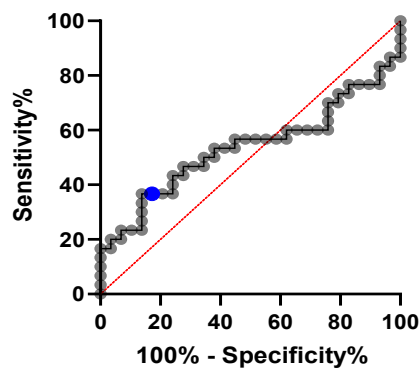
## Anexo II

Curva ROC das reações ELISA e CLIA com diferentes antígenos. Em azul, destaca-se o ponto que apresenta a maior sensibilidade e especificidade simultaneamente, denominado *Cutoff*.

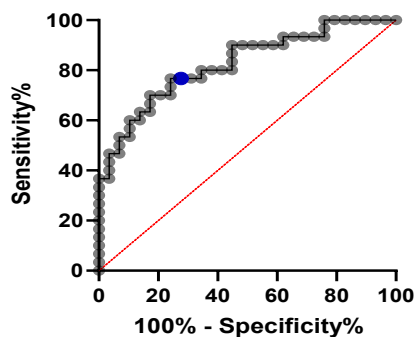
ROC curve: ROC of HS1 (ELISA)



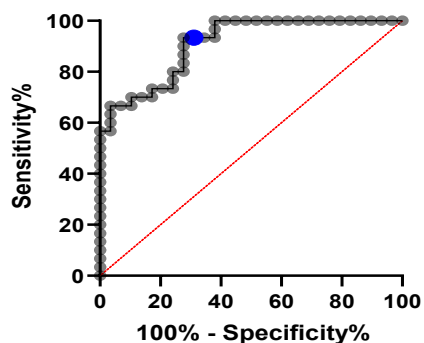
ROC curve: ROC of HS1 (CLIA)



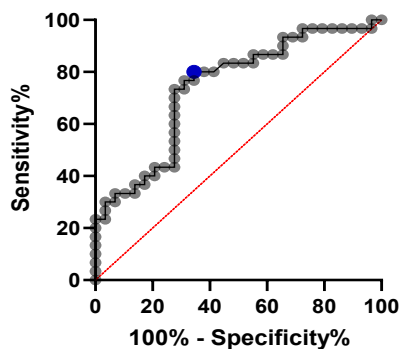
ROC curve: ROC of HS3 (ELISA)



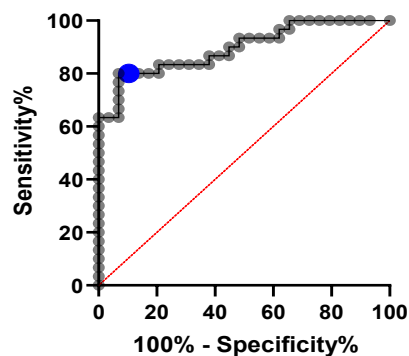
ROC curve: ROC of HS3 (CLIA)



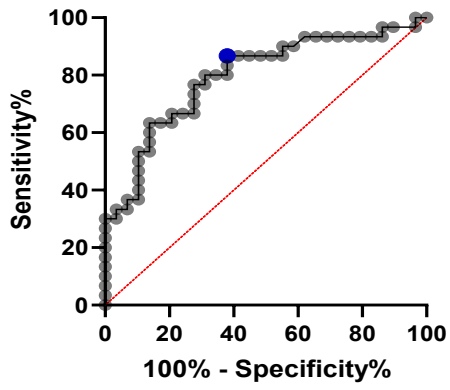
ROC curve: ROC of HS5 (ELISA)



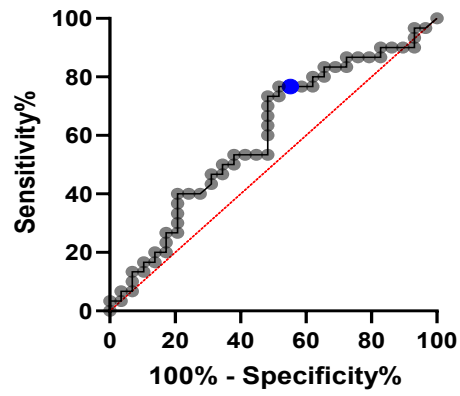
ROC curve: ROC of HS5 (CLIA)



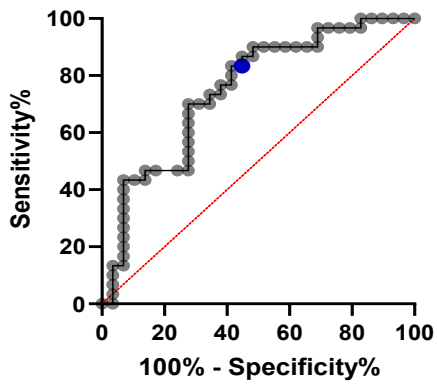
ROC curve: ROC of EL1 (ELISA)



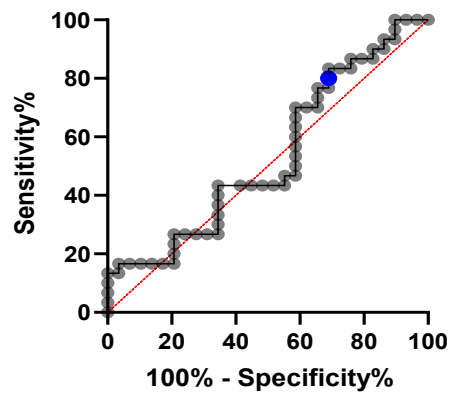
ROC curve: ROC of EL1 (CLIA)



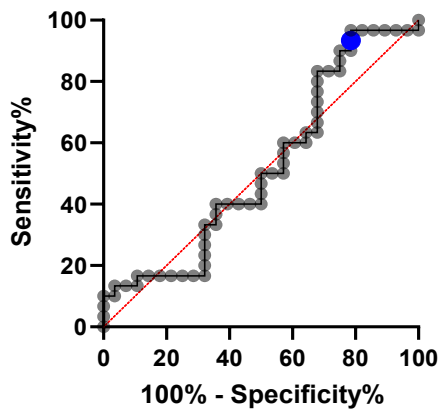
ROC curve: ROC of EL 2 (ELISA)



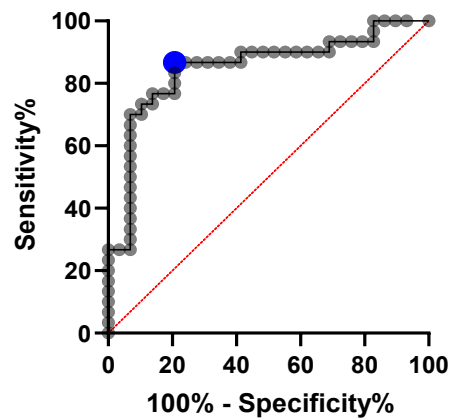
ROC curve: ROC of EL2 (CLIA)



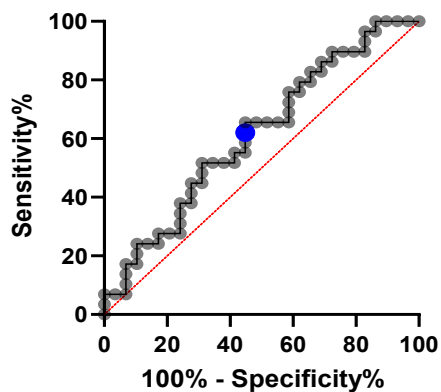
ROC curve: ROC of EL3 (ELISA)



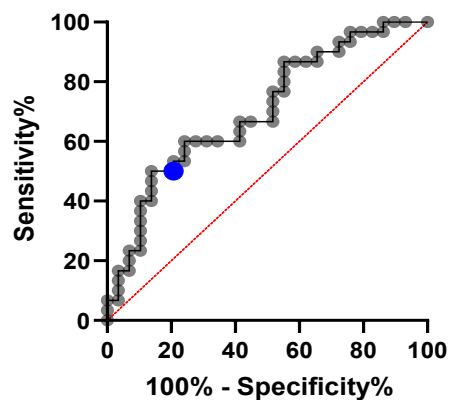
ROC curve: ROC of EL3 (CLIA)



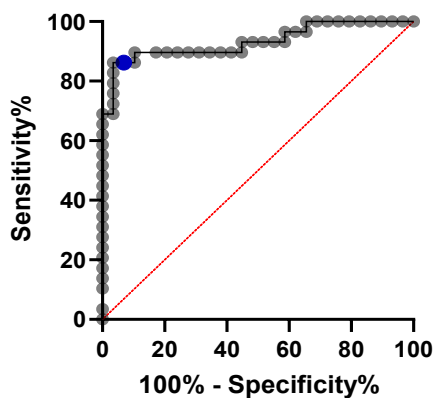
ROC curve: ROC of BT4 (ELISA)



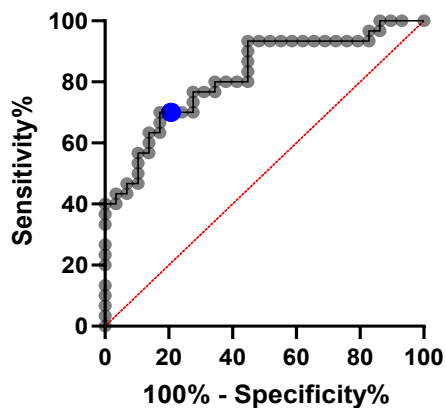
ROC curve: ROC of BT4 (CLIA)



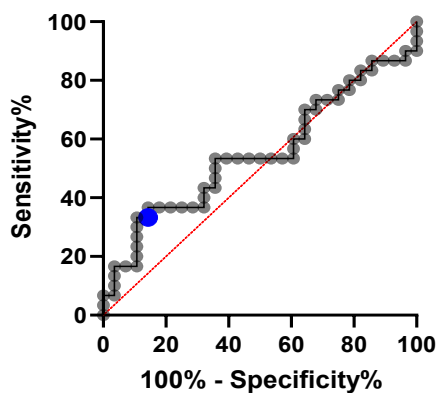
ROC curve: ROC of BT 7 (ELISA)



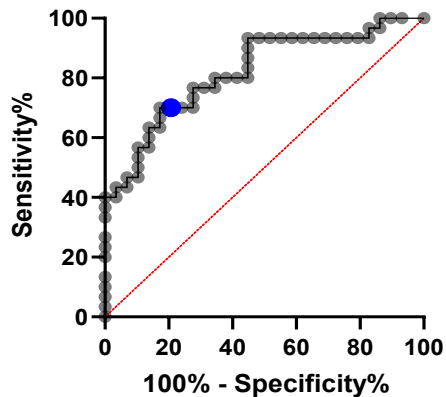
ROC curve: ROC of BT7 (CLIA)



ROC curve: ROC of PEP (ELISA)



ROC curve: ROC of BT7 (CLIA)



## Anexo III



21/09/2023 870230083659  
11:17  
29409162304086183

**Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT**

Número do Processo: BR 10 2023 019257 2

**Dados do Depositante (71)**

---

Depositante 1 de 1

**Nome ou Razão Social:** UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

**Tipo de Pessoa:** Pessoa Jurídica

**CPF/CNPJ:** 17217985000104

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Jurídica:** Instituição de Ensino e Pesquisa

**Endereço:** Av. Antônio Carlos, 6627 - Unidade Administrativa II - 2º andar- sala 2011

**Cidade:** Belo Horizonte

**Estado:** MG

**CEP:** 31270-901

**País:** Brasil

**Telefone:** (31) 3409-6430

**Fax:**

**Email:** patentes@ctit.ufmg.br

**Dados do Pedido**

---

**Natureza Patente:** 10 - Patente de Invenção (PI)

**Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54):** KIT E MÉTODO PARA IMUNODIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR, E USOS

**Resumo:** A presente tecnologia trata de um kit compreendendo peptídeos imunogênicos específicos para leishmaniose tegumentar. A tecnologia também trata do método de diagnóstico baseado nos peptídeos.

**Figura a publicar:** 2

**PETICIONAMENTO ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 21/09/2023 às 11:17, Petição 870230083659

**Dados do Inventor (72)**

---

**Inventor 1 de 3****Nome:** HÉLIDA MONTEIRO DE ANDRADE**CPF:** 46329277320**Nacionalidade:** Brasileira**Qualificação Física:** Professor do ensino superior**Endereço:** Av. Pres. Antônio Carlos, 6627 - Pampulha**Cidade:** Belo Horizonte**Estado:** MG**CEP:** 31270-901**País:** BRASIL**Telefone:** (31) 340 94774**Fax:****Email:** patentes@ctit.ufmg.br**Inventor 2 de 3****Nome:** BRUNA RODRIGUES DE ALMEIDA**CPF:** 11973921650**Nacionalidade:** Brasileira**Qualificação Física:** Pesquisador**Endereço:** Av. Pres. Antônio Carlos, 6627 - Pampulha**Cidade:** Belo Horizonte**Estado:** MG**CEP:** 31270-901**País:** BRASIL**Telefone:** (31) 340 94774**Fax:****Email:** patentes@ctit.ufmg.br