

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE:
INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL**

DANNIELE LUCIANA VALE

**AVALIAÇÃO DE NOVOS ANTÍGENOS QUIMÉRICOS RECOMBINANTES NO
DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE CANINA E HUMANA**

BELO HORIZONTE

2024

DANNIELE LUCIANA VALE

**AVALIAÇÃO DE NOVOS ANTÍGENOS QUIMÉRICOS RECOMBINANTES NO
DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE CANINA E HUMANA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Infectologia e Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da UFMG, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor pelo referido Programa.

Orientadores

Prof. Dr. Eduardo Antonio Ferraz
Coelho - UFMG

Dra. Vivian Tamietti Martins - UFMG

Co-Orientadora

Dra. Daniela Pagliara Lage - UFMG

BELO HORIZONTE

2024

V149a Vale, Danniele Luciana.
Avaliação de novos Antígenos Quiméricos Recombinantes no diagnóstico da Leishmaniose canina e humana [recurso eletrônico]. / Danniele Luciana Vale.
- - Belo Horizonte: 2024.
98f.: il.
Formato: PDF.
Requisitos do Sistema: Adobe Digital Editions.

Orientador (a): Eduardo Antonio Ferraz Coelho; Vivian Tamietti Martins.
Coorientador (a): Daniela Pagliara Lage.
Área de concentração: Ciências da Saúde.
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Proteínas Recombinantes. 2. Peptídeos. 3. Testes Sorológicos. 4. Leishmaniose. 5. Dissertação Acadêmica. I. Coelho, Eduardo Antonio Ferraz. II. Martins, Vivian Tamietti. III. Lage, Daniela Pagliara. IV. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. V. Título.

NLM: QU 55

Bibliotecário responsável: Fabian Rodrigo dos Santos CRB-6/2697



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL
ATA DE DEFESA DE TESE

Aos seis dias do mês de dezembro de dois mil e vinte e quatro (06/12/2024), às 09:00 (nove) horas, por videoconferência pela plataforma GOOGLE MEET (<https://meet.google.com/rqg-tyrk-kcm>), realizou-se a sessão pública para a 236ª defesa de tese de **DANNIELE LUCIANA VALE**, número de registro 2020658245, graduada no curso de FARMÁCIA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em CIÊNCIAS DA SAÚDE - INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL. A presidência da sessão coube ao professor **EDUARDO ANTONIO FERRAZ COELHO**, orientador. Inicialmente, o presidente fez a apresentação da Comissão Examinadora assim constituída: **PROF. EDUARDO ANTONIO FERRAZ COELHO - ORIENTADOR (UFMG)**, **DRA. VIVIAN TAMIETTI MARTINS – ORIENTAÇÃO DUPLA (UFMG)**, **DRA. DANIELA PAGLIARA LAGE – COORIENTADORA (UFMG)**, **DRA. FERNANDA FONSECA RAMOS (USP)**, **PROFA. NATHÁLIA CORAL GALVANI (UFSC)**, **PROF. MARIO DA SILVA GIUSTA (UNA-BH)**, **DRA. ISABELA AMORIM GONÇALVES PEREIRA (UFMG)**. Em seguida, a candidata fez a apresentação do trabalho que constitui sua **Tese de Doutorado**, intitulada: **"AVALIAÇÃO DE NOVOS ANTÍGENOS QUIMÉRICOS RECOMBINANTES NO DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE CANINA E HUMANA"**. Seguiu-se a arguição pelos examinadores e, logo após, a Comissão reuniu-se, sem a presença da candidata e do público, e decidiu considerar a tese **APROVADA**. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata e ao público, pelo presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o presidente encerrou a sessão, sendo lavrada a presente ata que, depois de lida e aprovada, foi assinada eletronicamente por todos os membros titulares da Comissão Examinadora presente através do SEI (Sistema Eletrônico de Informações) do Governo Federal.

Belo Horizonte, 06 de dezembro de 2024.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Nathalia Coral Galvani, Usuária Externa**, em 06/12/2024, às 11:36, 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 **Daniela Pagliara Lage, Usuário Externo**, em 06/12/2024, às 11:37, 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 **Mário da Silva Giusta, Usuário Externo**, em 06/12/2024, às 11:49, 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 **Vivian Tamietti Martins, Usuário Externo**, em 06/12/2024, às 13:19, 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 **Isabela Amorim Gonçalves Pereira, Usuária Externa**, em 06/12/2024, às 22:15, 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 **Fernanda Fonseca Ramos, Usuário Externo**, em 07/12/2024, às 21:19, 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 **Eduardo Antonio Ferraz Coelho, Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 09/12/2024, às 10:55, 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, informando o código verificador **3749538** e o código CRC **71E5C2EE**.

Dedico este trabalho:

À Deus, por me dar forças para seguir em frente;

Aos meus pais por me darem todo suporte;

Á minha irmã Ana Luiza, por todo incentivo.

AGRADECIMENTOS

Escrevo este agradecimento com um coração repleto de gratidão e emoção para expressar meus sinceros reconhecimentos a todos que estiveram ao meu lado durante minha jornada acadêmica. É uma honra e uma bênção ter cada um de vocês na minha vida, e sou profundamente grata por todo apoio, encorajamento e compreensão que recebi.

Em primeiro lugar, desejo expressar minha imensa gratidão a Deus, por nunca me desamparar e por me conceder força e orientação em cada passo do caminho. Sua presença constante em minha vida tem sido uma fonte de conforto e motivação, e sou profundamente grata por Sua bondade e amor infinito.

Aos meus amados familiares, em especial ao meu pai José Geraldo e minha mãe Edelweiss, quero agradecer pelo apoio incondicional ao longo desses anos dedicados à vida acadêmica. Suas palavras de encorajamento, paciência e compreensão foram fundamentais para me manter focada e determinada em alcançar meus objetivos. Sou grata por todo sacrifício que fizeram em prol do meu crescimento e sucesso.

Aos meus queridos irmãos, Ana Luiza e Wellerson, agradeço de todo coração por sempre acreditarem em mim e por serem fontes constantes de motivação. Seu apoio incansável e torcida inabalável foram uma luz que me impulsionou em momentos desafiadores. Sou grata pela nossa conexão especial e pelo amor que compartilhamos.

Aos meus amigos, quero expressar minha sincera gratidão por estarem sempre presentes, pelos ânimos e incentivos constantes. Em especial, gostaria de agradecer aos amigos do laboratório, que me ajudaram de forma significativa ao longo dessa jornada. Suas palavras de encorajamento, discussões enriquecedoras e apoio mútuo foram inestimáveis. Sou grata pela amizade e pelo suporte que recebi, em particular a Rafaela e o Thiago.

Às minhas amigas, orientadoras da minha tese, Dra. Vivian Tamietti Martins e Dra. Daniela Pagliara Lage, quero expressar minha profunda gratidão pela sabedoria, conhecimento e orientação que compartilharam comigo durante a realização do trabalho. Sua expertise e orientação foram fundamentais para o sucesso dessa

pesquisa. Também gostaria de agradecer à banca pela disponibilidade e avaliação cuidadosa do meu trabalho.

À Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), gostaria de estender meu agradecimento por proporcionar essa oportunidade de crescimento e realização. Agradeço por todos os recursos, instalações e conhecimentos disponibilizados pela instituição, que foram essenciais para minha formação acadêmica.

Aos meus professores, quero expressar minha profunda gratidão por sua dedicação e compromisso em moldar meu caminho acadêmico. Cada um desempenhou um papel importante na minha formação, e sou grata por todo conhecimento transmitido, pelo incentivo constante e pela paixão demonstrada ao seu trabalho. Em especial, quero agradecer ao meu orientador, Eduardo Antonio Ferraz Coelho, por toda compreensão, ajuda, disponibilidade, compromisso, sinceridade, exemplo e apoio ao longo dessa jornada. Suas orientações e mentorias foram inestimáveis, e não há palavras suficientes para expressar meu agradecimento e carinho por você.

Por fim, quero agradecer a todos que participaram direta ou indiretamente da minha formação, seja por meio de palavras encorajadoras, gestos de apoio, colaboração em projetos ou simplesmente por acreditar em mim. Cada interação e contribuição deixaram uma marca indelével em minha jornada, e sou imensamente grata por cada um de vocês.

Mais uma vez, meu profundo agradecimento a todos que me acompanharam ao longo dessa trajetória e me ajudaram a alcançar essa conquista. Sei que não estaria aqui sem vocês, e valorizo imensamente o amor, o apoio e a amizade que recebi.

“ O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar à um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis. ”
José de Alencar.

RESUMO

Leishmanioses são doenças infecciosas negligenciadas que acarretam sérios problemas de saúde pública. Podem ser classificadas em duas categorias: leishmaniose tegumentar (LT) e leishmaniose visceral (LV); cada uma com manifestações clínicas específicas. Em áreas onde a LV é uma zoonose, cães domésticos desempenham importante papel de reservatório do parasito *Leishmania*, contribuindo para a transmissão entre o vetor flebotomíneo e mamíferos. O diagnóstico da LV ainda representa um desafio, seja pela dificuldade de diferenciação clínica ou pela variação na sensibilidade e especificidade dos testes. Nesse sentido, o presente estudo utilizou a bioinformática para selecionar epítomos lineares específicos de células B de quatro proteínas de *Leishmania infantum*, que foram previamente demonstradas como antigênicas para LV, com o objetivo de produzir uma nova proteína quimérica e avaliá-la no diagnóstico da LV canina (LVC). Sete epítomos de células B foram preditos e usados para construir a quimera chamada “B1”, que foi produzida e avaliada sob a forma recombinante por ELISA contra painel sorológico canino. Resultados mostraram que a quimera B1 apresentou ótimos valores de sensibilidade e especificidade para diagnóstico da LVC. Em adição, o estudo também selecionou epítomos específicos de células B de proteínas identificadas em *L. infantum* e *L. braziliensis* para geração de outra quimera chamada “B2”, no intuito de avaliá-la no diagnóstico da LV e LT humana. Experimentos de ELISA usando painel sorológico humano mostraram também elevados valores de sensibilidade e especificidade no diagnóstico de ambas as doenças. Em conclusão, os achados preliminares permitem sugerir que as quimeras B1 e B2 possuem potencial antigênico para o diagnóstico da leishmaniose canina e humana. Estudos adicionais são necessários para avaliar as quimeras frente a condições de campo e em outras plataformas diagnósticas de teste rápido.

Palavras-chave: leishmaniose visceral, ELISA, diagnóstico, quimera recombinante, sensibilidade, especificidade.

ABSTRACT

Leishmaniasis are neglected infectious diseases that causes serious public health problems. This disease complex can be classified into two main clinical categories: tegumentary leishmaniasis (TL) and visceral leishmaniasis (VL); each one with specific clinical manifestations. In areas where VL is a zoonosis, domestic dogs play an important role as reservoir for the *Leishmania* parasite, contributing to transmission between the phlebotomine vector and mammals. The diagnosis of VL remains a challenge, either due to the difficulty of clinical differentiation or to the variable sensitivity and specificity of the tests. In this context, the present study, we used bioinformatics to select specific linear B cell epitopes of four *Leishmania infantum* proteins, which were previously showed to be antigenic for VL, with the aim of producing a new chimeric protein and evaluating it for the diagnosis of canine VL (CVL). Seven B cell epitopes were predicted and used to construct the chimera called "B1", which was produced and evaluated in a recombinant format by ELISA against a canine serological panel. Results showed that chimera B1 presented excellent sensitivity and specificity values for the diagnosis of CVL. In addition, the study also selected specific B cell epitopes from *L. infantum* and *L. braziliensis* proteins for the generation of another chimera called "B2", with the aim of evaluating it for the diagnosis of human leishmaniasis. ELISA experiments using a human serological panel showed high sensitivity and specificity values for the diagnosis of both TL and VL. In conclusion, preliminary findings suggest that chimeras B1 and B2 have antigenic potential for the diagnosis of canine and human leishmaniasis. Additional studies are needed to evaluate the chimeras under field conditions and in other rapid test diagnostic platforms.

Keywords: visceral leishmaniasis, ELISA, diagnosis, recombinant chimera, sensitivity, specificity.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1: Número de casos de LC reportados em 2022.....	20
Figura 2: Número de casos de LV reportados em 2022.....	21
Figura 3: Ciclo biológico do parasito <i>Leishmania spp.</i>	24

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AUC - Acurácia do teste

DAT - Teste de aglutinação direta

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DO - Densidade ótica

DSe% - Percentual de sensibilidade diagnóstica

DSp% - Percentual de especificidade diagnóstica

DPP® - Dual-Path Platform

EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético

EIE-LVC - Ensaio imunoenzimático- leishmaniose visceral canina

ELISA - Teste de imunoadsorção enzimática

HIV - Vírus da imunodeficiência humana

IC - Intervalo de confiança

ICT - Teste imunocromatográfico

IDRM - Intradermoreação de Montenegro

IFAT - Teste de imunofluorescência indireta

IFN - Interferon

IgG - Imunoglobulina G

IL - Interleucina

IPTG - Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosideo

KDa - kilodalton

LC - Leishmaniose cutânea

LCD - Leishmaniose cutâneo-difusa

LCDs - Leishmaniose cutâneo-disseminada

LMC - Leishmaniose muco-cutânea

LR - Razão de verossimilhança

LT - Leishmaniose tegumentar

LV - Leishmaniose visceral

LVC - Leishmaniose visceral canina

LVH - Leishmaniose visceral humana

MAPA - Ministério da Agricultura e Pecuária

n - Número amostral

ODP - Orto-fenilodiamina

pb - Pares de bases

PBS - Solução salina tamponada com fosfato

PCR - Reação em cadeia da polimerase

PSA - Persulfato de amônio

RIFI - Reação de imunofluorescência indireta

ROC - Característica de operação do receptor

SDS - Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE - Gel de poliacrilamida desnaturante

SFB - Soro fetal bovino

SLA - Extrato antigênico solúvel de *Leishmania spp.*

SUS - Sistema Único de Saúde

TAE - Tampão Tris-HCl/Ácido acético/EDTA

TBE - Tampão Tris-HCl/Ácido Bórico/EDTA

TE - Tampão Tris-EDTA

TEMED - N, N, N', N'-Tetrametil-etilenodiamina

TI - Tampão de incubação

TNF - Fator de necrose tumoral

VPN - Valor preditivo negativo

VPP - Valor preditivo positivo

UV - Ultra violeta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 Leishmanioses no seu contexto epidemiológico	19
2.2 Etiologia do parasito <i>Leishmania spp.</i>	22
2.3 Ciclo de vida do parasito <i>Leishmania spp.</i>	23
2.4 Manifestações clínicas das leishmanioses	24
2.5 Medidas de prevenção e controle das leishmanioses	26
2.6 Tratamento das leishmanioses	28
2.6.1 Tratamento das leishmanioses em humanos	28
2.6.2 Tratamento da LVC.....	29
2.7 Diagnóstico das leishmanioses: panoramas	30
2.8 Diagnóstico das leishmanioses humanas	31
2.8.1 Diagnóstico parasitológico	31
2.8.2 Diagnóstico molecular	32
2.8.3 Diagnóstico imunológico	33
2.8.4 Diagnóstico da leishmaniose visceral canina	35
2.9 Proteínas usadas no projeto	38
3. OBJETIVOS	42
3.1 Objetivo Geral	42
3.2 Objetivos Específicos.....	42
4. MATERIAIS E MÉTODOS	43
4.1 Aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEUA) e Humana da UFMG	43
4.2 Amostras de soros	43
4.2.1 Soros de cães	43
4.2.2 Soros humanos.....	44
4.2.3 Outras amostras humanas.....	44
4.3 Coleta de amostras antes e após o tratamento	45
4.4 Parasitos e preparo do extrato solúvel de <i>Leishmania</i>	45
4.5 Mapeamento de epítomos específicos de células B para construção das quimeras.....	46
4.5.1 Quimera B1	46
4.5.2 Quimera B2	47
4.6 Expressão e purificação das quimeras B1 e B2	48

4.7 Eletroforese em gel de poliacrilamina SDS-PAGE	49
4.8 Ensaio de Western-blotting usando a quimera B1	50
4.9 ELISA	50
4.9.1 ELISA para o diagnóstico da LVC	50
4.9.2 ELISA para o diagnóstico da LT e LV humana	51
4.10 Kit comercial para LVC	52
4.11 Análises estatísticas	52
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
5.1 Apresentação do artigo “ <i>Serodiagnosis of canine leishmaniasis using a novel recombinant chimeric protein constructed with distinct B-cell epitopes from antigenic Leishmania infantum proteins</i> ” publicado na revista <i>Veterinary Parasitology</i> .”	54
5.2 Apresentação do artigo “ <i>Evaluation from a B-cell epitope-based chimeric protein for the serodiagnosis of tegumentary and visceral leishmaniasis</i> ” publicado na revista <i>Microbial Pathogenesis</i> .”	54
6. CONSIDERAÇÕES GERAIS E CONCLUSÃO	72
7. PERSPECTIVAS	73
8. REFERÊNCIAS	74
9. ANEXOS	88
9.1 Comprovantes de aprovação dos projetos	88
9.2 Patentes depositadas durante o doutorado	90
10 APÊNDICES	91
10.1 Artigos de primeira autoria	91
10.1.1 Publicação do artigo científico intitulado: “ <i>Efficacy an immunotherapy combining immunogenic chimeric protein plus adjuvante and amphotericin B against murine visceral leishmaniasis</i> .”	91
10.1.2 Publicação do artigo científico intitulado: “ <i>Evaluation from a B-cell epitope-based chimeric protein for the serodiagnosis of tegumentar and visceral leishmaniasis</i> .”	92
10.1.3 Publicação do artigo científico intitulado: “ <i>Serodiagnosis of canine leishmaniasis using a novel recombinant chimeric protein constructed with distinct B-cell epitopes from antigenic Leishmania infantum proteins</i> .”	93
10.2 Demais trabalhos publicados durante o doutorado	94

1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças infecto-parasitárias causadas por parasitos protozoários do gênero *Leishmania*, que estão entre as principais doenças negligenciadas em países em desenvolvimento (PAHO, 2024). Com mais de 20 espécies do parasito conhecidas por causar leishmanioses (Grimaldi e Tesh, 1993), elas são amplamente distribuídas em várias regiões do mundo, incluindo países das Américas do Sul e Central, África, Ásia e Europa (PAHO, 2024). As leishmanioses podem ser classificadas em dois grandes grupos clínicos: a leishmaniose tegumentar (LT), cuja forma clínica mais comum é a leishmaniose cutânea (LC); e a leishmaniose visceral (LV) (Da Silva, *et al.*, 2017; Moosavian *et al.*, 2019; Figueiredo *et al.*, 2022).

Estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS) indicam que mais de 1 bilhão de pessoas vivem em áreas endêmicas, com 50.000 a 90.000 novos casos de LV sendo registrados anualmente, dos quais apenas 25% a 45% são relatados. Para a LT, os números variam de 60.000 a 1 milhão de novos casos anuais (WHO, 2024). Nesse contexto, as leishmanioses são consideradas enfermidades emergentes, com sintomas que variam de lesões cutâneas únicas a manifestação visceral e fatal da doença (MSF, 2023; OMS, 2023).

Em relação ao parasito causador, este possui ciclo de vida dimórfico, ou seja, se apresenta sob duas formas morfológicas distintas: amastigota e promastigota (Sacks e Kamhawi, 2001; Sacks e Sher, 2002). Além disso, são heteroxênicos, oscilam os estágios de vida entre hospedeiros mamíferos e invertebrados (Quinnell e Courtenay, 2009; Roque e Jansen, 2014). Ressalta-se que o principal reservatório urbano do parasito é o cão, e por existir uma relação direta entre a incidência de leishmaniose nesses animais e no homem, o controle da doença necessita de um diagnóstico precoce e eficaz, para que medidas cabíveis possam ser executadas. Geralmente, o diagnóstico é realizado pela combinação entre a avaliação dos sinais clínicos com exames laboratoriais, tais como testes sorológicos, parasitológicos convencionais e moleculares (Larois, *et al.*, 2021).

Diante dos desafios apresentados pelas formas clínicas das doenças, o diagnóstico precoce e eficaz é fundamental (OMS, 2024). Com relação ao diagnóstico da LV canina (LVC) no Brasil, o Ministério da Saúde protocolou, por meio da Nota Conjunta de 01/2011, o uso do teste imunocromatográfico *Dual Path Platform* (DPP)

como uma ferramenta de triagem inicial. Para a confirmação do diagnóstico, o ensaio imunoenzimático (ELISA) é utilizado (Souza-Filho *et al.*, 2016).

No caso das formas de leishmaniose humana, o diagnóstico segue abordagens diferentes. Para LT, deve ser realizado o diagnóstico parasitológico (Brasil, 2023), uma vez que no sorodiagnóstico pacientes geralmente apresentam baixos níveis de anticorpos antileishmanial, principalmente aqueles que desenvolvem a LC. Como consequência, baixa sensibilidade é encontrada quando testes imunológicos são aplicados nestes casos (Romero *et al.*, 2005; Fagundes-Silva *et al.*, 2012). Por outro lado, para o diagnóstico da LV, o Sistema Único de Saúde (SUS) disponibiliza principalmente duas técnicas: o diagnóstico parasitológico e o imunológico, utilizando testes como a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e imunocromatografia. Essas metodologias são amplamente utilizadas em unidades de saúde pública para detectar a forma visceral da doença. De outra forma, os testes moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), embora mais sensíveis, não são amplamente disponíveis no SUS, sendo limitados a laboratórios de referência e centros especializados (Fiocruz, 2022; Brasil, 2023).

A técnica de ELISA, por sua vez, é a mais comumente aplicada dentre os exames laboratoriais, embora a sensibilidade e especificidade dependam do antígeno utilizado. Uma vantagem é o fato da técnica ser de fácil execução e possibilitar a avaliação de diversas amostras ao mesmo tempo (Elmahallawy *et al.*, 2014). Existe um teste no Brasil baseado em extrato antigênico solúvel de *Leishmania* (SLA) de *Leishmania major*, o kit EIE-CVL® (EIE-Leishmaniose-Visceral-Canina) produzido pela Bio-Manguinhos/FIOCRUZ (Lira, 2005); contudo, a sensibilidade e especificidade do antígeno usado na técnica ainda precisa ser aprimorada, sugerindo que o emprego de antígenos mais refinados possa oferecer boas perspectivas para o desenvolvimento do teste (Faria e Andrade, 2012).

A utilização de ferramentas biotecnológicas, como a imunoproteômica, tem auxiliado na identificação de proteínas com potencial para serem usadas na prevenção e/ou diagnóstico das doenças. Posto isso, esta técnica foi empregada por nosso grupo de pesquisa a fim de detectar proteínas do parasito *L. infantum* através do seu reconhecimento por anticorpos presentes em amostras de soros de cães com LVC sintomática e assintomática (Coelho *et al.*, 2012), bem como de pacientes com LT (Duarte *et al.*, 2015).

Diversas proteínas antigênicas foram identificadas e algumas foram testadas individualmente para o diagnóstico da leishmaniose. Entre essas proteínas, quatro foram selecionadas por terem tido melhores resultados individuais para compor uma das quimeras desse estudo, chamada de “B1”. As proteínas escolhidas foram: proteína hipotética LiHyD (XP_001468360.1) (Lage *et al.*, 2016), proteína “fator liberador de histamina dependente de IgE”, denominada HRF (XP_001465979.1) (Coelho *et al.*, 2016), proteína hipotética LiHyp1 (XP_001468941.1) (Martins *et al.*, 2013) e a proteína β -tubulina (XP_001468164.1) (Duarte *et al.*, 2015). As sequências dessas proteínas foram analisadas e seus epitopos utilizados para a construção da quimera B1, então avaliada no sorodiagnóstico da LVC.

Por outro lado, a quimera B2, usada no diagnóstico da LT e LV contra um painel sorológico humano, foi construída a partir das seguintes proteínas: proteína hipotética (XP_001568689.1); enolase (XP_001563419.1); triparedoxina peroxidase (XP_001563558.1) (Duarte *et al.*, 2015) e proibitina (XP_001568126.1) (Rodrigues *et al.*, 2019). As proteínas enolase e triparedoxina oxidase foram selecionadas em *L. braziliensis* por uma abordagem imunoproteômica realizada por Duarte e colaboradores (2015), enquanto a proteína proibitina foi provinda de um estudo de imunoproteômica realizada por Coelho *et al.*, 2012.

Vale ressaltar que, com vista em uma melhora na eficácia dos testes diagnósticos, as construções de proteínas quiméricas apresentam vantagens em relação ao uso das proteínas individuais, já que essas moléculas são formadas por multiepítomos pré-selecionados de células B, específicos de diferentes proteínas do parasito, nos quais se eliminam epitopos com reatividade cruzada ou pouco específicos (Boarino *et al.*, 2005). Assim, almeja-se que uma proteína quimérica seja capaz de melhorar a sensibilidade e especificidade de um teste, uma vez que pode eliminar a presença de epítomos indesejados (Santos *et al.*, 2020).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Leishmanioses no seu contexto epidemiológico

As leishmanioses constituem um grave problema de saúde pública no continente Americano, caracterizadas por sua magnitude, ampla distribuição geográfica e morbimortalidade, além de estarem entre as dez doenças infecciosas mais negligenciadas e que afetam, principalmente, a população mais carente e com menos acesso aos serviços de saúde (Alvar *et al.*, 2006; Alvar *et al.*, 2012; WHO, 2024). Globalmente, estima-se que mais de 12 milhões de pessoas estejam infectadas. Atualmente, 99 países são endêmicos para a doença, sendo 89 para leishmaniose cutânea, 80 para leishmaniose visceral e 71 endêmicos para ambas as formas clínicas, LT e LV (WHO, 2024).

As leishmanioses são causadas por diferentes espécies de *Leishmania* nas regiões das Américas, fator que influencia nas manifestações clínicas, na gravidade da doença, na exatidão do diagnóstico (Romero *et al.*, 2010; Fernandez *et al.*, 2014) bem como na resposta ao tratamento (Gonzalez *et al.*, 2009; Reveiz *et al.*, 2013). No Continente Americano, a forma mais comum da doença é a LC, que está associada à 15 espécies do parasito como agentes causadores, correspondendo à aproximadamente 90% dos casos de leishmaniose. Essa forma é endêmica em 18 países e possui uma média de aproximadamente 54.000 novos casos por ano (OPAS, 2020; OPAS 2022).

Outras formas clínicas de LT, como a disseminada (principalmente causada por *L. braziliensis*) e a cutânea difusa (principalmente causada por *L. amazonensis* e *L. mexicana*), apresentam maiores desafios no tratamento e frequentemente resultam em recidivas (OPAS, 2020). A distribuição é predominante na Região Andina, que representa 43% dos casos, seguido pelo Brasil com 37%, América Central com 18% e o restante distribuído no Cone Sul, Caribe não latino e México. Entre os países endêmicos, aproximadamente 76% dos casos ocorrem no Brasil, Colômbia, Nicarágua e Peru (OPAS, 2019; OPAS 2022). A forma mucosa, mais comumente causada por *L. braziliensis*, *L. panamensis* e *L. guyanensis*, representa cerca de 4% dos casos de LT nas Américas e é uma forma clínica grave passível de levar a incapacidades impactantes se não diagnosticada e tratada de forma prévia (OPAS, 2020; OPAS 2022).

Por outro lado, a leishmaniose visceral é a forma mais grave da doença, e pode levar à morte até 95% dos indivíduos não tratados (MSF, 2023). É endêmica em 13 países das Américas, com uma média de 3.500 casos por ano, dos quais 96% dos casos foram notificados no Brasil. Adicionalmente, a proporção de casos coinfectados por HIV-LV tem aumentado a cada ano, chegando a 11% em 2019 e ocupando posição de maior taxa desde 2012 (OPAS, 2020; OPAS 2022).

Em suma, a LC apresenta distribuição mundial, com 205.986 novos casos relatados à OMS em 2022. Países como Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Irã, Iraque, Peru e República Árabe Síria notificaram mais de 5.000 casos de LC, juntando no total 175.733 dos casos, o que corresponde a cerca de 85% dos casos globais (Figura 1). Por outro lado, nesse mesmo ano, foram notificados 12.842 novos casos de LV, com Brasil, Quênia, Sudão do Sul e Sudão relatando mais de 1.000 casos individualmente, equivalendo à aproximadamente 68% dos casos globais (Figura 2) (WHO, 2023).

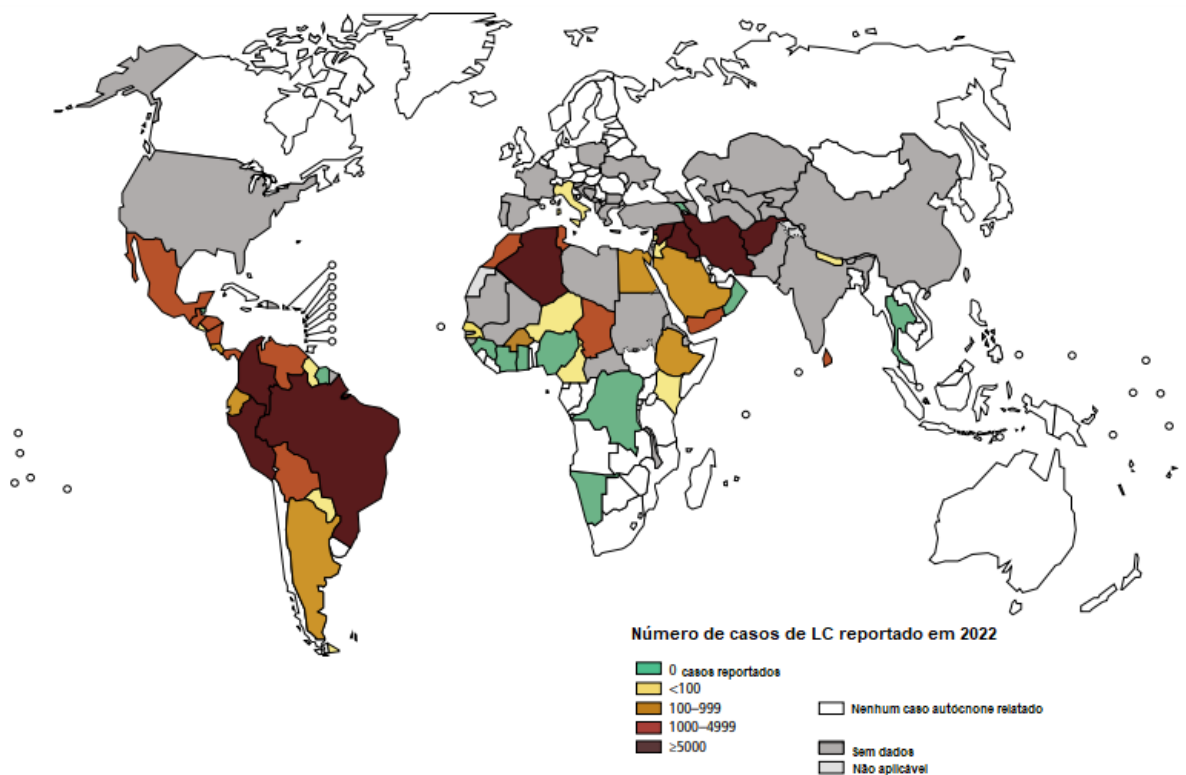


Figura 1: Número de casos de LC reportados em 2022. Adaptado de WHO, 2023.

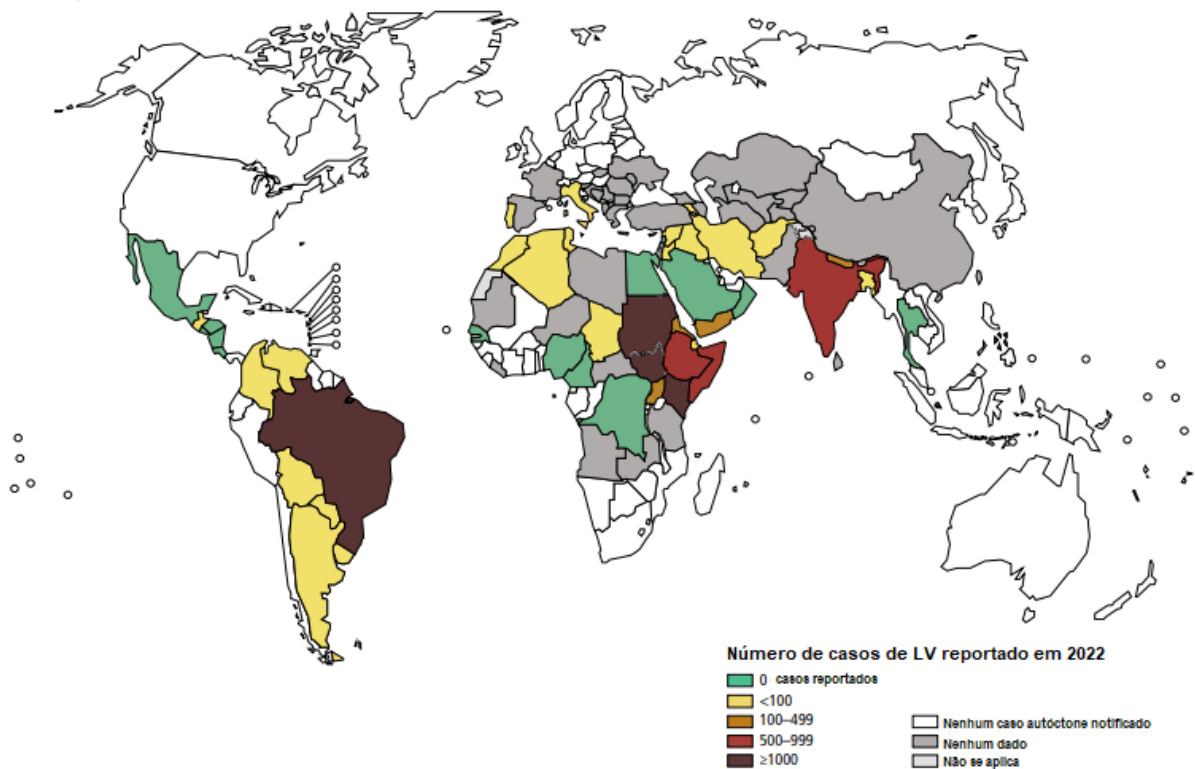


Figura 2: Número de casos de LV reportados em 2022. Adaptado de WHO, 2023.

Quanto à LV zoonótica, os cães são os principais reservatórios urbanos do parasito *L. infantum*, agente etiológico da LVC, desempenhando um papel essencial no ciclo de transmissão para outros seres vivos (Sevá *et al.*, 2016; Rocha *et al.*, 2018). É importante destacar que existem milhões de cães infectados na América do Sul e, especialmente no Brasil e na Venezuela, a taxa de infecção é significativamente maior (Silva *et al.*, 2021).

Diante desse cenário, a LVC requer atenção especial das autoridades competentes, principalmente por apresentar maior prevalência em relação à doença humana e por haver uma correlação direta entre o número de cães infectados e o aumento da incidência da doença em humanos, sugerindo um maior risco para disseminação (Costa *et al.*, 2018; Ribeiro *et al.*, 2018). Além dos fatores citados, deve-se considerar a existência de muitos animais assintomáticos vivendo em áreas endêmicas da doença, o que pode potencializar a transmissão vetorial para novos hospedeiros (Marzochi *et al.*, 1985; Duprey, *et al.*, 2006).

A propagação da doença também se deve à migração de cães infetados para zonas não endêmicas, bem como à migração de cães saudáveis para zonas endêmicas da doença, facilitando a continuação do ciclo do parasito (Arias *et al.*,

1996). Além disso, outros fatores facilitadores, incluem mudanças climáticas que podem favorecer a ocorrência do vetor transmissor da doença em determinados períodos (Mendes *et al.*, 2016; Adegboye *et al.*, 2019). Vale ressaltar, que no Brasil, a vacina desenvolvida para a LVC é a Leish-Tec®, composta pela proteína recombinante A2 (Fernandes *et al.*, 2008). É a única vacina licenciada com intuito de imunizar cães contra a doença; entretanto, a comercialização da mesma foi suspensa em 2023 pelo Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA) devido à intercorrências no produto (MAPA, 2023), fortalecendo a necessidade de novos estudos visando a melhoria da eficácia e a descoberta de novos candidatos vacinais para proteção contra a LVC (Matias *et al.*, 2020).

2.2 Etiologia do parasito *Leishmania*

As leishmanioses são doenças vetoriais causadas por parasitos protozoários, pertencentes ao Sub-reino Protozoa, Filo Sarcomastigophora, Ordem Kinetoplastida, Família Trypanosomatidae e ao gênero *Leishmania*. O vetor transmissor é um inseto da Ordem Diptera, Família Psychodidae, Sub-Família Phlebotominae, pertencente aos gêneros *Phlebotomus*, em países do velho mundo e *Lutzomyia* nas Américas. Ressalta-se que os hábitos hematófagos são exclusivos das fêmeas do vetor, já que os machos são fitófagos, e por isso apenas as fêmeas são capazes de disseminar a doença (Grimaldi e Tesh, 1993).

Com relação aos parasitos *Leishmania spp.*, estes são ditos heteroxênicos, ou seja, oscilam os estágios de vida entre hospedeiros mamíferos e invertebrados. Destacam-se, entre os mamíferos, uma ampla variedade de espécies hospedeiras, tais como cães domésticos, gatos, coelhos e, também, animais silvestres, como raposas e marsupiais (Quinnell e Courtenay, 2009; Roque e Jansen, 2014). Ainda nesse contexto, esses protozoários apresentam comportamento dimórfico, isto é, as fases do ciclo de vida do parasito determinam suas estruturas morfológicas, sendo a forma móvel, extracelular e flagelada, denominada promastigota, e a forma intracelular, denominada amastigota (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

As formas promastigotas são aquelas encontradas no trato gastrointestinal do inseto vetor, que se caracterizam pelo formato losangular adelgado, medindo de 10 a 15 µm, e por possuírem um flagelo longo e único na sua extremidade, que é responsável pela motilidade do parasito. Ademais, possuem estrutura mitocondrial

característica, o cinetoplasto, localizado entre a porção anterior e o núcleo (Sacks e Kamhawi, 2001; Sacks e Sher, 2002; Aguiar e Rodrigues, 2017).

Por outro lado, as amastigotas são arredondadas, medindo de 3 a 6µm de diâmetro e possuem flagelo interiorizado. O cinetoplasto possui formato de bastão e detém uma quantidade significativa de DNA extracelular. Além disso, a multiplicação ocorre nos vacúolos parasitóforos, no interior do sistema fagocítico mononuclear dos mamíferos (Sacks e Kamhawi, 2001; Sacks e Sher, 2002; Aguiar e Rodrigues, 2017).

2.3 Ciclo biológico do parasito *Leishmania*

Um elemento importante na epidemiologia das leishmanioses é o inseto vetor, pois as fêmeas dos flebotomíneos requerem sangue para a ovulação e desenvolvimento dos ovos. Desse modo, ao realizarem o repasto sanguíneo, os parasitos podem ser transmitidos do inseto infectado para os hospedeiros mamíferos, podendo esses parasitos estarem como amastigotas livres no sangue ou em fagócitos infectados (Pessoa e Martins, 1988; Medeiros *et al.*, 2005; Bates, 2007). Essas células, ao chegarem no intestino do inseto, rompem-se e liberam os parasitos que posteriormente convertem-se nas formas promastigotas procíclicas e então, deslocam-se até o trato digestório médio e anterior do flebotomíneo, onde sofrem um processo de multiplicação e diferenciação em promastigotas metacíclicas. Essa nova forma infectiva do parasito passa a colonizar glândulas salivares do vetor, permitindo que este infecte outros hospedeiros mamíferos (Pessoa e Martins, 1988; Medeiros *et al.*, 2005).

Ao realizar um novo repasto sanguíneo, o flebotomíneo infectado, inocula junto à saliva, formas promastigotas metacíclicas na derme do hospedeiro mamífero. Em seguida, algumas células como os neutrófilos, monócitos e macrófagos, migram para o local da infecção, passando a fagocitar as formas promastigotas, que uma vez dentro dos fagolisossomos se diferenciam em amastigotas e estas, por sua vez, iniciam um processo de sucessivas divisões binárias (Handler *et al.*, 2015; Rios *et al.*, 2022). Uma vez que os macrófagos estão densamente parasitados, sofrem rompimento e liberam as amastigotas que podem parasitar outros macrófagos e dar seguimento à doença no hospedeiro, ou ser novamente ingerido por vetores flebotomíneos, concluindo o ciclo biológico do parasito *Leishmania* (Figura 3) (Sheikh *et al.*, 2020).

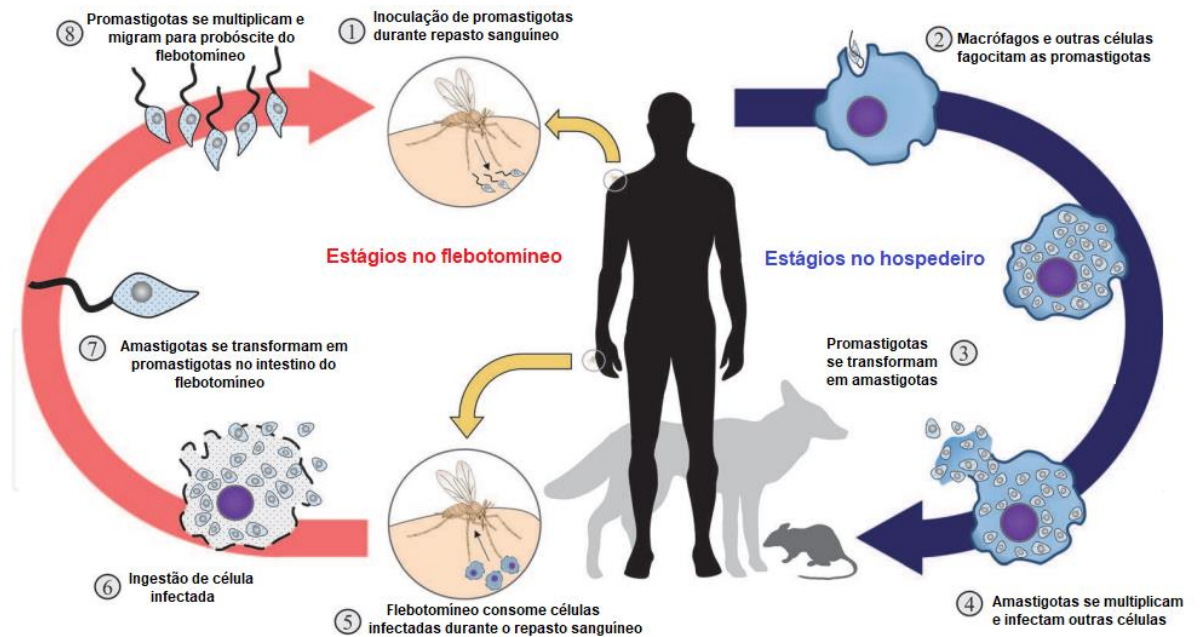


Figura 3: Ciclo de vida do parasito *Leishmania* spp. 1. Inoculação de formas promastigotas metacíclicas na derme do hospedeiro mamífero através do repasto sanguíneo pela fêmea do flebotomíneo. 2 e 3. Fagocitose dos parasitos por macrófagos, onde ocorre a diferenciação em amastigotas. 4. Multiplicação e lise da célula hospedeira com consequente liberação das formas amastigotas. 5 e 6. Infecção do inseto vetor fêmea durante o repasto sanguíneo em um hospedeiro infectado através da ingestão de formas amastigotas ou células parasitadas. 7. Formas amastigotas se diferenciam em promastigotas no trato digestório médio do inseto vetor. 8. Replicação e diferenciação em promastigotas metacíclicas, migração para a probóscide do inseto (Adaptado de Sheikh *et al.*, 2020).

2.4 Manifestações clínicas das leishmanioses

A apresentação clínica da leishmaniose é diversa e a patogênese pode ser definida por características relacionadas ao hospedeiro, tais como fatores genéticos e imunológicos, juntamente aliados à fatores do parasito, como a virulência da espécie infectante e composição salivar dos vetores (Kane e Mosser, 2001; Sharifi *et al.*, 2017). Como resultado dessa interação, pode ocorrer o desenvolvimento da doença nas formas assintomáticas até as diferentes formas clínicas. Desse modo, de acordo com as manifestações clínicas, as leishmanioses podem ser divididas em duas grandes categorias: a leishmaniose tegumentar, que engloba as formas

cutânea (LC), cutânea disseminada (LCDs), cutânea difusa (LCD) e mucosa (LM); e a leishmaniose visceral (Kevric *et al.*, 2015; Scorza *et al.*, 2017; Burza *et al.*, 2018).

Salienta-se que a forma mais difundida da doença é a leishmaniose tegumentar, listada pela Organização Mundial da Saúde como uma das seis doenças infecciosas mais importantes devido à elevada distribuição geográfica e à capacidade em gerar deformidades (SES, 2023). Das formas citadas, a LC é a mais comumente encontrada entre os pacientes com LT. Trata-se de uma doença com uma ampla gama de sintomas, que vão desde lesões de cura espontânea até lesões abertas, podendo comprometer a pele e gerar desfigurações. Durante o processo de cura clínica, as úlceras deixam cicatrizes permanentes, o que acarreta um impacto psicológico, com consequente despertar de doenças como depressão e ansiedade, ocasionando uma perda da qualidade de vida dos indivíduos acometidos (da Silva, *et al.*, 2017; Moosavian *et al.*, 2019; PAHO, 2024).

A LCDs, por sua vez, se caracteriza pela presença de lesões múltiplas não ulcerativas disseminadas pelo corpo, acometendo face, tronco e membros. As lesões podem se apresentar de forma simultânea e frequentemente com uma distribuição simétrica. Sua infecção é comumente associada aos pacientes imunossuprimidos (Turetz *et al.*, 2002; Ribeiro, *et al.*, 2013). Já a LCD é uma forma mais rara e grave da doença. É caracterizada pelo aparecimento de várias lesões satélites que podem se agrupar para formar placas que cobrem grandes áreas da pele. Essas lesões geralmente são nodulares ou papulosas, contêm abundante forma amastigota do parasito e raramente ulceram (Scorza *et al.*, 2017; Aldama *et al.*, 2020). O fato da lesão se espalhar pelo corpo pode estar relacionado à ineficácia ou ausência de resposta celular do sistema imune do hospedeiro (Desjeux, 2004).

Com relação à LM, clinicamente se expressa por lesões destrutivas localizadas nas membranas mucosas do trato respiratório superior e a forma clássica dessa doença é secundária a uma lesão cutânea. Frequentemente, pacientes com LM relatam histórico de LC com curso crônico que se resolveu sem tratamento ou com tratamento inadequado. Em alguns casos, a lesão da mucosa ocorre por extensão de uma lesão de pele adjacente, e há também aqueles em que a lesão se inicia em uma semimucosa exposta, como o lábio. O início dos sintomas é insidioso e com pouca sintomatologia. Em geral, a lesão é indolor e inicia-se no septo nasal anterior cartilaginoso, próximo ao intróito nasal, sendo de fácil visualização. A mucosa nasal é

a mais afetada, mas podem estar presentes lesões de orofaringe, palato, lábios, língua, laringe e, excepcionalmente, traqueia e vias respiratórias superiores (Brasil, 2017).

Por outro lado, a LV é a forma mais grave da doença e é frequentemente causada pelas espécies *Leishmania donovani* e *L. infantum* (Torres-Guerrero *et al.*, 2017). É caracterizada por sintomas como febre e hepatoesplenomegalia, além de estar associada à deficiência nutricional e consequente perda de peso. Alguns pacientes, por motivos ainda desconhecidos, mas que se acredita estarem relacionados ao parasito e às respostas imunes efetivas, podem desenvolver a forma mais grave da doença, que pode ser fatal se não for tratada (Fievez, 2019).

As manifestações clínicas variam em intensidade e os indivíduos podem permanecer assintomáticos por longos períodos de tempo, fator que dificulta o diagnóstico clínico, embora aproximadamente 20% dos pacientes infectados desenvolvam a forma aguda da doença. Os sintomas são progressivos e as complicações decorrentes do desenvolvimento da doença são responsáveis pelas elevadas taxas de letalidade (Badaró *et al.*, 1986; Gama *et al.*, 2004).

Em se tratando da forma zoonótica da doença, nos casos da leishmaniose visceral canina, a doença se desenvolve de forma lenta, tendo início insidioso. As manifestações clínicas estão relacionadas ao tipo de resposta imune do animal, variando desde uma infecção sem sintomas até a forma sistêmica grave (BRASIL, 2007). Os animais podem apresentar alterações dermatológicas, linfadenopatia, hepatoesplenomegalia, perda de peso, uveíte, onicogrifose, alopecia e ceratoconjuntivite (Ettinger e Feldman, 2004). Vale ressaltar que devido ao número elevado de casos de LVC no Brasil, os cães se tornaram os principais reservatórios urbanos do protozoário, necessitando de uma atenção especial das autoridades competentes e centros de zoonoses (Gramiccia e Gradoni, 2005; Dantas-Torres, 2007).

2.5 Medidas de controle e prevenção das leishmanioses

A disseminação da leishmaniose é sustentada por sistemas sociais e biológicos complexos, que envolvem hospedeiros mamíferos e insetos vetores. Geralmente, o controle efetivo da transmissão dessas doenças não pode ser alcançado apenas por intervenções simples, requerendo uma combinação de abordagens estratégicas que

envolvam o controle de vetores e a gestão dos animais hospedeiros (WHO, 2019). Nesse sentido, a principal finalidade das medidas de prevenção e controle das leishmanioses visa interromper o ciclo biológico do parasito. No entanto, devido à ampla diversidade de espécies envolvidas, à natureza zoonótica da doença e à manutenção do seu ciclo silvestre, são enfrentadas dificuldades para que estas medidas sejam implementadas de forma eficiente (Tesh, 1995).

Em seres humanos, as estratégias de controle das leishmanioses são fundamentadas na detecção de casos através de um diagnóstico preciso e tratamento efetivo dos pacientes, combinados com medidas de prevenção à reinfecção, tais como utilização de repelentes pessoais contra insetos e instalação de telas protetoras nas residências. Embora essas medidas possam reduzir a transmissão da doença, seu impacto significativo ainda é limitado (Grimaldi e Tesh, 1993; Costa, 2018; WHO, 2019). Por outro lado, para LVC, como os cães são importantes reservatórios domésticos do parasito, contribuem significativamente para a transmissão entre vetor e seres humanos. Logo, no controle dessa doença é fundamental que as autoridades de saúde pública realizem o rastreamento dos cães, por meio da detecção de sinais clínicos e testes sorológicos (WHO, 2010; WHO, 2019). Nesse cenário, tanto os animais sintomáticos quanto os assintomáticos devem ser considerados para ações de controle, incluindo a possibilidade de eutanásia, a fim de limitar a propagação do parasito. Contudo, tal medida tem enfrentado desafios, uma vez que alguns proprietários se recusam a submeter seus animais de estimação aos testes ou permitir a eutanásia dos animais doentes. Ademais, é importante levar em conta que nas áreas endêmicas ocorre uma rápida reposição dos animais. Além disso, é fundamental estar atento à seleção de tratamentos disponíveis para os animais, visto que, em muitos casos, se mostram ineficazes na redução do número de casos em um determinado ambiente (WHO, 2010; WHO, 2019).

Dessa forma, essas deficiências e obstáculos têm contribuído para a dificuldade no controle efetivo da LVC, demandando esforços adicionais no desenvolvimento de estratégias mais abrangentes e engajamento da comunidade para o controle e prevenção da doença (WHO, 2010; WHO, 2019). Uma das estratégias que surtem impacto positivo para o controle da LVC é a utilização de inseticidas tópicos ou impregnados em coleiras, bem como a vacinação profilática (Costa, 2018).

Por sua vez, o controle do vetor, realizado por meio da administração de inseticidas, uso de repelentes e telas de proteção (Brasil, 2014), é de suma importância para interromper a transmissão da doença. Esse controle pode ser realizado através da aplicação de inseticidas no ambiente doméstico; entretanto, a eficácia é influenciada por diversos fatores, como a classe de inseticida utilizada, a sensibilidade do vetor, o tipo de superfície onde é aplicado, além da dosagem e do método de aplicação empregado. A fim de assegurar a efetividade dessa estratégia, é imprescindível seguir procedimentos operacionais padronizados, estabelecer um bom gerenciamento, implementar uma logística adequada e garantir supervisão contínua. Desse modo, ao adotar abordagens padronizadas e realizar uma gestão eficiente, é possível aumentar significativamente as chances de sucesso no controle do vetor e, conseqüentemente, interromper a transmissão da doença de forma mais eficaz (WHO, 2010; WHO, 2019).

Outro ponto é a implementação de medidas de saneamento adequado e ações de educação social que também são fundamentais para o controle eficaz das leishmanioses, complementando o controle dos vetores e dos hospedeiros. Em áreas endêmicas, onde a doença é uma preocupação de saúde pública significativa, a eliminação de criadouros de flebotomíneos por meio de sistemas de saneamento básico, como o manejo de resíduos e o controle da água parada, pode reduzir consideravelmente a proliferação desses vetores. Ademais, campanhas de conscientização sobre a importância da higiene, do uso de repelentes e da instalação de telas protetoras nas residências, são eficazes para limitar a exposição ao vetor. A educação social desempenha um papel crucial na mudança de comportamentos e na promoção de atitudes que favorecem o controle da doença. As estratégias de mobilização comunitária e o envolvimento local tem mostrado impacto positivo, garantindo que as medidas de controle sejam mais amplamente aceitas e seguidas, especialmente em comunidades vulneráveis (Araújo *et al.*, 2022; WHO, 2022; Gontijo *et al.*, 2023).

2.6 Tratamento das leishmanioses

2.6.1 Tratamento da leishmaniose humana

O tratamento das leishmanioses depende da espécie do parasito bem como da imunidade do paciente, sendo que a resposta clínica pode variar com a abordagem

terapêutica aplicada, seja pela toxicidade dos fármacos ou pela resistência gerada aos mesmos (Garniere Croft, 2002). Atualmente, os principais medicamentos usados no tratamento das leishmanioses são os antimoniais pentavalentes, a anfotericina B e sua formulação lipossomal, a miltefosina, a paromomicina e a pentamidina. Contudo tais compostos podem apresentar limitações devido a maioria deles poder causar toxicidade, além da necessidade de administração parenteral, fatores que acabam por dificultar a adesão do paciente ao tratamento. Além disso, também deve ser considerado o surgimento de cepas resistentes aos fármacos em questão (Tiwari *et al.*, 2018; Santiago *et al.*, 2023).

No Brasil, o tratamento é ofertado pelo SUS de forma gratuita e deve ser feito sob orientação médica atrelado à repouso e boa alimentação. A terapia medicamentosa é realizada com drogas específicas, sendo que tanto para LV quanto para LT, a substância de primeira escolha é o antimoniato de N-metil glucamina (Glucantime®). Além disso, é protocolado pela OMS que a dose do Glucantime® deve ser calculada em mg/Sb+5/Kg/dia. Em caso de lesões cutâneas, o tratamento é de 15 mg/Sb+5/Kg/dia por um período de 20 dias e para a forma cutânea difusa da doença passa para 20 mg/Sb+5/Kg/dia por 20 dias. Já para lesões em mucosas, recomenda-se a dose de 20 mg/Sb+5/Kg/dia por um período de 30 dias. Ademais, existem outras opções terapêuticas que também estão disponíveis nos serviços de saúde, entre elas o isotionato de pentamicina e anfotericina B (Secretaria da Saúde do Estado da Bahia, 2023).

Por fim, para todas as formas de leishmanioses, o objetivo da terapia é garantir a adesão do paciente bem como a redução do desconforto da doença, amenizando os sintomas, além de minimizar a ocorrência de efeitos adversos através de uma administração segura dos medicamentos (Brasil, 2018; Santiago *et al.*, 2023). No entanto, estudos salientam a insatisfação em torno dos fármacos atualmente disponíveis, considerando principalmente questões como eficácia, custo, viabilidade de administração e segurança (Mcgwire e Satoskar, 2014; Hendrickx, 2019; Santiago *et al.*, 2023).

2.6.2 Tratamento da LVC

Durante muito tempo, uma das medidas adotadas no Brasil para o controle da LVC era a eutanásia de animais soropositivos (Dantas-Torres *et al.*, 2018; Marcondes

e Michael, 2019), porém, foi autorizado no país, em 2016 pelo MAPA, a terapia medicamentosa para cães com leishmanioses, tendo como medicamento de escolha o Milteforan®, que já era anteriormente comercializado para esse fim na Europa. O Milteforan® é o único fármaco sancionado para uso veterinário no Brasil no combate à doença. Seu princípio ativo é a miltefosina e sua administração é por via oral. Para o tratamento ser implementado, alguns requisitos foram estabelecidos: o animal ser domiciliado, e o tutor precisa arcar com a terapia em sua totalidade (MAPA, 2016; Krolow *et al.*, 2023). Além da miltefosina, o tratamento envolve outras opções terapêuticas como os antimoniais pentavalentes, anfotericina B, pentamidina e alopurinol (Brasil, 2022). Esses tratamentos são regulados pelo Ministério da Saúde e devem ser escolhidos com base na gravidade da doença e nas condições de cada animal (Brasil, 2022). Ressalta-se que a escolha do tratamento é muitas vezes feita de acordo com o protocolo estabelecido pelas autoridades de saúde veterinária do país, e deve ser monitorada cuidadosamente, dado que o tratamento tem riscos e efeitos colaterais.

Nesse contexto, o alopurinol é o medicamento mais comumente utilizado para o tratamento da LVC e sua ação ocorre por meio da inibição da síntese de DNA e RNA do parasito, de maneira que impede a multiplicação do mesmo e, consequentemente, reduz a carga parasitária (Santos *et al.*, 2021). Por outro lado, a miltefosina age diretamente no parasito causando sua destruição. No geral, ela é a escolha em países onde há resistência parasitária aos outros medicamentos (Chagas *et al.*, 2017; Pacheco *et al.*, 2021).

Fármacos como os antimoniais pentavalentes, pentamidina e anfotericina B também destroem o parasito agindo diretamente nele, entretanto podem apresentar efeitos colaterais consideráveis para a saúde do animal (Costa *et al.*, 2021; Castro *et al.*, 2021; Maia *et al.*, 2018). Deste modo, a avaliação da eficácia do tratamento na LVC se dá através da redução da carga parasitária e pela melhora dos sinais clínicos dos animais. Todavia, já foi demonstrado que a cura estéril não é garantida, podendo o animal ser tratado e continuar hospedando o parasito em seu organismo. Assim sendo, deve-se levar em consideração a ocorrência de recidivas e por isso é de suma importância o monitoramento regular destes cães (Dias *et al.*, 2017).

2.7 Diagnóstico das leishmanioses: panoramas

É conhecido que o diagnóstico das leishmanioses é baseado na combinação de evidências clínicas e epidemiológicas, juntamente com exames laboratoriais (Tesh, 1995). A detecção correta e precoce dos casos, seguida de tratamento adequado, é fundamental para controlar a disseminação da doença. No entanto, a leishmaniose visceral, diagnosticada principalmente em áreas endêmicas, apresenta uma ampla variedade de manifestações clínicas, tornando os sinais e sintomas frequentemente inconclusivos e/ou confundidos com outras enfermidades, como malária, tuberculose, entre outras (Brasil, 2017), o que representa um grande desafio (Srividya *et al.*, 2012; Abbas *et al.*, 2015).

No caso da LT, o diagnóstico clínico-epidemiológico deve ser complementado por pesquisa direta dos parasitos ou outros testes laboratoriais. Além disso, considerando o número de doenças que podem ter diagnóstico diferencial com LT, tais como hanseníase e outras doenças crônicas que causam lesões cutâneas (Brasil, 2017), quando os métodos não fornecem um diagnóstico conclusivo, o paciente deve ser examinado por outros testes (Brasil, 2017).

Dessa forma, o diagnóstico laboratorial das leishmanioses é dividido em três diferentes categorias de métodos: testes parasitológicos, moleculares e imunológicos (Brasil, 2017). Essas metodologias diferem principalmente em termos de sensibilidade e especificidade, bem como em sua aplicação prática em condições de campo e na disponibilidade de reagentes, equipamentos e mão de obra especializada (Martins e Lima, 2013).

O diagnóstico precoce seguido por um tratamento completo são fatores cruciais para reduzir a disseminação das leishmanioses (Singh e Sundar, 2015). No entanto, a toxicidade do tratamento, junto com seu alto custo, ressalta a importância de um teste diagnóstico confirmatório com alta especificidade e sensibilidade, uma vez que o controle dos casos individuais e a implementação de medidas de controle são prejudicados por ferramentas diagnósticas inadequadas (Diro *et al.*, 2017).

2.8 Diagnóstico da leishmaniose humana

2.8.1 Diagnóstico parasitológico

O diagnóstico parasitológico considerado o padrão-ouro é baseado na análise microscópica dos parasitos em lâminas e/ou culturas *in vitro*. Essa abordagem envolve a visualização dos parasitos em aspirados de órgãos ou tecidos e, embora tenha

elevada especificidade, a sensibilidade é inconstante devido à distribuição não homogênea dos parasitos nas amostras coletadas. Ademais, vale ressaltar que essa técnica apresenta alguns inconvenientes, como riscos, potencial desconforto e invasividade (Sakkas *et al.*, 2016; Borja *et al.*, 2018). Para a leishmaniose tegumentar (LT), são utilizados fragmentos de lesões de pele e mucosas, enquanto que para a leishmaniose visceral (LV), são coletados aspirados de baço, linfonodos e/ou medula óssea (Elmahallawy *et al.*, 2014). No entanto, é importante destacar que a sensibilidade dos testes pode variar, uma vez que depende das amostras analisadas (Srividya, 2012). Dessa forma, mesmo que o exame parasitológico seja amplamente utilizado, é importante considerar suas limitações e explorar alternativas menos invasivas e dolorosas para o diagnóstico das leishmanioses.

2.8.2 Diagnóstico molecular

Ensaio moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR) e a PCR *Real-Time*, são usados para detectar material genético dos parasitos em amostras, e demonstram elevada especificidade na detecção da doença. Tais testes oferecem a vantagem de amplificar o genoma do parasito a partir de uma quantidade mínima de DNA presente nessas amostras biológicas (Akhoundi *et al.*, 2017; Hossain *et al.*, 2017). Contudo, intercorrências podem ser observadas, pois dependendo da amostra analisada, a sensibilidade da técnica pode variar devido a presença heterogênea de parasitos em diferentes órgãos ou frações teciduais. Além disso, sua execução necessita de profissionais com treinamento especializado e de um cuidado rigoroso para evitar contaminação por agentes externos. Adicionalmente, este método possui custo elevado e demanda uma infraestrutura laboratorial (de Paiva-Cavalcanti *et al.*, 2015; Sakkas *et al.*, 2016).

Ademais, a PCR convencional apresenta um problema de positividade em indivíduos saudáveis de regiões endêmicas. Além disso, tanto a PCR convencional quanto os testes sorológicos têm a limitação de não diferenciarem a doença clinicamente ativa de infecções assintomáticas. No entanto, essas desvantagens podem ser superadas pela PCR quantitativa em tempo real (Sudarshan *et al.*, 2014). A PCR quantitativa em tempo real além de detectar, também permite a quantificação da carga parasitária na amostra, o que pode auxiliar na determinação da atividade da doença e servir como um marcador prognóstico (Mary *et al.*, 2006). Ambos os testes,

qualitativos e quantitativos, também podem ser utilizados para avaliar a cura, uma vez que geralmente se tornam negativos após o tratamento (Boelaert *et al.*, 2004).

Por fim, apesar das técnicas moleculares terem aumentado a sensibilidade dos testes parasitários, estas apresentam custos elevados, além da necessidade adicional de profissionais altamente qualificados e equipamentos sofisticados para a realização dos testes (Ghasemian *et al.*, 2014; Ruitter *et al.*, 2014). Nesse contexto, o diagnóstico da leishmaniose ainda permanece difícil (Paiva-Cavalcanti *et al.*, 2015).

2.8.3 Diagnóstico imunológico

Devido aos baixos títulos de anticorpos circulantes, ensaios imunológicos são pouco usados em áreas com prevalência de LC. Ademais, os níveis desses anticorpos também podem variar significativamente entre as diferentes formas de LT. Por esse motivo, os testes de detecção de anticorpos não são úteis no diagnóstico dessas formas de leishmaniose. Mas, apesar dos anticorpos anti-*leishmania* serem dificilmente detectáveis na LC, em certa medida podem ser detectados na LM e na LCD, porém com desempenho limitado e variável (WHO, 2010; Kaye *et al.*, 2020). Além de que, em regiões com doenças de reação cruzada, como a doença de Chagas, a especificidade poder ser variável (Reithinger e Dujardin 2007; Thakur *et al.*, 2020).

Por outro lado, na LV, é observada a hiperimunoglobulinemia, o que impulsionou o desenvolvimento de técnicas imunológicas para detecção de anticorpos (Boelaert *et al.* 2004; Thakur *et al.*, 2020). O método pioneiro no diagnóstico laboratorial foi o teste de intradermorreação de Montenegro (IDRM), o qual é baseado em uma reação de hipersensibilidade tardia mediada por células T de memória com especificidade para antígenos do parasito. Todavia, existem algumas limitações associadas ao método, por exemplo, indivíduos saudáveis que vivem em áreas endêmicas da doença, pacientes curados ou aqueles com doenças correlacionadas, podem apresentar resultados falsos positivos para leishmaniose. Além disso, indivíduos que tiveram a forma difusa da doença, que sejam recém infectados ou que são imunossuprimidos podem apresentar resultados falsos negativos, indicando uma variação na sensibilidade do teste (Weigle *et al.*, 1991; de Paiva-Cavalcanti *et al.*, 2015).

Outro fator é que apesar de aplicado como suporte para o diagnóstico da leishmaniose cutânea e também para o diagnóstico das formas mucosas, onde a

reação é mais intensa, tal técnica não é eficaz para o diagnóstico da leishmaniose visceral (LV), pois durante a fase ativa da doença o teste é sempre não reativo, sendo que a maioria dos pacientes, só se torna reativo após o término do tratamento (cerca de 3 a 6 meses após o fim do tratamento). Desse modo, a IDRM não é capaz de distinguir entre infecções atuais e infecções anteriores, portanto, em áreas com transmissão endêmica, ela fornece orientação, mas não um diagnóstico definitivo (WHO, 2019). Por esses motivos e principalmente devido às variações na sensibilidade e especificidade, essa técnica caiu em desuso (Espir *et al.*, 2016).

Vários outros métodos sorológicos, como o ensaio imunoenzimático (ELISA), ensaio de imunofluorescência indireta (IFAT), teste de aglutinação direta (DAT), Western-blot e o teste imunocromatográfico (ICT) são alternativas para o diagnóstico laboratorial (Peixoto *et al.*, 2015; Oliveira *et al.*, 2016; WHO, 2019, Roatt *et al.*, 2020). Esses métodos se baseiam na detecção de anticorpos específicos aos parasitos em amostras de soro dos pacientes; entretanto, existe a possibilidade de apresentarem variações com relação à sensibilidade e/ou especificidade (de Paiva-Cavalcanti *et al.*, 2015).

Dessa forma, a sensibilidade dos testes sorológicos pode variar conforme a metodologia empregada (BRASIL, 2015). Da mesma forma, a especificidade dos testes sorológicos também está diretamente relacionada ao antígeno utilizado. Cada antígeno pode ter sua própria especificidade, podendo variar de acordo com a amostra e o método adotado. Por isso, é importante considerar esses fatores ao interpretar os resultados dos testes sorológicos para leishmaniose (Elmahallawy *et al.*, 2014).

O sorodiagnóstico tem sido amplamente utilizado como uma ferramenta valiosa no auxílio ao diagnóstico da LV. É importante ressaltar que esse método ainda enfrenta desafios na distinção precisa entre infecções ativas, passadas ou curadas. Essas limitações podem dificultar o diagnóstico preciso da doença, especialmente em áreas endêmicas, onde indivíduos saudáveis podem apresentar a infecção na forma assintomática ou mesmo após terem recebido tratamento para a doença, mantendo níveis detectáveis de anticorpos (Kaye *et al.*, 2020). Também deve-se considerar que em casos de indivíduos imunossuprimidos, testes de detecção de anticorpos apresentam limitações na sensibilidade (Lindoso *et al.*, 2018).

Dentre os ensaios imunológicos, a técnica de ELISA é amplamente utilizada para o sorodiagnóstico da LV, embora sua sensibilidade e especificidade dependam

dos antígenos específicos empregados. Um benefício dessa técnica é a sua simplicidade de execução, além da possibilidade de adaptação para o uso de diferentes moléculas antigênicas. No entanto, é importante ressaltar que sua implementação requer uma equipe qualificada e equipamentos sofisticados, o que pode torná-la inviável em algumas áreas endêmicas (Elmahallawy *et al.*, 2014).

Neste contexto, a maioria das pesquisas realizadas sobre o diagnóstico das leishmanioses utiliza o extrato proteico solúvel de *Leishmania* (SLA) na preparação dos testes devido à sua alta sensibilidade. Entretanto, um dos principais desafios é a baixa especificidade do teste, uma vez que pode haver reações cruzadas com outras doenças, resultando em falsos positivos (Souza *et al.*, 2013; De Paiva-Cavalcanti *et al.*, 2015).

Dentre as diversas ferramentas disponíveis de diagnóstico para a LV humana (LVH), destaca-se o teste imunocromatográfico baseado no antígeno rk39. Essa proteína tem a capacidade de identificar anticorpos específicos contra o complexo *donovani*. Trata-se de um teste rápido, que pode ser realizado em condições de campo e de fácil execução (Sundar *et al.*, 2007; Maia *et al.*, 2012). No entanto, o teste de fita possui algumas limitações, pois pode fornecer resultados positivos em pacientes com outras doenças, resultando em falsos positivos (Mandal *et al.*, 2008).

Uma alternativa promissora para melhorar a especificidade do teste é a utilização de moléculas semipurificadas ou purificadas dos parasitos, bem como proteínas recombinantes e peptídeos sintéticos. Tal abordagem permite uma melhor diferenciação entre leishmaniose e outras doenças que podem causar reatividade sorológica cruzada. Assim sendo, com o uso desses componentes específicos do parasito, resultados mais precisos podem ser obtidos e a ocorrência de falsos positivos é reduzida, melhorando a confiabilidade dos testes sorológicos usados para o diagnóstico da doença (Celeste *et al.*, 2014).

2.8.4 Diagnóstico da leishmaniose visceral canina

O sucesso do diagnóstico clínico da LVC é desafiador, uma vez que existe uma gama de sintomas dessa enfermidade que se assemelham a outras doenças. Além disso, alguns animais podem permanecer assintomáticos por períodos prolongados e, ainda assim, serem capazes de transmitir o parasito através do vetor (Gomes *et al.*, 2008). No geral, o diagnóstico da LVC é feito com base na detecção de parasitos em

amostras de baço, linfonodos ou medula óssea (Santos *et al.*, 2018). Entretanto, esses métodos parasitológicos diretos podem culminar em falsos negativos devido a variação do número de parasitos nas amostras clínicas ou à dificuldade na identificação morfológica dos mesmos. Somado a isso, deve-se considerar o fato da técnica ser altamente invasiva (Gomes *et al.*, 2008; Pessoa-e-Silva *et al.*, 2019).

Técnicas sorológicas, tais como IFAT, DAT, ICT e ELISA, são usadas no sorodiagnóstico da LVC, contudo, esses métodos podem apresentar vantagens e desvantagens (Nunes *et al.*, 2015). Tais testes se fundamentam na detecção de anticorpos específicos ao parasito, porém, existe uma probabilidade de retratarem adversidades com respeito à sensibilidade e à especificidade, pois podem ocorrer problemas em decorrência de reatividade cruzada com *Trypanosoma cruzi*, *Babesia canis* e *Ehrlichia canis*, bem como a ocorrência de falso-negativos (Gomes *et al.*, 2008; de Paiva-Cavalcanti *et al.*, 2015).

A técnica de ELISA usando o SLA é comumente empregada para identificar cães com LV, no entanto, o uso do antígeno bruto pode levar a resultados inconsistentes, com baixa sensibilidade em cães assintomáticos e, especificidade comprometida, já que a reatividade com anticorpos de animais apresentando doenças cruzadas podem levar a resultados falso-positivos (Porrozzi *et al.*, 2007; Miro *et al.*, 2008). Das ferramentas atualmente disponíveis para o diagnóstico da LVC no Brasil, existe um teste baseado em extrato antigênico de *Leishmania* (SLA), o kit EIE-CVL® (EIE-Leishmaniose-Visceral-Canina) produzido por Bio-Manguinhos/FIOCRUZ (Lira, 2005). Entretanto, a sensibilidade e especificidade dos antígenos usados na técnica ainda precisam ser aprimoradas, sugerindo que o emprego de antígenos mais refinados possa oferecer boas perspectivas para o desenvolvimento em campo (Faria e Andrade, 2012).

A tecnologia de DNA recombinante tem sido amplamente utilizada na busca por novos alvos para testes sorológicos da LVC. Essa tecnologia permite o desenvolvimento de proteínas originais ou combinadas em genes quiméricos (Gomes *et al.*, 2008). O uso de proteínas recombinantes e/ou peptídeos sintéticos, assim como as combinações entre antígenos (Porrozzi *et al.*, 2007; Goto *et al.*, 2009), têm sido avaliados por ELISA com o objetivo de se obter um teste diagnóstico que seja mais sensível e específico para a doença (Kubar e Fragaki, 2005).

Nesse contexto, as proteínas recombinantes mostraram-se eficazes na superação das restrições encontradas nos ensaios sorológicos para o diagnóstico da LV, que surgiam devido ao uso de extratos brutos de antígenos. Essas proteínas, em versões recombinantes, foram avaliadas em protótipos para identificar a reatividade dos anticorpos de cães infectados, fornecendo um diagnóstico sorológico mais preciso da doença (Souza *et al.*, 2012; Fraga *et al.*, 2014; Oliveira *et al.*, 2015; Coelho *et al.*, 2016; Dias *et al.*, 2018).

Estudos mostraram a eficácia do uso de proteínas isoladas que podem ser potenciais antígenos em testes diagnósticos mais sensíveis e específicos para LVC. Um exemplo é a proteína recombinante rLc36, expressa em *L. infantum*, que foi capaz de diferenciar casos assintomáticos da doença, demonstrando resultados satisfatórios e sugerindo ser um alvo promissor no sorodiagnóstico da LVC (Nogueira *et al.*, 2018). Outro estudo apresentou a proteína recombinante proibitina, que foi identificada em *L. infantum* e reconhecida por anticorpos nos soros de animais sintomáticos e assintomáticos para LV. Os resultados apontaram elevados valores de sensibilidade e especificidade, principalmente, quando comparada ao SLA, sugerindo sua aplicação como um possível marcador diagnóstico da doença (Dias *et al.*, 2018). Também foram identificadas proteínas como, LiHyp1 (Martins *et al.*, 2015), rLiHyD (Lage *et al.*, 2016) e MAPK3 (Menezes-Souza, *et al.*, 2015), que apresentaram boa eficácia diagnóstica para a LVC e LVH. Em um trabalho desenvolvido por Salles *et al.* (2019), foi demonstrada a utilização da proteína SMP-3, bem como de um epítipo específico de células B dessa proteína, como marcadores diagnósticos da LV canina e humana. Além destas, algumas pesquisas apontaram o desempenho do uso de antígenos combinados, como uma proteína quimérica, rK28, composta pela fusão dos antígenos k9 com unidades de repetição de k39 e k26, cuja versão recombinante demonstrou bons valores de especificidade e sensibilidade (Boarino *et al.*, 2005).

No Brasil, foi protocolado pelo Ministério da Saúde através de uma Nota Técnica Conjuntiva em 01/2011 em que se orienta a utilização de um teste imunocromatográfico, DPP, como método de triagem para o diagnóstico da LVC, e ELISA como método confirmatório (Souza-Filho *et al.*, 2016). O DPP é um teste rápido que utiliza antígenos recombinantes rK26 e rK39, os quais conferem elevada sensibilidade e especificidade na detecção de cães sintomáticos para leishmaniose. No entanto, a sensibilidade do teste é reduzida quando aplicado a cães

assintomáticos, resultando em variações na eficácia (Grimaldi *et al.*, 2012; Chaabouni *et al.*, 2018).

Outro fator que pode influenciar a eficácia dos testes diagnósticos para LVC é a vacinação dos animais, que pode levar a soroconversão e a resultados falso positivos nos testes utilizados (Chaabouni *et al.*, 2018). Desta forma, é importante que os antígenos aplicados nos testes sejam capazes de distinguir entre os que animais que estão realmente infectados daqueles que se encontram saudáveis e vacinados (Kubar e Fragaki, 2005). Em países endêmicos, como o Brasil, o diagnóstico preciso da LV é fundamental, pois o Ministério da Saúde recomenda a eutanásia dos cães que reagem positivamente ao teste. Dessa forma, testes com baixa eficácia tendem a levar sérias questões éticas de eutanásia desnecessária. Somado a isto, resultados falso-negativos de animais assintomáticos também representam um problema, desde que permite a presença de animais reservatórios na comunidade e uma potencial chance de disseminação da doença (Werneck, 2014).

Sendo assim, a busca por novos testes que ofereçam elevada sensibilidade e especificidade para detecção correta de animais sintomáticos e assintomáticos para LV ainda se faz necessária (Regina-Silva *et al.*, 2014). Vale ressaltar que estudos realizados em torno da questão da eutanásia dos animais doentes, demonstraram que essa medida não obteve sucesso em países no qual foi implementada, justificados em parte pela alta prevalência e incidência de infecções nesses locais, pela dificuldade em diagnosticar esses animais doentes devido à ausência de testes diagnósticos confiáveis, bem como pela rapidez com que os cães submetidos ao procedimento foram substituídos por outros animais susceptíveis (Gharbi *et al.*, 2015; Gomez e Picado, 2017; Dantas-Torres *et al.*, 2018).

Todavia, alguns estudos ainda sugerem que devido ao caráter zoonótico do parasito, ao fato do cão atuar como o principal reservatório urbano da doença e, principalmente quando o animal está muito debilitado, apresentando lesões externas (Beugnet *et al.*, 2018) ou em contatos com indivíduos imunossuprimidos, deve-se considerar a pratica da eutanásia (Beugnet e Chomel, 2013).

2.9 Proteínas usadas no projeto

Para a validação deste estudo duas proteínas distintas, Quimera B1 e Quimera B2, foram avaliadas. A quimera B1 foi obtida a partir de proteínas identificadas em

uma abordagem imunoproteômica utilizando extratos de proteínas de promastigotas e amastigotas de *L. infantum*, juntamente com soros de cães com LV, tanto sintomáticos quanto assintomáticos. Os anticorpos presentes nos soros dos animais identificaram proteínas do parasito que poderiam ser promissoras para melhorar o diagnóstico da LVC (Coelho *et al.*, 2012).

Nesse contexto, algumas proteínas foram testadas individualmente em suas formas recombinantes para avaliação de sua função biológica. A LiHyD (XP_001468360.1), uma proteína hipotética específica de *Leishmania*, foi analisada como um marcador diagnóstico para LVC, e resultados bem-sucedidos foram obtidos (Lage *et al.*, 2016). Outra proteína também identificada, o fator liberador de histamina dependente de IgE (HRF; XP_001465979.1), exibiu valores elevados de sensibilidade e especificidade para o diagnóstico da LVC (Coelho *et al.*, 2016). Uma proteína hipotética específica das formas amastigotas de *Leishmania*, denominada LiHyP1 (XP_001468941.1), que apresenta homologia com a família de genes da super-oxigenase, também foi bem avaliada para o diagnóstico da LVC (Martins *et al.*, 2013).

A proteína β -tubulina (XP_001468164.1), também reconhecida no referido estudo de imunoproteômica, foi avaliada em sua versão recombinante para o diagnóstico da leishmaniose, demonstrando bons resultados (Duarte *et al.*, 2015). As sequências de aminoácidos das quatro proteínas analisadas para construção da quimera B1 são mostradas abaixo:

-Proteína hipotética - LiHyP1 (XP_001468941.1)

MSIVSRFIGGAKHLLKGGSMKYLAAGEPYCPFGEAFGLTILPEYILEDASNLKRGYV
DVYTRASDRIILNDGRFQLPPLPPASFMPLLERLEQDNVVPKNWLNNQTANLYEPG
DFIRAHIDNLFVYDDIFAICSLGSNCLLRFVHVQNGEELDVMVPDRSVYIMSGPARYV
YFHMVLPVEAQRFSLVFRRSIME SDGGFRPVKTPFKEIMPYRATQILNALYSKQVGG
VRVSVDDDFLESANIGAFDTSRWVKRLHPLRDWSLLRQLDEDEARVEELREKRFID
VDFSWRYRELRSYYKAMEESLVSPHVAHVTPQA

-Fator liberador de histamina dependente de IgE - HRF (XP_001465979.1)

MKIFKDVLTGSEVVCDNDPCFDVEGDIMYVVNGRYIDVGGEDYGISANVDEDAEAG
ATGEVAEGKERVVVDVYNNRYTETSYDKASYMAHIRSYMKQLLEKIENEEERKVFQ

TNAAAFVKKVLKDIDEYQFFIPEGNDEDPDNGMIVLCRWDGETPRFYFWKDGLKGE
RV

-Beta-tubulina (XP_001468164.1)

MREIVSCQAGQCGNQIGSKFWEVIADEHGVDP TGSYQGDSDLQLERINVYFDESA
GGRYVPRAVLMDLEPGTMDSVRAGPYGQLFRPDNFIFGQSGAGNNWAKGHYTEG
AELIDSVLDVCRKEAESCDCLQGFQLSHSLGGGTGSGMGTLLISKLREEYPDRIMM
TFSVIPSPRVSDTVVEPYNTTSLVHQLVENSDESMCIDNEALYDICFRTLKLTPTFG
DLNHLVAAVMSGVTCCLRFPQGQLNSDLRKLAVNLVPFPRLHFFMMGFAPLTSRGS
QQYRGLSVAELTQQMFDANKMMQAADPRHGRYLTASALFRGRMSTKEVDEQMLN
VQNKNSSYFIEWIPNNIKSSICDIPPKGLKMSVTFIGNNTCIQEMFRRVGEQFTGMFR
RKAFLHWYTGEGMDEMEFTEAESNMNDLVSEYQQYQDATVEEEGEYDEEEEAY

-Proteína hipotética - LiHyD (XP_001468360.1)

MQMQGNMYPRQMEWAVHQQQPQSMQGNRQAVASRAYHLEPISTMQLRQQRGS
MPGMMIGQQPGGGMMDGLSTYGPRPMIRDVQDGHMGPQQADAARAAGYGTQG
MYGSHLMSYGAAGMGGVNNLQNGNAALFAAGSAGQASEGNSINFNGIFNSAVNP
QVQSSVAVQDDGKPLPFPPGNLLAQYPPEYQQQLIFYRLLRLQYPELYQQYVDYY
VMYYEPLYHPAPSSLSKDDLNGGQQRKKEPLLQQTQRAHMQRQQPAMPQPGYQP
PPPMEHALPSEVMCRTTSNLGGGLKRQSSLRQNSMRRNEVNQLKNEGSLKRLPS
MRQQ

Por fim, a proteína quimérica B1, composta pelos sete epítopos específicos originados a partir das proteínas de origem LiHyD (Lage *et al.*, 2016); HRF (Coelho *et al.*, 2016); LiHyP1 (Martins *et al.*, 2013) e β -tubulina (Duarte *et al.*, 2015), foi avaliada no sorodiagnóstico da LVC:

VPRAVLMDLEPGTMGGYEPGDFIRAHIDNLGGCPFDVEGDIMYVVNGRYIDVGGED
YGISAGGIGQQPGGGMMDGLSGGLPVEAQRFSLVFRRGGDVQDGHMGPQQADA
GGAKNMMQAADPRHGR

Por outro lado, a proteína quimérica B2 é composta por sete epítopos específicos selecionados a partir de proteínas que foram testadas anteriormente, sendo estas: proteína hipotética (XP_001568689.1); enolase (XP_001563419.1); e triparedoxina peroxidase (XP_001563558.1), que foram avaliadas individualmente por

ELISA para o diagnóstico de LT e demonstraram resultados promissores (Duarte *et al.*, 2015). Em outro estudo, a proibitina (XP_001568126.1) também foi avaliada para o diagnóstico de LV e LT e os resultados mostraram altos valores de sensibilidade e especificidade para o diagnóstico sorológico (Rodrigues *et al.*, 2019).

Dessa forma, nesse estudo, foram previstos epítomos específicos de células B nas sequências de aminoácidos dessas quatro proteínas que foram utilizadas para construir o gene que codifica a proteína quimérica B2. A proteína recombinante B2 foi expressa, purificada e avaliada em ELISA para o diagnóstico de LT e LV humana. Além disso, os próprios epítomos de células B usados para construir a quimera B2 foram sintetizados e testados nos ensaios sorológicos, assim como o SLA, que foi usado como controle. A sequência de aminoácidos da quimera B2 é mostrada abaixo:

IQFSDSIKRFNELDCEGGGFSGDSSESYSLSDNSSKVDDRIKLGGLVSIEDPFAEDN
FDEFGGAFRISDPPQYSRVVPAGGIAKTLRDHGNGRYYLDSDSLYVNGG
KGDATMKPERQASIEGGEIGSASKYGYSGWA

Em suma, as quimeras foram avaliadas quanto à sua eficácia no diagnóstico das leishmanioses. Elas foram construídas com base em epítomos específicos de proteínas previamente identificadas, buscando melhorar a sensibilidade e a especificidade dos testes diagnósticos. Por meio das proteínas quimeras recombinantes; o estudo visou contribuir para o desenvolvimento de métodos diagnósticos mais precisos, essenciais para o controle e tratamento dessas doenças em regiões endêmicas.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Desenvolver e avaliar duas proteínas quiméricas recombinantes baseadas em epítomos específicos de linfócitos B de proteínas presentes nas espécies *Leishmania infantum* e *Leishmania braziliensis* para avaliar o potencial diagnóstico das leishmanioses tegumentar e visceral no homem e no cão.

3.2 Objetivos Específicos

- Identificar, por bioinformática, epítomos específicos de linfócitos B para a construção dos genes quiméricos. Clonar, expressar e purificar as proteínas polipeptídicas;
- Avaliar a reatividade por ELISA de soros de cães com LV sintomática e assintomática e amostras de outras classes de soros, como de animais saudáveis vacinados e de animais infectados com *Trypanossoma cruzi*, *Babesia canis* e *Ehrlichia canis*, usando a proteína quimérica B1 comparada ao SLA do parasito *L. infantum* e ao kit comercial para o diagnóstico da LVC;
- Avaliar a reatividade por ELISA de um painel sorológico humano, frente à proteína quimera B2, peptídeos sintéticos e SLA do parasito *L. infantum* e *L. braziliensis*;
- Avaliar a sensibilidade e especificidade da proteína B1 no diagnóstico da LVC, bem como da quimera B2 no diagnóstico da LT e LV humana;
- Avaliar o papel prognóstico da quimera B2 usando amostras de soro coletadas de pacientes com LV e LT, antes e após o tratamento.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEUA) e Humana da UFMG

Os projetos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEUA) da UFMG com número de protocolo 144/2020 e pelo Comitê de Ética em Seres Humanos da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG; Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil), registrado sob o protocolo número CAAE-32343114.9.0000.5149. Ressalta-se que, neste segundo projeto, todos os pacientes receberam uma cópia individual da política do estudo e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido, antes da coleta de sangue. Assim sendo, os procedimentos descritos neste estudo estão de acordo com os padrões éticos do comitê de pesquisa institucional e/ou nacional e com a declaração de Helsinki de 1964 e suas emendas posteriores ou padrões éticos comparáveis.

4.2 Amostras de soros

4.2.1 Soros de cães

Para a avaliação da antigenicidade da proteína quimérica B1, 190 amostras de soros de cães (*Canis familiaris*), machos (n=111) e fêmeas (n=79) de diferentes raças e idades, provenientes de área endêmica para LV (Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil), foram utilizadas. As amostras foram oriundas de um banco de soros localizado no Laboratório do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da UFMG, onde estão armazenadas a -80°C. Para a confirmação da infecção por *L. infantum* nos animais sintomáticos e assintomáticos, foi realizada a técnica de PCR convencional nas amostras de aspirados de medula óssea desses animais, conforme descrito em outro estudo (Reis *et al.*, 2013). Além da confirmação da infecção por meio da técnica de PCR, os cães sintomáticos (n=25) apresentavam três ou mais dos seguintes sinais clínicos: alopecia; onicogribose; hepatomegalia; conjuntivite; adenopatia; dermatite esfoliativa no nariz, cauda e ponta das orelhas; perda de peso; esplenomegalia e azotemia renal. Enquanto os animais assintomáticos (n=25), não apresentavam sinais da doença.

Soros de cães saudáveis que vivem em áreas endêmicas (n=30; Belo Horizonte) ou não endêmicas (n=25; Poços de Caldas, Minas Gerais, Brasil) para LVC

também foram utilizados. Esses animais não apresentavam sinais clínicos de LVC, além de exibirem resultados parasitológicos (PCR) e sorológicos negativos (kit EIE-CVL®, BioManguinhos, Rio de Janeiro, Brasil). Adicionalmente, também foram utilizados soros de cães saudáveis imunizados com a vacina comercial Leish-Tec® (n=25), bem como de animais infectados experimentalmente com *Ehrlichia canis* (n=25), *Babesia canis* (n=15) ou *Trypanosoma cruzi* (n=20). Todos os animais foram mantidos isolados em canil para evitar o contato com vetores transmissores da doença.

4.2.2 Soros humanos

Amostras de soros de pacientes com LC (n = 25; incluindo 17 homens e 8 mulheres, com idades entre os 31 e 59 anos); LM (n = 25; incluindo 19 homens e 6 mulheres, com idades variando de 26 a 61 anos) e LV (n = 25; incluindo 14 homens e 11 mulheres, com idades variando de 30 a 66 anos), todos residentes em área endêmica da doença (Belo Horizonte, MG), foram usadas. Destaca-se que nenhum dos pacientes foi tratado antes da coleta da amostra. O diagnóstico de LC e LM foi realizado pelo exame clínico e detecção do kDNA de *L. braziliensis* em biópsias de pele (LC) e/ou fragmentos de mucosa (LM) por meio da técnica de PCR. Por outro lado, a LV foi diagnosticada por exame clínico e detecção de kDNA de *L. infantum* em baço e/ou aspirados de medula óssea por PCR de acordo com o descrito por Cota *et al.*, 2013. Para tal, o DNA foi extraído das amostras usando o Mini Kit QIAamp® DNA Blood (Qiagen®, MD, EUA). O material foi purificado, analisado por espectrofotometria e diluído em água ultrapura estéril. Os primers 5'-GGGKAGGGGCGTTCTSCGAA-3' (*Forward*) e 5'-SSSWCTAWTTACACCAACCCC-3' (*Reverse*) foram usados para amplificar uma região de kDNA conservada do parasito, contendo 150 pares de bases nas amostras coletadas de pacientes com LC, LM e LV. Adicionalmente, o DNA extraído de cepas de referência para LT (MHOM/BR/2002/LPC-RPV) e LV (MHOM/BR/1974/PP75) foi utilizado como controle positivo, enquanto água ultrapura estéril foi utilizada como controle negativo. Os seguintes reagentes foram usados nas reações: 2 mM MgCl₂, 200 µM dNTP, 0,6 µM de cada iniciador (Sigma-Aldrich, EUA), 1 UI Taq DNA polimerase e tampão específico (Invitrogen, EUA) e 20 ng DNA.

4.2.3 Outras amostras humanas

Amostras de soro coletadas de indivíduos saudáveis e de pacientes com outras doenças (n=145) também foram usadas nos ensaios sorológicos. Os soros foram coletados de indivíduos saudáveis residentes em áreas endêmicas de leishmaniose (n = 35, incluindo 19 homens e 16 mulheres, com idades variando de 25 a 53 anos; Belo Horizonte), que não apresentavam sinais clínicos da doença. Também foram utilizadas amostras de pacientes com doença de Chagas (n = 25, incluindo 14 homens e 11 mulheres, com idades variando de 28 a 60 anos), diagnosticados por hemocultura e kit ELISA recombinante Chagatest® v.4.0 (Wiener lab., Rosário, Argentina); bem como de pacientes com hanseníase (n = 25, sendo 12 homens e 8 mulheres, com idade variando de 35 a 55 anos), diagnosticados pelo teste rápido ML Flow positivo; aspergilose (n = 10, incluindo 8 homens e 7 mulheres, com idade variando de 34 a 60 anos), diagnosticada pela detecção de hifas fúngicas no exame histopatológico; paracoccidioidomicose (n = 10, 6 homens e 4 mulheres com idades variando de 31 a 57 anos), diagnosticada por exame clínico e cultura *Paracoccidioides* positiva ; e histoplasmose (n = 10; incluindo 6 homens e 9 mulheres, com idades variando de 30 a 56 anos), diagnosticados pelo isolamento do fungo em cultura de lavado broncoalveolar e/ou sangue total. Além disso, soros de pacientes infectados por HIV (n = 20, incluindo 12 homens e 8 mulheres, com idades variando de 24 a 51 anos), que foram diagnosticados por exame clínico e contagem de células T CD4⁺ e determinação da carga viral, também foram empregados nos experimentos.

4.3 Coleta de amostras antes e após o tratamento

Para análise da reatividade humoral contra os antígenos antes e após a terapêutica, coletou-se soro de pacientes com LM (n = 15) e LV (n = 10) antes e seis meses após o tratamento, que foi realizado com antimoniais pentavalentes (Sanofi Aventis Farmacêutica Ltda., Suzano, São Paulo, Brasil) na dose de 20 mg Sb⁺⁵ por kg durante 30 dias. Ressalta-se que não havia nenhum paciente sofrendo de outra infecção ou que possuía qualquer doença pré-existente. Desse modo, após o término do tratamento, os pacientes estavam livres de quaisquer sinais de leishmaniose, sendo diagnosticados como clinicamente curados.

4.4 Parasitos e preparo do extrato solúvel de *Leishmania*

Os extratos antigênicos solúveis de *Leishmania* (SLA) foram produzidos de acordo com o descrito por Coelho *et al.*, 2003. As cepas de *L. infantum* (MHOM/BR/1970/BH46) e de *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2904) foram mantidas em meio de cultura Schneider's completo, constituído pelo meio (Sigma, St. Louis, MO, EUA) acrescido com 20% de soro fetal bovino (SFB) inativado (20%; FBS, Sigma-Aldrich, EUA), L-glutamina 20 mM, 200 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, em pH 7,4; e incubada a 24°C. Decorridos seis dias de cultivo e sendo constatada a viabilidade e a ausência de agentes contaminantes, as formas promastigotas em fase estacionária de crescimento foram quantificadas em câmara de Neubauer, sendo ajustadas para uma concentração de 2×10^8 promastigotas por mL. Para o preparo do SLA, os parasitos foram centrifugados por 15 min, a 2.000 x g e a 4°C (modelo Z300K - Hermle Labortechnik GmbH). O *pellet* foi lavado em 5 mL de solução salina tamponada com fosfato estéril (PBS 1x) e centrifugado a 2.000 x g por 10 min a 4°C. O processo de lavagem foi realizado por 3 vezes. Após a última centrifugação, o sobrenadante foi descartado, o *pellet* foi ressuspendido em 5 mL de PBS 1x e submetido a um processo de choque térmico em nitrogênio líquido e banho maria a 37°C, por 5 ciclos alternados. Em seguida, o lisado foi sonicado em cinco ciclos de 30 seg, com intervalos de 30 seg e amplitude de 38 MHz. O produto da lise foi centrifugado a 10.000 x g durante 15 min e a fração antigênica solúvel, que corresponde ao SLA, foi coletada. A concentração de proteínas foi estimada pelo método colorimétrico do Ácido Bicinconínico (BCA), utilizando o kit BCA Protein Assay Reagent (Thermo Scientific, Waltham, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras foram armazenadas a -80°C, até o momento do uso.

4.5 Mapeamento de epítomos específicos de células B para construção das quimeras

4.5.1 Quimera B1

Os epítomos específicos de células B das proteínas LiHyp1 (XP_001468941.1), HRF (XP_001465979.1), β -tubulina (XP_001468164.1) e LiHyD (XP_001468360.1) foram preditos usando os programas SwissProt (web.expasy.org/docs/swiss-prot) e IEDB (www.iedb.org), nos quais a sequência de aminoácidos na estrutura primária da proteína mais provável de ser acessível, foi identificada aplicando os seguintes parâmetros: *Window Size of 12* e *Threshold of 1.0*. Os aminoácidos considerados

positivos foram marcados na estrutura da proteína, e o programa ABCpred (www.imtech.res.in/raghava/abcpred/) foi utilizado para predizer os epítomos lineares, quando foram aplicados os seguintes parâmetros: *Window Size* de 16 e *Threshold* de 0,85. Neste caso, as sequências que apresentaram valores acima de 0,85 foram consideradas positivas, e os aminoácidos foram marcados na estrutura da proteína. Aqueles considerados positivos em ambas as análises foram usados para construir o epítomo de célula B de cada proteína. Nesse contexto, sete epítomos foram identificados e posteriormente ligados por meio de resíduos de glicina para evitar a sobreposição espacial dos peptídeos. A estrutura secundária da quimera B1 foi predita usando o programa JPRED (Drozdetskiy *et al.*, 2015), enquanto que as características físico-químicas foram avaliadas pelo programa Protparam (Gasteiger *et al.*, 2005).

4.5.2 Quimera B2

As sequências de aminoácidos de proteínas expressas nas espécies de *L. braziliensis*: proibitina (XP_001568126.1); hipotética (XP_001568689.1), enolase (XP_001563419.1) e triparedoxina peroxidase (XP_001563558.1), foram avaliadas para prever epítomos de células B, usando os servidores SwissProt (web.expasy.org/docs/swiss-prot) e IEDB (www.iedb.org), nos quais a sequência de aminoácidos na estrutura primária da proteína mais provável de ser acessível, foi identificada aplicando os seguintes parâmetros: *Window Size* de 12 e *Threshold* de 1.0. Os aminoácidos considerados positivos foram marcados na estrutura da proteína, e o programa ABCpred (www.imtech.res.in/raghava/abcpred/) foi utilizado para predizer os epítomos lineares, quando foram aplicados os seguintes parâmetros: *Window Size* de 16 e *Threshold* de 0,85. Neste caso, as sequências que apresentaram valores acima de 0,85 foram consideradas positivas, e os aminoácidos foram marcados na estrutura da proteína. Aqueles considerados positivos em ambas as análises foram usados para definir o epítomo de célula B de cada proteína. Nesse contexto, sete epítomos foram identificados e posteriormente ligados por meio de resíduos de glicina para evitar a sobreposição espacial dos peptídeos e fornecer flexibilidade à proteína. A estrutura secundária da quimera B2 foi predita usando o servidor JPRED (Drozdetskiy *et al.*, 2015). O servidor ProtParam (Gasteiger *et al.*, 2005) foi utilizado para avaliar as

características físico-químicas da proteína quimérica, enquanto o servidor PepCalc (www.pepcalc.com) foi utilizado para avaliar a solubilidade da proteína. Os sete peptídeos selecionados também foram sintetizados pela técnica F-moc (Machado-de-Avila, 2011). Em resumo, os peptídeos foram separados da resina de amina utilizando ácido trifluoracético e removedores adequados. Em seguida, foram diluídos em água milli-Q e submetidos à um processo de purificação utilizando cromatografia líquida de alta eficiência em uma coluna de fase reversa C18, com uma vazão de 1,0 mL/min. Para verificar a pureza dos peptídeos, foi realizado o ensaio MALDI-TOF-TOF.

4.6 Expressão e purificação das quimeras B1 e B2

O gene que codifica as proteínas polipeptídicas B1 e B2 foram sintetizados comercialmente no vetor pET28a-TEV (Genscript®, EUA) e bactérias *Escherichia coli* Artic Express (DE3, Agilent) foram transformadas com os respectivos plasmídeos. As bactérias foram cultivadas em meio Luria-Bertani (LB), em shaker (Cientec Equipamentos Científicos Ltda. 2005), sob agitação, a 200rpm, juntamente com 20 µg/mL de gentamicina e canamicina 40 µg/mL (Sigma-Aldrich, EUA), até a densidade ótica (DO) da cultura alcançar aproximadamente uma leitura de 0,6, em comprimento de onda de 600 nm, quando uma alíquota de 1 mL foi removida, sendo correspondente ao tempo não induzido. Seguidamente, as culturas foram induzidas com 1.0 mM de isopropil β-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG; Promega, Montreal, Canadá), por 24 h a 12°C e após a indução, alíquotas de 1 mL foram retiradas para confirmação da expressão em gel SDS-PAGE. Posteriormente, as células foram colhidas por centrifugação a 3.000 x g por 10 min a 4°C. A lise dos pellets foi realizada em solução, contendo 0,25 mg/mL de lisozima, 20mM de Tris, 0,5M de NaCl, 5 mM de imidazol, 8M de uréia e 1 mM β-mercaptoetanol (adquiridos de Sigma-Aldrich, EUA). Então, os lisados foram sonificados em banho de gelo (7 pulsos de 30 seg a 36MHz, com intervalos de 30 seg), seguidos por seis ciclos de congelamento em nitrogênio líquido a -196°C e descongelamento em banho-maria a 37°C. As amostras foram centrifugadas a 14.000 x g por 40 min e depois armazenada a 4°C. As proteínas quiméricas foram expressas com cauda de seis resíduos de histidina e purificadas através de cromatografia de afinidade em coluna de níquel nitrilotriacético (Ni-NTA) (GE Healthcare Life Sciences, EUA). Para isso, o sobrenadante foi carregado em uma coluna Ni-NTA, que foi pré-equilibrada com solução contendo 20 mM de Tris, 0,5M de

NaCl, 5 mM de imidazol, 8M de uréia e 1 mM β -mercaptoetanol (adquiridos de Sigma-Aldrich, EUA) e, em seguida, conectado a um sistema AKTA. A quimera foi eluída usando o mesmo tampão mais imidazol 400 mM. As frações eluídas foram concentradas em filtro centrífugo Amicon® ultra-15, com limite de peso molecular nominal de 10.000 (NMWL, Millipore, Alemanha), e posteriormente purificado em uma coluna de filtração em gel Superdex™ 200 (GE Healthcare, EUA). Sais e imidazol foram removidos por diálise usando PBS. As quimeras foram passadas por uma coluna de polimixina-agarose (Sigma-Aldrich, EUA) para remover qualquer conteúdo residual de endotoxina (Quantitative Chromogenic Kit Limulus Amebocyte Assay QCL-1000, BioWhittaker, MD, EUA). As proteínas purificadas B1 e B2 foram aplicadas em gel SDS-PAGE a 12%, no qual utilizou-se um padrão PageRuler (Invitrogen™, Life Technologies, EUA) para confirmação do peso molecular das proteínas B1 e B2 e, então, a amostra foi alíquotada e estocada a -80°C, até o momento do uso.

4.7 Eletroforese em gel de poliacrilamina SDS-PAGE

As amostras obtidas nos ensaios de expressão e purificação foram submetidas à separação por eletroforese em géis desnaturantes (SDS-PAGE 12%) em sistema de eletroforese vertical, Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell (BioRad). Os géis de separação foram preparados utilizando as soluções Bis-acrilamida 40%, diluída a 12,5% v/v e 1,5 M de Tris-HCl pH 8.8, 0,4% de SDS. A polimerização dos géis ocorreu com a adição de 0,5% (v/v) de persulfato de amônio e 0,05% (v/v) de NNN'N'-tetrametiletenodiamina (TEMED). Os géis de concentração foram preparados de modo semelhante aos de separação, porém a 4% de Bis-Acrilamida e com solução 0,5 M de Tris-HCl, pH 6.8. As amostras foram diluídas na proporção de 5:1 em tampão de amostra 6x (125 mM Tris hidroximetil aminometano, SDS 2% v/v, Azul de Bromofenol, Glicerol P.A. 60% v/v e β -mercaptoetanol 10% v/v). As amostras com tampão foram aquecidas a 100°C durante 5 minutos para a desnaturação das proteínas e, posteriormente, aplicadas 36 μ L no gel para a separação eletroforética. A eletroforese foi realizada utilizando tampão de corrida (25 mM de Tris-HCl, 192 mM de glicina, 0,1% de SDS e água destilada q.s.p.), sob à voltagem de 70 Volts até que as amostras entrassem o gel separador e, em seguida, a 150 Volts. Após a corrida, os géis foram incubados com solução corante Coomassie Blue (Coomassie Brilliant Blue R-250 0,1% p/v, Coomassie Brilliant Blue G-250 0,1% p/v, Metanol 50% v/v, Ácido

acético 10% v/v e água destilada) e, em seguida, descorados por lavagens sucessivas em solução descorante (ácido acético 10%, metanol 30% e água destilada 60%), possibilitando a visualização das bandas proteicas no gel.

4.8 Ensaios de Western-blotting usando a quimera B1

Experimentos de *Western-blotting* foram realizados como descrito por Towbin *et al.* (1979), com modificações. Para tal, após o preparo do gel SDS-PAGE, no qual foram aplicados 10 µg da proteína, foi realizada a transferência para membranas de nitrocelulose (NC, poro de 0,2 µm, Millipore) em tampão de transferência (0,192 M glicina, 0,025 M tris e metanol 20%), a 100 V por 1 h e 30 min. As membranas foram bloqueadas com PBS-T 1x (PBS 1x, pH 7,4 e Tween 20 a 0,05% v/v), e albumina bovina a 5%, por 1 h a 37°C, e posteriormente, lavadas com PBS-T 1x. As membranas foram incubadas individualmente frente a um pool de soros de cães com LV ou não infectados (ambos diluídos 1:100 em solução PBS-T 1x). Em seguida, as membranas foram lavadas e incubadas com anticorpo secundário específico (anti-IgG total de cão) conjugado à enzima peroxidase (Sigma-Aldrich), diluído em PBS-T 1x (1:20.000) e incubados 1h a 37°C. Após realização de duas lavagens com PBS-T 1x, seguida por duas lavagens de PBS 1x, o substrato (cloronaftol 6,25 mg, metanol 4%, diaminobenzidina 12,5 mg, 20 µL de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 20 vols. e PBS 1x para um volume final de 25 mL) foi acrescentado para a revelação da reação. A reação foi interrompida com água destilada e as membranas foram secas em papel de filtro. Como um controle de proteína, um anticorpo monoclonal anti-HisTag (catálogo MA1-21315; Thermo Fisher Scientific, EUA) também foi adicionado.

4.9 ELISA

4.9.1 ELISA para o diagnóstico da LVC

Para avaliar a antigenicidade da proteína B1 e do SLA de *L. infantum*, curvas de titulação foram realizadas para determinar a melhor concentração da quimera recombinante ou do SLA, bem como a melhor diluição dos conjugados a serem utilizados nos testes sorológicos. Placas de microtitulação para ELISA de 96 poços (JetBiofil®, China) foram sensibilizadas com 0.5 e 1.0 µg/poço de proteína quimérica ou SLA de *L. infantum*, respectivamente. Os antígenos foram diluídos em 100 µL de tampão (carbonato de sódio 0,1M e bicarbonato de sódio 0,05 M, pH 9,6) e incubadas

durante 16 h a 4°C. O bloqueio da placa foi realizado usando 250 µl de PBS 1x mais Tween 20 a 0,05% (PBS-T) combinado com 5% de albumina de soro bovino durante 1 h e a 37°C. Após 5 lavagens, as placas foram incubadas com 100 µL dos soros individuais (em duplicata) a uma diluição de 1:100 de soro canino em tampão de incubação (TI – solução de lavagem acrescida de 0,05% de albumina bovina). As amostras permaneceram em incubação durante 1 h e a 37°C e então as placas foram lavadas novamente por 5 vezes. Os anticorpos anti-IgG (Anticorpo Anti-IgG. St. Louis: Sigma-Aldrich), conjugados à peroxidase, foram utilizados em uma diluição de 1:5.000, diluídos em TI e aplicados 100 µL por poço, permanecendo em incubação à 37°C por 1 h. As placas foram lavadas por 5 vezes e incubadas com 100 µL da solução reveladora (10 mL de tampão citrato-fosfato (Na₂HPO₄ 24 mM e ácido cítrico 17,5 mM para 1 L de água destilada, pH 5,0); 2 mg de orto-fenilenodiamina (OPD) (St. Louis: Sigma-Aldrich) e 2 µL de H₂O₂ durante 30 min e protegido da luz. A reação de revelação foi interrompida adicionando-se 25 µL de solução de ácido sulfúrico (H₂SO₄) a 3 M e a leitura foi realizada em espectrofotômetro (Molecular Devices, Spectra Max Plus, Canadá), no comprimento de onda de 492 nm. *Pool/s* positivos e negativos foram utilizados como controles.

4.9.2 ELISA para o diagnóstico da LT e LV humana

Para avaliar a antigenicidade da proteína B2, dos peptídeos sintéticos bem como do SLA de *L. infantum* e SLA de *L. braziliensis*, curvas de titulação foram previamente realizadas para determinar a melhor concentração destes, e também a melhor diluição dos conjugados a serem utilizados nos testes sorológicos. Para isso, foram testadas diferentes concentrações de antígenos (0,10 µg–20,0 µg), bem como concentrações de amostras de soro (1:100 a 1:1000) e anticorpo secundário anti-IgG humano conjugado com peroxidase (1:2500 a 1: 40.000). Nesse contexto, placas de microtitulação para ELISA de 96 poços (JetBiofil®, China) foram sensibilizadas com 0,25 µg/poço de proteína quimera B2; 0,5 µg/poço de cada peptídeo sintético; e 1,0 µg/poço de SLA. Os antígenos foram diluídos em 100 µL de tampão (carbonato de sódio 0,1M e bicarbonato de sódio 0,05 M, pH 9,6) e incubadas durante 16 h a 4°C. O bloqueio da placa foi realizado usando 250 µl de PBS 1x mais Tween 20 a 0,05% (PBS-T) combinado com 5% de albumina de soro bovino (BSA) durante 1 h e a 37°C. Após 5 lavagens com PBS-T, as placas foram incubadas com 100 µL dos soros

individuais (em duplicata) a uma diluição de 1:100 de soro para peptídeos sintéticos e SLA, e 1:200 para quimera B2, em tampão de incubação (TI – solução de lavagem acrescida de 0,05% de albumina bovina). As amostras permaneceram em incubação durante 1 h e a 37°C e então as placas foram lavadas novamente por 5 vezes. Os anticorpos anti-IgG peroxidase humana (Anticorpo Anti-IgG humano-peroxidase produzido por Sigma: A6029. St. Louis: Sigma Aldrich), foram utilizados em uma diluição de 1:10.000 para peptídeos sintéticos e SLA, e 1:20.000 para quimera B2, diluídos em TI e aplicados 100 µL por poço, permanecendo em incubação à 37°C por 1 h. As placas foram lavadas por 5 vezes e incubadas com 100 µL da solução reveladora (10 mL de tampão citrato-fosfato (Na_2HPO_4 24 mM e ácido cítrico 17,5 mM para 1 L de água destilada, pH 5,0); 2 mg de orto-fenilenodiamina (OPD) (St. Louis: Sigma-Aldrich) e 2 µL de H_2O_2 durante 30 min e protegido da luz. A reação de revelação foi interrompida adicionando-se 25 µL de solução de ácido sulfúrico (H_2SO_4) a 2 M e a leitura foi realizada em espectrofotômetro (Molecular Devices, Spectra Max Plus, Canadá), no comprimento de onda de 492 nm. As amostras de soro foram avaliadas no mesmo dia a fim de reduzir a variação experimental.

4.10 Kit comercial para LVC

A eficácia comparativa da quimera B1 foi avaliada com o kit EIE-CVL®, (kit EIE-CVL®, BioManguinhos, Rio de Janeiro, Brasil) que é preparado com extrato antigênico bruto do parasito e foi utilizado neste estudo de acordo com as normas do fabricante. Foram avaliadas amostras de soro de cães com LV sintomáticos (n=25) e assintomáticos (n=25).

4.11 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas no software Graph Pad Prism (versão 6.0 para Windows). O ponto de corte dos experimentos para cada antígeno testado foi estabelecido usando Curvas *Receiver Operator characteristic* (ROC) que foram construídas e usadas para avaliar a acurácia dos antígenos. Tabelas de contingência e o teste de Fisher foram utilizados para comparar os resultados obtidos para cada antígeno, os quais foram estimados pela avaliação de seus percentuais de sensibilidade diagnóstica (DSe%), porcentagem de especificidade diagnóstica (DSp%), valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN), área sob a

curva (AUC) e razão de verossimilhança (LR). Intervalos de confiança (IC) foram calculados usando um nível de confiança de 95% (IC 95%). As diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme regem as normas gerais do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical da UFMG, segundo a Resolução nº 02/2013, de 18 de setembro de 2013, os resultados e discussão deste relatório serão apresentados sob a forma de dois artigos científicos já publicados nas revistas *Veterinary Parasitology* e *Microbial Pathogenesis*.

5.1 Apresentação do artigo “*Serodiagnosis of canine leishmaniasis using a novel recombinant chimeric protein constructed with distinct B-cell epitopes from antigenic Leishmania infantum proteins*” publicado na revista *Veterinary Parasitology*. Neste trabalho, a proteína quimera B1 foi avaliada em ELISA para o diagnóstico da LV canina.

5.2 Apresentação do artigo “*Evaluation from a B-cell epitope-based chimeric protein for the serodiagnosis of tegumentary and visceral leishmaniasis*” publicado na revista *Microbial Pathogenesis*. Neste trabalho, a proteína quimera B2 foi avaliada em ELISA para o diagnóstico da LV e LT humana.



Contents lists available at ScienceDirect

Veterinary Parasitology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vetpar

Research paper

Serodiagnosis of canine leishmaniasis using a novel recombinant chimeric protein constructed with distinct B-cell epitopes from antigenic *Leishmania infantum* proteins

Danniele L. Vale^a, Daniela P. Lage^a, Amanda S. Machado^a, Camila S. Freitas^a, Daysiane de Oliveira^b, Nathália C. Galvani^a, Bruna B. Fernandes^b, Gabriel P. Luiz^b, Jamil S. Oliveira^c, João A. Oliveira-da-Silva^a, Fernanda F. Ramos^a, Thaís T.O. Santos^a, Williane F. Siqueira^d, Livia A. Alves^e, Miguel A. Chávez-Fumagalli^f, Danielle F. de Magalhães-Soares^g, Julia A.G. Silveira^d, Lílian L. Bueno^{a,d}, Ricardo T. Fujiwara^{a,d}, Ricardo A. Machado-de-Ávila^b, Vívian T. Martins^a, Eduardo A. F. Coelho^{a,h,*}

^a Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 30130-100, Minas Gerais, Brazil

^b Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, 88806-000, Santa Catarina, Brazil

^c Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 31270-901, Minas Gerais, Brazil

^d Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 31270-901, Minas Gerais, Brazil

^e Secretaria Municipal de Saúde, Prefeitura Municipal de Igarapé, Igarapé, Minas Gerais, Brazil

^f Universidad Católica de Santa María, Urb. San José S/N, Umacollo, Arequipa, Peru

^g Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 31270-901, Minas Gerais, Brazil

^h Departamento de Patologia Clínica, COLTEC, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 31270-901, Minas Gerais, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Visceral leishmaniasis

Dogs

Recombinant chimera

Commercial kit

Serodiagnosis

ELISA

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis (VL) is an important public health problem in the world, and control measures are insufficient to avoid the spread of this neglected disease. Dogs are important domestic reservoirs of *Leishmania* parasites in countries where VL is a zoonosis, representing a major source of infection between sand fly vectors and humans. In this context, a precise diagnosis of canine leishmaniasis (CanL) could help to reduce the number of human cases. Distinct approaches for the diagnosis of CanL have used recombinant proteins in serological assays. However, variable results of the antigens have been found, mainly to diagnosis asymptomatic cases. The present study used bioinformatics to select specific B-cell epitopes of four *Leishmania infantum* proteins, which had previously been proven to be antigenic in VL, aiming to produce a novel chimeric protein and to evaluate it for the diagnosis of CanL. Seven B-cell epitopes were identified and used to construct the chimera, which was analyzed in a recombinant format through an ELISA assay against a canine serological panel. A soluble *Leishmania* antigenic extract (SLA) was used as an antigen control. Results showed 100 % sensitivity and specificity for chimera, while when using SLA the values were 26.0 % and 96.4 %, respectively. The performance of chimera was compared with a commercial kit using asymptomatic and symptomatic dog sera, and the data showed that no false-negative result was found when the recombinant protein was used. However, when using the commercial kit, 40.0 % and 16.0 % of the false-negative results were found, respectively. In conclusion, the recombinant chimera showed an antigenic potential to be evaluated in new studies against a larger serological panel for the diagnosis of CanL.

* Corresponding author at: Laboratório de Pesquisa do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Prof. Alfredo Balena, 190, 30130-100, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

E-mail address: eduardoferrazcoelho@yahoo.com.br (E.A.F. Coelho).

<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2021.109513>

Received 24 April 2021; Received in revised form 25 June 2021; Accepted 26 June 2021

Available online 1 July 2021

0304-4017/© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Visceral leishmaniasis (VL) is a neglected tropical disease that presents a significant impact on global public health, where 0.5 million new cases are registered per year (WHO, 2018). In the Americas, the infection is caused by the parasite *Leishmania infantum*, with dogs being the main domestic reservoirs and representing the major source of infection for sand fly vectors (Alvar et al., 2004; Giunchetti et al., 2006). Measures to control disease dissemination have not contributed to a reduction in the number of human cases (Dantas-Torres et al., 2019). In addition, canine leishmaniasis (CanL) presents a more relevant epidemiological context due to the higher number of the canine disease cases, when compared to human VL, and, in this context, the improvement in diagnosis of CanL is urgently required to avoid the spread of disease for both mammalian hosts (Costa et al., 2018; Ribeiro et al., 2018).

The diagnosis of CanL is conducted by means of serological, molecular, and parasitological tests, with parasitological methods being the reference standard. However, in endemic areas, serological tests can be better used in epidemiological surveys to facilitate diagnosis (Borja et al., 2018; Pessoa-E-Silva et al., 2019). In this context, recombinant proteins have overcome the limitations for VL diagnosis in the serological assays due to the use of crude antigen extracts, and such antigens have been tested in prototypes to detect humoral reactivity in *L. infantum*-infected dogs (Souza et al., 2012; Fraga et al., 2014; Oliveira et al., 2015; Coelho et al., 2016; Dias et al., 2018). Otherwise, commercial kits have been produced to detect CanL; however, although they present high sensitivity to detect symptomatic cases, the sensitivity is reduced when asymptomatic animals are evaluated, due to the lower presence of specific antibodies in the sera of these animals (Costa et al., 2013; Souza-Filho et al., 2016), which is an important problem due to the higher prevalence of asymptomatic disease among the infected animals. In addition, these kits present also cross-reactions, mainly when sera samples from dogs infected by other pathogens, such as *Trypanosoma cruzi*, *Ehrlichia canis* and *Toxoplasma gondii*, among others, are evaluated (Troncarelli et al., 2009; Pessoa-E-Silva et al., 2019).

In an immunoproteomic approach performed in *L. infantum* promastigote and amastigote protein extracts with the sera of asymptomatic and symptomatic VL dogs, animal antibodies identified parasite proteins that could be considered for the improvement of the diagnosis of VL (Coelho et al., 2012). In fact, some of these proteins were individually tested in recombinant formats for this biological purpose. LiHyD (XP_001468360.1), a *Leishmania*-specific hypothetical protein, was evaluated as a diagnostic marker for CanL, and successful results were obtained (Lage et al., 2016). Another protein, the IgE-dependent histamine-releasing factor (HRF; XP_001465979.1), was also identified in the study and showed high values of sensitivity and specificity for the diagnosis of CanL (Coelho et al., 2016). A hypothetical *Leishmania* amastigote-specific protein, called LiHyp1 (XP_001468941.1), which presents homology to the super-oxygenase gene family, was also well-evaluated for the diagnosis of CanL (Martins et al., 2013). The β -tubulin (XP_001468164.1) protein also identified in the cited immunoproteomics study was evaluated in a recombinant version for the diagnosis of leishmaniasis (Duarte et al., 2015).

Based on the possibilities to construct novel recombinant proteins for the diagnosis of CanL, chimeric proteins have shown advantages when compared to the use of individual proteins, since they are single molecules consisting of distinctly specific B-cell epitopes of different parasite proteins (Boarino et al., 2005; Santos et al., 2020). In this context, chimera could help to improve the sensitivity and specificity of the tests, mainly by eliminating the presence of other undesired dominant epitopes. Therefore, in the present study, specific B-cell epitopes were selected from amino acid sequences of the four *L. infantum* proteins (LiHyD, LiHyp1, HRF, and β -tubulin). The gene codifying a novel chimeric protein was designed, and the protein was expressed, purified, and evaluated as a CanL marker. In addition, the performance of this chimeric protein was compared with a commercial kit to identify

asymptomatic and symptomatic cases of the disease.

2. Materials and methods

2.1. Ethics

The Ethical Handling of Research Animals (CEUA) from the Federal University of Minas Gerais (UFMG; Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil) approved this study with the protocol number 144/2020.

2.2. Dog samples

The sample size consisted of 190 dogs (*Canis familiaris*), consisting of males (n = 111) and females (n = 79) of different breeds and ages, which were collected from an endemic area of VL (Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil). The samples used here were derived from a sera bank located at the Laboratory of the Post-Graduate Program in Health Sciences: Infectious Diseases and Tropical Medicine at the UFMG School of Medicine, where they were stored at -70°C . A conventional PCR technique was used to confirm the *L. infantum* infection in both asymptomatic and symptomatic animals, when their blood and/or bone marrow samples were collected and applied in the tests, according to that described elsewhere (Reis et al., 2013). Briefly, L150/L152 primers were used to amplify the conserved region of the *Leishmania* kDNA minicircle, and the reaction consisted of a 1x buffer (10 mM Tris-HCl plus 50 mM KCl pH 8.8), 1.5 mM MgCl_2 , 0.2 mM dNTP, 1.0 pmol of each primer, 0.76 U Taq polymerase, 1.0 μL DNA, and milli-Q water, added to a final volume of 12.5 μL . PCR amplification was performed in a 96-well Thermal Cycler (Applied Biosystems), using the program: initial denaturation for 6 min at 96°C , followed by 40 cycles of 30 s at 93°C , 30 s at 64°C , and 30 s at 72°C , with a final extension for 7 min at 72°C . In addition to the confirmation of infection provided by the PCR technique, symptomatic dogs (n = 25) presented three or more of the following clinical signals: alopecia; onychogryposis; hepatomegaly; conjunctivitis; adenopathy; exfoliative dermatitis on the nose, tail, and ear tips; weight loss; splenomegaly; lymphadenomegaly; and renal azotemia. Otherwise, asymptomatic animals (n = 25) presented no sign of disease. Sera from healthy dogs living in endemic (n = 30; Belo Horizonte) or non-endemic (n = 25; Poços de Caldas, Minas Gerais, Brazil) areas of CanL were also used. These animals presented no sign of CanL and showed negative parasitological (PCR technique) and serological (EIE-CVL® kit, BioManguinhos, Rio de Janeiro, Brazil) results. In addition, sera of healthy dogs immunized with Leish-Tec® vaccine (n = 25), as well as from those experimentally infected with *Ehrlichia canis* (n = 25), *Babesia canis* (n = 15), or *Trypanosoma cruzi* (n = 20), all of which were maintained in kennels to avoid their contact with transmitting vectors of disease, were also used.

2.3. Parasite and preparation of the *Leishmania* antigen

Leishmania infantum (MOM/BR/1970/BH46) stationary promastigotes were maintained in Schneider's medium (Sigma, St. Louis, MO, USA), together with inactivated fetal bovine serum (20 %; FBS, Sigma-Aldrich, USA), 20 mM L-glutamine, 200 U/mL penicillin, and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin, pH 7.4, at 24°C . The soluble *Leishmania* antigenic extract (SLA) was prepared according to that described elsewhere (Coelho et al., 2009). For this, stationary promastigotes (2×10^8 cells) were maintained in complete Schneider's medium and submitted to five alternating cycles of freezing and thawing, using liquid nitrogen and water bath, respectively. Parasites were additionally ruptured by sonication in an Ultrasonic processor (GEX600 model), where five cycles of 30 s at 38 MHz were applied. The material was centrifuged at $10,000 \times g$ for 15 min at 4°C , at which time the *L. infantum* SLA present in the supernatant was collected, and the protein concentration was estimated by the Bradford method (Bradford, 1976).

2.4. Bioinformatics for the mapping of B-cell epitopes to construct the chimera

B-cell epitopes of the LiHyp1 (XP_001468941.1), HRF (XP_001465979.1), β -tubulin (XP_001468164.1), and LiHyD (XP_001468360.1) proteins were predicted using the SwissProt (web. expasy.org/docs/swiss-prot) and IEDB (www.iedb.org) programs, in which the amino acid sequence in the protein primary structure that was most likely to be accessible was identified by applying the following parameters: Window Size of 12 and Threshold of 1.0. The amino acids considered positive were marked in the protein structure, and the ABCpred (www.imtech.res.in/raghava/abcpred/) program was used to predict the linear epitopes, when the following parameters were applied: Window Size of 16 and Threshold of 0.85. In this case, sequences presenting values above 0.85 were considered positive, and the amino acids were marked in the protein structure. Those considered positive in both analyses were used to construct the B-cell epitope of each protein. In this context, seven epitopes were identified and subsequently linked with glycine residues to avoid the spatial overlap between them, and the secondary structure of the chimera was predicted using the JPRED program (Drozdetskiy et al., 2015), while the physical-chemical characteristics were calculated by the Protparam program (Gasteiger et al., 2005).

2.5. Expression and purification of recombinant chimera

The gene encoding the chimeric protein was commercially synthesized in the pET28a-TEV vector (Genscript®, USA), and Artic Express cells were transformed with it. Bacteria were grown in Luria-Bertani (LB) medium, together with 100 μ g/mL ampicillin (Sigma-Aldrich, USA), until reaching the optical density value of 0.600 at 600 nm, when the expression of recombinant protein was induced by adding 1 mM isopropyl β -D-thiogalactopyranoside (IPTG; Promega, Montreal, Canada), for 4 h at 12 °C. Cells were then harvested by centrifugation at 3,000 $\times$ g for 10 min at 4 °C, and the pellet was lysed in PBS containing 0.25 mg/mL lysozyme, 25 U/mL benzonase nuclease, 10 mM imidazol, 1 mM PMSF, and 2 mM β -mercaptoethanol (all purchased from Sigma-Aldrich, USA). Lysates were sonicated seven times in an ice bath for 30 s each (36 MHz), with a 30 s rest, followed by six cycles of freezing (liquid nitrogen, -196 °C) and thawing (water bath, +37 °C), at which time they were stored at 4 °C. The chimeric protein was expressed as a 6-His tagged protein and purified in a nickel nitrilotriacetic (Ni-NTA) column (GE Healthcare Life Sciences, USA). For this, the supernatant was loaded into a Ni-NTA column, which was pre-equilibrated with PBS, containing 10 mM imidazole, 1 mM PMSF, and 2 mM β -mercaptoethanol, and then connected to an AKTA system. The chimera was eluted using the same buffer plus 400 mM imidazole. The eluted fractions were concentrated in Amicon® ultra-15 centrifugal filter, with a 10,000 nominal molecular weight limit (NMWL, Millipore, Germany), and further purified on a Superdex™ 200 gel-filtration column (GE Healthcare, USA). Salts and imidazole were removed by dialysis using PBS. The chimera was passed through a polymyxin-agarose column (Sigma-Aldrich, USA) in order to remove any residual endotoxin content (Quantitative Chromogenic Limulus Amebocyte Assay QCL-1000 kit, BioWhittaker, MD, USA). An SDS-12 % PAGE gel was performed to evaluate the purity of the purified protein, and a low range PageRuler Unstained Protein Ladder (Invitrogen™, Life Technologies, USA) was used as a molecular weight control.

2.6. ELISA experiments

To perform the ELISA experiments using the chimera and *L. infantum* SLA, previous titration curves were performed to determine the antigen concentration and antibody dilution to be used. In this context, the concentrations of 0.5 and 1.0 μ g per well, respectively, were used to coat microtiter immunoassay plates (Jetbiofil®, Belo Horizonte), when

antigens were diluted in coating buffer (100 μ L; 50 mM carbonate buffer pH 9.6) and incubated for 16 h at 4 °C. Next, free binding sites were blocked using PBS-T (250 μ L; phosphate buffer saline plus Tween 20 0.05 %), together with 5% bovine serum albumin for 1 h at 37 °C. Next, plates were washed five times with PBS-T and incubated with dog sera (100 μ L, 1:100 diluted in PBS-T) for 1 h at 37 °C. Plates were subsequently washed with PBS-T and incubated with anti-mouse IgG peroxidase conjugated antibody (1:5,000 diluted in PBS-T) for 1 h at 37 °C. Next, plates were washed with PBS-T and reactions were developed by incubation with a solution (100 μ L per well) composed of H₂O₂ (2 μ L), ortho-phenylenediamine (2 mg), and citrate-phosphate buffer (10 mL), at pH 5.0 for 30 min in the dark. Next, these reactions were stopped by adding 2 N H₂SO₄ (25 μ L per well), when the optical density (OD) values were read in a spectrophotometer (Molecular Devices, Spectra Max Plus, Canada) at 492 nm. Experiments were performed on the same day, aiming to reduce the experimental variation and interference in the interpretation of data.

2.7. Immunoblottings assays

An SDS-12 % PAGE gel was performed applying the chimera (10 μ g), which was then blotted onto a nitrocellulose membrane (0.2 μ m pore size, Sigma-Aldrich, USA). Next, membranes were blocked with PBS-T plus 5% (v/v) bovine serum albumin and incubated for 1 h at 37 °C before undergoing the first incubation with VL (n = 4) and healthy (n = 4) dog serum pools, which were both 1:100 diluted in PBS-T. Membranes were washed with PBS-T, and an anti-dog IgG peroxidase conjugated antibody was added (1:20,000 diluted in PBS-T; Sigma-Aldrich, USA), and an incubation was performed for 1 h at 37 °C. Reactions were developed by adding chloronaphthol, diaminobenzidine, and H₂O₂ for 30 min, and were stopped by using distilled water. Like a protein control, an anti-HIS Tag monoclonal antibody (catalog MA1-21315; Thermo Fisher Scientific, USA) was also added.

2.8. Commercial kit for the diagnosis of CanL

The EIE-CVL® kit (BioManguinhos, Rio de Janeiro, Brazil), which is prepared using a parasite crude antigenic extract, was used in our study according to manufacturer instructions. Serum samples of symptomatic and asymptomatic VL dogs (n = 25 in both cases) were evaluated against the kit to compare its efficacy with that obtained using the recombinant chimera.

2.9. Statistical analysis

The individual OD values obtained for each sample in the serological assays were analyzed by GraphPad Prism™ (version 6.0 for Windows) and Receiver Operating Characteristic (ROC) curves were constructed to calculate the sensitivity (Se), specificity (Sp), area under the curve (AUC), confidence intervals (CI) with a 95 % confidence level (95 % CI), positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV), and Youden index (Y). The cut-off values for each tested antigen were determined by using ROC curves and were defined based on the Youden index, which provided the maximum sensitivity and specificity values. Differences were considered significant with $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Bioinformatics, construction of chimera, and immunoblottings

The following B-cell epitopes were identified by bioinformatics assays in the four target proteins: YEPGDFIRAHIDNL and LPVEAQRFSLVFRR for LiHyp1, CFPDVEGDIMYVVN-GRYIDVGGEDYGISA for HRF, VPRAVLMDLEPGTM and AKNMM-QAADPRHGR for β -tubulin, and IGQQPGGGMMDGSL and DVQDGHMGPQQADA for LiHyD. The secondary structure of the

chimera was predicted using the JPRED program (Fig. 1). The presence of alpha-helix is indicated in red color, while beta-leaves are represented in blue color. The figure also shows the confidence estimate for the epitope prediction, indicating that high values represent high confidence for the prediction. The physical-chemical parameters were calculated and showed that the chimera presents 125 amino acid residues and a molecular weight of 13.04 kDa. The instability index showed that the protein is stable in *in vivo* and *in vitro* conditions, and the aliphatic index indicated that it is also thermostable. The protein was submitted to an SDS-12 % PAGE gel (Fig. 2A), where its purity was visualized, and immunoblottings demonstrated that the chimera was recognized by a VL dog serum pool but not through the healthy dog serum pool (Fig. 2B).

3.2. Diagnostic evaluation of CanL

The diagnostic efficacy of the chimera was evaluated by means of ELISA experiments. Results showed that the protein was identified by all sera from asymptomatic and symptomatic VL dogs, with Se and Sp values, as well as from PPV and NPV, of 100 % in all cases (Table 1). *L. infantum* SLA used as a comparative antigen showed Se and Sp values of 26.0 % and 96.4 %, respectively. Such a fact was mainly based on the weak reactivity of this antigen extract being identified by asymptomatic dogs sera. The PPV and NPV values were of 72.2 % and 78.5 %, respectively. In addition, the individual OD values in reaction against the chimera and SLA are also shown (Fig. 3).

3.3. Testing the specific-chimera ELISA reactivity against a commercial kit

The performance of the chimeric protein was compared to the EIE-CVL® kit to detect asymptomatic and symptomatic CanL cases. Results showed that, when asymptomatic dog samples were evaluated against the chimera and commercial kit, the positivity was found in 25 and 15 sera samples (n = 25), respectively, resulting in 0 % and 40.0 % of false-negative results (Table 2). Testing symptomatic dog samples, the positivity was found in 25 and 21 sera samples (n = 25), respectively, resulting in 0 % and 16.0 % of false-negative results (Table 3).

4. Discussion

An immunoproteomics approach performed in *L. infantum* antigenic extracts against sera samples from asymptomatic and symptomatic CanL identified parasite proteins that could be tested as diagnostic antigens for disease (Coelho et al., 2012). In fact, identified antigens, such as LiHyD, LiHyp1, HRF, and β -tubulin were individually tested as recombinant proteins for the diagnosis of canine and/or human disease, and results were satisfactory (Martins et al., 2013; Duarte et al., 2015;

Coelho et al., 2016; Lage et al., 2016). Hence, our purpose was to select specific B-cell epitopes of these four parasite proteins, aiming to construct a novel synthetic gene, as well as to express and purify the recombinant chimeric protein and analyze it within the diagnosis of CanL context.

With the performed experiments, high and specific reactivity was found when testing *L. infantum*-infected dogs sera. In addition, low cross-reactivity was observed when sera from healthy dogs or those presenting CanL-related diseases were tested in the serological experiments. The performance of chimera was compared with a commercial kit in order to identify asymptomatic and symptomatic CanL cases, and results showed a better performance for the recombinant antigen, when compared to results obtained using the commercial kit, thus demonstrating the feasibility to test this novel protein in future studies for a sensitive and specific diagnosis of CanL.

Symptomatic CanL causes severe disease in the infected animals, where a usually high parasite load is found in distinct organs (Gonçalves et al., 2019). In addition, a suppressed immune response in such animals is also found (Reis et al., 2009). However, most of the infected dogs remain asymptomatic for months or years, although they are potential sources of parasites for the vectors and represent a risk for ongoing transmission to humans (Lopes et al., 2020). Otherwise, the diagnostic tools for CanL present high accuracy to diagnose symptomatic cases, but the asymptomatics are poorly diagnosed by such tests (Carvalho et al., 2018). In this context, problems still remain to reach a sensitive and specific diagnosis of CanL in order to detect both clinical conditions.

Some studies have suggested that the combination of B-cell epitopes derived from parasite proteins used to create chimeric proteins could induce to the improvement of a CanL diagnosis (Soto et al., 1998; Boarino et al., 2005). This strategy has been also applied for the diagnosis of other diseases, such as malaria (Garcia et al., 2013), toxoplasmosis (Dai et al., 2012), tuberculosis (Cheng et al., 2011), Chagas Disease (Camussone et al., 2009), and dengue (Tripathi et al., 2007). The present study described a bioinformatics approach to select specific B-cell epitopes from four *Leishmania* proteins, which proved to be antigenic in VL, aiming to construct a new molecule with the potential to diagnose CanL. The construct was based on an *in silico* gene design and experimental data, and results obtained against our serological panel showed that this new recombinant antigen was able to detect, with high Se and Sp values, the symptomatic and asymptomatic animals, as well as to differentiate them from the healthy dogs or those presenting cross-reactive diseases, such as ehrlichiosis, babesiosis, and Chagas Disease. The use of chimeric proteins can enhance the diagnostic potential for diseases, since these molecules are composed of joined antigenic fragments representing multiple proteins to create a new polypeptide-based product (Santos et al., 2020). In addition, this new antigen will be chemically improved, since undesired epitopes found in protein native conformations are eliminated from these new constructs,

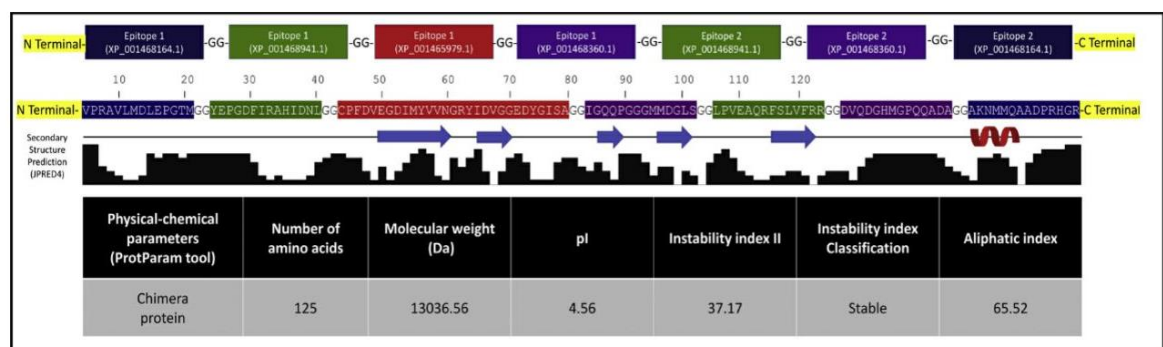


Fig. 1. Bioinformatics to evaluate the chimera construction. The schematic representation of the chimeric protein is shown, with the respective specific B-cell epitopes used to construct it, as well as the amino acid sequence of the protein. The presence of the alpha-helix is indicated in red, while beta-leaves are represented in blue. In addition, the physical-chemical characteristics of the protein are also shown.

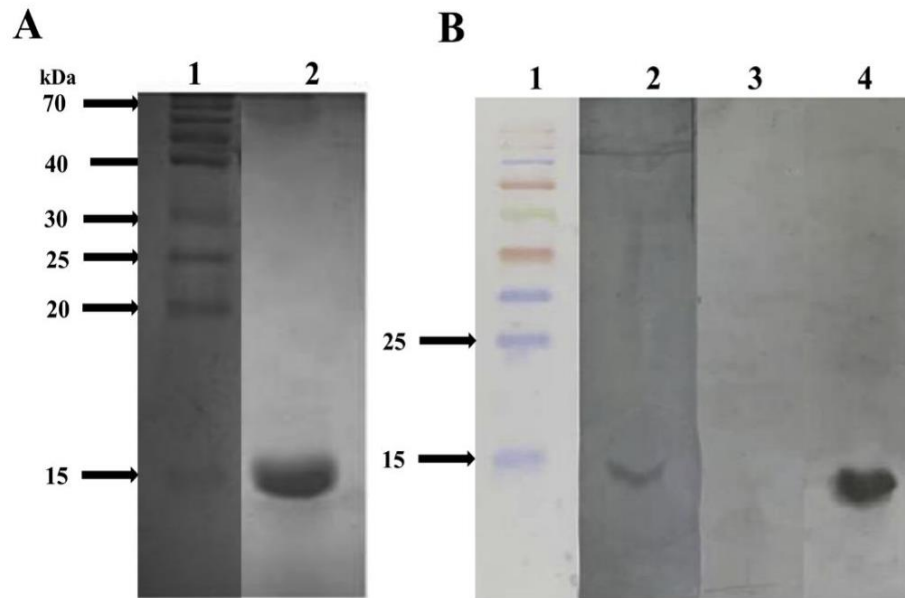


Fig. 2. Expression and purification of the recombinant B-cell chimera. In A, an SDS-12 % PAGE gel was performed to verify the purity and quality of the recombinant protein. The low range PageRuler Unstained Protein Ladder (Invitrogen™, Life Technologies, USA) was used (lane 1), and the purified protein is shown (lane 2). In B, an immunoblotting experiment was performed. The Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, USA) was used (lane 1). The recombinant chimera (10 µg) was blotted onto a nitrocellulose membrane and incubated with the CanL (lane 2) and healthy (lane 3) dog serum pools, all diluted 1:100 in PBS-T. An anti-HIS Tag monoclonal antibody (catalog MA1-21315; Thermo Fisher Scientific, USA) was used as the control (lane 4).

Table 1

Serological assays employing the recombinant chimera and the parasite antigenic extract. Serum samples from asymptomatic (n = 25) and symptomatic (n = 25) VL dogs, as well as from non-infected dogs living in endemic (n = 30) or non-endemic (n = 25) areas of disease; sera from *Trypanosoma cruzi* (n = 20), *Babesia canis* (n = 15), or *Ehrlichia canis*-infected (n = 25) dogs; and samples of Leish-Tec®-vaccinated animals (n = 25) were evaluated in ELISA experiments against the recombinant chimera and *L. infantum* SLA. The optical density values were used to calculate the sensitivity (Se), specificity (Sp), confidence interval (95 % CI), positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV), and Youden index (Y).

Antigen	Sensitivity	95 %CI	Specificity	95 %CI	PPV	95 %CI	NPV	95 %CI	Y
Chimera	100	92.89–100	100	97.40–100	100	92.89–100	100	97.40–100	1.00
SLA	26.00	14.63–40.34	96.43	91.86–98.83	72.22	46.52–90.31	78.49	71.59–84.38	0.22

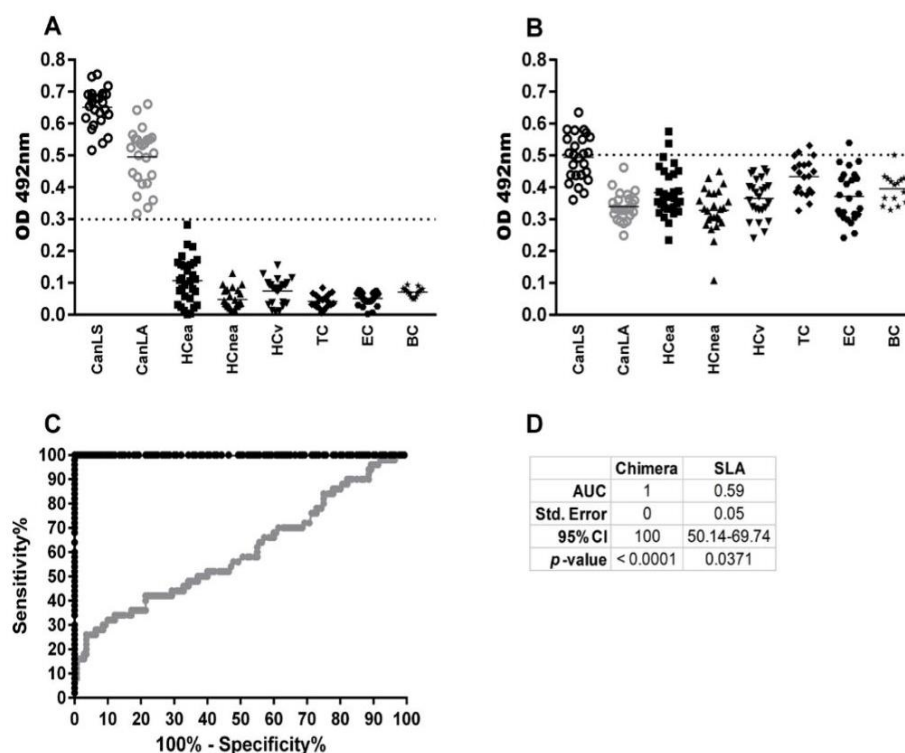


Fig. 3. Diagnostic evaluation for canine leishmaniasis. ELISA experiments were performed with serum samples from asymptomatic (CanL_A; n = 25) and symptomatic (CanL_S; n = 25) VL dogs, as well as from non-infected dogs living in endemic (HC_{ea}; n = 30) or non-endemic (HC_{nea}; n = 25) areas of disease, besides the sera from *Trypanosoma cruzi*- (TC; n = 20), *Babesia canis* (BC; n = 15), or *Ehrlichia canis*-infected (EC; n = 25) dogs. Samples from Leish-Tec®-vaccinated animals (HC_v; n = 25) were also used. Reactions against the recombinant chimeric protein (A) and *L. infantum* SLA (B) are shown, as well as the Receiver Operator Curves (C), which were constructed using the discrimination between negative (healthy and cross-reactive sera) and positive (CanL sera) sample values. The cut-off values (dotted lines) were calculated by the ROC curves for each antigen and defined by the Youden index, which provided the maximum of Se and Sp values. The area under the curve (AUC), 95 % confidence interval (95 % CI), and p-value for each antigen are shown here (D).

Table 2
Comparative diagnostic performance of the chimera and commercial kit for asymptomatic canine leishmaniasis. Serum samples from asymptomatic dogs (n = 25) were reacted against the recombinant chimeric protein and EIE-CVL® kit (BioManguinhos, Rio de Janeiro, Brazil). The number and percentage of positive and negative cases were determined and values are shown.

Antigen	Positive/number of samples	Positive (%)	Negative/number of samples	Negative (%)
EIE-CVL® kit	15/25	60.0	10/25	40.0
Chimera	25/25	100	0	0

Table 3
Comparative diagnostic evaluation of the chimera and commercial kit for symptomatic canine leishmaniasis. Serum samples from symptomatic dogs (n = 25) were reacted against the recombinant chimera and EIE-CVL® kit (BioManguinhos, Rio de Janeiro, Brazil). The number and percentage of positive and negative cases were determined, and the values are shown here.

Antigen	Positive/number of samples	Positive (%)	Negative/number of samples	Negative (%)
EIE-CVL® kit	21/25	84.0	4/25	16.0
Chimera	25/25	100	0	0

making them more specific than parasite antigenic preparations and more sensitive than the use of single synthetic peptides or individual proteins, which tends to be more limited due to the scarcity of antigenic diversity (Soto et al., 1998; Boarino et al., 2005; Fraga et al., 2016).

Otherwise, an efficient diagnosis of CanL is relevant to aid in the control of human disease, since infected dogs are the main parasitic domestic reservoirs and contribute to transmission between sand flies and humans (Dantas-Torres et al., 2019). In this context, serological tests have been used for the detection of *Leishmania*-specific antibodies in host sera. These tests present advantages, such as, practicality, low cost, and standardization (Fraga et al., 2014; Oliveira et al., 2015; Coelho et al., 2016). However, serological methods present limitations that impair the definitive diagnosis of *L. infantum* infection in dogs, mainly when samples from asymptomatic animals with subclinical infection and/or presenting low titers of specific antibodies are evaluated, and false-negative results can be obtained (Fraga et al., 2016; Hosein et al., 2017; Solano-Gallego et al., 2017). In these cases, moderate to high antileishmanial antibody titers can take a longer period of time to increase, following the establishment of infection, or, in some cases, animals may never develop high titers in response to infection and never become clinically ill (Dye et al., 1993; Solano-Gallego et al., 2001). There are also cases where animals become transiently seropositive but never become infectious. In this context, additional studies are warranted, seeking to solve such important questions related to the use of serological tests, as well as to find a more suitable antigen able to identify asymptomatic and symptomatic dogs, and differentiate them from animals that present past infections and those cured by own their immune systems (Cardoso et al., 2007; Borja et al., 2018).

In addition, dog's vaccination along with the use of insecticide-impregnated collars represent important veterinary interventions which contribute to reducing *Leishmania* transmission, mainly in countries where VL is a zoonotic disease (Dantas-Torres et al., 2020). In this context, serological tests used to differentiate vaccinated and healthy dogs from infected dogs are important in the public health context in such regions (Costa et al., 2013). In our study, vaccinated dogs with a Brazilian commercial vaccine were not reactive against the recombinant chimera in the ELISA assays, thus suggesting that this antigen could help to perform such serological differentiation. In fact, vaccinated animals living in endemic areas of VL can be further infected, although they tend not to develop the disease. In this situation, they could be reactive when evaluated by serological methods and erroneously diagnosed with

false-positive results (Solano-Gallego et al., 2009; Velez et al., 2020). In this context, the clinical evaluation by trained professionals is also required to contribute to the diagnosis of CanL (Santarém et al., 2020). In our study, sera samples were collected from vaccinated animals that were living in well-controlled kennels to avoid their contact with *Leishmania* transmitting vectors. In this context, the data presented here suggest that the vaccine did not cause cross-reactivity with the recombinant chimera, thus highlighting the potential of this antigen for a sensitive and specific diagnosis of disease. However, additional studies aiming to evaluate the recombinant chimera against samples collected from vaccinated dogs living in endemic areas of VL are warranted, in an attempt to validate the findings related to the high Se and Sp values found in the present study so as to verify if such results will be also maintained in field conditions.

The EIE-LVC kit is a commercial test recommended by the Brazilian Ministry of Health for CanL diagnoses (Lira et al., 2006). Satisfactory results have been obtained when samples from symptomatic dogs are evaluated; however, studies have also shown a poor performance in detecting asymptomatic cases, as well as animal samples infected by other pathogens that present antigens that are cross-reactive with *Leishmania* parasites. In this context, the association of such kits with other diagnostic methods is employed mainly to reduce the incidence of false-negative or false-positive cases (Athanasίου et al., 2014; Dhom-Lemos et al., 2019; Basurco et al., 2020). In one study, the EIE-CVL® kit showed Se and Sp values of 72 % and 87.5 %, respectively, for the diagnosis of symptomatic CanL (Lira et al., 2006), while in another study these values were 93.8 % and 86.5 %, respectively (Dhom-Lemos et al., 2019). According to these data, in the present study, the occurrence of false-negative results was also observed, mainly when asymptomatic dog sera were evaluated. By contrast, when the recombinant chimeric protein was tested, all asymptomatic and symptomatic dog sera were reactive against it in an ELISA assay, suggesting a better diagnostic potential for this antigen, when compared to the use of a commercial kit.

Another important issue for a precise diagnosis of CanL is the cross-reactivity with sera samples from coinfections animals with *Leishmania*-related species (Alves et al., 2012; Pessoa-E-Silva et al., 2019). Our data showed that, when SLA was used as an antigen, moderate cross-reaction with serum samples from dogs infected with *E. canis*, *Babesia canis*, or *T. cruzi* was found. By contrast, when the chimera was used in the serological assays, no cross-reactivity was found. In this context, results suggest that the chimera-based ELISA provides good accuracy for the diagnosis of CanL, as well as in the differentiation of CanL-related disease dogs from *L. infantum*-infected dogs.

The absence of comparative ELISA assay using the own synthetic peptides that composed the recombinant chimeric protein, as well as the reduced sample size used in this study, are limitations of this work, since one could speculate about the necessity to test the chimera against a larger sample size obtained in field conditions from naturally infected dogs. However, the preliminary data presented here suggest that this novel recombinant protein, composed of seven specific B-cell epitopes of four parasite antigenic proteins, should be considered for future studies concerning its application in CanL diagnoses.

Author contributions

Conceived and designed the experiments: EAFC VTM RAMA DO NCG. Performed the experiments: DLV DPL ASM CSF BBF GPL JSO JAOS FFR TTOS WFS. Analyzed the data: EAFC RTF LLB MACF. Contributed reagents/materials/analysis tools: LAA DFMS JAGS LLB. Wrote the paper: EAFC VTM RAMA RTF.

Financial support

This work was supported by grant MR/R005850/1 from the Medical Research Council (Vaccine development for complex Intracellular neglected pAThogens - VALIDATE), UK, and grant APQ-408675/2018-7

from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil. The authors also thank the Brazilian agencies Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), CNPq and the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) for the student scholarships.

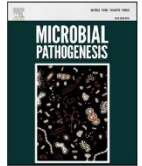
Declaration of Competing Interest

The authors hereby declare that they have no conflicts of interest.

References

- Alvar, J., Cañavate, C., Molina, R., Moreno, J., Nieto, J., 2004. Canine leishmaniasis. *Adv. Parasitol.* 57, 1–88.
- Alves, A.S., Mouta-Confort, E., Figueiredo, F.B., Oliveira, R.V., Schubach, A.O., Madeira, M.F., 2012. Evaluation of serological cross-reactivity between canine visceral leishmaniasis and natural infection by *Trypanosoma caninum*. *Res. Vet. Sci.* 93, 1329–1333.
- Athanasiou, L.V., Petanides, T.A., Chatzis, M.K., Kasabalis, D., Apostolidis, K.N., Saridomichelakis, M.N., 2014. Comparison of two commercial rapid in-clinic serological tests for detection of antibodies against *Leishmania* spp. in dogs. *J. Vet. Diagn. Invest.* 26, 286–290.
- Basurco, A., Natale, A., Capello, K., Fernández, A., Verde, M.T., González, A., Yzuel, A., Giner, J., Villanueva-Saz, S., 2020. Evaluation of the performance of three serological tests for diagnosis of *Leishmania infantum* infection in dogs using latent class analysis. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 29, e018020.
- Boarino, A., Scalone, A., Gradoni, L., Ferroglio, E., Vitale, F., Zanatta, R., Giuffrida, M.G., Rosati, S., 2005. Development of recombinant chimeric antigen expressing immunodominant B epitopes of *Leishmania infantum* for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 12, 647–653.
- Borja, L.S., Coelho, L.B., Jesus, M.S., Queiroz, A.T.L., Celedon, P.A.F., Zanchin, N.I.T., Silva, E.D., Ferreira, A.G.P., Krieger, M.A., Veras, P.S.T., Fraga, D.B.M., 2018. High accuracy of an ELISA test based in a flagella antigen of *Leishmania* in serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis with potential to improve the control measures in Brazil - a phase II study. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 12, e0006871.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Camussonne, C., Gonzalez, V., Belluzo, M.S., Pujato, N., Ribone, M.E., Lagier, C.M., Marcipar, I.S., 2009. Comparison of recombinant *Trypanosoma cruzi* peptide mixtures versus multi-epitope chimeric proteins as sensitizing antigens for immunodiagnosis. *Clin. Vaccine Immunol.* 16, 899–905.
- Cardoso, L., Schallig, H.D., Cordeiro-da-Silva, A., Cabral, M., Alunda, J.M., Rodrigues, M., 2007. Anti-*Leishmania* humoral and cellular immune responses in naturally infected symptomatic and asymptomatic dogs. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 117, 35–41.
- Carvalho, F.L.N., Riboldi, E.O., Bello, G.L., Ramos, R.R., Barcellos, R.B., Gehlen, M., Halon, M.L., Romão, P.R.T., Dallegrave, E., Rossetti, M.L.R., 2018. Canine visceral leishmaniasis diagnosis: a comparative performance of serological and molecular tests in symptomatic and asymptomatic dogs. *Epidemiol. Infect.* 146, 571–576.
- Cheng, Z., Zhao, J.W., Sun, Z.Q., Song, Y.Z., Sun, Q.W., Zhang, X.Y., Wang, H.H., Guo, X.K., Liu, Y.F., Zhang, S.L., 2011. Evaluation of a novel fusion protein antigen for rapid serodiagnosis of tuberculosis. *J. Clin. Lab. Anal.* 25, 344–349.
- Coelho, E.A.F., Ramírez, L., Costa, M.A.F., Coelho, V.T.S., Martins, V.T., Chávez-Fumagalli, M.A., Oliveira, D.M., Tavares, C.A., Bonay, P., Nieto, C.G., Abánades, D.R., Alonso, C., Soto, M., 2009. Specific serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis using *Leishmania* species ribosomal protein extracts. *Clin. Vaccine Immunol.* 16, 1774–1780.
- Coelho, V.T.S., Oliveira, J.S., Valadares, D.G., Chávez-Fumagalli, M.A., Duarte, M.C., Lage, P.S., Soto, M., Santoro, M.M., Tavares, C.A., Fernandes, A.P., Coelho, E.A., 2012. Identification of proteins in promastigote and amastigote-like *Leishmania* using an immunoproteomic approach. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6, e1430.
- Coelho, E.A., Costa, L.E., Lage, D.P., Martins, V.T., Garde, E., Jesus-Pereira, N.C., Lopes, E.G., Borges, L.F., Duarte, M.C., Menezes-Souza, D., Magalhães-Soares, D.F., Chávez-Fumagalli, M.A., Soto, M., Tavares, C.A., 2016. Evaluation of two recombinant *Leishmania* proteins identified by an immunoproteomic approach as tools for the serodiagnosis of canine visceral and human tegumentary leishmaniasis. *Vet. Parasitol.* 215, 63–71.
- Costa, D.N., Codeço, C.T., Silva, M.A., Werneck, G.L., 2013. Culling dogs in scenarios of imperfect control: realistic impact on the prevalence of canine visceral leishmaniasis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7, e2355.
- Costa, D.N.C.C., Bermudi, P.M.M., Rodas, L.A.C., Nunes, C.M., Hiramoto, R.M., Tolezano, J.E., Cipriano, R.S., Cardoso, G.C.D., Codeço, C.T., Chiaravalloti-Neto, F., 2018. Human visceral leishmaniasis and relationship with vector and canine control measures. *Rev. Saude Publica* 52, 92.
- Dai, J., Jiang, M., Wang, Y., Qu, L., Gong, R., Si, J., 2012. Evaluation of a recombinant multi-epitope peptide for serodiagnosis of *Toxoplasma gondii* infection. *Clin. Vaccine Immunol.* 19, 338–342.
- Dantas-Torres, F., Miró, G., Baneth, G., Bourdeau, P., Breitschwerdt, E., Capelli, G., Cardoso, L., Day, M.J., Dobler, G., Ferrer, L., Irwin, P., Jongejans, F., Kempf, V.A.J., Kohn, B., Lappin, M., Little, S., Madder, M., Maggi, R., Maia, C., Marcondes, M., Naucke, T., Oliva, G., Pennisi, M.G., Penzhorn, B.L., Peregrine, A., Pfeffer, M., Roura, X., Sainz, A., Shin, S., Solano-Gallego, L., Straubinger, R.K., Tasker, S., Traub, R., Wright, I., Bowman, D.D., Gradoni, L., Otranto, D., 2019. Canine leishmaniasis control in the context of one health. *Emerg. Infect. Dis.* 25, 1–4.
- Dantas-Torres, F., Nogueira, F.D.S., Menz, I., Tabanez, P., Silva, S.M., Ribeiro, V.M., Miró, G., Cardoso, L., Petersen, C., Baneth, G., Oliva, G., Solano-Gallego, L., Ferrer, L., Pennisi, M.G., Bourdeau, P., Maia, C., Otranto, D., Gradoni, L., Courtenay, O., Costa, C.H.N., 2020. Vaccination against canine leishmaniasis in Brazil. *Int. J. Parasitol.* 50, 171–176.
- Dhom-Lemos, L., Viana, A.G., Cunha, J.L.R., Cardoso, M.S., Mendes, T.A.O., Pinheiro, G.R.G., Siqueira, W.F., Lobo, F.P., Teles, L.F., Bueno, L.L., Guimarães-Carvalho, S.F., Bartholomeu, D.C., Fujiwara, R.T., 2019. *Leishmania infantum* recombinant kinesin degenerated derived repeat (rKDDR): a novel potential antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *PLoS One* 14, e0211719.
- Dias, D.S., Ribeiro, P.A.F., Salles, B.C.S., Santos, T.T.O., Ramos, F.F., Lage, D.P., Costa, L.E., Portela, A.S.B., Carvalho, G.B., Chávez-Fumagalli, M.A., Caligiore, R.B., Oliveira, J.S., Magalhães-Soares, D.F., Silva, E.S., Galdino, A.S., Menezes-Souza, D., Duarte, M.C., Gonçalves, D.U., Coelho, E.A.F., 2018. Serological diagnosis and prognostic of tegumentary and visceral leishmaniasis using a conserved *Leishmania* hypothetical protein. *Parasitol. Int.* 67, 344–350.
- Drozdzicki, A., Cole, C., Procter, J., Barton, G.J., 2015. JPred4: a protein secondary structure prediction server. *Nucleic Acids Res.* 43, W389–W394.
- Duarte, M.C., Pimenta, D.C., Menezes-Souza, D., Magalhães, R.D., Diniz, J.L., Costa, L.E., Chávez-Fumagalli, M.A., Lage, P.S., Bartholomeu, D.C., Alves, M.J., Fernandes, A.P., Soto, M., Tavares, C.A., Gonçalves, D.U., Rocha, M.O., Coelho, E.A., 2015. Proteins selected in *Leishmania (Viannia) braziliensis* by an immunoproteomic approach with potential serodiagnosis applications for tegumentary leishmaniasis. *Clin. Vaccine Immunol.* 22, 1187–1196.
- Dye, C., Vidor, E., Dereure, J., 1993. Serological diagnosis of leishmaniasis: on detecting infection as well as disease. *Epidem. Infect.* 110, 647–656.
- Fraga, D.B., Silva, E.D., Pacheco, L.V., Borja, L.S., Oliveira, I.Q., Coura-Vital, W., Monteiro, G.R., Oliveira, G.G., Jerônimo, S.M., Reis, A.B., Veras, P.S., 2014. A multicentric evaluation of the recombinant *Leishmania infantum* antigen-based immunochromatographic assay for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Parasit. Vectors* 7, 136.
- Fraga, D.B., Pacheco, L.V., Borja, L.S., Tuy, P.G., Bastos, L.A., Solcà, M.S., Amorim, L.D., Veras, P.S., 2016. The rapid test based on *Leishmania infantum* chimeric rK28 protein improves the diagnosis of canine visceral leishmaniasis by reducing the detection of false-positive dogs. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10, e0004333.
- Garcia, V.S., Gonzalez, V.D.G., Caudana, P.C., Vega, J.R., Marcipar, I.S., Gugliotta, L.M., 2013. Synthesis of latex-antigen complexes from single and multi-epitope recombinant proteins. Application in immunoagglutination assays for the diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 101, 384–391.
- Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., Ivanyi, I., Appel, R.D., Bairoch, A., 2005. ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res.* 31, 3784–3788.
- Giunchetti, R.C., Mayrink, W., Genaro, O., Carneiro, C.M., Corrêa-Oliveira, R., Martins-Filho, O.A., Marques, M.J., Tafuri, W.L., Reis, A.B., 2006. Relationship between canine visceral leishmaniasis and the *Leishmania (Leishmania) chagasi* burden in dermal inflammatory foci. *J. Comp. Pathol.* 135, 100–107.
- Gonçalves, A.A.M., Leite, J.C., Resende, L.A., Mariano, R.M.D.S., Silveira, P., Melo-Júnior, O.A.O., Ribeiro, H.S., Oliveira, D.S., Soares, D.F., Santos, T.A.P., Marques, A.F., Galdino, A.S., Martins-Filho, O.A., Dutra, W.O., Silveira-Lemos, D., Giunchetti, R.C., 2019. An overview of immunotherapeutic approaches against canine visceral leishmaniasis: what has been tested on dogs and a new perspective on improving treatment efficacy. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 9, 427.
- Lage, D.P., Martins, V.T., Duarte, M.C., Costa, L.E., Garde, E., Dimer, L.M., Kursancew, A.C., Chávez-Fumagalli, M.A., Magalhães-Soares, D.F., Menezes-Souza, D., Roatt, B.M., Machado-de-Ávila, R.A., Soto, M., Tavares, C.A., Coelho, E.A., 2016. A new *Leishmania*-specific hypothetical protein and its non-described specific B cell conformational epitope applied in the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Parasitol. Res.* 115, 1649–1658.
- Lira, R.A., Cavalcanti, M.P., Nakazawa, M., Ferreira, A.G.P., Silva, E.D., Abath, F.G.C., Alves, L.C., Souza, W.V., Gomes, Y.M., 2006. Canine visceral leishmaniasis: a comparative analysis of the EIE-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos and the IFI-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos kits. *Vet. Parasitol.* 137, 11–16.
- Lopes, J.V., Michalsky, E.M., Pereira, N.C.L., Paula, A.J.V., Souza, A.G.M., Pinheiro, L.C., Lima, A.C.V.M.R., Avelar, D.M., Franca-Silva, J.C., Lanzetta, V.A.S., Melo, J., Fortes-Dias, C.L., Dias, E.S., 2020. Canine visceral leishmaniasis in area with recent *Leishmania* transmission: prevalence, diagnosis, and molecular identification of the infecting species. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 53, e20200141.
- Martins, V.T., Chávez-Fumagalli, M.A., Costa, L.E., Canavaci, A.M., Martins, A.M., Lage, P.S., Lage, D.P., Duarte, M.C., Valadares, D.G., Magalhães, R.D., Ribeiro, T.G., Nagem, R.A., DaRocha, W.D., Régis, W.C., Soto, M., Coelho, E.A., Fernandes, A.P., Tavares, C.A., 2013. Antigenicity and protective efficacy of a *Leishmania* amastigote-specific protein, member of the super-oxygenase family, against visceral leishmaniasis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7, e2148.
- Oliveira, I.Q., Silva, R.A., Sucupira, M.V., Silva, E.D., Reis, A.B., Grimaldi, G.Jr., Fraga, D.B., Veras, P.S., 2015. Multi-antigen print immunoassay (MAPIA)-based evaluation of novel recombinant *Leishmania infantum* antigens for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Parasit. Vectors* 8, 45.
- Pessoa-E-Silva, R., Vaitkevicius-Antão, V., Andrade, T.A.S., Oliveira-Silva, A.C., Oliveira, G.A., Trajano-Silva, L.A.M., Nakasone, E.K.N., Paiva-Cavalcanti, M., 2019. The diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil: confronting old problems. *Exp. Parasitol.* 199, 9–16.

- Reis, A.B., Martins-Filho, O.A., Teixeira-Carvalho, A., Giunchetti, R.C., Carneiro, C.M., Mayrink, W., Tafuri, W.L., Corrêa-Oliveira, R., 2009. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 128, 87–95.
- Reis, L.E., Coura-Vital, W., Roatt, B.M., Bouillet, L.É., Ker, H.G., Fortes-de-Brito, R.C., Resende, D.M., Carneiro, M., Giunchetti, R.C., Marques, M.J., Carneiro, C.M., Reis, A.B., 2013. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: a comparative study of three methods using skin and spleen from dogs with natural *Leishmania infantum* infection. *Vet. Parasitol.* 197, 498–503.
- Ribeiro, R.R., Michalick, M.S.M., Silva, M.E., Santos, C.C.P., Frézard, F.J.G., Silva, S.M., 2018. Canine leishmaniasis: an overview of the current status and strategies for control. *Biomed. Res. Int.* 3296893.
- Santarém, N., Sousa, S., Amorim, C.G., Carvalho, N.L., Carvalho, H.L., Felgueiras, Ó., Brito, M., Silva, A.C., 2020. Challenges in the serological evaluation of dogs clinically suspect for canine leishmaniasis. *Sci. Rep.* 10, 3099.
- Santos, W.J.T., Tavares, D.H.C., Castro-Neto, A.L., Nascimento, M.B., Dhalia, R., Albuquerque, A.L., Costa, C.H.N., Magalhães, F.B., Rezende, A.M., Neto, O.P.M., 2020. Gene design, optimization of protein expression and preliminary evaluation of a new chimeric protein for the serological diagnosis of both human and canine visceral leishmaniasis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 14, e0008488.
- Solano-Gallego, L., Riera, C., Roura, X., Iniesta, L., Gallego, M., Valladares, J.E., Fisa, R., Castillejo, S., Alberola, J., Ferrer, L., Arboix, M., Portús, M., 2001. *Leishmania infantum*-specific IgG, IgG1 and IgG2 antibody responses in healthy and ill dogs from endemic areas: evolution in the course of infection and after treatment. *Vet. Parasitol.* 96, 265–276.
- Solano-Gallego, L., Koutinas, A., Miró, G., Cardoso, L., Pennisi, M.G., Ferrer, L., Bourdeau, P., Oliva, G., Baneth, G., 2009. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Vet. Parasitol.* 165, 1–18.
- Soto, M., Requena, J.M., Quijada, L., Alonso, C., 1998. Multicomponent chimeric antigen for serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *J. Clin. Microbiol.* 36, 58–63.
- Souza, C.M., Silva, E.D., Ano-Bom, A.P., Bastos, R.C., Nascimento, H.J., Silva-Junior, J. G., 2012. Evaluation of an ELISA for canine leishmaniasis immunodiagnostic using recombinant proteins. *Parasite Immunol.* 34, 1–7.
- Souza-Filho, J.A., Barbosa, J.R., Figueiredo, F.B., Mendes, A.A.J., Silva, S.R., Coelho, G. L., Marcelino, A.P., 2016. Performance of Alere immunochromatographic test for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Vet. Parasitol.* 225, 114–116.
- Tripathi, N.K., Shrivastva, A., Pattnaik, P., Parida, M., Dash, P.K., Gupta, N., Asha, M., Jana, P.V., Rao, L., 2007. Production of IgM specific recombinant dengue multiepitope protein for early diagnosis of dengue infection. *Biotechnol. Prog.* 23, 488–493.
- Troncarelli, M.Z., Camargo, J.B., Machado, J.G., Lucheis, S.B., Langoni, H., 2009. *Leishmania* spp. and/or *Trypanosoma cruzi* diagnosis in dogs from endemic and nonendemic areas for canine visceral leishmaniasis. *Vet. Parasitol.* 164, 118–123.
- Velez, R., Gállego, M., 2020. Commercially approved vaccines for canine leishmaniosis: a review of available data on their safety and efficacy. *Trop. Med. Int. Health* 25, 540–557.
- World Health Organization, 2018. Leishmaniasis, 2018. <http://www.who.int/topics/leishmaniasis/en/>.



Evaluation from a B-cell epitope-based chimeric protein for the serodiagnosis of tegumentary and visceral leishmaniasis

Danniele L. Vale^a, Amanda S. Machado^a, Fernanda F. Ramos^a, Daniela P. Lage^a, Camila S. Freitas^a, Daysiane de Oliveira^b, Nathalia C. Galvani^a, Gabriel P. Luiz^b, Mirian I. Fagundes^b, Bruna B. Fernandes^b, João A. Oliveira-da-Silva^a, Fernanda Ludolf^a, Grasielle S.V. Tavares^a, Nathalia S. Guimarães^a, Ana T. Chaves^a, Miguel A. Chávez-Fumagalli^c, Unaí Tupinambás^a, Manoel O.C. Rocha^a, Denise U. Gonçalves^a, Vívian T. Martins^a, Ricardo A. Machado-de-Ávila^b, Eduardo A.F. Coelho^{a,d,*}

^a Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 30130-100, Minas Gerais, Brazil

^b Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, 88806-000, Santa Catarina, Brazil

^c Computational Biology and Chemistry Research Group, Vicerrectorado de Investigación, Universidad Católica de Santa María, Urb. San José S/N, Umacollo, Arequipa, 04000, Peru

^d Departamento de Patologia Clínica, COLTEC, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 31270-901, Minas Gerais, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Leishmaniasis
Diagnosis
Chimeric protein
B-Cell epitopes
Sensitivity
Specificity

ABSTRACT

The diagnosis of leishmaniasis presents problems due to the variable sensitivity and/or specificity of tests. In addition, high levels of anti-parasite antibodies can remain after treatment, making it difficult to conduct a prognostic follow-up of patients. In this context, it is necessary to identify new candidates to be examined for the sensitive and specific diagnosis of the disease. In the present study, four *Leishmania* proteins, previously shown as antigenic for tegumentary leishmaniasis (TL), were evaluated, and their linear specific B-cell epitopes were predicted and used to generate a new gene codifying chimeric protein called ChimB, which was cloned, and the recombinant version was expressed, purified, and evaluated in ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) to diagnose TL and visceral leishmaniasis (VL). A total of 220 human serum samples were used, and, when ChimB was used, results showed sensitivity, specificity, and positive and negative predictive values of 100% for the diagnosis of both diseases; however, when using peptides, the sensitivity values reached from 28.0% to 57.3% and specificity varied from 16.3% to 83.7%. A soluble *Leishmania* extract (SLA) showed sensitivity and specificity values of 30.7% and 45.9%, respectively. The area under the curve (AUC) value for ChimB was 1.0, while for synthetic peptides, this value reached between 0.502 and 0.635, whereas for SLA, the value was of 0.589. Serological assays using sera samples collected before and after treatment showed significant reductions in the anti-ChimB antibody levels after therapy, suggesting a prognostic role of this recombinant antigen. In conclusion, preliminary data suggest the use from ChimB as a potential candidate for the diagnosis and prognosis of leishmaniasis.

1. Introduction

Leishmaniasis is a neglected disease complex caused by different species of the protozoan parasites of genus *Leishmania*, which are transmitted by bites of infected sandflies [1]. There are about 20 parasite species able to cause disease in humans and an incidence of 0.2–0.4

million cases of visceral leishmaniasis (VL) and 0.7 to 1.2 million cases of tegumentary leishmaniasis (TL) is estimated to occur annually. Over 90% of VL cases have been registered in Bangladesh, Ethiopia, Brazil, India, Sudan, and South Sudan. TL is more widespread and occurs in countries, such as Afghanistan, Algeria, Brazil, Iran, Peru, Ethiopia, North Sudan, Costa Rica, Colombia, and Syria [2]. VL is the most severe

* Corresponding author. Laboratório de Pesquisa do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Prof. Alfredo Balena, 190, 30130-100, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

E-mail address: eduardoferrazcoelho@yahoo.com.br (E.A.F. Coelho).

<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105562>

Received 14 January 2022; Received in revised form 26 April 2022; Accepted 27 April 2022
Available online 2 May 2022

0882-4010/© 2022 Elsevier Ltd. All rights reserved.

form of disease and is most commonly caused by *Leishmania donovani* and *L. infantum* species [3]. TL is caused by several parasite species, with *L. braziliensis* being the most common etiological agent of the disease in the Americas [4]. It can cause distinct clinical manifestations in patients, producing self-limiting lesions found in cutaneous leishmaniasis (CL) and even deforming ulcers, causing morbidity in mucosal leishmaniasis (ML) [5].

The diagnosis of leishmaniasis is based on the demonstration of parasite amastigote forms in collected samples of patients, with skin and mucosal lesion fragments used for TL and aspirates collected from spleen, lymph node, and/or bone marrow used for VL [6]. The sensitivity of tests is variable and depends on the presence of parasites in the collected samples. In addition, the procedure is considered invasive and dangerous to the patients [7]. Molecular techniques have improved the sensitivity of the parasitological tests; however, they incur high costs, and there is an additional need for trained professionals and sophisticated equipments to perform such exams [8,9]. In this context, conducting the diagnosis of leishmaniasis continues to be difficult [10].

Immunological tests, such as indirect immunofluorescence assay (IFA), direct agglutination test (DAT), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), amongst others, have been used for the diagnosis of leishmaniasis [11]. For VL, tests present satisfactory results to identify symptomatic cases, mainly by high antileishmanial serology titers present in most patients [12]. However, specificity is variable and depends on the antigen used, geographic region, and reactivity with leishmaniasis-related diseases [13]. Otherwise, serodiagnosis of TL presents drawbacks, since patients usually have low levels of antileishmanial antibodies, mainly those developing CL. As a consequence, low sensitivity is found when immunological tests are applied [14,15]. In addition, antileishmanial serology remains positive after treatment and the clinical cure of the patients, making it difficult to differentiate between those with the active disease or those who have been treated and/or cured [16–18].

Aiming to solve such a problem, *Leishmania* proteins, such as K39, A2, HSP83, heat shock proteins, LiHyp1, LiHyD, LiHyE, amongst others, have been used as recombinant antigens for the serodiagnosis of disease, and results have been promising [19–23]. However, few have been evaluated as prognostic markers for leishmaniasis [24,25]. In addition, the variability in the humoral response found for individual patients suggests that the combination of distinct antigens in a unique product could potentially improve the diagnosis efficacy [26,27]. Therefore, the selection of parasite proteins, followed by the identification of specific B-cell epitopes, resulting in the construction of B-cell epitope-based chimeric proteins, could account for the development of better diagnostic candidates for VL and TL.

In this context, recent studies have shown that hypothetical (XP_001568689.1), enolase (XP_001563419.1), and trypanothione peroxidase (XP_001563558.1) proteins were individually tested in ELISA for the diagnosis of TL, and serological results were promising [16]. In another study, prohibitin was also evaluated for the diagnosis of VL and TL, and results showed high sensitivity and specificity values for the diagnosis of VL and TL [28]. In this context, in the present study, specific B-cell epitopes were predicted in the amino acid sequences of these four proteins, which were used to construct the gene encoding for a chimeric protein, which was called ChimB. The recombinant protein was expressed, purified, and evaluated in ELISA for the diagnosis of VL and TL. In addition, the B-cell epitopes themselves used to construct the chimera were synthesized and tested in the serological assays, as was the *Leishmania* antigenic preparation, which was used as a control. The main purpose was to develop a new chimeric antigen based on B-cell epitopes of parasite antigenic proteins, which could be used as an antigen for the diagnosis of leishmaniasis. In addition, the prognostic role of this chimeric protein was also evaluated in ELISA, by using sera samples collected from VL and TL patients, before and after their treatment.

2. Materials and methods

2.1. Ethical approval

The study was approved by the Human Ethics Committee from the Federal University of Minas Gerais (UFMG; Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil), logged under protocol number CAAE-32343114.9.0000.5149. All patients received an individual copy of the study policy, which was reviewed by an independent person, and all participants signed an informed consent form, in Portuguese, before blood collection. The procedures described in this study were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

2.2. Leishmaniasis patient samples

Seventy-five serum samples of leishmaniasis patients were used in this study. In this context, samples were collected of cutaneous (CL; n = 25; including 17 males and 8 females, with ages ranging from 31 to 59 years old), mucosal (ML; n = 25; including 19 males and 6 females, with ages ranging from 26 to 61 years), and visceral (VL; n = 25; including 14 males and 11 females, with ages ranging from 30 to 66 years) leishmaniasis patients; all living in endemic area of disease (Belo Horizonte). None of the patients had been treated before sample collection. The diagnosis of CL and ML was performed by clinical exam and detection of *L. braziliensis* kDNA in skin biopsies (CL) and/or mucosal fragments (ML) by means of the polymerase chain reaction (PCR) technique; while VL was diagnosed by clinical exam and detection of *L. infantum* kDNA in spleen and/or bone marrow aspirates by PCR according to that described in Ref. [29]. Briefly, DNA was extracted from samples by using the QIAamp® DNA Blood Mini Kit (Qiagen®, MD, USA). The material was purified, assayed by spectrophotometry and diluted in sterile ultrapure water. The primers 5'-GGGKAGGGCGTCTCTSCGAA-3' (Forward) and 5'-SSSWCTATWTTACACCAACCCC-3' (Reverse) were used to amplify a conserved parasite kDNA region containing 150 base pairs in the collected samples from CL, ML, and VL patients. DNA extracted from reference strains for TL (MHOM/BR/2002/LPC-RPV) and VL (MHOM/BR/1974/PP75) was used as positive control, while sterile ultrapure water was used as a negative control. The following reagents were used in the reactions: 2 mM MgCl₂, 200 µM dNTP, 0.6 µM of each primer (Sigma-Aldrich, USA), 1 U Taq DNA polymerase and specific buffer (Invitrogen, USA), and 20 ng DNA templates. The following program was employed: 94 °C for 10 min (step 1), 60 °C for 30 s (step 2), 72 °C for 30 s (step 3), 94 °C for 30 s (step 4), go to step 2 for 42 times, and 72 °C for 10 min (step 5). The amplified product was analyzed on an SDS-12% PAGE polyacrylamide gel.

2.3. Other serum samples

One hundred forty-five serum samples collected from healthy subjects and other disease patients were also used in the serological assays. Sera were collected from healthy individuals living in endemic areas of leishmaniasis (n = 35, including 19 males and 16 females, with ages ranging from 25 to 53 years; Belo Horizonte), which presented no clinical signs of disease. This study also used samples from Chagas Disease patients (n = 25, including 14 males and 11 females, with ages ranging from 28 to 60 years), which were diagnosed by hemoculture and Chagatest® recombinant ELISA v.4.0 kit (Wiener lab., Rosario, Argentina); as well as from patients with leprosy (n = 25, with 12 males and 8 females, with ages ranging from 35 to 55 years), which were diagnosed by positive ML Flow rapid test; aspergillosis (n = 10, including 8 males and 7 females, with ages ranging from 34 to 60 years), diagnosed through the detection of fungal hyphae in histopathological examination; paracoccidioidomycosis (n = 10, 6 males and 4 females with ages ranging from 31 to 57 years), diagnosed by clinical

examination and positive *Paracoccidioides* culture; and histoplasmosis (n = 10; including 6 males and 9 females, with ages ranging from 30 to 56 years), diagnosed by the isolation of the fungus in a culture of bronchoalveolar lavage fluids and/or whole blood. In addition, the sera from HIV-infected patients (n = 20, including 12 males and 8 females, with ages ranging from 24 to 51 years), which were diagnosed by clinical exam and CD4⁺ T-cell count and determination of viral load, were also employed in the experiments.

2.4. Post-therapeutic serological follow-up

To evaluate the humoral reactivity against the antigens before and after treatment, the sera of ML (n = 15) and VL (n = 10) patients were collected before and six months after treatment, which was performed with pentavalent antimonials (Sanofi Aventis Farmacêutica Ltda., Suzano, São Paulo, Brazil) at a dose of 20 mg Sb³⁺ per kg for 30 days. None of the patients suffered from other infection or had any pre-existing disease. After completion of the treatment, they were free of any sign of leishmaniasis and were diagnosed as clinically cured.

2.5. Parasites and preparation of soluble *Leishmania* antigenic extract

L. infantum (MHOM/BR/1970/BH46) and *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2904) strains were grown in Schneider's medium (Sigma, St. Louis, MO, USA), which was added with 20% (v/v) inactivated fetal bovine serum (FBS, Sigma-Aldrich, USA), 20 mM L-glutamine, 200 U/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin pH 7.4 at 24 °C. The soluble *Leishmania* antigenic extract (SLA) was prepared using stationary promastigotes according to that described in Coelho et al., 2003. Briefly, parasites (10⁹ cells) were washed three times in sterile phosphate-buffered saline (PBS 1x pH 7.4) and submitted to six cycles of freezing and thawing, at which time they were submitted to ultrasonication (Ultrasonic processor, GEX600) with five cycles of 30 s at 38 MHz. The supernatant containing SLA was collected after centrifugation (9000×g for 30 min at 4 °C) and stored at -70 °C until use.

2.6. Prediction of B-cell epitopes and the construction of chimeric proteins

The amino acid sequences of proteins expressed in *L. braziliensis* species: prohibitin (XP_001568126.1), hypothetical (XP_001568689.1), enolase (XP_001563419.1), and trypanothione peroxidase (XP_001563558.1), were evaluated in order to predict specific B-cell epitopes, using the SwissProt (web.expasy.org/docs/swiss-prot) and IEDB (www.iedb.org) servers. In these programs, the amino acid sequence in the protein primary structure most likely to be accessible is identified by using the parameters: window size of 12 and threshold of 1.0. The selected amino acids were marked in the protein sequence, while the ABCpred (www.imtech.res.in/raghava/abcpred/) server was used to predict linear epitopes, employing the following parameters: window size of 16 and threshold of 0.85 [30]. The selected amino acids were also marked in the protein sequence. The amino acids selected in both analyses were used to construct the B-cell epitopes of each protein. A total of seven epitopes were identified, and two glycine residues were included between them to avoid spatial overlap and to provide flexibility for the protein. The ProtParam [31] server was used to evaluate the physical-chemical characteristics of chimeric protein, while the PepCalc (www.pepcalc.com) server was used to evaluate the protein solubility. The protein secondary structure was also predicted by using the JPred (Drozdetskiy et al., 2015) server. The seven selected peptides were also synthesized by the F-moc technique [32]. Briefly, peptides were released from the amine resin by trifluoroacetic acid treatment in the presence of the appropriate scavengers and diluted in milli-Q water. These were purified by high performance liquid chromatography on a C18 reverse phase column with a flow rate 1.0 mL/min and submitted to a MALDI-TOF-TOF assay to evaluate their purity.

2.7. Production and purification of ChimB

The gene encoding the chimeric protein was commercially synthesized in the pET28a-TEV vector (Genscript®, USA). *Escherichia coli* Artic Express cells were transformed with the plasmid, and cells were grown in Luria-Bertani (LB) medium, together with 100 µg/mL ampicillin (Sigma-Aldrich, USA), until reaching the optical density value of 0.600 at 600 nm. At this point, the expression of chimeric protein was induced by adding 1 mM isopropyl β-D-thiogalactopyranoside (IPTG; Promega, Montreal, Canada) for 2 h at 37 °C. After, bacteria were centrifuged at 3000×g for 10 min at 4 °C, and subsequently disrupted with six cycles of freezing and thawing, followed by six cycles of ultrasonication with cycles of 30 s each (at 36 MHz). Cell debris was removed after centrifugation for 5000×g during 15 min at 4 °C, when the supernatant was collected and concentrated in Amicon® ultra15 filters with a nominal molecular weight limit of 10,000 (NMWL, Millipore, Germany). The recombinant chimeric protein was purified on a HisTrap HP affinity column (GE Healthcare Life Sciences, USA) connected to an AKTA system. After, ChimB was passed through a polymyxin-agarose column (Sigma-Aldrich, USA) in order to remove any residual endotoxin content (<10 ng of LPS per 1 mg of recombinant protein, measured by the Quantitative Chromogenic Limulus Amebocyte Assay QCL-1000 kit, BioWhittaker, USA). An SDS-12% PAGE polyacrylamide gel was prepared and used to evaluate the purification profile of the ChimB protein.

2.8. ELISA

Before performing the serological assays, titration curves were performed to determine the most appropriate concentration of antigens (ChimB, synthetic peptides and SLA), as well as the serum samples and conjugated antibody dilutions to be used. For this, different concentrations of antigens were tested (0.10 µg–20.0 µg), as well as concentrations from sera samples (1:100 to 1:1000) and peroxidase-conjugated anti-human IgG secondary antibody (1:2500 to 1:40,000). In the pilot assays, wells were sensitized with the same sera pools obtained from healthy individuals and leishmaniasis patients. The optimal concentration of reagents was defined based on their lowest concentrations, whose absorbance difference between the positive and negative samples had the highest value. In this context, immunoassay plates (Jetbiofil®, Belo Horizonte) were coated with ChimB (0.25 µg/well), synthetic peptides (5.0 µg/well each) or SLA (1.0 µg/well), which were diluted in coating buffer (50 mM carbonate buffer, at pH 9.6) for 18 h at 4 °C. Next, free binding sites were blocked using 250 µL per well of PBS-T plus 5% (w/v) BSA for 1 h at 37 °C. After washing the plates five times with PBS-T, they were incubated with sera samples (1:100 diluted for synthetic peptides and SLA, and 1:200 diluted for ChimB, both diluted in PBS-T), and incubated for 1 h at 37 °C. Plates were washed five times with PBS-T and incubated with anti-human IgG peroxidase conjugated antibody (1:10,000 diluted for peptides and SLA, and 1:20,000 diluted for ChimB; both in PBS-T) for 1 h at 37 °C. After washing the plates six times with PBS-T, reactions were developed by incubation with 100 µL per well of solution composed by 2 µL H₂O₂, 2 mg *ortho*-phenylenediamine and 10 mL citrate-phosphate buffer at pH 5.0, for 30 min and in the dark. Reactions were stopped by adding 25 µL 2 N H₂SO₄, and optical density (OD) values were read in a microplate reader (Molecular Devices, Spectra Max Plus, Canada), at 492 nm. Sera samples were evaluated on the same day to reduce experimental variation.

2.9. Statistical analysis

Results were entered into Microsoft Excel (version 10.0) spreadsheets and analyzed with GraphPad Prism™ software (version 6.0 for Windows). The cut-off values were calculated by constructing Receiver Operating Characteristic (ROC) curves, which also evaluated the sensitivity (Se), specificity (Sp), area under the curve (AUC), 95% confidence interval (95%CI), positive predictive value (PPV), negative predictive

Table 1

Characterization of selected B-cell epitopes. The identity of predicted B-cell epitopes in the amino acid sequences of prohibitin (XP_001568126.1), hypothetical protein (XP_001568689.1), enolase (XP_001563419.1), and trypanredoxin peroxidase (XP_001563558.1) proteins are shown.

Peptide	Amino acid sequence
PepA	IQFSDSIKRFNELDCE
PepB	GFSGDSSESYSLSDNSSKVDDRIKL
PepC	LVSIEDPFAEDNFDEF
PepD	AFRISDPPQYSRVVPA
PepE	IAKTLRDHGNRGYYLSDSLVYN
PepF	KGDATMKPERQASIE
PepG	EIGSASKYGYSGWA

value (NPV), Youden index (Y), *p*-value, and likelihood ratio (LR). The unpaired two-tailed *t*-test was used to indicate a statistically significant difference between the antigens ($P < 0.05$).

3. Results

3.1. Selection of B-cell epitopes, construction, and characterization of ChimB

Bioinformatic assays were performed using the amino acid sequences of *L. braziliensis* prohibitin (XP_001568126.1), as well as hypothetical (XP_001568689.1), enolase (XP_001563419.1), and trypanredoxin peroxidase (XP_001563558.1) proteins, in order to predict specific B-cell epitopes. Results showed that seven B-cell epitopes were selected (PepA, PepB, PepC, PepD, PepE, PepF, and PepG), and their amino acid sequences are shown in Table 1. A BLAST assay showed that all epitopes, which were selected from *L. braziliensis* expressed proteins, proved to be

conserved in the *L. infantum* and *L. donovani* species, showing a similarity in their amino acid sequences in the order of 93.0%–100% (Table 2). The protein sequence was defined according to the epitope's original position in the native protein sequence. In this context, epitopes found near the N-terminus portion were maintained in this position, while the others found near the C-terminus portion were also maintained in this position. The arrangement of the amino acid sequence of protein is shown, as is the prediction of the secondary structure, with the alpha-helix and beta sheet regions also being presented (Fig. 1A). ChimB has 137 amino acid residues, 411 base pairs, a molecular weight of 14.71 kDa, and isoelectric point of 4.5. The protein presents an estimated half-life of 30 min in yeasts and >10 h in *E. coli*, an aliphatic index of 59.12, and an instability index of 39.35. In addition, ChimB is a stable protein, with good water solubility and a purification yield of >95.0%. Additionally, the chimeric protein was submitted to an SDS-12% PAGE polyacrylamide gel, where its purity was visualized (Fig. 1B).

3.2. Evaluation of antigens for diagnosis of leishmaniasis

ELISA experiments were performed using ChimB, synthetic peptides and SLA against a human serological panel. Results showed that the chimeric protein was recognized by antibodies in the sera of TL (CL and ML cases) and VL patients, with OD values above the cut-off. By contrast, ChimB was not recognized by the sera of healthy subjects or from patients with diseases that present clinical and laboratory similarity to leishmaniasis (Fig. 2). Using SLA, VL patient samples identified this parasite antigenic preparation; however, the other groups, including TL patients, were not reactive, presenting OD values below the cut-off. The synthetic peptides were also evaluated in the assays, and results showed variations in the OD values in distinct sera groups, although none of them presented a high reactivity to VL and TL patient samples. ROC curves were constructed (Fig. 3), and results showed that ChimB

Table 2

Similarity of selected epitope sequences between distinct *Leishmania* species. The selected B-cell epitopes identified in the amino acid sequences of *L. braziliensis* proteins were evaluated regarding their similarity in the protein sequences present in *L. infantum* and *L. donovani* species. The analyzed proteins and identity percentage are shown. Code: PepA (IQFSDSIKRFNELDCE), PepB (GFSGDSSESYSLSDNSSKVDDRIKL), PepC (LVSIEDPFAEDNFDEF), PepD (AFRISDPPQYSRVVPA), PepE (IAKTLRDHGNRGYYLSDSLVYN), PepF (KGDATMKPERQASIE), and PepG (EIGSASKYGYSGWA).

Peptide	Protein origin (<i>L. braziliensis</i>)	Protein code (<i>L. infantum</i>)	Identity (%)	Protein code (<i>L. donovani</i>)	Identity (%)
PepA	trypanredoxin (XP_001563558.1)	XP_001464444.1	100	AYU77526.1	100
PepB	hypothetical (XP_001568689.1)	XP_001469551.1	96.0	XP_003865174.1	96.0
PepC	enolase (XP_001563419.1)	XP_003865174.1	100	ACE74540.1	100
PepD	hypothetical (XP_001568689.1)	XP_001469551.1	93.0	XP_003865174.1	93.0
PepE	prohibitin (XP_001568126.1)	XP_001468827.1	100	XP_003864600.1	100
PepF	trypanredoxin (XP_001563558.1)	XP_001464443.1	100	ABP68405.1	100
PepG	enolase (XP_001563419.1)	XP_001464303.1	100	ACE74540.1	100

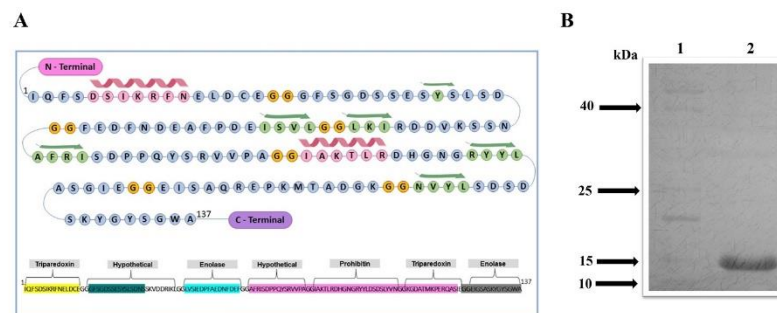


Fig. 1. Construction and purification of ChimB protein. B-cell epitopes were mapped in the amino acid sequences of prohibitin (XP_001568126.1), hypothetical (XP_001568689.1), enolase (XP_001563419.1), and trypanredoxin peroxidase (XP_001563558.1) proteins, using distinct bioinformatics tools. Seven specific B-cell epitopes were predicted and used to construct the chimeric protein sequence, which is shown with the inclusion of two glycine residues between them. The Jpred4 server was used to predict the protein's secondary structure. The amino acid residues highlighted in pink represent alpha-helix regions, while those shown in green indicate beta sheet regions in the protein sequence (A). In addition, the purified protein was evaluated by an SDS-12% PAGE polyacrylamide gel (B). A low range PageRuler Unstained Protein Ladder (Invitrogen™, Life Technologies, USA) was used (lane 1), and the purified recombinant ChimB protein is shown (lane 2), presenting an estimated molecular weight of 14.71 kDa. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

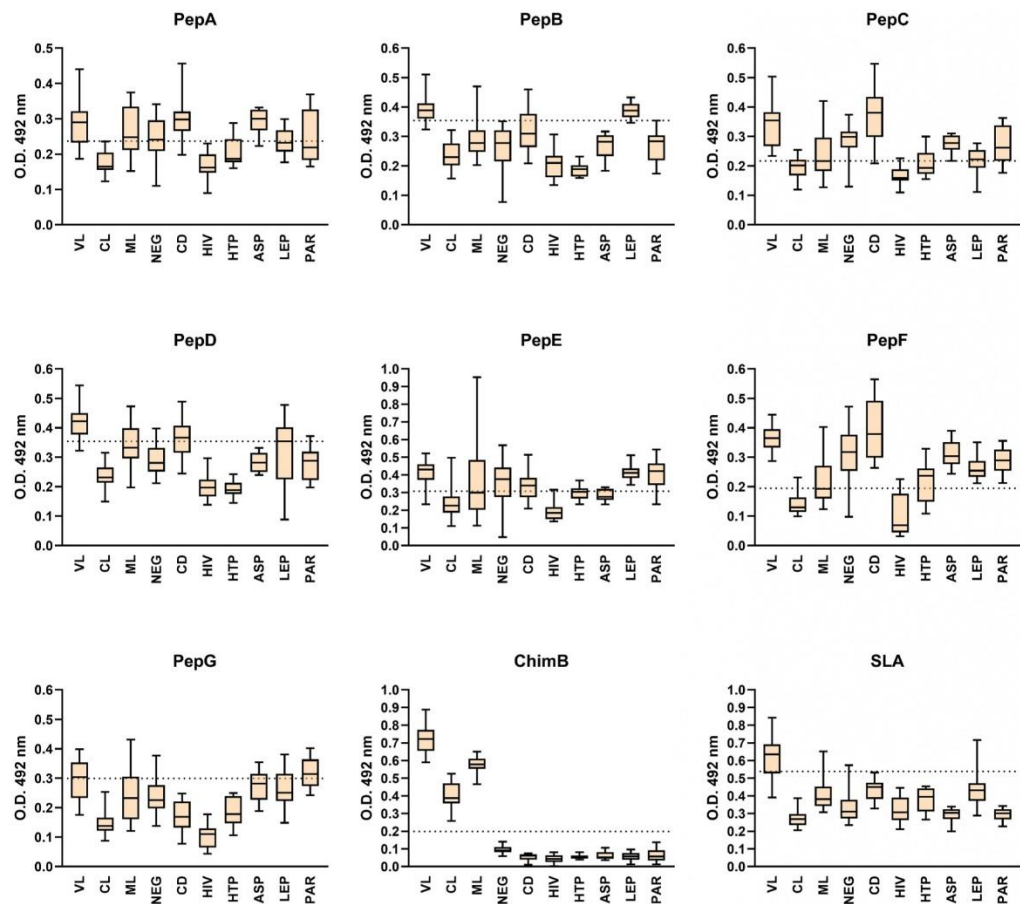


Fig. 2. Serological assays for the diagnosis of leishmaniasis. ELISA assays were performed, using as antigens: ChimB, synthetic peptides (PepA, PepB, PepC, PepD, PepE, PepF, and PepG), and SLA. These were reacted against sera samples of visceral (VL, $n = 25$), cutaneous (CL, $n = 25$), and mucosal (ML, $n = 25$) leishmaniasis patients, as well as against the sera of healthy individuals living in endemic regions of disease (NEG, $n = 35$) or against patient samples with Chagas Disease (CD, $n = 25$), HIV-infected (HIV, $n = 20$), histoplasmosis (HTP, $n = 10$), aspergilliosis (ASP, $n = 10$), leprosy (LEP, $n = 25$) and paracoccidioidomycosis (PAR, $n = 10$). The optical density (OD) values were used to construct box plots, which represent the minimum and maximum values for each serum class. Dotted lines indicate cut-off values for each antigen. Abbreviation: SLA: soluble *Leishmania* antigenic extract.

presented an AUC of 1.0, while synthetic peptides presented values reaching from 0.502 to 0.635. Using SLA as an antigen, the AUC value was of 0.589 (Table 3). Additionally, sensitivity, specificity, PPV, and NPV values for ChimB were 100%, whereas synthetic peptides showed sensitivity ranging from 28.0% to 57.3%, and specificity varying from 16.3% to 83.7% (Table 4). The sensitivity and specificity values for SLA were 30.7% and 45.9%, respectively.

3.3. Serological follow-up after patient treatment

The humoral response was also evaluated before and after the treatment of leishmaniasis patients. Serological results showed that anti-ChimB IgG antibodies were reduced significantly six months after TL and VL patients had undergone treatment, with individual OD values being similar to those found in healthy subjects (Fig. 4A). Using SLA as an antigen, the humoral reactivity was similar before and after treatment in both patient classes, thus suggesting that the antigenic preparation is not suitable as a prognostic marker for leishmaniasis. In addition, ratios between antibody levels before and after treatment were calculated, and results are also shown, in which anti-ChimB IgG antibodies declined significantly after treatment, as compared to anti-

parasite antibody values (Fig. 4B).

4. Discussion

Serological tests have been used for the diagnosis of leishmaniasis, although variable sensitivity and/or specificity have been registered [17,33]. In this context, there is an urgent need to identify more sensitive and specific antigens to be employed in the diagnosis of disease, which could contribute to a better treatment of diagnosed patients, as well as to a reduction in the number of disease cases [24]. In this context, in the present study, a chimeric protein that was constructed using linear B-cell epitopes from four *Leishmania* proteins, which were previously shown to be antigenic for TL [16,28], was evaluated as a candidate antigen for the diagnosis of TL and VL. A parasite antigenic preparation and peptides used to construct the chimeric protein were used as antigen controls. Results showed that ChimB presented maximum sensitivity, specificity, and positive and negative predictive values, while synthetic peptides and SLA presented the worst diagnostic values, thus suggesting a potential diagnostic role of the new antigen to diagnose leishmaniasis.

Individual recombinant proteins have been evaluated for the diagnosis of VL [34,35] and TL [36,37], and promising results have been

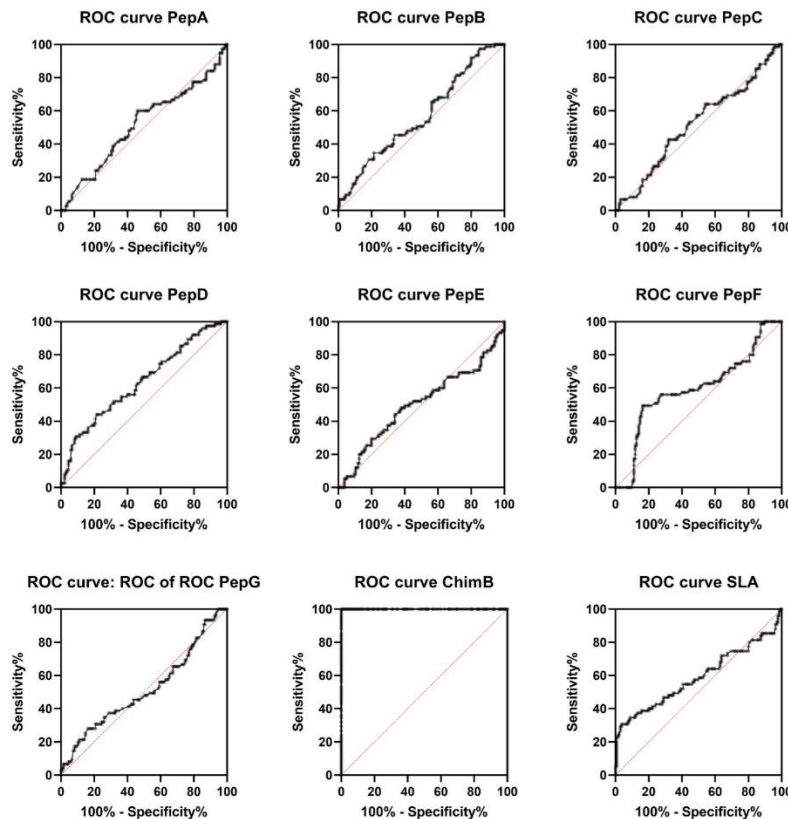


Fig. 3. Construction of Receiver Operating Characteristic (ROC) curves for the diagnostic antigens. ELISA assays were performed using ChimB, synthetic peptides (PepA, PepB, PepC, PepD, PepE, PepF, and PepG), and SLA as antigens. The serological panel consisted of samples of visceral, cutaneous, and mucosal leishmaniasis patients, as well as from healthy individuals and patients with diseases that present clinic and laboratory similarity to leishmaniasis cross-reactive diseases. The optical density (OD) values were obtained and used to construct ROC curves for each antigen. Abbreviation: SLA: soluble *Leishmania* antigenic extract.

Table 3

Diagnostic accuracy of antigens. ELISA assays were performed using sera samples of visceral (VL, n = 25), cutaneous (CL, n = 25), and mucosal (ML, n = 25) leishmaniasis patients, as well as from healthy individuals living in endemic regions of disease (NEG, n = 35), and patients with Chagas Disease (CD, n = 25), HIV-infected (HIV, n = 20), histoplasmosis (HTP, n = 10), aspergillosis (ASP, n = 10), leprosy (LEP, n = 25), or paracoccidioidomycosis (PAR, n = 10). Reactions occurred against ChimB, synthetic peptides (Pept 1, Pept 2, Pept 3, Pept 4, Pept 5, Pept 6, Pept 7, and Pept 8), and SLA. The optical density (OD) values were used to construct ROC curves and determine the cut-off values, as well as area under the curve (AUC), 95% confidence interval (95% CI), Youden index (Y), and p-value. Abbreviation: SLA: soluble *Leishmania* antigenic extract.

Antigen	Cut-off	AUC	Std. Error	95%CI	Y	p value
PepA	<0.2369	0.517	0.043	0.400–0.600	0.14	0.68
PepB	>0.3545	0.568	0.041	0.480–0.640	0.13	0.11
PepC	<0.2168	0.520	0.042	0.430–0.600	0.11	0.63
PepD	>0.3545	0.635	0.040	0.550–0.710	0.23	0
PepE	<0.3075	0.502	0.044	0.410–0.580	0.10	0.96
PepF	<0.1950	0.596	0.043	0.510–0.670	0.33	0.02
PepG	>0.3000	0.516	0.043	0.430–0.590	0.12	0.71
ChimB	>0.1988	1.000	0	1.000–1.000	1.00	<0.0001
SLA	>0.5385	0.589	0.045	0.500–0.670	0.27	0.03

obtained. However, there is still no effective candidate to diagnose both clinical conditions of this disease complex. In fact, the use of single recombinant proteins as diagnostic candidates could limit their potential, since the heterogeneity found in the patients' individual immune response could reduce the diagnostic efficacy of these antigens, limiting their sensitivity and/or specificity [26]; Galvani et al., 2021). Otherwise, the combination of distinct antigens or their B-cell epitopes in chimeric

proteins could help to solve such a problem, since they present advantages when compared to the use of individual antigens, such as the possibility to aggregate in a unique, distinct molecule and antigenic B-cell epitopes derived from parasite proteins [38,39]. In this context, chimeric recombinant proteins have been developed and evaluated for the diagnosis of diseases, such as malaria (Garcia et al., 2012), toxoplasmosis [40], tuberculosis [41], Chagas Disease [42], dengue [43], among others, and diagnostic results have been satisfactory.

For leishmaniasis, such an experimental strategy has also been adopted for both canine and human diseases. Soto et al. [44] developed a chimeric protein containing B-cell epitopes from LiP2a, LiP2b, and LiP0 ribosomal and histone H2A proteins, and obtained a sensitivity of 79.0%–93.0% and a specificity of 96%–100% for the diagnosis of canine VL. Boarino et al. [38] developed a chimeric protein containing B-cell epitopes from K9, K26, and K39 proteins, and the antigen showed a sensitivity of 82.0% and 96.0% to diagnose human and canine VL, respectively, and a specificity of 99.0% for both diseases. Figueiredo et al. [27] constructed a chimera composed of B-cell epitopes of five *Leishmania* proteins, and obtained sensitivity and specificity values of 94.61% and 99.41%, respectively, for the diagnosis of human VL. For TL, Garcia et al. [39] designed a chimeric protein composed of 13 linear B-cell epitopes from *L. braziliensis* proteins, and ELISA assays showed that it was recognized by antibodies in TL patient sera but not by samples from healthy subjects or from patients with diseases that present clinic and laboratory similarity to leishmaniasis. In all studies described, the low number of samples evaluated, as well as the absence of tests using sera samples of both VL and TL patients were cited as limitations of the study.

The proteins used in our study to predict B-cell epitopes and

Table 4

Serological evaluation of antigens for diagnosis of leishmaniasis. Sera of visceral (VL, n = 25), cutaneous (CL, n = 25), and mucosal (ML, n = 25) leishmaniasis patients, as well as from healthy individuals living in endemic regions of disease (NEG, n = 35), and of patients with Chagas Disease (CD, n = 25), HIV-infected (HIV, n = 20), histoplasmosis (HTP, n = 10), aspergillosis (ASP, n = 10), leprosy (LEP, n = 25), or paracoccidioidomycosis (PAR, n = 10) were used. These were reacted against ChimB, synthetic peptides (Pept 1, Pept 2, Pept 3, Pept 4, Pept 5, Pept 6, Pept 7, and Pept 8), and SLA. The individual optical density (OD) values were obtained and used to construct ROC curves and determine sensitivity (Se), specificity (Sp), 95% confidence interval (95% CI), positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV), and likelihood ratio (LR). Abbreviation: SLA: soluble *Leishmania* antigenic extract.

Antigen	Se(%)	95%CI	Sp(%)	95%CI	PPV	95% CI	NPV	95% CI	LR
PepA	40.0	29.7–51.3	45.9	37.8–54.3	29.1	21.2–38.5	57.9	48.5–66.9	0.74
PepB	34.7	24.9–46.0	78.5	70.9–84.6	47.3	34.7–60.2	68.4	60.7–75.2	1.61
PepC	57.3	46.1–67.9	31.9	24.6–40.1	31.9	24.6–40.1	57.3	46.0–67.9	0.84
PepD	44.0	33.3–55.3	78.5	70.9–84.6	53.2	41.0–65.1	71.6	63.9–78.3	2.05
PepE	52.0	40.9–62.9	37.8	30.0–46.2	31.7	24.1–40.4	58.6	48.1–68.4	0.84
PepF	50.7	39.6–61.7	16.3	11.0–23.4	25.2	18.9–32.6	37.3	26.1–50.0	0.61
PepG	28.0	19.1–39.0	83.7	76.6–89.0	48.8	34.6–63.3	67.7	60.2–74.3	1.72
ChimB	100	95.1–100	100	97.2–100	100	95.1–100	100	97.2–100	NC
SLA	30.7	21.4–41.8	45.9	37.8–54.3	29.1	21.2–38.5	58.0	48.5–66.9	8.28

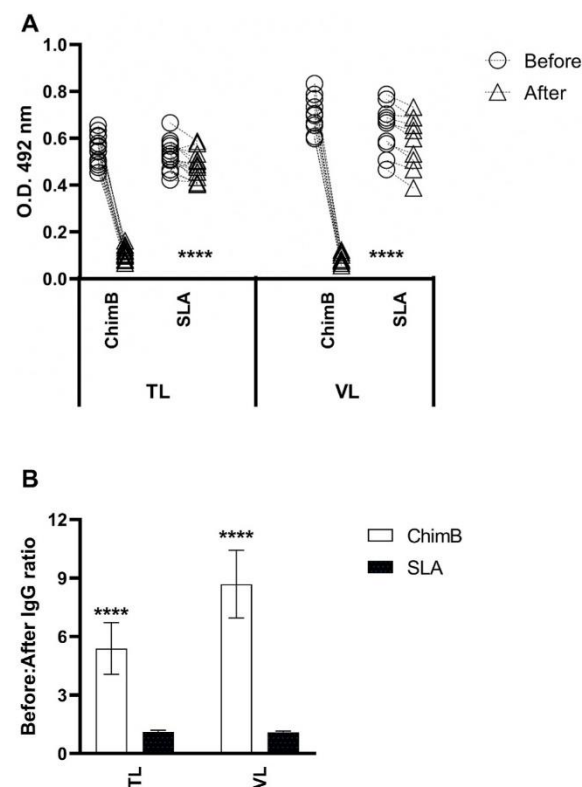


Fig. 4. Humoral response evaluated before and after patient treatments. Sera samples of mucosal (ML, n = 15) and visceral (VL, n = 10) leishmaniasis patients were collected before and six months after treatment, and levels of anti-ChimB and anti-SLA IgG antibodies were evaluated. Circles and triangles indicate the individual optical density (OD) values for each sample against antigens, before and after treatment, respectively (A). In addition, ratios between antibody levels before and after treatment were calculated, and results are shown (B). Abbreviation: SLA: soluble *Leishmania* antigenic extract. (****) indicates statistically significant difference in relation to the values found before treatment ($P < 0.0001$).

construct ChimB were previously shown to be antigenic in the TL [16, 28]. In fact, the conservation of proteins in distinct *Leishmania* species opens the possibility to identify new candidates able to simultaneously diagnose both clinical conditions of this disease complex [45,46]. Here,

bioinformatics tools also showed that predicted B-cell epitopes were conserved in *Leishmania* species able to cause VL, thus suggesting the possibility to test ChimB for the diagnosis of TL and VL. Due to the satisfactory results obtained in the experiments, this fact can be considered the main contribution of the study, since recombinant antigens are usually evaluated for the diagnosis of TL or VL [17,19,20,47]. In this context, although preliminary, data presented here suggest the possibility of using this new protein construct for the diagnosis of both VL and TL. Otherwise, commercial kits have been developed and used for the diagnosis of VL, and satisfactory results have been obtained, mainly for the detection of symptomatic patients. However, for TL, they present low efficacy, mainly due to the low presence of antileishmanial antibodies in patient sera. Results obtained here highlight the possibility to test the chimera as a diagnostic antigen for both TL and VL; the development of additional validation studies will certainly be warranted, and the present study represents the first step or a proof-of-concept of this new diagnostic candidate for leishmaniasis.

In addition to a highly successful diagnostic candidate, serological tests should also be evaluated for the prognosis of disease after patient treatment and should be used as an immunological cure control of patients [48]. However, laboratory kits have failed to monitor treatment efficacy and patient cure [25,49]. For instance, kits containing the rK39 protein as a diagnostic antigen have failed to differentiate active disease patients from those who have been treated and cured, where high levels of anti-rK39 IgG antibodies were detectable still months and years after the treatment and clinical cure of the patients [50–53]. In the present study, anti-ChimB antibodies declined in significant levels six months after VL and TL patient treatments, thereby suggesting that this antigen could also be considered with a prognostic purpose for leishmaniasis.

Limitations of this study include the low number of sera samples used to evaluate the diagnostic potential of ChimB for TL and VL, as well as the low number of sera collected from patients before and after treatment, aiming to evaluate the prognostic potential of this antigen. In this context, data presented here could be considered a proof-of-concept of use of the ChimB protein for the diagnosis and prognosis of leishmaniasis, and additional studies, including a higher number of sera and the incorporation of protein in other diagnostic platforms, such as lateral counter-flow rapid tests, are warranted.

Conflicts of interest

The authors declare no commercial or financial conflict of interest.

CRediT authorship contribution statement

Danniele L. Vale: Methodology, Investigation. **Amanda S. Machado:** Methodology, Investigation. **Fernanda F. Ramos:** Methodology, Investigation. **Daniela P. Lage:** Methodology, Investigation.

Camila S. Freitas: Methodology, Investigation. **Daysiane de Oliveira:** Methodology, Formal analysis, Data curation. **Nathalia C. Galvani:** Methodology, Formal analysis, Data curation. **Gabriel P. Luiz:** Methodology. **Mirian I. Fagundes:** Methodology, Data curation. **Bruna B. Fernandes:** Methodology, Data curation. **João A. Oliveira-da-Silva:** Methodology, Investigation, Data curation. **Fernanda Ludolf:** Methodology, Investigation, Data curation. **Grasiele S.V. Tavares:** Methodology, Investigation, Data curation. **Nathalia S. Guimarães:** Methodology, Data curation. **Ana T. Chaves:** Methodology, Investigation, Data curation. **Miguel A. Chávez-Fumagalli:** Validation, Formal analysis. **Unaf Tupinambás:** Investigation, Data curation. **Manoel O.C. Rocha:** Supervision, Data curation, Conceptualization. **Denise U. Gonçalves:** Investigation, Data curation, Conceptualization. **Vivian T. Martins:** Methodology, Investigation, Data curation. **Ricardo A. Machado-de-Ávila:** Supervision, Investigation, Conceptualization. **Eduardo A.F. Coelho:** Writing – original draft, Supervision, Resources, Project administration, Conceptualization.

Acknowledgements

This work was supported by grant APQ-408675/2018-7 from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico and by grant APQ-02167-21 from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, Brazil. EAFC, DUG, MOCR, and RAMA wish to thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil, for their fellowships. The authors also wish to thank the Brazilian funding agencies of Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior and CNPq for their student grants.

References

- [1] JrG. Grimaldi, R.B. Tesh, Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research, *Clin. Microbiol. Rev.* 6 (1993) 230–250.
- [2] World Health Organization, Leishmaniasis. <http://www.who.int/topics/leishmaniasis/en/>, 2018.
- [3] E. Torres-Guerrero, M.R. Quintanilla-Cedillo, J. Ruiz-Esmenjaud, R. Arenas, Leishmaniasis: a review, *F1000Res* 6 (2017) 750.
- [4] H. Goto, J.A.L. Lindoso, Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis, *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 8 (2010) 419–433.
- [5] R. Reithinger, J. Dujardin, H. Louzir, C. Pirmuez, B. Alexander, S. Brooker, Cutaneous leishmaniasis, *Lancet Infect. Dis.* 7 (2007) 581–596.
- [6] E.K. Elmahallawy, A. Sampedro Martinez, J. Rodriguez Granger, Y. Hoyos-Mallectot, A. Agil, J.M. Navarro Mari, J. Gutierrez Fernandez, Diagnosis of leishmaniasis, *J. Infect. Dev. Ctries.* 8 (2014) 961–972.
- [7] G. Srividya, A. Kulshrestha, R. Singh, P. Salotra, Diagnosis of visceral leishmaniasis: developments over the last decade, *Parasitol. Res.* 110 (2012) 1065–1078.
- [8] M. Ghasemian, M.J. Gharavi, L. Akhlaghi, M. Mohebbali, A.R. Meamar, E. Aryan, H. Oormazdi, Development and assessment of loop mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the diagnosis of human visceral leishmaniasis in Iran, *Iran. J. Parasitol.* 9 (2014) 50–59.
- [9] C.M. Ruitter, C. van der Veer, M.M. Leeflang, S. Deborggraeve, C. Lucas, E. R. Adams, Molecular tools for diagnosis of visceral leishmaniasis: systematic review and meta-analysis of diagnostic test accuracy, *J. Clin. Microbiol.* 52 (2014) 3147–3155.
- [10] M. Paiva-Cavalcanti, R.C. de Moraes, R. Pessoa-E-Silva, L.A. Trajano-Silva, C. Gonçalves-de-Albuquerque Sda, H. Tavares Dde, M.C. Brelaz-de-Castro, F. Silva Rde, V.R. Pereira, Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of immunological and molecular tools, *Cell Biosci.* 5 (2015) 31.
- [11] R.C.F. Brito, R.D.O. Aguiar Soares, J.M.O. Cardoso, W. Coura Vital, B.M. Roatt, A. B. Reis, Recent advances and new strategies in Leishmaniasis diagnosis, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 104 (2020) 8105–8116.
- [12] H. Sakkas, C. Gartzonika, S. Levdiotou, Laboratory diagnosis of human visceral leishmaniasis, *J. Vector Borne Dis.* 53 (2016) 8–16.
- [13] D. Ozerdem, F. Eroglu, A. Genc, M. Demirkazik, I.S. Koltas, Comparison of microscopic examination, rK39, and PCR for visceral leishmaniasis diagnosis in Turkey, *Parasitol. Res.* 106 (2009) 197–200.
- [14] G.A. Romero, M. de la Glória Orge Orge, M.V. de Farias Guerra, M.G. Paes, V. de Oliveira Macêdo, E.M. de Carvalho, Antibody response in patients with cutaneous leishmaniasis infected by *Leishmania* (Viannia) *braziliensis* or *Leishmania* (Viannia) *guyanensis* in Brazil, *Acta Trop.* 93 (2005) 49–56.
- [15] G.A. Fagundes-Silva, R. Vieira-Gonçalves, M.P. Nepomuceno, M.A. de Souza, S. Favoreto Jr., M.P. Oliveira-Neto, A.M. Da-Cruz, A. Gomes-Silva, Decrease in anti-Leishmania IgG3 and IgG1 after cutaneous leishmaniasis lesion healing is correlated with the time of clinical cure, *Parasite Immunol.* 34 (2012) 486–491.
- [16] M.C. Duarte, D.C. Pimenta, D. Menezes-Souza, R.D. Magalhães, J.L. Diniz, L. E. Costa, M.A. Chávez-Fumagalli, P.S. Lage, D.C. Bartholomeu, M.J. Alves, A. P. Fernandes, M. Soto, C.A. Tavares, D.U. Gonçalves, M.O. Rocha, E.A. Coelho, Proteins selected in *Leishmania* (Viannia) *braziliensis* by an immunoproteomic approach with potential serodiagnosis applications for tegumentary leishmaniasis, *Clin. Vaccine Immunol.* 22 (2015) 1187–1196.
- [17] M.P. Lima, L.E. Costa, M.C. Duarte, D. Menezes-Souza, B.C.S. Salles, T.T. de Oliveira Santos, F.F. Ramos, M.A. Chávez-Fumagalli, A.C.S. Kursancew, R. P. Ambrósio, B.M. Roatt, R.A. Machado-de-Ávila, D.U. Gonçalves, E.A.F. Coelho, Evaluation of a hypothetical protein for serodiagnosis and as a potential marker for post-treatment serological evaluation of tegumentary leishmaniasis patients, *Parasitol. Res.* 116 (2017) 1197–1206.
- [18] J.A. Oliveira-da-Silva, A.S. Machado, G.S.V. Tavares, F.F. Ramos, D.P. Lage, F. Ludolf, B.T. Steiner, T.A.R. Reis, T.T.O. Santos, L.E. Costa, R.S. Bandeira, V. T. Martins, N.C. Galvani, A.T. Chaves, J.S. Oliveira, M.A. Chávez-Fumagalli, U. Tupinambás, D.F. de Magalhães-Soares, J.A.G. Silveira, S. Lyon, R.A. Machado-de-Ávila, E.A.F. Coelho, Biotechnological applications from a *Leishmania* amastigote-specific hypothetical protein in the canine and human visceral leishmaniasis, *Microb. Pathog.* 147 (2020), 104283.
- [19] V.T. Martins, M.A. Chávez-Fumagalli, L.E. Costa, A.M. Canavaci, A.M. Martins, P. S. Lage, D.P. Lage, M.C. Duarte, D.G. Valadares, R.D. Magalhães, T.G. Ribeiro, R. A. Nagem, W.D. Darocha, W.C. Régis, M. Soto, E.A. Coelho, A.P. Fernandes, C. A. Tavares, Antigenicity and protective efficacy of a *Leishmania* amastigote-specific protein, member of the super-oxygenase family, against visceral leishmaniasis, *PLoS Neglected Trop. Dis.* 7 (2013), e2148.
- [20] D.P. Lage, V.T. Martins, M.C. Duarte, L.E. Costa, E. Garde, L.M. Dimer, A. C. Kursancew, M.A. Chávez-Fumagalli, D.F. de Magalhães-Soares, D. Menezes-Souza, B.M. Roatt, R.A. Machado-de-Ávila, M. Soto, C.A. Tavares, E.A. Coelho, A new *Leishmania* specific hypothetical protein and its not described specific B cell conformational epitope applied in the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis, *Parasitol. Res.* 115 (2016) 1649–1658.
- [21] M. Farahmand, H. Nahrevanian, Application of recombinant proteins for serodiagnosis of visceral leishmaniasis in humans and Dogs, *Iran. Biomed. J.* 20 (2016) 128–134.
- [22] P.A.F. Ribeiro, D.S. Dias, D.P. Lage, L.E. Costa, B.C.S. Salles, B.T. Steiner, F. F. Ramos, M.P. Lima, T.T.O. Santos, A.T. Chaves, M.A. Chávez-Fumagalli, R. T. Fujiwara, L.L. Bueno, R.B. Caligorne, D.F. de Magalhães-Soares, J.A.G. Silveira, R.A. Machado-de-Ávila, D.U. Gonçalves, E.A.F. Coelho, A conserved *Leishmania* hypothetical protein evaluated for the serodiagnosis of canine and human visceral and tegumentary leishmaniasis, as well as a serological marker for the posttreatment patient follow up, *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 92 (2018) 196–203.
- [23] M.K. Kakh, M. Golchin, M. Kazemi Arababadi, H. Daneshvar, Application of the *Leishmania infantum* 21 kDa recombinant protein for the development of an immunochromatographic test, *Parasite Immunol.* 42 (2020), e12770.
- [24] D.S. Dias, P.A.F. Ribeiro, B.C.S. Salles, T.T.O. Santos, F.F. Ramos, D.P. Lage, L. E. Costa, A.S.B. Portela, G.B. Carvalho, M.A. Chávez-Fumagalli, R.B. Caligorne, J. S. Oliveira, D.F. Magalhães Soares, E.S. Silva, A.S. Galdino, D. Menezes Souza, M. C. Duarte, D.U. Gonçalves, E.A.F. Coelho, Serological diagnosis and prognosis of tegumentary and visceral leishmaniasis using a conserved *Leishmania* hypothetical protein, *Parasitol. Int.* 67 (2018) 344–350.
- [25] A.S. Machado, F.F. Ramos, J.A. Oliveira-da-Silva, T.T.O. Santos, F. Ludolf, G.S. V. Tavares, L.E. Costa, D.P. Lage, B.T. Steiner, A.T. Chaves, M.A. Chávez-Fumagalli, D.F. de Magalhães-Soares, J.A.G. Silveira, K.M.N. Napolos, U. Tupinambás, M. C. Duarte, R.A. Machado-de-Ávila, L.L. Bueno, R.T. Fujiwara, R.L.F. Moreira, M.O. C. Rocha, R.B. Caligorne, E.A.F. Coelho, A *Leishmania infantum* hypothetical protein evaluated as a recombinant protein and specific B-cell epitope for the serodiagnosis and prognosis of visceral leishmaniasis, *Acta Trop.* 203 (2020), 105318.
- [26] W.J.T. Santos, D.H.C. Tavares, A.L. Castro Neto, M.B. Nascimento, R. Dhalia, A. L. Albuquerque, C.H.N. Costa, F.B. Magalhães, A.M. Rezende, O.P. de Melo Neto, Gene design, optimization of protein expression and preliminary evaluation of a new chimeric protein for the serological diagnosis of both human and canine visceral leishmaniasis, *PLoS Neglected Trop. Dis.* 14 (2020), e0008488.
- [27] M.M. Figueiredo, A.R.R. Santos, L.C. Godoi, N.S. de Castro, B.C. de Andrade, S.A. R. Sergio, S.M.B. Jerônimo, E.J. de Oliveira, R.T. Valencia-Portillo, L.M. Bezerra, H. Goto, M.C.A. Sanchez, C. Junqueira, S.M.R. Teixeira, F.G. da Fonseca, R. T. Gazzinelli, A.P. Fernandes, Improved performance of ELISA and immunochromatographic tests using a new chimeric A2-based protein for human visceral leishmaniasis diagnosis, *J. Immunol. Res.* 2021 (2021), 5568077.
- [28] M.R. Rodrigues, L.M.O. Santos, C.K. Miyazaki, V.T. Martins, F.R. Ludolf, A. C. Kursancew, F.F. Ramos, D.S. Dias, J.S. Oliveira, P.M.A. Vieira, B.M. Roatt, R. A. Machado de Ávila, D.U. Gonçalves, D. Menezes Souza, E.A.F. Coelho, M. C. Duarte, Immunodiagnosis of human and canine visceral leishmaniasis using recombinant *Leishmania infantum* Prohibitin protein and a synthetic peptide containing its conformational B cell epitope, *J. Immunol. Methods* 474 (2019), 112641.
- [29] G.F. Cota, M.R. Sousa, B.M.N. Freitas, L.I. Gomes, E. Oliveira, T.S. Assis, A. L. Mendonça, B.F. Pinto, J.W. Saliba, A. Rabello, Comparison of parasitological, serological, and molecular tests for visceral leishmaniasis in HIV infected patients: a cross-sectional delayed-type study, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 89 (2013) 570–577.
- [30] S. Saha, G.P.S. Raghava, Prediction of continuous B cell epitopes in an antigen using recurrent neural network, *Proteins* 65 (2006) 40–48.
- [31] E. Gasteiger, A. Gattiker, C. Hoogland, I. Ivanyi, R.D. Appel, A. Bairoch, ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis, *Nucleic Acids Res.* 31 (2005) 3784–3788.
- [32] R.A. Machado-de-Ávila, S. Stransky, M. Velloso, P. Castanheira, F.S. Schneider, E. Kalopothakis, E.F. Sanchez, C. Nguyen, F. Molina, C. Granier, C. Chávez-Olortegui, Minotopes of mutalysin-II from *Lachesis muta* snake venom induce

- hemorrhage inhibitory antibodies upon vaccination of rabbits, *Peptides* 32 (2011) 1640–1646.
- [33] C.M. Sato, M.C. Sanchez, B.J. Celeste, M.S. Duthie, J. Guderian, S.G. Reed, M.E. de Brito, M.B. Campos, H.V. de Souza Encarnação, J. Guerra, T.G. de Mesquita, S. K. Pinheiro, R. Ramasawmy, F.T. Silveira, M. de Assis Souza, H. Goto, Use of recombinant antigens for sensitive serodiagnosis of American tegumentary leishmaniasis caused by different *Leishmania* species, *J. Clin. Microbiol.* 55 (2017) 495–503.
- [34] S. Heidari, H. Hajjarian, B. Kazemi, J. Gharechahi, M. Mohebbi, M.M. Ranjbar, B. Akhoundi, B. Azarian, S. Mirshahvaladi, R. Raoofian, Identification of immunodominant proteins of *Leishmania infantum* by immunoproteomics to evaluate a recombinant multi-epitope designed antigen for serodiagnosis of human visceral leishmaniasis, *Exp. Parasitol.* 222 (2021), 108065.
- [35] R.E.M. Ramos, W.J.T. Santos, F.B. Magalhães, G.T.N. Diniz, C.H.N. Costa, O.P. de Melo Neto, Z.M. Medeiros, C.R.S. Reis, Assessment of a recombinant protein from *Leishmania infantum* as a novel tool for Visceral Leishmaniasis (VL) diagnosis in VL/HIV co-infection cases, *PLoS One* 16 (2021), e0251861.
- [36] D.P. Lage, A.S. Machado, F.F. Ramos, P.C. Silveira, D.S. Dias, P.A.F. Ribeiro, G.S. V. Tavares, L.E. Costa, T.T.O. Santos, B.T. Steiner, M.I. Fagundes, M.A. Chávez-Fumagalli, S. Lyon, R.L.F. Moreira, M.C. Duarte, D. Menezes-Souza, R. B. Caligiorme, R.A. Machado-de-Ávila, A.L. Teixeira, E.A.F. Coelho, A biomarker for tegumentary and visceral leishmaniasis based on a recombinant *Leishmania* hypothetical protein, *Immunobiology* 224 (2019) 477–484.
- [37] M.L. Freire, F.D. Rêgo, G. Cota, M.A. Pascoal-Xavier, E. Oliveira, Potential antigenic targets used in immunological tests for diagnosis of tegumentary leishmaniasis: a systematic review, *PLoS One* 16 (2021), e0251956.
- [38] A. Boarino, A. Scalone, L. Gradoni, E. Ferroglio, F. Vitale, R. Zanatta, M. G. Giuffrida, S. Rosati, Development of recombinant chimeric antigen expressing immunodominant b epitopes of *Leishmania infantum* for serodiagnosis of visceral leishmaniasis, *Clin. Vaccine Immunol.* 12 (2005) 647–653.
- [39] G.C. Garcia, A.M.R.S. Carvalho, M.C. Duarte, M.F.C.E. Silva, F.A.C. Medeiros, E.A. F. Coelho, D.M. de Moura Franco, D.U. Gonçalves, T.A. de Oliveira Mendes, D. Menezes-Souza, Development of a chimeric protein based on a proteomic approach for the serological diagnosis of human tegumentary leishmaniasis, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 105 (2021) 6805–6817.
- [40] J. Dai, M. Jiang, Y. Wang, L. Qu, R. Gong, J. Si, Evaluation of a recombinant multi-epitope peptide for serodiagnosis of *Toxoplasma gondii* infection, *Clin. Vaccine Immunol.* 19 (2012) 338–342.
- [41] Z. Cheng, J.W. Zhao, Z.Q. Sun, Y.Z. Song, Q.W. Sun, X.Y. Zhang, H.H. Wang, X. K. Guo, Y.F. Liu, S.L. Zhang, Evaluation of a novel fusion protein antigen for rapid serodiagnosis of tuberculosis, *J. Clin. Lab. Anal.* 25 (2011) 344–349.
- [42] C. Camussone, V. Gonzalez, M.S. Belluzo, N. Pujato, M.E. Ribone, C.M. Lagier, I. S. Marcipar, Comparison of recombinant *Trypanosoma cruzi* peptide mixtures versus multi-epitope chimeric proteins as sensitizing antigens for immunodiagnosis, *Clin. Vaccine Immunol.* 16 (2009) 899–905.
- [43] N.K. Tripathi, A. Shrivastava, P. Pattanaik, M. Parida, P.K. Dash, N. Gupta, A.M. Jana, P.V.L. Rao, Production of IgM specific recombinant dengue multi-epitope protein for early diagnosis of dengue infection, *Biotechnol. Prog.* 23 (2007) 488–493.
- [44] M. Soto, J.M. Requena, L. Quijada, C. Alonso, Multicomponent chimeric antigen for serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis, *J. Clin. Microbiol.* 36 (1998) 58–63.
- [45] V.T.S. Coelho, J.S. Oliveira, D.G. Valadares, M.A. Chávez-Fumagalli, M.C. Duarte, P.S. Lage, M. Soto, M.M. Santoro, C.A. Tavares, A.P. Fernandes, E.A. Coelho, Identification of proteins in promastigote and amastigote-like *Leishmania* using an immunoproteomic approach, *PLoS Neglected Trop. Dis.* 6 (2012), e1430.
- [46] A.P. Souza, M. Soto, J.M. Costa, V.S. Boaventura, C.I. de Oliveira, J.R. Cristal, M. Barral-Netto, A. Barral, Towards a more precise serological diagnosis of human tegumentary leishmaniasis using *Leishmania* recombinant proteins, *PLoS One* 8 (2013), e66110.
- [47] Á.S.B. Portela, L.E. Costa, B.C.S. Salles, M.P. Lima, T.T.O. Santos, F.F. Ramos, D. P. Lage, V.T. Martins, R.B. Caligiorme, D.R. Lessa, F.R. Silva, A.S. Machado, G. F. Nascimento, I.S. Gama, M.A. Chávez-Fumagalli, A.L. Teixeira, M.O.C. Rocha, R. L. Rocha, E.A.F. Coelho, Identification of immune biomarkers related to disease progression and treatment efficacy in human visceral leishmaniasis, *Immunobiology* 223 (2018) 303–309.
- [48] Y. Takele, T. Mulaw, E. Adem, C.J. Shaw, S.U. Fraussen, R. Womersley, M. Kaforou, G.P. Taylor, M. Levin, I. Müller, J.A. Cotton, P. Kropf, Immunological factors, but not clinical features, predict visceral leishmaniasis relapse in patients co-infected with HIV, *Cell. Rep. Med.* Dec. 3 (2021), 100487.
- [49] A.C. Vallur, A. Hailu, D. Mondal, C. Reinhart, H. Wondimu, Y. Tutterrow, H. W. Ghalib, S.G. Reed, M.S. Duthie, Specific antibody responses as indicators of treatment efficacy for visceral leishmaniasis, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 34 (2015) 679–686.
- [50] E.E. Zijlstra, Y. Nur, P. Desjeux, E.A. Khalil, A.M. El-Hassan, J. Groen, Diagnosing visceral leishmaniasis with the recombinant K39 strip test: experience from the Sudan, *Trop. Med. Int. Health* 6 (2001) 108–113.
- [51] L. Almeida-Silva, H.D. Romero, A. Prata, R.T. Costa, E. Nascimento, S.F. Carvalho, V. Rodrigues, Immunologic tests in patients after clinical cure of visceral leishmaniasis, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 75 (2006) 739–743.
- [52] K. Gidwani, A. Picado, B. Ostyn, S.P. Singh, R. Kumar, B. Khanal, V. Lejon, F. Chappuis, M. Boelaert, S. Studar, Persistence of *Leishmania donovani* antibodies in past visceral leishmaniasis cases in India, *Clin. Vaccine Immunol.* 18 (2011) 346–348.
- [53] R.R. Patil, J.P. Mulyil, A. Nandy, A. Addy, A.K. Maji, P. Chatterjee, Dynamics of the antibodies in cohorts of cured cases of visceral leishmaniasis: its implication on the validity of serological test, value in prognosis and in post therapeutic assessment, *Hum. Vaccines Immunother.* 8 (2012) 725–730.

6. CONSIDERAÇÕES GERAIS E CONCLUSÃO

Com base nos dois estudos publicados, observou-se que a proteína quimérica B1, composta por epítomos de células B selecionados das proteínas LiHyD, LiHyP1, HRF e β -tubulina, demonstrou valores de sensibilidade e especificidade de 100% contra um painel sorológico canino, superando o desempenho do SLA e do kit comercial usado no sorodiagnóstico da LVC. Isso a torna uma candidata promissora para avaliação em futuros estudos e para ser aplicada em outras plataformas para o diagnóstico de campo da LVC.

A proteína quimérica B2, composta por epítomos de células B selecionados das proteínas hipotética, enolase, triparedoxina e proibitina, mostrou também elevado potencial como um antígeno para o diagnóstico da LT e LV humana, apresentando elevados valores de sensibilidade e especificidade. Além disso, níveis reduzidos de anticorpos anti-B2 após o tratamento dos pacientes sugerem um possível valor prognóstico de eficácia terapêutica contra a doença. Os peptídeos sintéticos também foram avaliados nos ensaios e os resultados demonstraram variações nos valores de OD entre os diferentes grupos sorológicos, embora nenhum tenha exibido reatividade similar aos das proteínas quiméricas.

Tais resultados destacam a importância dessas proteínas como candidatas promissoras para o diagnóstico das leishmanioses, tanto em cães quanto em humanos, e sugerem sua relevância para futuras pesquisas e aplicações clínicas.

7. PERSPECTIVAS

- Avaliar os antígenos B1 e B2 contra um maior número de soros e em estudo de coorte em áreas endêmicas;
- Testar os antígenos em outras plataformas diagnósticas, como em testes imunocromatográficos rápidos, a fim de possibilitar seu uso em campo.

8. REFERÊNCIAS

- ADEGBOYE, M.A.; OLUMOH, J.; SAFFARY, T.; ELFAKI, F.; ADEGBOYE, O. Effects of time-lagged meteorological variables on attributable risk of leishmaniasis in central region of Afghanistan. **Science of the Total Environment**. 685, p. 533–541. 2019.
- AKHOUNDI, M.; DOWNING, T.; VOTYPKA, J.; KUHLS, K.; LUKES, J.; CANNET, A.; RAVEL, C.; MARTY, P.; DELAUNAY, P.; KASBARI, M.; GRANOUILAC, B.; GRADONI, L.; SERENO, D. *Leishmania* Infections: Molecular Targets and diagnosis. **Molecular Aspects of Medicine**. v. 56, p. 1-29. 2017.
- ALDAMA, A.; GARCIA, J.M.; ALDAMA, J.G.; PEREIRA, J. Diffuse cutaneous leishmaniasis by *Leishmania (Viannia) brasiliensis*. About a case. **An. Fac. Cienc. Méd.** (Asunción). v. 53, n.2, 2020.
- ALVAR J, YACTAYO S, BERN C. Leishmaniasis and poverty. **Trends Parasitol.** 2006;22(12):552–7. 3.
- ALVAR J, VÉLEZ ID, BERN C, HERRERO M, DESJEUX P, CANO J, *et al.* Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLOS One**. 2012;7(5):e35671. 2.
- ARAÚJO, *et al.*, Prevenção da leishmaniose visceral: um estudo de caso nas comunidades endêmicas. Rio de Janeiro: **Editora Fiocruz**, 2022.
- ARIAS, J.; MONTEIRO, P.S.; ZICKER, F. The reemergence of visceral leishmaniasis in Brazil. **Euro. Infect. Dis.** v. 2, p. 145-146. 1996.
- BADARÓ, R.; JONES, T.C.; CARVALHO, E.M.; SAMPAIO, D.; REED, S.G.; BARRAL, A.; TEIXEIRA, R.; JOHNSON, W.D.JR. New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. **J Infect Dis**. v. 154, n. 6, p. 1003-11. 1986.
- BATES, P.A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **Scienc Direct**. v. 37, p. 1097-1106. 2007.
- BEUGNET, F., CHOMEL, B. Guide to Vector Borne Diseases of Pets. **Lyon: Merial. Sas**. 2013.
- BEUGNET, F., HALOS, L., GUILLOT, J. (2018). Textbook of Clinical Parasitology in dogs and cats. **Servet editorial** - Grupo Asís Biomedica, S.L.
- BOARINO, A.; SCALONE, A.; GRADONI, L.; FERROGLIO, E.; VITALE, F. ZANATTA, R.; GIUFFRIDA, M.G.; ROSATI, S. Development of recombinant chimeric antigen expressing immunodominant B epitopes of *Leishmania infantum* for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**. v.12. n.5. p.647-653. 2005.
- BOELAERT, M.; RIJAL, S.; REGMI, S.; SINGH, R.; KARKI, B.; JACQUET, D.; CHAPPUIS, F.; CAMPINO, L.; DESJEUX P.; LE RAY, D.; KOIRALA, S.; VAN DER STUYFT, P. A comparative study of the effectiveness of diagnostic tests for visceral leishmaniasis. **Am J Trop Med Hyg**, v. 70(1), p. 72–7, 2004.
- BOELAERT, M.; BHATTACHARYA, S.; CHAPPUIS, F.; EL SAFI, S.H.; HAILU, A.; MONDAL, D.; RIJAL, S.; SUNDAR, S.; WASUNNA, M.; PEELING, R.W. Avaliação de

testes diagnósticos rápidos: leishmaniose visceral. **Nat Rev Microbiol.** v. 5, p. 30-39. 2007

BORJA, L.S.; COLEHO, L.B.; DE JESUS, M.S.; QUEIROZ, A.T.L.; CELEDON, P.A.F.; ZACHIN, N.I.T.; SILVA, E.D.; FERREIRA, A.G.P.; KRIEGER, M.A.; VERAS, P.S.T.; FRAGA, D.B.M. High accuracy of na ELISA test based in a flagela antigen of *Leishmania* in serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis with potential to improve the control measures in Brazil – A Phase II study. **Plos Neglected Tropical Diseases.** p.1-14. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde (MS). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Brasília: MS; 2007.

BRASIL M da S do. Manual de Vigilância e controle da Leishmaniose Visceral. 2014: 122. Available: <http://www.saude.ba.gov.br/wp-content/uploads/2019/05/2014-Manual-de-vigilância-e-controle-da-leishmaniose-visceral.pdf> (Brasil, 2014)

BRASIL, M. D. S. Manual de recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes com a coinfeção *Leishmania*-HIV. 1º ed. Brasília - DF. 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – Brasília: Ministério da Saúde. 2017.

BRASIL. Leishmaniose tegumentar. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/lt#:~:text=tosse.-,Diagn%C3%B3stico,%2C%20s%C3%ADfilis%2C%20hansen%C3%ADase%20e%20tuberculose>. Acesso em 19 de julho de 2023.

BRASIL, Ministério da Saúde. Leishmaniose Visceral Canina: Recomendações e Tratamento. Brasília: Ministério da Saúde. 2022.

BRASIL. Leishmaniose visceral. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/leishmaniose-visceral>. Acesso em 19 de julho de 2023.

BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. **The Lancet.** v. 392, n. 10151, p. 951–970, 2018.

CASTRO, V. S.; ALVES, T. M. C.; PEREIRA, M. C. C. *et al.* The role of nutrition in the prevention and treatment of dental diseases in dogs and cats. **Journal of Animal Science and Technology**, v. 63, p. 46-55, 2021.

CHAABOUNI, A.; ELANDOULSI, R.B.; MHADHBI, M.; GHARBY, M.; SASSI, A. Comparative analysis of the *Leishmania infantum*-specific antibody repertoires and the autoantibody repertoires between asymptomatic and diseased dogs. **Veterinary Parasitology.** 2018.

CHAGAS, A. C. S. *et al.* Combination therapy with a low dose of miltefosine and allopurinol for the treatmentof canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 234, p. 1-6, 2017.

COELHO, V.S.; OLIVEIRA, J.; VALADARES, D.; CHAVES-FUMAGALLI, M.A.; DUARTE, M.; LAGE, P.S.; SOTO, M.; SANTORO, M.M.; TAVARES, C.A.; FERNANDES, A.P.; COELHO, E.A.F. Identification of proteins in promastigote and amastigote-like *Leishmania* using an immunoproteomic approach. **Plos Neglected tropical diseases**. v.6. e.1430. 2012.

COELHO, E.A.F.; COSTA, L.E.; LAGE, D.P.; MARTINS, V.T.; GARDE, E.; PEREIRA, N.C.J.; LOPES, E.G.P.; BORGES, L.F.N.M.; DUARTE, M.C.; MENEZES-SOUZA, D.; MAGALHÃES-SOARES, D.F.; CHAVÉZ-FUMAGALLI, M.A.; SOTO, M.; TAVARES, C.A.P. Evaluation of two recombinant *Leishmania* proteins identified by an immunoproteomic approach as tools for the serodiagnosis of canine visceral and human tegumentary leishmaniasis. **Veterinary parasitology**. v.215. p.63-71. 2016.

COSTA, C.H.N. How effective is dog culling in controlling zoonotic visceral leishmaniasis? A critical evaluation of the science, politics and ethics behind this public health policy. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 44, n. 2, p. 232-242. 2011.

COSTA DNCC, BERMUDI PMM, RODAS LAC, NUNES CM, HIRAMOTO RM, TOLEZANO JE, *et al.* Leishmaniose visceral em humanos e relação com medidas de controle vetorial e canino. **Rev Saude Publica**. 2018;52:92.

COSTA, J. R.; FERREIRA, L. C.; SANTOS, J. P. L. *et al.* Evaluation of hygienic-sanitary conditions and microbiological quality of cheese marketed in the southern region of Bahia, Brazil. **Higiene Alimentar**, v. 35, n. 306/307, p. 181-187, 2021.

DANTAS-TORRES. O papel dos cães como reservatórios de parasitos *Leishmania*, com destaque para *Leishmania infantum* e *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Vet Parasitol**. v.149 (3-4), p.139-146. 2007.

DANTAS-TORRES, F., MIRÓ, G., BOWMAN, D. D., GRADONI, L., & OTRANTO, D. (2018). Culling Dogs for Zoonotic Visceral Leishmaniasis Control: The Wind of Change. **Trends in Parasitology**, xx, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2018.11.005>

DA SILVA, M.R.B.; BRANDÃO, N.A.A.; COLOVATI, M.; DE SOUSA, M.M.P.; DE LIMA, L.C.; DORTA, M.L.; RIBEIRO-DIAS, F.; COSTA, D.L.; COSTA, C.H.N.; DE OLIVEIRA, M.A.P. Performance of two immunochromatographic tests for diagnosis of visceral leishmaniasis in patients coinfecting with HIV. **Parasitology Research**. v. 117, p. 419-427. 2017.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp. Immunol. Microbiol.* **Infect. Dis.** v. 27, p. 305-18. 2004.

DIAS, E. S. *et al.* Seroprevalence and risk factors for *Leishmania* spp. Infection in dogs from an endemic area of Brazil. **ActaTropica**, v. 171, p. 178-183, 2017.

DIAS, D.S.; RIBEIRO, A.F.; MARTINS, V.T.; LAGE, D.P.; RAMOS, F.F.; DIAS, A.L.T.; RODRIGUES, M.R.; PORTELA, A.S.B.; COSTA, L.E.; CALIGIORNE, R.B.; STEINER, B.T.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, M.A.; SALLES, B.C.S.; SANTOS, T.T.O.; SILVEIRA, J.A.G.; MAGALHÃES-SOARES, D.F.; ROATT, B.R.; MACHADO-DE-ÁVILA, R.A.; COELHO, E.A.F. Recombinant prohibitin protein of *Leishmania infantum* acts as a vaccine candidate and diagnostic marker against visceral leishmaniasis. **Cellular Immunology**. v. 323, p. 59 - 69. 2018.

DIRO, E.; YANSOUNI, C.P.; TAKELE, Y.; MENGESHA, B.; LYNEN, L.; HAILU, A.; GRIENSVEN, J.; BOELAERT, M.; BUSCHER, P. Diagnosis of Visceral Leishmaniasis Using Peripheral Blood Microscopy in Ethiopia: A Prospective Phase-III Study of the Diagnostic Performance of Different Concentration Techniques Compared to Tissue Aspiration. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 96. n. 1, p. 190-196. 2017.

DROZDETSKIY, A.; COLE, C.; PROCTER, J.; BARTON, G.J. JPred4: a protein secondary structure prediction server. **Nucleic Acids Research.** v.43. p.389- 394. 2015.

DUARTE, M.C.; PIMENTA, D.C.; MENEZES-SOUZA, D.; MAGALHÃES, R.D.M.; DINIZ, J.L.C.P.; COSTA, L.E.; CHAVEZ-FUMAGALLI, M.A.; LAGE, P.S.; BARTHOLOMEU, D.C.; ALVES, M.J.M.; FERNANDES, A.P.; SOTO, M. Proteins selected in *Leishmania (Viannia) braziliensis* by an immunoproteomic approach with potential serodiagnosis applications for tegentary leishmaniasis. **Clinical and Vaccine immunology.** v.22. n.11. p.1187-1196. 2015.

DUPREY, Z. H.; STEURER, F.J.; ROONEY, J.A.; KIRCHHOFF, L.V.; JACKSON, J.E.; ROWTON, E.D.; SCHANTZ, P.M. Canine visceral leishmaniasis, United States and Canada, 2000–2003. **Emerging infectious diseases**, v. 12, n. 3, p. 440. 2006.

ELMAHALLAWY, E.K.; MARTINEZ, A.S.; RODRIGUES-GRANGER, J.; HOYOSMALLECOT, Y.; AGIL, A.; MARI, J.M.N.; FERNANDEZ, J.G. Diagnosis of leishmaniasis. **J Infect Dev Ctries** v. 8, p. 961- 972. 2014.

ESPIR, T.T.; GUERREIRO, T.S.; NAIFF, M. F.; FIGUEIRA, L.P.; SOARES, F.V.; DA SILVA, S.S.; FRANCO, A.M. Evaluation of different diagnostic methods of American Cutaneous Leishmaniasis in the Brazilian Amazon. **Experimental Parasitology.** n. 167, p. 1-6. 2016.

ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. Tratado de Medicina Interna Veterinária - Doenças do Cão e do Gato. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A. 2004.

FAGUNDES-SILVA G.A., VIEIRA-GONCALVES R., NEPOMUCENO M.P., DE SOUZA M.A., FAVORETO JR. S., OLIVEIRA-NETO M.P., DA-CRUZ A.M., GOMES-SILVA A. Decrease in anti*Leishmania* IgG3 and IgG1 after cutaneous leishmaniasis lesion healing is correlated with the time of clinical cure, **Parasite Immunol.** 34 (2012) 486–491.

FARIA, A.R.; ANDRADE, H.M. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina: grandes avanços tecnológicos e baixa aplicação prática. **Rev Pan-Amaz Saude.** v. 3, n. 2, p. 47-57. 2012.

FERNANDEZ OL, DIAZ-TORO Y, OVALLE C, VALDERRAMA L, MUVDI S, RODRIGUEZ I, *et al.* Miltefosine and antimonial drug susceptibility of *Leishmania Viannia* species and populations in regions of high transmission in Colombia. **PLOS Neglect Trop Dis.** 2014;8(5):e2871.

FIEVEZ, A.M.C.; SILVA-FREITAS, M.L.; QUEIROS-SOUSA, A.; SANTOS-OLIVEIRA, J.R.; DA-CRUZ, A.M. Lower levels of leptin are associated with severity parameters in visceral leishmaniasis patients. **PLoS One.** v. 14. n. 3. e. e0214413. 2019.

FRAGA, D.B., SILVA, E.D., PACHECO, L.V., BORJA, L.S., OLIVEIRA, I.Q., COURAVITAL, W., MONTEIRO, G.R., OLIVEIRA, G.G., JERONIMO, S.M., REIS, A.B.,

- VERAS, P.S. A multicentric evaluation of the recombinant *Leishmania infantum* antigen-based immunochromatographic assay for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Parasit. Vectors** 7, 136. 2014.
- GAMA, M.E.; COSTA, J.M.; GOMES, C.M.; CORBETT, C.E. Subclinical form of the American visceral leishmaniasis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 99, n. 8, p. 889-93. 2004.
- GARNIER, T.; CROFT, S.L. Topical treatment for Cutaneous Leishmaniasis. Current opinion in investigational drugs, 2002.
- GASTEIGER, E.; GATTIKER, A.; HOOGLAND, C.; IVANYI, I.; APPEL, R.D.; BAIROCH, R. Expasy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. **Nucleic Acids Researchs**. v.31. n.3. 2003
- GHARBI, M., MHADHBI, M., REJEB, A., JAOUADI, K., ROUATBI, M., & DARGHOUTH, M. A. (2015). Leishmaniosis (*Leishmania infantum* infection) in dogs. **Revue Scientifique et Technique de l'OIE**, 34(2), 613–626. <https://doi.org/10.20506/rst.34.2.2384>
- GRAMICCIA, M.; GRADONI, L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. **Int J Parasitol**. v. 35, n.11-12, p. 1169-80. 2005.
- GRIMALDI, G.; TESH, R.B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. **Clin. Microbiol. Rev.** v. 6, p. 230–50. 1993.
- GONTINJO, C.M.F.; MELO, M.N. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**. v. 7, n. 3, p. 338- 349. 2004.
- GOMES, Y.M.; CAVALCANTI, M.P.; LIRA, R.A.; ABATH, F.G.C.; ALVES, L.C. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Biotechnological advances. **The veterinary Journal**. v. 175, n. 1, p. 45–52. 2008.
- GOMEZ, S. A., E PICADO, A. (2017). Systemic insecticides used in dogs: potential candidates for phlebotomine vector control? **Barcelona Institute for Global Health**. DOI: 10.1111/tmi.12870
- GONTIJO, C.M. *et al.*, Education and controlo f visceral leishmaniasis in urban populations. **Journal of Global Health**. V.13, n.2, p. 123-135. 2023.
- GONZÁLEZ U, PINART M, RENGIFO-PARDO M, MACAYA A, ALVAR J, TWEED JA. Interventions for American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Cochrane Database of Systematic Reviews**. 2009;(2).
- GOTO, H.; PRIANTI, M.G. Immunoactivation And Immunopathogeny During Active Visceral Leishmaniasis. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo** .v. 51, n. 5, p. 241-246. 2009
- GRIMALDI, G.; TESH, R.B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. **Clin. Microbiol. Rev.** v. 6, p. 230–50. 1993.
- GRIMALDI, G.Jr.; TEVA, A.; FERREIRA, A.L.; SANTOS, C.B.; PINTO, I.D.; AZEVEDO, C.T.; FALQUETO, A. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Trans R Soc Trop Med Hyg**. v. 106, n. 1, p. 54-9. 2012.

GHASEMIAN, M.; GHARAVI, M.J.; AKHLAGHI, L.; MOHEBALI, M.; MEAMAR, A.R.; ARIANO, E.; OORMAZDI, H. Development and assessment of loop- mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the diagnosis of human visceral leishmaniasis in Iran. **Iranian Journal of Parasitology**. v.9, n.1, p.50-59. 2014.

HANDLER, M. Z.; PATEL, P. A.; KAPILA, R.; AL-QUBATI, Y.; SCHWARTZ, R. A. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: Differential diagnosis, diagnosis, histopathology, and management. **Journal of American Dermatology**. v. 73, n. 6, p. 911-926. 2015.

HENDRICKX, S.; CALJON, G.; MAES, L. Need for sustainable approaches in antileishmanial drug Discovery. **Parasitology Research**. 2019.

HOSSAIN, F.; GHOSH, P.; KHAN, A.A.; DUTHIE, M.S.; VALLUR, A.C.; PICONE, A.; HOWARD, R.F.; REED, S.G.; MONDAL, D. Real-time PCR in detection and quantitation of *Leishmania donovani* for the diagnosis of Visceral Leishmaniasis patients and the monitoring of their response to treatment. **Plos One**. 2017.

KANE, M. M. MOSSER, D M. The Role of IL-10 in Promoting Disease Progression in Leishmaniasis. **J Immunol**. v. 2, n.166, p.1141-1147. 2001.

KAYE, P.M.; CRUZ, I.; PICADO, A.; BOCXLAER, K.V.; CROFT, S.L. Leishmaniasis immunopathology – impact on design and use of vaccines, diagnosis and drugs. **Seminars in immunopathology**. v.42, p.247-264. 2020.

KEVRIC, I.; CAPPEL, M.A.; KEELING, J.A.. New world and old world *Leishmania* infections. **Dermatol Clin** 33 (2015) 579–593. 2015.

KROLOW, MT; GOMES, SENHOR; VERSTEG, N.; WALLER, SB; FIGUEIREDO, FB; CLEFF, MB; DIAS, TP Possibilidades terapêuticas para o tratamento da Leishmaniose Visceral Canina no Brasil: Revisão de literatura. **Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento**. v. 11, e503111133760, 2022. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/33760>. Acesso em: 8 nov. 2023.

KUBAR, J.; FRAGAKI, K. Recombinant DNA-derived *Leishmania* proteins: from the laboratory to the field. **Lancet Infect. Dis**. v. 5, n. 2, p. 107–114. 2005.

LAGE, D.P.; MARTINS, V.T.; DUARTE, M.C.; COSTA, L.E.; GARDE, E.; DIMER, L. M.; KURSANCEW, A.C.S.; CHAVEZ-FUMAGALLI, M.A.; MAGALHÃES SOARES, D.F.; MENEZES-SOUZA, D.; ROATT, B.M.; AVILA, R.M.; SOTO, M.; TAVARES, C.A.P.; COELHO, E.A.F. A new *Leishmania* specific hypothetical protein and its non-described specific B cell conformational epitope applied in the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Parasitology Research**. n. 115, p. 1649-1658. 2016.

LAROIS, G., RIBEIRO, M.; ARRUDA, C.; OLIVEIRA, S.L.; CANASSA, T.; BAKER, M.J.; MARANGONI, B.; RAMOS, C.; CENA, C. A new strategy for canine visceral leishmaniasis diagnosis based on FTIR spectroscopy and machine learning. **Journal of Biophotonics**. 14: e20210014. 2021.

LINDOSO JAL, MOREIRA CHV, CUNHA MA, QUEIROZ IT. Visceral leishmaniasis and HIV coinfection: current perspectives. **HIV AIDS**. (2018) 10:193–201. doi: 10.2147/HIV.S143929

LIRA RA. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina: avaliação do desempenho dos kits EIE-Leishmaniose-Visceral-Canina-Bio-Manguinhos e IFI Leishmaniose-

Visceral- Canina-Bio-Manguinhos [dissertação]. Recife (PE): Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Departamento de Saúde Coletiva; 2005.

LOPES, E. G., SEVÁ, A. P., FERREIRA, F., NUNES, C. M., KEID, L. B., & HIRAMOTO, R. M. SOARES, R.M. (2018). Vaccine effectiveness and use of collar impregnated with insecticide for reducing incidence of *Leishmania* infection in dogs in an endemic region for visceral leishmaniasis, in Brazil. *Epidemiology and Infection*. <https://doi.org/10.1017/S0950268817003053>.

NOGUEIRA, C.T.; CISTIA, M.L.D.; URBACZEK, A.C.; JUSI, M.G.; VELÁSQUEZ, A.M.A.; MACHADO, R.Z.; FERREIRA, H.; SILVA, F.H.; LANGONI, H.; COSTA, P.I.; GRAMINHA, A.S. Potential application of rLc36 protein for diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**.v. 113(3), p. 197 - 201. 2018.

NUNES, C.M.; LIMA, V.M.F.; MELO, G.D.; PAULA, H.B.; PEREIRA, M.E.G.; TRONCO, C.M.T.; HIRAMOTO, R.M.; LAURENTI, M.D.; BURATTINI, M.N. Serological, parasitological and molecular tests for canine visceral leishmaniosis diagnosis in a longitudinal study. **Braz. J. Vet. Parasitol**. v. 24, n. 4, p. 402-409. 2015.

MAIA Z, LÍRIO M, MISTRO S, MENDES CM, MEHTA SR, BADARO R, Comparative study of rK39 *Leishmania* antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis: systematic review with meta-analysis. **PLoS Negl Trop Dis**. 6:e1484. 2012.

MAIA, C.; CAMPINO, L. Canine leishmaniasis in Portugal: Review of 2001–2016. **Veterinary Parasitology**, v. 251, p. 108-115, 2018.

MANDAL, J.; KHURANA, S.; DUBEY, M. L.; BHATIA, P.; VARMA, N.; MALLA, N. Short Report: Evaluation of Direct Agglutination Test, rk39 Test, and ELISA for the Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med**. 79(1), p. 76 - 78. 2008.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Coordenação de Fiscalização de Produtos Veterinários. Nota técnica nº 11/2016/CPV/DFIP/SDA/GM/MAPA. Processo nº 21000.042544/2016-94. <https://www.sbmt.org.br/portal/wp/content/uploads/2016/09/nota-tecnica.pdf>. 2016.

MAPA. Ministério da Agricultura e Pecuária. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/mapa-suspende-fabricacao-e-venda-e-determina-o-recolhimento-de-lotes-de-vacina-contra-leishmaniose-apos-fiscalizacao>. 2023.

MARY, C.; FARAUT, F.; DROGOUL, M.P.; XERIDAT, B.; SCHLEINITZ, N.; CUISENIER, B.; DUMON, H. Reference values for *Leishmania infantum* parasitemia in different clinical presentations: quantitative polymerase chain reaction for therapeutic monitoring and patient follow-up. **AmJ Trop Med Hyg**, v. 75, p. 858–63, 2006.

MARTINS, V.T.; CHAVEZ-FUMAGALLI, M.A.; COSTA, L.E.; MARTINS, A.M.C.C.; LAGE, P.S.; LAGE, D.P.; DUARTE, M.C.; VALADARES, D.G.; MAGALHÃES, R.D.M.; RIBEIRO, T.G.; NAGEM, R.A.P.; ROCHA, W.D.; REGIS, W.C.B.; SOTO, M.; COELHO, E.A.F.; FERNANDES, A.P.; TAVARES, C.A.P. Antigenicity and protective efficacy of a *Leishmania* amastigote –specific protein, member of the super oxygenase family, against visceral leishmaniasis. **PLoS Negl Trop Dis** . v.7. n.3. e2148. 2013.

MARTINS, V.T.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, M.A.; LAGE, D.A.; DUARTE, M.A.; GARDE, E.; COSTA, L.E.; DA SILVA, V.G.; OLIVEIRA, J.S.; MAGALHÃES-SOARES, D.F.; RIBEIRO TEIXEIRA, S.M.R.; FERNANDES, A.P.; SOTO, A.; TAVARES, C.A.P.; COELHO, E.A.F. Antigenicity, Immunogenicity and Protective Efficacy of Three Proteins Expressed in the Promastigote and Amastigote Stages of *Leishmania infantum* against Visceral Leishmaniasis. **PLoS One**. 10(9). 2015.

MARTINS, GLÊNDARA A.S, LIMA, MARIA D. Leishmaniose: do diagnóstico ao tratamento. **Enciclopédia biosfera, Centro Científico Conhecer** - Goiânia, v.9, n.16; p. 2559. 2013.

MARZOCHI, M.C.; COUTINHO, S.G.; DE SOUZA, W.J.; DE TOLEDO, L.M.; GRIMALDI JUNIOR, G.; MOMEN, H.; PACHECO, R.D.A.S.; SABROZA, P.C.; DE SOUZA, M.A.; RANGEL JUNIOR, F.B. Canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. Clinical, parasitological, therapeutical and epidemiological findings (1977-1983). **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 80, p. 349-57. 1985.

MATIAS, E.P; SANTO, F.F.; GUIMARÃES, J.P.; CHUCRI, T.M. Adverse effects of LEISH-TEC® vaccine on seronegative dogs for Visceral Leishmaniasis. **Brazilian Journal of Development**. v. 6, n. 7, p. 53019-53028. 2020.

Ministério da Agricultura e Pecuária. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/mapa-suspende-fabricacao-e-venda-e-determina-o-recolhimento-de-lotes-de-vacina-contraleishmaniose-apos-fiscalizacao>. 2023.

MEDEIROS, I. M.; NASCIMENTO, E.; HINRICHSEN, S. L., Leishmanioses (visceral e tegumentar). Hinrichsen SL. DIP-Doenças Infecciosas e Parasitárias. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 398-409. 2005.

MENEZES-SOUZA, D.; MENDES, T.A.; GOMES, S.; BARTHOLOMEU, D.C.; FUJIWARA, R.T. Improving serodiagnosis of human and canine leishmaniasis with recombinant *Leishmania braziliensis* cathepsin I-like protein and a synthetic peptide containing its linear B-cell epitope. **PLoS Negl Trop Dis**. 8;9(1):e3426. 2015.

MGCWIRE, B. S.; SATOSKAR, A.R. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. **Q J Med**. v.107. p.7-14. 2014.

MIRO, G.; CARDOSO, L.; PENNISI, M.G.; OLIVA, G.; BANETH, G. Canine leishmaniosis—new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. **Trends Parasitol**. v. 24, n. 8, p. 371–377. 2008.

MOOSAVIAN, S.A.; FALLAH, M.; JAAFARI, M.R. The activity of encapsulated meglumine antimoniate in stearylamine-bearing liposomes against cutaneous leishmaniasis in BALB/c mice. **Experimental parasitology**. 2019.

OLIVEIRA E, SALIBA JW, OLIVEIRA D, DIAS ES, PAZ GF. A prototype of the direct agglutination test kit (DAT-*Canis*) for the serological diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Vet Parasitol**. 2016; 221: 9-13.

OLIVEIRA, L. G.; FERNANDES, R. L.; FARIAS, L. *et al*. Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* spp. Isolated from broiler chickens in Brazil. **Poultry Science**, v. 100, n. 5, p. 101-123, 2021.

OLIVEIRA, F. *et al*. Estudo sobre as opções terapêuticas da leishmaniose visceral canina. São Paulo: **Editora Veterinária**. 2021.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases, Geneva, 22-26 March 2010 [Internet]. Geneva: OMS; 2010. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/44412>

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Leishmaniose. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/topicos/leishmaniose>. Acesso em 19 de julho de 2023.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Leishmanioses. Disponível em: https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab_1. Acesso em 15 de julho de 2023.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. Leishmanioses. Informe epidemiológico das Américas, Informe 8, dezembro 2019 [Internet]. Washington, DC: OPAS; 2019. Disponível em: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/51738>

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. Atlas interativo de leishmaniose nas Américas: aspectos clínicos e diagnósticos diferenciais [Internet]. Washington, DC: OPAS; 2020. Disponível em: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/54129>

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. Diretrizes para o tratamento das leishmanioses na Região das Américas. Segunda edição. Washington, DC: OPAS; 2022. Disponível em <https://doi.org/10.37774/9789275725030>.

OTRANTO, D., E DANTAS-TORRES, F. (2013). The prevention of canine leishmaniasis and its impact on public health. **Trends in Parasitology**, 29(7), 339–345. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2013.05.003>

PACHECO, C. F.; LIMA, M. L.; RODRIGUES, P. F. *et al.* Molecular detection and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* in wild rodents from the Amazon region of Brazil. **Journal of Parasitology**, v. 107, n. 3, p. 472-478, 2021.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. ****Leishmaniasis - PAHO/WHO****. Organização Pan-Americana da Saúde, 2021. Disponível em: <https://www.paho.org/en/topics/leishmaniasis>. Acesso em: 10 out. 2024.

PAIVA-CAVALCANTI, I. M.; MORAIS, R.C.S.; PESSOA-SILVA, R.; TRAJANO-SILVA, L.A.M.; GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE, S.C.; TAVARES, D.H.C.; BRELAZ-DECASTRO, M.C.; SILVA, R.F.; PEREIRA, V.R. Leishmaniasis diagnosis: An update on the use of immunological and molecular tools. **Cell Biosci** v. 5, n.31, p. 1-10. 2015.

PANIZ-MONDOLFI, A.E.; TALHARI, C.; BUSTOS, M.F.G.; ROSALES, T.; VILLAMIL-GOMES, W.; MARQUEZ, M.; ALVAREZ, A.M.P.; SANCHES, A.I.T.; RODRIGUES-MORALES, A. American cutaneous leishmaniasis in infancy and childhood. **International Journal of Dermatology**. v. 56, p. 1328-1341. 2017.

PEIXOTO HM, DE OLIVEIRA MR, ROMERO GA. Serological diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil: systematic review and meta-analysis. **Trop Med Int Health**. 2015; 20(3): 334-352.

PESSOA-E-SILVA, R.; SOUZA, V.V.A.; ANDRADE, T.A.S.; SILVA, A.C.O.; OLIVEIRA, G.A.; TRAJANO-SILVA, L.A.M.; NAKASONE, E.K.N.; PAIVACAVALCANTI, M. The diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil: confronting old problems. **Experimental Parasitology**. 2019.

PESSOA SB, MARTINS AV. Parasitologia médica. 11^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 872, 1988.

PORROZZI, R.; SANTOS DA COSTA, M.V.; TEVA, A.; FALQUETO, A.; FERREIRA, A.L.; DOS SANTOS, C.D.; FERNANDES, A.P.; GAZINELLI, R.T.; CAMPOS-NETO, A.; GRIMALDI, J. JR. Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays based on crude and recombinant leishmanial antigens for serodiagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania infantum* visceral infections in dogs. **Clinical and Vaccine immunology**. v. 14, n. 5, p. 544-548, 2007.

QUINNELL, R. J.; COURTENAY, O. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. **Parasitology**. v.14, n. 136, p. 1915–1934. 2009.

REGINA-SILVA, S.; FORTES-DIAS, C.L.; MICHALSKY, E.M.; FRANÇA-SILVA, J.C.; QUARESMA, P.F.; LIMA, A.C.V.M.R.; TEIXEIRA-NETO, R.G.; DIAS, E.S. Evaluation of parasitological examination, kDNA polymerase chain reaction and rK39-based immunochromatography for the diagnosis of visceral leishmaniasis in seropositive dogs from the screening-culling program in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 47, n. 4, p. 462-468. 2014.

REGUERA, R. M., MORÁN, M., PÉREZ-PERTEJO, Y., GARCÍA-ESTRADA, C., & BALAÑA-FOUCE, R. (2016). Current status on prevention and treatment of canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, 227, 98–114. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.07.011>

REVEIZ L, MAIA-ELKHOURY AN, NICHOLLS RS, ROMERO GA, YADON ZE. Interventions for American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: a systematic review update. **PLOS One**. 2013;8(4):e61843.

RIOS, L.C.; AMARAL, C.A.; PINTO, D.C.S.; SOBRINHO, V.R.S.; MAGALHÃES, O.D.O.; ARAUJO, J.G.N.; HIGINO, T.M.M.; ALIANÇA, A.S.S. Leishmaniose visceral: Histórico, agente etiológico, ciclo biológico, vetor, diagnóstico e tratamento. **Tópicos nas ciências da saúde**. v.10, p.98. 2022.

RIBEIRO, PATRÍCIA A.F.; DIAS, DANIEL S.; LAGE, DANIELA P.; COSTA, LOURENA E.; SALLES, BEATRIZ C.S.; STEINER, BETHINA T.; RAMOS, FERNANDA F.; LIMA, MARIANA P.; SANTOS, THAÍS T.O.; CHAVES, ANA T.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, MIGUEL A.; FUJIWARA, RICARDO T.; BUENO, LÍLIAN L.; CALIGIORNE, RACHEL B.; DE MAGALHÃES-SOARES, DANIELLE F.; SILVEIRA, JULIA A.G.; MACHADO-DE-ÁVILA, RICARDO A.; GONÇALVES, DENISE U.; COELHO, EDUARDO A.F. A conserved *Leishmania* hypothetical protein evaluated for the serodiagnosis of canine and human visceral and tegumentary leishmaniasis, as well as a serological marker for the posttreatment patient follow-up. **Diagnostic microbiology and infectious diseases**, v.92, p.196 - 203, 2018.

RODRIGUES M.R., SANTOS L.M.O., MIYAZAKI C.K., MARTINS V.T., LUDOLF F.R., KURSANCEW A. C., RAMOS F.F., DIAS D.S., OLIVEIRA J.S., VIEIRA P.M.A., ROATT B.M., MACHADO DE AVILA R. A., GONÇALVES D.U., MENEZES-SOUZA D., COELHO E.A.F., DUARTE M. C. Immunodiagnosis of human and canine visceral leishmaniasis using recombinant *Leishmania infantum* Prohibitin protein and a synthetic peptide containing its conformational B cell epitope, **J. Immunol. Methods** 474 (2019), 112641

- RODRIGUES-VEGA, A.; LOSADA-BARAGAN, M.; BERBERT, L.R.; MESQUITA-RODRIGUES, C.; BOMBAÇA, A.C.S.; MENNA-BARRETO, R.; AQUINO, P.; CARVALHO, P.C.; PADRON, G.; JESUS, J.B.; CUERVO, P. Quantitative analysis of protein secreted by *Leishmania (Viannia) braziliensis* strains associated to distinct clinical manifestations of american tegumentary leishmaniasis. **Journal of Proteomics** 232 (2021) 104077. 2021.
- ROQUE, A.L.R.; JANSEN, A.M. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*. v.3, p. 251–262. 2014
- ROATT, B.M., DE OLIVEIRA CARDOSO, J.M., DE BRITO, R.C.F. *et al.* Recent advances and new strategies on leishmaniasis treatment. **Appl Microbiol Biotechnol** 104, 8965–8977 (2020).
- ROCHA, M.A.N.; MATOS-ROCHA, T.J.; RIBEIRO, C.M.B.; ABREU, S.R.O. Epidemiological aspects of human and canine visceral leishmaniasis in State of Alagoas, Northeast, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**. v. 78, n.4, p. 609-614. 2018.
- ROMERO GA, M. DE LA GLORIA ´ORGE ORGE, M.V. DE FARIAS GUERRA, PAES MG, DE OLIVEIRA MACEDO V, DE CARVALHO EM. Antibody response in patients with cutaneous leishmaniasis infected by *Leishmania (Viannia) braziliensis* or *Leishmania (Viannia) guyanensis* in Brazil, **Acta Trop**. 93 (2005) 49–56.
- ROMERO GAS, BOELAERT M. Control of visceral leishmaniasis in latin America - A systematic review. **PLoS Negl Trop Dis**. 2010;4(1).
- RUITER, C.M.; VAN DER VEER, C.; LEEFLANG, M.M.; DEBORGGRAEVE, S.; LUCAS, C.; ADAMS, E.R. Molecular tools for diagnosis of visceral leishmaniasis: systematic review and meta-analysis of diagnostic test accuracy. **J Clin Microbiol**, v. 52(9), p. 3147–55, 2014.
- SACKS, D.; KAMHAWI, S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in Leishmaniasis. **Annu. Rev. Microbiol**. v. 55, p. 453-483. 2001.
- SACKS, D.; SHER, A. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. **Nature Immunol**. v. 3, n. 11, p. 1041-1047. 2002.
- SALLES, B.C.S.; DIAS, D.S.; STEINER, B.T.; LAGE, D.P.; RAMOS, F.F.; RIBEIRO, P.A.F.; SANTOS, T.T.O.; LIMA, M.P.; COSTA, L.E.; CHAVES, A.T.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, M.A.; FUJIWARAA, R.T.; BUENOA, L.L.; CALIGIORNE, R.B.; DE MAGALHÃES-SOARES, D.F.; SILVEIRA, J.A.G.; MACHADO-DE-ÁVILA, R.A.; GONÇALVES, D.U.; COELHO, E.A.F. Potential application of small myristoylated protein-3 evaluated as recombinant antigen and a synthetic peptide containing its linear B-cell epitope for the serodiagnosis of canine visceral and human tegumentary leishmaniasis. **Immunobiology**. 224(1):163-171. 2019.
- SANTOS, A.R.R.; SERUFO, A.V.; FIGUEIREDO, M.M.; GODOI, L.C.; VITORIO, J.G.; MARCELINO, A.P.; AVELAR, D.M.; RODRIGUES, F.T.G.; MACHADO-COELHO, G.L.L.; MEDEIROS, F.A.C.; JERONIMO, S.M.B.; OLIVEIRA, E.J.; NASCIMENTO, F.C.; TEIXEIRA, S.M.R.; GAZINELLI, R.T.; NAGEM, R.A.P.; FERNANDES, A.P. Evaluation of three recombinant proteins for the development of ELISA and immunochromatographic tests for visceral leishmaniasis serodiagnosis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 114: e180405, p.1-11. 2019.

SANTOS, W.J.T.; TAVARES, D.H.C.; NETO, A.L.C.; NASCIMENTO, M.B.; DHALIA, R.; ALBUQUERQUE, A.L.; COSTA, C.H.N.; MAGALHÃES, F.B.; REZENDE, A.M.; NETO, O.P.M. Gene design, optimization of protein expression and preliminary evaluation of a new chimeric protein for the serological diagnosis of both human and canine visceral leishmaniasis. **Plos Neglected Tropical Diseases**. 14(7): e0008488. 2020.

SANTOS, A. S.; SILVA, E. G.; GONÇALVES, R. C. *et al.* Canine visceral leishmaniasis and associated factors in dogs from rural settlements in the state of Mato Grosso, **Brazil. Journal of Infection and Public Health**, v. 14, n. 1, p. 80-85, 2021.

SAKKAS, H.; GARTZONIKA, C. AND LEVIDIOTOU, S. Laboratory diagnosis of human visceral leishmaniasis. **Journal of Vectors Borne Diseases**, v. 53, n.1, p. 8–16, 2016.

SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE. Leishmaniose tegumentar americana. Boletim epidemiológico. p.1-14. 2023.

SECRETARIA DA SAÚDE DO ESTADO DA BAHIA. Vigilância Epidemiológica. Leishmaniose. Disponível em: www.saude.ba.gov.br/suvisa/vigilancia-epidemiologica/doencas-de-transmissao-vetorial/leishmaniose. Acesso em: 08 de novembro de 2023.

SANTIAGO, AS; PITA, SS da R.; GUIMARÃES, ET Tratamento da leishmaniose, limitações terapêuticas atuais e novas exigências alternativas: uma revisão narrativa. **Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento**, v. 7, e29510716543, 2021. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/16543>. Acesso em: 8 nov. 2023.

SEVÁ, A.P.; OVALLOS, F.G.; AMAKU, M.; CARILLO, E.; MORENO, J.; GALATI, E.A.B.; LOPES, E.G.; SOARES, R.M.; FERREIRA, F. Canine-Based Strategies for Prevention and Control of Visceral Leishmaniasis in Brazil. **PLoS One**. v. 11, n.7, p. e0160058. 2016.

SILVA, R.R.; SILVA, A.S.; SANTOS, P.L.; CAMPOS, R.N.S. Leishmaniose Visceral em cães no Brasil: revisão de literatura. **Science and animal health**. v.9, n.1, p.54-75. 2021.

SINGH S, DEY A, SIVAKUMAR R. Applications of molecular methods for *Leishmania* control. **Expert Rev Mol Diagn**. 2005;5(2):251–265.

SINGH OP, SUNDAR S. Developments in diagnosis of visceral leishmaniasis in the elimination era. **J Parasitol Res**. 2015;2015:2015.

SCORZA, B.M.; CARVALHO, E.M., WILSON, M.E. Cutaneous Manifestations of Human and Murine Leishmaniasis. **Int. J. Molecular Sciences**. 18, 1296, p.1-26. 2017.

SHARIFI I., AFLATOONIAN MR., DAEI PARIZI MH., HOSSEININASAB A., MOSTAFAVI M., BAMOROVAT M., AGHAEI AFSHAR A., MOHEBALI M., KESHAVARZ H., DANESHVAR H., BABAEI Z., MAHMOUDVAND H., MOHAMMADI MA., SHARIFI F., BARATI M., KAMIABI H., KHALEGHI T., Visceral Leishmaniasis in Southeastern Iran: A Narrative Review. **Iran J Parasitol**. v. 12, n.1, p.1-11. 2017.

SHEIKH, S.; AMIR, A. A.; AMIR, A. B.; AMIR, A.A. Leishmaniasis. **Parasitology and Microbiology Research**. IntechOpen. 2020.

SRIVIDYA, G.; KULSHRESTHA, A.; SINGH, R.; SALOTRA, P. Diagnosis of visceral leishmaniasis: Developments over the last decade. **Parasitol Res.** v. 110, p. 1065–78, 2012.

SUDARSHAN, M & SUNDAR S. Parasite load estimation by qPCR differentiates between asymptomatic and symptomatic infection in Indian visceral leishmaniasis. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 80(1), p. 40–2, 2014.

SOUZA, C.M.; SILVA, E.D.; ANOBOM, A.P.D.; BASTOS, R.C.; NASCIMENTO, H.J.; DA SILVA JUNIOR, J.G. Evaluation of na ELISA for canine leishmaniasis immunodiagnostic using recombinant proteins. *Parasite immunology*. 34, 1-7. 2012.

SOUZA, A.P.; SOTO, M.; COSTA, J.M.L.; BOAVENTURA, V.S.; DE OLIVEIRA, C.I.; CRISTAL, J.R.; BARRALNETTO, M.; BARRAL, A. Towards a more precise serological diagnosis of human tegumentary leishmaniasis using *Leishmania* recombinant proteins. **PLoS One** 8:e66110. 2013.

SOUZA-FILHO, J.A.; BARBOSA, J.R.; FIGUEIREDO, F.B.; MENDES JUNIOR, A.A.V.; DA SILVA, S.R.; COELHO, G.L.L.M.; MARCELINO, A.P. Performance of Alere™ immunochromatographic test for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology** v. 225, p. 114–116. 2016.

SRIVIDYA, G.; KULSHRESTHA, A.; SINGH, R.; SALOTRA, P. Diagnosis of visceral leishmaniasis: Developments over the last decade. **Parasitol Res.** V. 110, p. 1065–78, 2012.

SUNDAR, S.; SINGH, R.K.; BIMAL, S.K.; GIDWANI, K.; MISHRA, A.; MAURYA, R.; SINGH, S.K.; MANANDHAR, K.D.; BOELAERT, M.; RAI, M. Comparative evaluation of parasitology and serological tests in the diagnosis of visceral leishmaniasis in India: a phase III diagnostic accuracy study. **Tropical Medicine and International Health.** v. 12, n. 2, p. 284 – 289. 2007.

THAKUR, S.; JOSHI, J.; KAUR, S. Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of parasitological, immunological and molecular methods. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 44, n. 2, p. 253–272, 1 jun. 2020.

TESH, R.B. Control of zoonotic visceral leishmaniasis: is it time to change strategies? **Am J Trop Med Hyg.** v. 52, n. 3, p. 287-92. 1995.

TORRES-GUERRERO, E. *et al.* Leishmaniasis: A review. **F1000Research**, v. 6, n. May, p. 1–15, 2017.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; BORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci USA.** v. 76, n. 9, p. 4350-4354. 1979.

TIWARI, N., GEDDA, M. R., TIWARI, V. K., SINGH, S.P, SINGH, R. K. (2018). Limitations of Current Therapeutic Options, Possible Drug Targets and Scope of Natural Products in Control of Leishmaniasis. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry.** v. 18, n. 1

VALE, D.L.; DIAS, D.S.; MACHADO, A.S.; RIBEIRO, P.A.F.; LAGE, D.P.; COSTA, L.E.; STEINER, B.T.; TAVARES, G.S.V.; RAMOS, F.F.; MARTINEZ-RODRIGO, A.; CHAVEZ-FUMAGALLI, M.A.; CALIGIORNE, R.B.; MAGALHÃES-SOARES, D.F.;

SILVEIRA, J.A.G.; MACHADO-DE-AVILA, R.A.; TEIXEIRA, A.L.; COELHO, E.A.F. Diagnostic **Microbiology and Infectious Disease**. v.95, p.134-143. 2019.

WEIGLE K.A.; VALDERRAMA L.; ARIAS A.L.; SANTRICH C.; SARAVIA N.G. Leishmanin skin test standardization and evaluation of safety, dose, storage, longevity of reaction and sensitization. **Am J Trop Med Hyg**. v. 44, n. 3, p. 260-71. 1991.

WERNECK, G.L. Visceral leishmaniasis in Brazil: rationale and concerns related to reservoir control. **Rev Saude Publica**. v. 48, n.5, p. 851-6. 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22-26 March 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Leishmaniasis, 2018. <http://www.who.int/topics/leishmaniasis/en/>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Manual de procedimientos para vigilancia y control de las leishmaniasis em las Americas. 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Leishmaniasis control strategies. Geneva: WHO, 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Leishmanioses. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/topicos/leishmaniose>. Acesso em 18 de julho de 2023.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, LEISHMANIASIS. Disponível em: <http://www.who.int/topics/leishmaniasis>. Acesso em: 15 de julho de 2023.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Leishmaniasis Surveillance, 2022. Weekly Epidemiological Record, 98(40), 471-487. Disponível em: <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/373229/WER9840-471-487.pdf?sequence=1>. Acesso em: 09 de novembro de 2023.

9. ANEXOS

9.1 Comprovantes de aprovação dos projetos



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação da eficácia vacinal e do desempenho diagnóstico de antígenos de *Leishmania*, identificados por ferramentas biotecnológicas, para a leishmaniose tegumentar e visceral", protocolo do CEUA: 144/2020 sob a responsabilidade de Eduardo Antonio Ferraz Coelho que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 03/08/2020.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

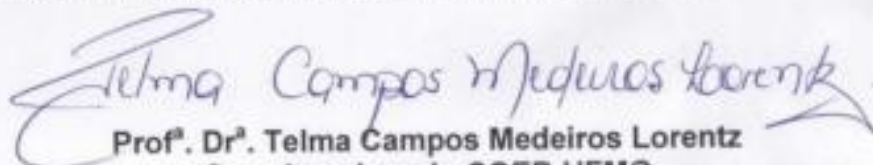
Projeto: CAAE – 32343114.9.0000.5149

Interessado(a): Prof^a. Denise Utsch Gonçalves
Depto. de Oftalmologia e Otorrinolaringologia
Faculdade de Medicina- UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 02 de setembro de 2014, o projeto de pesquisa intitulado "Avaliação longitudinal clínica e imunológica de pacientes com leishmaniose cutâneo-mucosa da região metropolitana de Belo Horizonte" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto através da Plataforma Brasil.


Prof.^a. Dr.^a. Telma Campos Medeiros Lorentz
Coordenadora do COEP-UFMG

9.2 Patentes depositadas durante o doutorado



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria,
Comércio e Serviços
Instituto Nacional da Propriedade Industrial



(21) BR 102021018556-2 A2

(22) Data do Depósito: 17/09/2021

(43) Data da Publicação Nacional:
28/03/2023

(54) Título: PROTEÍNA QUIMÉRICA RECOMBINANTE, KIT, MÉTODO E USOS PARA DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL

(51) Int. Cl.: C07K 19/00; C07K 14/44; G01N 33/569; G01N 33/68.

(71) Depositante(es): UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS; FUNDAÇÃO EDUCACIONAL DE CRICIÚMA ? FUCRI.

(72) Inventor(es): EDUARDO ANTONIO FERRAZ COELHO; VÍVIAN TAMIETTI MARTINS; DANNIELE LUCIANA VALE; DANIELA PAGLIARA LAGE; AMANDA SANCHEZ MACHADO; FERNANDA FONSECA RAMOS; RICARDO ANDREZ MACHADO DE ÁVILA; DAYSIANE DE OLIVEIRA; BETHINA TREVISOL STEINER; GABRIEL PAULINO LUIZ.

(57) Resumo: PROTEÍNA QUIMÉRICA RECOMBINANTE, KIT, MÉTODO E USOS PARA DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL. A presente tecnologia trata de uma proteína quimérica recombinante composta por epítomos específicos de células B preditos por bioinformática. A tecnologia também compreende um kit e um método para diagnóstico da leishmaniose visceral no homem e cão.

VPRAVLMELTPTGME:CYSGDITREAHQSE:CPYGVGIDITYVNGQYVYDQ
DQVQVQ:SGDQVGVGSHDQ:LPVSGDQVGVGSHDQ:SGDQVGVGSHDQ
DQVQVQ:SGDQVGVGSHDQ:LPVSGDQVGVGSHDQ:SGDQVGVGSHDQ

Figura 2

10 APÊNDICES

10.1 Artigos de primeira autoria

10.1.1 Publicação do artigo científico intitulado: “Efficacy an immunotherapy combining immunogenic chimeric protein plus adjuvante and amphotericin B against murine visceral leishmaniasis.”



Article

Efficacy of an Immunotherapy Combining Immunogenic Chimeric Protein Plus Adjuvant and Amphotericin B against Murine Visceral Leishmaniasis

Danniele L. Vale ¹, Camila S. Freitas ¹, Vivian T. Martins ¹, Gabriel J. L. Moreira ², Amanda S. Machado ¹, Fernanda F. Ramos ¹, Isabela A. G. Pereira ¹, Raquel S. Bandeira ¹, Marcelo M. de Jesus ¹, Grasielle S. V. Tavares ¹, Fernanda Ludolf ¹, Miguel A. Chávez-Fumagalli ³, Alessandro S. Galdino ⁴, Ricardo T. Fujiwara ⁵, Lilian L. Bueno ⁶, Bruno M. Roatt ², Myron Christodoulides ^{4,*}, Eduardo A. F. Coelho ^{1,7,*} and Daniela P. Lage ¹

- ¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 30130-100, Minas Gerais, Brazil
 - ² Laboratório de Imunopatologia, Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas/NUPER, Departamento de Ciências Biológicas, Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto 35400-000, Minas Gerais, Brazil
 - ³ Computational Biology and Chemistry Research Group, Vicerrectorado de Investigación, Universidad Católica de Santa María, Urb. San José S/N, Urcosillo, Arequipa 04000, Peru
 - ⁴ Laboratório de Biotecnologia de Microrganismos, Universidade Federal de São João del-Rei, Divinópolis 35501-296, Minas Gerais, Brazil
 - ⁵ Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 31270-901, Minas Gerais, Brazil
 - ⁶ Netosseria Research Group, Molecular Microbiology, School of Clinical and Experimental Sciences, University of Southampton Faculty of Medicine, Southampton General Hospital, Southampton SO16 6YD, UK
 - ⁷ Departamento de Patologia Clínica, Colégio Técnico (COLTEC), Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, Belo Horizonte 31270-901, Minas Gerais, Brazil
- * Correspondence: mc40@ctan.ac.uk; Tel.: +44-(0)2381-205120
- † These authors contributed equally to this work.



Citation: Vale, D.L.; Freitas, C.S.; Martins, V.T.; Moreira, G.J.L.; Machado, A.S.; Ramos, F.F.; Pereira, I.A.G.; Bandeira, R.S.; de Jesus, M.M.; Tavares, G.S.V.; et al. Efficacy of an Immunotherapy Combining Immunogenic Chimeric Protein Plus Adjuvant and Amphotericin B against Murine Visceral Leishmaniasis. *Biology* **2023**, *12*, 851. <https://doi.org/10.3390/biology12060851>

Academic Editor: Nicola Carter

Received: 5 April 2023

Revised: 6 June 2023

Accepted: 9 June 2023

Published: 13 June 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Simple Summary: Visceral leishmaniasis is a tropical neglected disease caused by infection with *Leishmania* parasites. There are no human vaccines and the current drug treatments for infected patients are hampered by toxicity and the development of resistance. In our study, we have used an immunotherapeutic approach, which combines a vaccine and drug, to treat mice infected with the parasite. This involved injecting a candidate *Leishmania* vaccine ChimT with the adjuvant monophosphoryl lipid A (MPLA, which enhances the immune response) and a treatment drug amphotericin B (AmpB). We found that the combined immunotherapy of ChimT/MPLA/AmpB significantly reduced the number of parasites within infected internal organs of the animals and increased the production of protective antibodies. Organ toxicity was also lower with the ChimT/MPLA/AmpB immunotherapy, suggesting that the inclusion of the vaccine and adjuvant reduced the inherent toxicity of the drug. In addition, the ChimT vaccine stimulated *in vitro* mouse white cells to kill three different *Leishmania* parasites that had invaded the cells. We conclude that the combination of ChimT/MPLA/AmpB could be considered for further studies as an immunotherapy for *Leishmania* infection.

Abstract: Visceral leishmaniasis (VL) in the Americas is a chronic systemic disease caused by infection with *Leishmania infantum* parasites. The toxicity of antileishmanial drugs, long treatment course and limited efficacy are significant concerns that hamper adequate treatment against the disease. Studies have shown the promise of an immunotherapeutics approach, combining antileishmanial drugs to reduce the parasitism and vaccine immunogens to activate the host immune system. In the current study, we developed an immunotherapy using a recombinant T cell epitope-based chimeric protein, ChimT, previously shown to be protective against *Leishmania infantum*, with the adjuvant monophosphoryl lipid A (MPLA) and amphotericin B (AmpB) as the antileishmanial drug. BALB/c mice were infected with *L. infantum* stationary promastigotes and later they received saline or were treated with AmpB, MPLA, ChimT/Amp, ChimT/MPLA or ChimT/MPLA/AmpB.

10.1.2 Publicação do artigo científico intitulado: “Evaluation from a B-cell epitope-based chimeric protein for the serodiagnosis of tegumentar and visceral leishmaniasis.”

Microbial Pathogenesis 167 (2022) 105562



Contents lists available at ScienceDirect

Microbial Pathogenesis

journal homepage: www.elsevier.com/locate/micpath



Evaluation from a B-cell epitope-based chimeric protein for the serodiagnosis of tegumentary and visceral leishmaniasis

Danniele L. Vale^a, Amanda S. Machado^a, Fernanda F. Ramos^a, Daniela P. Lage^a, Camila S. Freitas^a, Daysiane de Oliveira^b, Nathalia C. Galvani^a, Gabriel P. Luiz^b, Mirian I. Fagundes^b, Bruna B. Fernandes^b, João A. Oliveira-da-Silva^a, Fernanda Ludolf^a, Grasielle S.V. Tavares^a, Nathalia S. Guimarães^a, Ana T. Chaves^a, Miguel A. Chávez-Fumagalli^c, Unai Tupinambás^a, Manoel O.C. Rocha^a, Denise U. Gonçalves^a, Vívian T. Martins^a, Ricardo A. Machado-de-Ávila^b, Eduardo A.F. Coelho^{a,d,*}

^a Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 30130-100, Minas Gerais, Brazil

^b Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, 88806-000, Santa Catarina, Brazil

^c Computational Biology and Chemistry Research Group, Vicerrectorado de Investigación, Universidad Católica de Santa María, Urb. San José S/N, Umacollo, Arequipa, 04000, Peru

^d Departamento de Patologia Clínica, COLTEC, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 31270-901, Minas Gerais, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Leishmaniasis
Diagnosis
Chimeric protein
B-Cell epitopes
Sensitivity
Specificity

ABSTRACT

The diagnosis of leishmaniasis presents problems due to the variable sensitivity and/or specificity of tests. In addition, high levels of anti-parasite antibodies can remain after treatment, making it difficult to conduct a prognostic follow-up of patients. In this context, it is necessary to identify new candidates to be examined for the sensitive and specific diagnosis of the disease. In the present study, four *Leishmania* proteins, previously shown as antigenic for tegumentary leishmaniasis (TL), were evaluated, and their linear specific B-cell epitopes were predicted and used to generate a new gene codifying chimeric protein called ChimB, which was cloned, and the recombinant version was expressed, purified, and evaluated in ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) to diagnose TL and visceral leishmaniasis (VL). A total of 220 human serum samples were used, and, when ChimB was used, results showed sensitivity, specificity, and positive and negative predictive values of 100% for the diagnosis of both diseases; however, when using peptides, the sensitivity values reached from 28.0% to 57.3% and specificity varied from 16.3% to 83.7%. A soluble *Leishmania* extract (SLA) showed sensitivity and specificity values of 30.7% and 45.9%, respectively. The area under the curve (AUC) value for ChimB was 1.0, while for synthetic peptides, this value reached between 0.502 and 0.635, whereas for SLA, the value was of 0.589. Serological assays using sera samples collected before and after treatment showed significant reductions in the anti-ChimB antibody levels after therapy, suggesting a prognostic role of this recombinant antigen. In conclusion, preliminary data suggest the use from ChimB as a potential candidate for the diagnosis and prognosis of leishmaniasis.

1. Introduction

Leishmaniasis is a neglected disease complex caused by different species of the protozoan parasites of genus *Leishmania*, which are transmitted by bites of infected sandflies [1]. There are about 20 parasite species able to cause disease in humans and an incidence of 0.2–0.4

million cases of visceral leishmaniasis (VL) and 0.7 to 1.2 million cases of tegumentary leishmaniasis (TL) is estimated to occur annually. Over 90% of VL cases have been registered in Bangladesh, Ethiopia, Brazil, India, Sudan, and South Sudan. TL is more widespread and occurs in countries, such as Afghanistan, Algeria, Brazil, Iran, Peru, Ethiopia, North Sudan, Costa Rica, Colombia, and Syria [2]. VL is the most severe

* Corresponding author. Laboratório de Pesquisa do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Prof. Alfredo Balena, 190, 30130-100, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.
E-mail address: eduardoferrazcoelho@yahoo.com.br (E.A.F. Coelho).

<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105562>

Received 14 January 2022; Received in revised form 26 April 2022; Accepted 27 April 2022

Available online 2 May 2022

0882-4010/© 2022 Elsevier Ltd. All rights reserved.

10.1.3 Publicação do artigo científico intitulado: “Serodiagnosis of canine leishmaniasis using a novel recombinant chimeric protein constructed with distinct B-cell epitopes from antigenic *Leishmania infantum* proteins.”

Veterinary Parasitology 296 (2021) 109513



Contents lists available at ScienceDirect

Veterinary Parasitology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vetpar



Research paper

Serodiagnosis of canine leishmaniasis using a novel recombinant chimeric protein constructed with distinct B-cell epitopes from antigenic *Leishmania infantum* proteins

Danniele L. Vale^a, Daniela P. Lage^a, Amanda S. Machado^a, Camila S. Freitas^a, Daysiane de Oliveira^b, Nathália C. Galvani^a, Bruna B. Fernandes^b, Gabriel P. Luiz^b, Jamil S. Oliveira^c, João A. Oliveira-da-Silva^a, Fernanda F. Ramos^a, Thaís T.O. Santos^a, Williane F. Siqueira^d, Livia A. Alves^e, Miguel A. Chávez-Fumagalli^f, Danielle F. de Magalhães-Soares^g, Julia A.G. Silveira^d, Lílían L. Bueno^{a,d}, Ricardo T. Fujiwara^{a,d}, Ricardo A. Machado-de-Ávila^b, Vívian T. Martins^a, Eduardo A. F. Coelho^{a,h,*}

^a Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 30130-100, Minas Gerais, Brazil

^b Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, 88806-000, Santa Catarina, Brazil

^c Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 31270-901, Minas Gerais, Brazil

^d Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 31270-901, Minas Gerais, Brazil

^e Secretaria Municipal de Saúde, Prefeitura Municipal de Igarapé, Igarapé, Minas Gerais, Brazil

^f Universidad Católica de Santa María, Urb. San José S/N, Umacollo, Arequipa, Peru

^g Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 31270-901, Minas Gerais, Brazil

^h Departamento de Patologia Clínica, COLTEC, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 31270-901, Minas Gerais, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Visceral leishmaniasis
Dogs
Recombinant chimera
Commercial kit
Serodiagnosis
ELISA

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis (VL) is an important public health problem in the world, and control measures are insufficient to avoid the spread of this neglected disease. Dogs are important domestic reservoirs of *Leishmania* parasites in countries where VL is a zoonosis, representing a major source of infection between sand fly vectors and humans. In this context, a precise diagnosis of canine leishmaniasis (CanL) could help to reduce the number of human cases. Distinct approaches for the diagnosis of CanL have used recombinant proteins in serological assays. However, variable results of the antigens have been found, mainly to diagnosis asymptomatic cases. The present study used bioinformatics to select specific B-cell epitopes of four *Leishmania infantum* proteins, which had previously been proven to be antigenic in VL, aiming to produce a novel chimeric protein and to evaluate it for the diagnosis of CanL. Seven B-cell epitopes were identified and used to construct the chimera, which was analyzed in a recombinant format through an ELISA assay against a canine serological panel. A soluble *Leishmania* antigenic extract (SLA) was used as an antigen control. Results showed 100 % sensitivity and specificity for chimera, while when using SLA the values were 26.0 % and 96.4 %, respectively. The performance of chimera was compared with a commercial kit using asymptomatic and symptomatic dog sera, and the data showed that no false-negative result was found when the recombinant protein was used. However, when using the commercial kit, 40.0 % and 16.0 % of the false-negative results were found, respectively. In conclusion, the recombinant chimera showed an antigenic potential to be evaluated in new studies against a larger serological panel for the diagnosis of CanL.

* Corresponding author at: Laboratório de Pesquisa do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Prof. Alfredo Balena, 190, 30130-100, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

E-mail address: eduardoferrazcoelho@yahoo.com.br (E.A.F. Coelho).

<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2021.109513>

Received 24 April 2021; Received in revised form 25 June 2021; Accepted 26 June 2021
Available online 1 July 2021

0304-4017/© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

10.2 Demais artigos científicos publicados durante o doutorado

FREITAS, CAMILA S. ; PEREIRA, ISABELA A.G. ; LAGE, DANIELA P. ; **VALE, DANNIELE L.** ; PIMENTA, BRENO L. ; SOARES, NÍCIA P. ; SANTIAGO, SAMIRA S. ; MARTINS, VÍVIAN T. ; CÂMARA, RAQUEL S.B. ; JESUS, MARCELO M. ; TAVARES, GRASIELE S.V. ; RAMOS, FERNANDA F. ; LUDOLF, FERNANDA ; MAGALHÃES, LÍCIA N.D. ; OLIVEIRA, FABRÍCIO M. ; Duarte, Mariana C. ; Chávez-Fumagalli, Miguel A. ; COSTA, ADILSON V. ; ROATT, BRUNO M. ; COELHO, E. A. F. ; et.al . New synthetic molecules incorporated into polymeric micelles used for treatment against visceral leishmaniasis. CYTOKINE **JCR**, v. 177, p. 156543, 2024.

PEREIRA, ISABELA A.G. ; FREITAS, CAMILA S. ; CÂMARA, RAQUEL S.B. ; JESUS, MARCELO M. ; LAGE, DANIELA P. ; TAVARES, GRASIELE S.V. ; SOYER, TAUANE G. ; RAMOS, FERNANDA F. ; SOARES, NÍCIA P. ; SANTIAGO, SAMIRA S. ; MARTINS, VÍVIAN T. ; **VALE, DANNIELE L.** ; PIMENTA, BRENO L. ; LUDOLF, FERNANDA ; OLIVEIRA, FABRÍCIO M. ; Duarte, Mariana C. ; Chávez-Fumagalli, Miguel A. ; COSTA, ADILSON V. ; GONÇALVES, DENISE U. ; COELHO, E. A. F. ; et.al . Treatment using vanillin-derived synthetic molecules incorporated into polymeric micelles is effective against infection caused by *Leishmania amazonensis* species. EXPERIMENTAL PARASITOLOGY **JCR**, v. 260, p. 108743, 2024.

SOYER, TAUANE GONÇALVES ; BANDEIRA CÂMARA, RAQUEL SOARES ; PEREIRA, ISABELA AMORIM GONÇALVES ; RAMOS, FERNANDA FONSECA ; DE JESUS, MARCELO MOREIRA ; LUDOLF, FERNANDA ; DE PAULA COSTA, GUILHERME ; LAGE, DANIELA PAGLIARA ; DE FREITAS, CAMILA SIMÕES ; **VALE, DANNIELE LUCIANA** ; PIMENTA, BRENO LUIZ ; MARTINS, VÍVIAN TAMIETTI ; GALDINO, ALEXSANDRO SOBREIRA ; CHÁVEZ-FUMAGALLI, MIGUEL ANGEL ; ROATT, BRUNO MENDES ; DE SOUSA VIEIRA TAVARES, GRASIELE ; COELHO, EDUARDO ANTONIO FERRAZ . Immunotherapy Combining Mimotopes Selected by Phage Display Plus Amphotericin B Is Effective for Treatment Against Visceral Leishmaniasis. PARASITE IMMUNOLOGY **JCR**, v. 46, p. e13037, 2024.

LAGE, DANIELA P. ; MACHADO, AMANDA S. ; FREITAS, CAMILA S. ; **VALE, DANNIELE L.** ; LINHARES, FLÁVIA P. ; CARDOSO, JAMILLE M.O. ; OLIVEIRA-DA-SILVA, JOÃO A. ; RAMOS, FERNANDA F. ; PEREIRA, ISABELA A.G. ; LUDOLF, FERNANDA ; TAVARES, GRASIELE S.V. ; BANDEIRA, RAQUEL S. ; Oliveira, Jamil S. ; MENEZES-SOUZA, DANIEL ; Duarte, Mariana C. ; GALDINO, ALEXSANDRO S. ; CHRISTODOULIDES, MYRON ; Chávez-Fumagalli, Miguel A. ; ROATT, BRUNO M. ; MARTINS, VÍVIAN T. ; Coelho, Eduardo A.F. . Recombinant endonuclease III protein from *Leishmania infantum* associated with Th1-type adjuvants is immunogenic and induces protection against visceral leishmaniasis. MOLECULAR IMMUNOLOGY **JCR**, v. 155, p. 79-90, 2023.

FREITAS, CAMILA S. ; LAGE, DANIELA P. ; MACHADO, AMANDA S. ; **VALE, DANNIELE L.** ; MARTINS, VÍVIAN T. ; CARDOSO, JAMILLE M.O. ; OLIVEIRA-DA-SILVA, JOÃO A. ; REIS, THIAGO A.R. ; TAVARES, GRASIELE S.V. ; RAMOS, FERNANDA F. ; LUDOLF, FERNANDA ; PEREIRA, ISABELA A.G. ; BANDEIRA, RAQUEL S. ; FUJIWARA, RICARDO T. ; BUENO, LÍLIAN L. ; ROATT, BRUNO M. ; Chávez-Fumagalli, Miguel A. ; Coelho, Eduardo A.F. . Exploring drug repositioning for leishmaniasis treatment: Ivermectin plus polymeric micelles induce immunological

response and protection against tegumentary leishmaniasis. *CYTOKINE JCR*, v. 164, p. 156143, 2023.

SOYER, TAUANE G. ; RAMOS, FERNANDA F. ; PEREIRA, ISABELA A. G. ; LAGE, DANIELA P. ; BANDEIRA, RAQUEL S. ; DE JESUS, MARCELO M. ; COSTA, GUILHERME P. ; MACHADO, AMANDA S. ; FREITAS, CAMILA S. ; **VALE, DANNIELE L.** ; MARTINS, VÍVIAN T. ; GALDINO, ALEXSANDRO S. ; Chávez-Fumagalli, Miguel A. ; MENEZES-SOUZA, DANIEL ; Duarte, Mariana C. ; ROATT, BRUNO M. ; Coelho, Eduardo A. F. ; TAVARES, GRASIELE S. V. . Immunotherapy Using Immunogenic Mimotopes Selected by Phage Display plus Amphotericin B Inducing a Therapeutic Response in Mice Infected with *Leishmania amazonensis*. *PATHOGENS JCR*, v. 12, p. 314, 2023.

FREITAS, CAMILA S. ; SANTIAGO, SAMIRA S. ; LAGE, DANIELA P. ; ANTINARELLI, LUCIANA M.R. ; OLIVEIRA, FABRÍCIO M. ; **VALE, DANNIELE L.** ; MARTINS, VÍVIAN T. ; MAGALHAES, LÍCIA N.D. ; BANDEIRA, RAQUEL S. ; RAMOS, FERNANDA F. ; PEREIRA, ISABELA A.G. ; DE JESUS, MARCELO M. ; LUDOLF, FERNANDA ; TAVARES, GRASIELE S.V. ; COSTA, ADILSON V. ; FERREIRA, RAFAELA S. ; COIMBRA, ELAINE S. ; TEIXEIRA, RÓBSON R. ; Coelho, Eduardo A.F. . In vitro evaluation of antileishmanial activity, mode of action and cellular response induced by vanillin synthetic derivatives against *Leishmania* species able to cause cutaneous and visceral leishmaniasis. *EXPERIMENTAL PARASITOLOGY JCR*, v. 251, p. 108555, 2023.

LAGE, DANIELA P. ; MARTINS, VÍVIAN T. ; **VALE, DANNIELE L.** ; FREITAS, CAMILA S. ; PIMENTA, BRENO L. ; MOREIRA, GABRIEL J.L. ; RAMOS, FERNANDA F. ; PEREIRA, ISABELA A.G. ; BANDEIRA, RAQUEL S. ; DE JESUS, MARCELO M. ; LUDOLF, FERNANDA ; TAVARES, GRASIELE S.V. ; Chávez-Fumagalli, Miguel A. ; ROATT, BRUNO M. ; CHRISTODOULIDES, MYRON ; Coelho, Eduardo A.F. . The association between rLiHyp1 protein plus adjuvant and amphotericin B is an effective immunotherapy against visceral leishmaniasis in mice. *ACTA TROPICA JCR*, v. 246, p. 106986, 2023.

GALVANI, NATHALIA C. ; MACHADO, AMANDA S. ; LAGE, DANIELA P. ; MARTINS, VÍVIAN T. ; DE OLIVEIRA, DAYSIANE ; FREITAS, CAMILA S. ; **VALE, DANNIELE L.** ; FERNANDES, BRUNA B. ; OLIVEIRA-DA-SILVA, JOÃO A. ; REIS, THIAGO A.R. ; SANTOS, THAÍS T.O. ; RAMOS, FERNANDA F. ; BANDEIRA, RAQUEL S. ; LUDOLF, FERNANDA ; TAVARES, GRASIELE S.V. ; GUIMARÃES, NATHALIA S. ; TUPINAMBÁS, UNAÍ ; Chávez-Fumagalli, Miguel A. ; HUMBERT, MARIA V. ; GONÇALVES, DENISE U. ; CHRISTODOULIDES, MYRON ; MACHADO-DE-ÁVILA, RICARDO A. ; Coelho, Eduardo A.F. . Sensitive and specific serodiagnosis of tegumentary leishmaniasis using a new chimeric protein based on specific B-cell epitopes of *Leishmania* antigenic proteins. *MICROBIAL PATHOGENESIS JCR*, v. 162, p. 105341, 2022.

MACHADO, AMANDA S. ; LAGE, DANIELA P. ; **VALE, DANNIELE L.** ; FREITAS, CAMILA S. ; LINHARES, FLÁVIA P. ; CARDOSO, JAMILLE M.O. ; PEREIRA, ISABELA A.G. ; RAMOS, FERNANDA F. ; TAVARES, GRASIELE S.V. ; LUDOLF, FERNANDA ; OLIVEIRA-DA-SILVA, JOÃO A. ; BANDEIRA, RAQUEL S. ; SIMÕES, ARATTI C. ; Duarte, Mariana C. ; Oliveira, Jamil S. ; CHRISTODOULIDES, MYRON ; Chávez-Fumagalli, Miguel A. ; ROATT, BRUNO M. ; MARTINS, VÍVIAN T. ; Coelho, Eduardo A.F. . A recombinant *Leishmania* amastigote-specific protein, rLiHyG, with

adjuvants, protects against infection with *Leishmania infantum*. ACTA TROPICA **JCR**, v. 230, p. 106412, 2022.

LAGE, DANIELA P. ; MACHADO, AMANDA S. ; **VALE, DANNIELE L.** ; FREITAS, CAMILA S. ; LINHARES, FLÁVIA P. ; CARDOSO, JAMILLE M.O. ; PEREIRA, ISABELA A.G. ; RAMOS, FERNANDA F. ; TAVARES, GRASIELE S.V. ; LUDOLF, FERNANDA ; OLIVEIRA-DA-SILVA, JOÃO A. ; BANDEIRA, RAQUEL S. ; SILVA, ALESSANDRA M. ; SIMÕES, LUCIANA C. ; REIS, THIAGO A.R. ; Oliveira, Jamil S. ; CHRISTODOULIDES, MYRON ; Chávez-Fumagalli, Miguel A. ; ROATT, BRUNO M. ; MARTINS, VÍVIAN T. ; Coelho, Eduardo A.F.. Recombinant guanosine-5--triphosphate (GTP)-binding protein associated with Poloxamer 407-based polymeric micelles protects against *Leishmania infantum* infection. CYTOKINE **JCR**, v. 153, p. 155865, 2022.

LAGE, DANIELA P. ; **VALE, DANNIELE L.** ; LINHARES, FLÁVIA P. ; FREITAS, CAMILA S. ; MACHADO, AMANDA S. ; CARDOSO, JAMILLE M. O. ; DE OLIVEIRA, DAYSIANE ; GALVANI, NATHÁLIA C. ; DE OLIVEIRA, MARCELO P. ; OLIVEIRA-DA-SILVA, JOÃO A. ; RAMOS, FERNANDA F. ; TAVARES, GRASIELE S. V. ; LUDOLF, FERNANDA ; BANDEIRA, RAQUEL S. ; PEREIRA, ISABELA A. G. ; Chávez-Fumagalli, Miguel A. ; ROATT, BRUNO M. ; MACHADO-DE-ÁVILA, RICARDO A. ; CHRISTODOULIDES, MYRON ; Coelho, Eduardo A. F. ; MARTINS, VÍVIAN T. . A Recombinant Chimeric Protein-Based Vaccine Containing T-Cell Epitopes from Amastigote Proteins and Combined with Distinct Adjuvants, Induces Immunogenicity and Protection against *Leishmania infantum* Infection. Vaccines **JCR**, v. 10, p. 1146, 2022.

MACHADO, AMANDA S. ; LAGE, DANIELA P. ; **VALE, DANNIELE L.** ; FREITAS, CAMILA S. ; LINHARES, FLÁVIA P. ; CARDOSO, JAMILLE M. O. ; OLIVEIRA-DA-SILVA, JOÃO A. ; PEREIRA, ISABELA A. G. ; RAMOS, FERNANDA F. ; TAVARES, GRASIELE S. V. ; LUDOLF, FERNANDA ; BANDEIRA, RAQUEL S. ; MAIA, LUIZ G. N. ; MENEZES-SOUSA, DANIEL ; Duarte, Mariana C. ; CHÁVEZ-FUMAGALLI, MIGUEL A. ; ROATT, BRUNO M. ; CHRISTODOULIDES, MYRON ; MARTINS, VÍVIAN T. ; Coelho, Eduardo Antonio Ferraz . *Leishmania* LiHyC protein is immunogenic and induces protection against visceral leishmaniasis. PARASITE IMMUNOLOGY **JCR**, v. 44, p. e12921, 2022.

SANTOS, THAÍS T.O. ; RAMOS, FERNANDA F. ; GONÇALVES, ISABELA A.P. ; TAVARES, GRASIELE S.V. ; LUDOLF, FERNANDA ; BANDEIRA, RAQUEL S. ; SILVA, ALESSANDRA M. ; OLIVEIRA-DA-SILVA, JOÃO A. ; REIS, THIAGO A.R. ; MACHADO, AMANDA S. ; LAGE, DANIELA P. ; FREITAS, CAMILA S. ; **VALE, DANNIELE L.** ; MARTINS, VÍVIAN T. ; ALVES, LIVIA A. ; GUIMARÃES, NATHALIA S. ; CHAVES, ANA THEREZA ; Chávez-Fumagalli, Miguel A. ; COTA, GLÁUCIA F. ; SILVEIRA, JULIA A.G. ; TUPINAMBÁS, UNAÍ ; GONÇALVES, DENISE U. ; CHRISTODOULIDES, MYRON ; Coelho, Eduardo A.F.. Potential of recombinant LiHyQ, a novel *Leishmania infantum* protein, for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis and as a diagnostic and prognostic marker for human leishmaniasis and human immunodeficiency virus co-infection: A preliminary study. ACTA TROPICA **JCR**, v. 224, p. 106126, 2021.

GALVANI, NATHALIA C. ; MACHADO, AMANDA S. ; LAGE, DANIELA P. ; FREITAS, CAMILA S. ; **VALE, DANNIELE L.** ; DE OLIVEIRA, DAYSIANE ; LUDOLF, FERNANDA ; RAMOS, FERNANDA F. ; FERNANDES, BRUNA B. ; LUIZ, GABRIEL

P. ; MENDONÇA, DÉBORA V. C. ; OLIVEIRA-DA-SILVA, JOÃO A. ; REIS, THIAGO A. R. ; TAVARES, GRASIELE S. V. ; CHAVES, ANA T. ; GUIMARÃES, NATHALIA S. ; TUPINAMBÁS, UNAÍ ; COTA, GLÁUCIA F. ; HUMBERT, MARIA V. ; MARTINS, VÍVIAN T. ; CHRISTODOULIDES, MYRON ; Coelho, Eduardo A. F. ; MACHADO-DE-ÁVILA, RICARDO A. . ChimLeish, a new recombinant chimeric protein evaluated as a diagnostic and prognostic marker for visceral leishmaniasis and human immunodeficiency virus coinfection. PARASITOLOGY RESEARCH **JCR**, v. 120, p. 4037-4047, 2021.