

**Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz  
Instituto René Rachou  
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde**

**Desenvolvimento e validação de técnica imuno-histoquímica utilizando anticorpo  
monoclonal para o diagnóstico da leishmaniose cutânea**

por

**Mariana Lourenço Freire**

**Belo Horizonte  
2021**

**TESE DCS-IRR**

**M. L. FREIRE**

**2021**

**Mariana Lourenço Freire**

**Desenvolvimento e validação de técnica imuno-histoquímica utilizando anticorpo monoclonal para o diagnóstico da leishmaniose cutânea**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, do Instituto René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde – área de concentração: Doenças Infecto-Parasitárias e crônicas não transmissíveis

Orientadores: Dr. Edward José de Oliveira  
e Dr. Marcelo Antônio Pascoal Xavier

**Belo Horizonte  
2021**

Catálogo-na-fonte  
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ  
Biblioteca do IRR  
CRB/6 1975

F883d  
2021

Freire, Mariana Lourenço.

Desenvolvimento e validação de técnica imuno-histoquímica utilizando anticorpo monoclonal para o diagnóstico da leishmaniose cutânea – Belo Horizonte, 2021

XIII, 167 f. il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f. 85-104

Tese (Doutorado) – Tese para obtenção do Título de Doutora em Ciência da Saúde pelo Programa de Pós- Graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou. Área de concentração: Doenças Infecto-Parasitárias e Crônicas não Transmissíveis

1. Leishmaniose Cutânea 2. Diagnóstico 3. Imuno-Histoquímica I. Título. II. Oliveira, Edward José de (Orientação). III. Pascoal-Xavier, Marcelo Antônio (Orientação)

CDD – 22. ed. – 616.075

**Mariana Lourenço Freire**

**Desenvolvimento e validação de técnica imuno-histoquímica utilizando anticorpo monoclonal para o diagnóstico da leishmaniose cutânea**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, do Instituto René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde – área de concentração: Doenças Infecto-Parasitárias e Crônicas não Transmissíveis

**Banca examinadora:**

Dr. Edward José de Oliveira (IRR/FIOCRUZ) Presidente

Dr. Marcelo Antônio Pascoal Xavier (IRR/FIOCRUZ) Presidente

Dra. Andréa Teixeira de Carvalho (IRR/FIOCRUZ) Titular

Dra. Erica Alessandra Rocha Alves (IRR/FIOCRUZ) Titular

Dra. Márcia Dalastra Laurenti (USP) Titular

Dr. Wanderson Geraldo de Lima (UFOP) Titular

Dra. Rosiane Aparecida da Silva Pereira (IRR/FIOCRUZ) Suplente

**Tese defendida e aprovada em Belo Horizonte, 10/06/2021**

*Dedico este trabalho aos meus avós, Juarez e Marluce,  
que estariam extremamente orgulhosos ao final desta etapa*

## AGRADECIMENTO

À minha mãe Eliane, meu grande exemplo de vida, de mulher e profissional. Por se fazer presente mesmo à distância, com sábios ensinamentos, muito amor e valiosos conselhos.

Ao meu pai José Carlos, pela confiança, incentivo e carinho de sempre.

Aos meus orientadores Dr. Edward Oliveira e Dr. Marcelo Pascoal-Xavier, pela oportunidade de fazer ciência! Agradeço por todos os ensinamentos e conhecimentos compartilhados, que foram essenciais para este trabalho e para minha formação. Sem dúvida foi um grande aprendizado!

À Dra. Gláucia Cota e ao Dr. Daniel Avelar, que me ensinaram e inspiraram muito durante esta jornada.

Às grandes amigas, que a Fiocruz me presenteou: Verônica Faria, Lindicy Alves, Carolina Senra, Juliana Saliba e Lara Saraiva, com quem sempre pude contar. Agradeço pelos inúmeros momentos agradáveis de descontração e pelo companheirismo nos trabalhos desenvolvidos. A amizade de vocês foi essencial para a conclusão dessa etapa.

À Dra. Rafaella Fortini e a estudante MSc. Lucélia Coutinho pelas contribuições e auxílio na produção dos anticorpos monoclonais.

À MSc. Karine Lopes pelo apoio e contribuição fundamental na produção dos antígenos recombinantes.

A Dra. Patrícia Bernardes pelo incentivo e troca de experiência que muito engrandeceu este trabalho e originou uma grande amizade.

Ao meu irmão Flávio, pelo carinho, companheirismo e confiança.

Á todos do Grupo de Pesquisa Clínica e Políticas Públicas em Doenças Infecciosas e Parasitárias pela troca de experiências e aprendizados diários.

À Fernanda Cesari do Departamento de Anatomia Patológica da UFMG e Larissa Finamore do Serviço de Imuno-histoquímica do Instituto René Rachou, pelo imenso apoio com os cortes histológicos.

Em especial agradeço ao Felipe, que teve participação fundamental apoiando e auxiliando na execução deste trabalho. Com muito amor e paciência você fez os dias difíceis serem mais leve e muito mais produtivo. Agradeço imensamente pelo grande incentivo e companheirismo de sempre!

À Biblioteca do Instituto René Rachou/Fiocruz Minas e em especial a Núzia, que sempre solicita atende as inúmeras demandas bibliográficas.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde e ao Instituto René Rachou/Fiocruz Minas que consideraram a bolsa de estudos durante a realização da tese e possibilitaram a realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), que apoiou o presente trabalho, com o Código de Financiamento 001, na etapa inicial de desenvolvimento da tese.

## RESUMO

A leishmaniose tegumentar (LT) continua sendo problema global de saúde pública, que se manifesta principalmente através de lesões cutâneas (leishmaniose cutânea - LC). Na América Latina, o Brasil é o país com maior registro de casos, com várias espécies de *Leishmania* associadas aos casos humanos. O diagnóstico laboratorial é essencial e um dos grandes desafios para o controle da doença. Desta forma, desenvolvemos e validamos uma técnica de imunohistoquímica (IHQ) utilizando anticorpo monoclonal (AcMo), para o diagnóstico da LC. Inicialmente, foi realizada uma revisão sistemática a fim de identificar potenciais alvos avaliados para o diagnóstico imunológico da LT. Antígenos com características distintas foram selecionados e considerados promissores para produção do AcMo e aplicação na técnica de IHQ. Os seis antígenos selecionados foram: triparedoxina mitocondrial peroxidase (mTXNPx); homólogo do receptor para proteína quinase C ativada (LACK); fosfatase ácida secretada (sAcP); proteína de membrana dos kinetoplastídeos-11 (KMP-11); proteína hipotética (LbPH) e proteína quinase ativada por mitógeno 4 (MAPK4). As sequências de nucleotídeos dos antígenos selecionados foram sintetizadas e inseridas no plasmídeo pET28a. Vetores de clonagem e de expressão foram transformados com os plasmídeos, para produção dos antígenos recombinantes. Os antígenos produzidos foram utilizados como imunógenos em camundongos BALB/c, para produção dos AcMos por meio da técnica de hibridização somática. A imunorreatividade dos AcMos foi avaliada através da técnica de *Western blotting*, utilizando os respectivos antígenos recombinantes e antígenos solúveis de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. guyanensis*. Em seguida, a técnica de IHQ foi realizada em biópsias de pele de hamsters experimentalmente infectados com estas espécies de *Leishmania*. A padronização da técnica de IHQ foi realizada utilizando o AcMo anti-mTXNPx e dois sistemas de detecção constituídos por polímero conjugados com as enzimas peroxidase (IHQ-POD) e fosfatase alcalina (IHQ-FA). A validação destes protocolos de IHQ foi realizada em biópsias de pele de 49 pacientes com LC diagnosticados por meio da reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR), que apresentavam resultados de exame direto e cultura, realizados como diagnóstico de rotina. Foram também incluídos 37 pacientes que apresentando outras doenças dermatológicas infecciosas. O exame histopatológico (HE) e a IHQ foram realizados em todos os pacientes incluídos neste estudo. Na revisão sistemática, foram encontrados potenciais alvos antigênicos para uso em técnicas imunológicas para o diagnóstico de LT, LC e leishmaniose mucosa (LM). No entanto, a maioria dos estudos são provas de conceito, fato que reforça a necessidade de desenvolvimento de estudos de validação mais abrangentes. Através da técnica de *Western blotting* e IHQ em lesão de animal experimentalmente infectado, foi comprovada a imunorreatividade dos AcMos anti-mTXNPx e anti-LACK. No estudo de validação empregando AcMos anti-mTXNPx, a maior sensibilidade foi observada para IHQ-FA (85,7%), seguida por IHQ-POD (79,6%), exame direto (77,6%), HE (65,3%) e cultura *in vitro* (49%). IHQ e HE apresentaram especificidade acima de 90%. A positividade do exame direto e da cultura aumentou significativamente quando os resultados foram combinados com da IHQ-FA, atingindo 95,9% e 93,9%, respectivamente. Através da análise de regressão logística verificamos que as técnicas de IHQ e HE são capazes de detectar pacientes com LC independentemente da carga parasitária. Os resultados obtidos neste estudo demonstram o potencial da técnica de IHQ para o diagnóstico da LC no Brasil e possibilita o desenvolvimento de novas alternativas diagnósticas para o controle dessa doença negligenciada.

**Palavras-chave:** Leishmaniose Cutânea; Diagnóstico; Imuno-Histoquímica; Anticorpos Monoclonais

## ABSTRACT

Tegumentary leishmaniasis (TL) is still a worldwide public health problem, presenting mainly through skin lesions (cutaneous leishmaniasis – CL). In Latin America, most cases occur in Brazil, and several *Leishmania* species have been associated with human cases. The laboratory diagnosis is crucial and considered one of the pillars to disease control. In this manner, the development and validation of an immunohistochemistry assay (IHC) using monoclonal antibody (mAb) for CL-diagnosis were performed. Firstly, a systematic review identifying potential antigenic targets that have been previously evaluated for TL-immunodiagnosis was performed. Antigens were further selected according specific characteristics and considered potential for CL-diagnosis through IHC. The six selected antigens were: mitochondrial trypanothione peroxidase (mTXNPx); *Leishmania* homologue of activated C kinase (LACK); secreted acid phosphatase (sAcP); kinetoplastid membrane protein-11 (KMP-11); hypothetical protein (LbHP) and Mitogen-activated protein kinase 4 (MAPK4). The amino acid sequences were selected, further synthesized, and inserted in pET28a plasmid by GenScript. Those plasmids were inserted into cloning and expression vectors for the production of recombinant antigens (rAg). The rAgs were used as immunogens in BALB/c mice for mAb production through somatic hybridization. The immunoreactivity of each mAb was tested by Western blotting using soluble antigens of *L. amazonensis*, *L. braziliensis* and *L. guyanensis*. Subsequently, the IHC was performed on skin biopsies from hamsters infected with the same *Leishmania* species. The standardization and validation of IHC was performed with anti-mTXNPx mAb through two detection systems consisting of polymer with peroxidase enzyme (IHC-HRP) and alkaline phosphatase (IHC-AP). The IHC was validated on skin biopsy from 49 CL-patients diagnosed by clinical examination and real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR). For this group, the direct examination and *in vitro* culture were also performed. Furthermore, 37 patients presenting other dermatological infectious diseases were included. The histopathology (HE) and IHC were performed for all patients included in the study. A total of 81 antigens were found in the systematic review for the diagnosis of TL, CL and mucosal leishmaniasis (ML). However, a large number of proof-of-concept studies reinforce the need for further studies. In the IHC validation study, the higher sensitivity value was observed for IHC-AP (85.7%), followed by IHC-HRP (79.6%), direct examination (77.6%), HE (65,3%) and *in vitro* culture (49%). Both IHCs and histopathology presented specificity over 90%. The IHC-AP combined with direct examination enhanced the positivity to 95.9%, and the same IHC combined with HE increased the positivity to 93.9%. The multivariate regression analysis showed that IHC and HE were the only tests able to detect CL-patients regardless the parasite burden. The IHC evaluated here is useful to detect the main *Leishmania* species causing CL in Brazil and could support the diagnostic strategies for disease control.

**Keywords:** Leishmaniasis, Cutaneous; Diagnosis; Immunohistochemistry; Antibodies, Monoclonal.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> Estratégia utilizada para busca no Medline .....	26
<b>Figura 2</b> Plasmídeo de expressão em bactéria pET-28a.....	30
<b>Figura 3</b> Gel de agarose 3%, corado com brometo de etídio, mostrando a caracterização das espécies de <i>Leishmania</i> sp., utilizadas neste estudo. ....	41
<b>Figura 4</b> Diagrama de fluxo ilustrando o processo de seleção de estudos de acordo com PRISMA... 51	
<b>Figura 5</b> Antígenos utilizados nos ensaios imunoenzimático de ELISA para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar. ....	56
<b>Figura 6</b> Antígenos utilizados no ensaio imunoenzimático de ELISA para o diagnóstico da leishmaniose cutânea. ....	58
<b>Figura 7</b> Antígenos utilizados em outros testes imunológicos para diagnóstico da leishmaniose cutânea. ....	59
<b>Figura 8</b> Antígenos utilizados no ensaio imunoenzimático de ELISA para o diagnóstico da leishmaniose mucosa. ....	60
<b>Figura 9</b> Risco de viés avaliado pela ferramenta QUADAS-2, de acordo com as diferentes características do estudo.....	60
<b>Figura 10</b> Gel de poliacrilamida 6%, corado com nitrato de prata 0,2%, apresentando os perfis de restrição das construções clivadas com as enzimas <i>Bam</i> HI e <i>Hind</i> III .....	62
<b>Figura 11</b> Gel de poliacrilamida 15% corado com azul de Coomassie, demonstrando a solubilidade dos antígenos recombinantes .....	63
<b>Figura 12</b> Gel de poliacrilamida 15% corado com azul de Coomassie, demonstrando a pureza dos antígenos recombinantes .....	64
<b>Figura 13</b> Técnica de <i>Western blotting</i> demonstrando o reconhecimento dos antígenos recombinantes pelo AcMo anti-histidina.....	64
<b>Figura 14</b> Cinética da produção de anticorpos IgG anti-antígenos recombinantes pelos camundongos imunizados .....	66
<b>Figura 15</b> Técnica de <i>Western blotting</i> demonstrando o reconhecimento dos antígenos recombinantes pelos anticorpos monoclonais anti-antígenos específicos. ....	67
<b>Figura 16</b> Técnica de <i>Western blotting</i> demonstrando o reconhecimento de antígenos específicos presentes no antígeno solúvel de <i>L. amazonensis</i> , <i>L. braziliensis</i> e <i>L. guyanensis</i> , pelos anticorpos monoclonais anti-mTXNPx e anti-LACK.....	68
<b>Figura 17</b> Cortes histológicos de lesões cutâneas de hamsters, experimentalmente infectados com <i>L. amazonensis</i> , <i>L. braziliensis</i> e <i>L. guyanensis</i> , apresentando a marcação de formas amastigotas, através da técnica de IHQ, usando AcMo anti-mTXNPx e dois sistemas de detecção. ....	69
<b>Figura 18</b> Cortes histológicos de lesões cutâneas de hamsters, experimentalmente infectados com <i>L. amazonensis</i> , <i>L. braziliensis</i> e <i>L. guyanensis</i> , apresentando a marcação de formas amastigotas, através da técnica de IHQ, usando AcMo anti-LACK e dois sistemas de detecção.....	70
<b>Figura 19</b> Cortes histológicos de lesões cutâneas de paciente com baixa e alta cargas parasitárias, corados por Hematoxilina-Eosina, e submetidos às IHQ-POD e IHQ-FA. ....	72
<b>Figura 20</b> Relação entre a positividade das técnicas diagnósticas com o tempo de evolução da lesão cutânea e carga parasitária.....	74

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> Especificações das construções sintetizadas pela GenScript (Piscataway, NJ, EUA) e dos antígenos gerados. ....	31
<b>Tabela 2</b> Condições utilizadas para produção de cada antígeno recombinante.....	32
<b>Tabela 3</b> Etapas da padronização da técnica de imuno-histoquímica, empregando o anticorpo monoclonal anti- mTXNPx. ....	45
<b>Tabela 4</b> Características dos estudos incluídos na revisão sistemática. ....	53
<b>Tabela 5</b> Alinhamento local das sequências polipeptídicas de antígenos de <i>Leishmania braziliensis</i> , selecionadas com proteínas de <i>L. guyanensis</i> , <i>L. amazonensis</i> , <i>Homo sapiens</i> e <i>Mus musculus</i> . ....	61
<b>Tabela 6</b> Desempenho do exame direto, cultura, exame histopatológico (HE) e imuno-histoquímica (IHQ) usando dois sistemas de detecção.....	71
<b>Tabela 7</b> Taxas de positividade obtidas com a combinação de resultados das técnicas de diagnóstico.....	73

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABC	Complexo Avidina-Biotina (do inglês <i>avidin-biotin complex</i> )
AcMo	Anticorpo Monoclonal
AgSL	Antígeno Solúvel de <i>Leishmania</i> sp.
AgSLa	Antígeno Solúvel de <i>Leishmania amazonensis</i>
AgSLb	Antígeno Solúvel de <i>Leishmania braziliensis</i>
AgSLg	Antígeno Solúvel de <i>Leishmania guyanensis</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APAAP	Fosfatase Alcalina Anti-Fosfatase Alcalina (do inglês <i>Alkaline Phosphatase Anti Alkaline Phosphatase</i> )
BetOH	2- $\beta$ -mercaptoetanol
BIOP	Biotério de Produção
BIOTEX	Biotério de Experimentação Animal
BSA	Albumina de Soro Bovino (do inglês <i>Bovine Serum Albumin</i> )
BVS	Biblioteca Virtual em Saúde
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CRL	Centro de Referência em Leishmanioses
DMEM	do inglês <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidade Ótica
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (do inglês <i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i> )
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
HAT	Hipoxantina-Aminopterina-Timidina
HE	Exame Histopatológico (do inglês <i>histopathological examination</i> )
IDRM	Intradermorreação de Montenegro
IFN- $\gamma$	Interferon-gama
IHQ	Imuno-histoquímica
IHQ-FA	Imuno-histoquímica empregando sistemas de detecção compostos por polímeros conjugados fosfatase alcalina
IHQ-POD	Imuno-histoquímica empregando sistemas de detecção compostos por polímeros conjugados à peroxidase
IL	Interleucina
IFN $\gamma$	Interferon gama
IPTG	Isopropil $\beta$ -D-1-Thiogalactopiranosida
IRR	Instituto René Rachou
ITS1	Espaçador interno transcrito 1 (do inglês <i>Internal transcribed spacer</i> )
ITS	Insulina, Transferrina e Selenito de Sódio
kDNA	DNA minicircular do cinetoplasto
KMP-11	do inglês <i>Kinetoplastid membrane protein-11</i>
LAB	Avidina-Biotina Marcada (do inglês <i>labeled avidin-biotin</i> )
LACK	Homólogo do receptor para proteína quinase C ativada
LAMP	Amplificação isotérmica de DNA mediada por <i>loop</i> (do inglês <i>Loop-mediated isothermal amplification</i> )
LB	Meio Luria Bertani
LbPH	Proteína hipotética
LC	Leishmaniose Cutânea
LCD	Leishmaniose Cutânea Difusa
LCL	Leishmaniose Cutânea Localizada
LD	Leishmaniose Cutânea Disseminada
LIT	do inglês <i>Liver Infusion Tryptose</i>
LM	Leishmaniose Mucosa
LSAB	Estreptoavidina-Biotina Marcada (do inglês <i>labeled streptavidin-biotin</i> )
LT	Leishmaniose Tegumentar
MAPK4	Proteína quinase ativada por mitógeno 4
MESH	do inglês <i>Medical Subject Headings</i>
Min	Minutos

mTXNPx	Triparedoxina Mitocondrial Peroxidase
NK	Células Natural Killer
NNN	Novy, McNeal, Nicolle
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
PAP	Peroxidase Anti-Peroxidase
PBS	Tampão Fosfato-Salino (do inglês <i>Phosphate Buffered Saline</i> )
PBS-leite 5%	PBS contendo 5% de leite em pó desnatado
PBS-T <sub>20</sub>	PBS contendo Tween 20 a 0,05%
PBS-T <sub>20</sub> -leite 1%	PBS-T <sub>20</sub> contendo 1% de leite em pó desnatado
PCR	Reações em cadeia da polimerase (do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
PCR-RFLP	do inglês <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
PEG	Polietilenoglicol
PenStrep	Penicilina e Estreptomicina
pH	Potencial Hidrogeniônico
PKDL	Leishmaniose Dérmica Pós Kalazar (do inglês <i>Post-kala-azar dermal leishmaniasis</i> )
PRISMA	do inglês <i>Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses</i>
qPCR	PCR quantitativo em tempo real (do inglês <i>quantitative real-time PCR</i> )
QUADAS-2	do inglês <i>Quality Assessment of Diagnostic Accuracy Studies</i>
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
RPA	Amplificação Isotérmica da Recombinase Polimerase (do inglês <i>Recombinase Polymerase Amplification</i> )
s	Segundos
sAcP	Fosfatase Ácida secretada (do inglês <i>secretory acid phosphatase</i> )
SFB	Soro Fetal Bovino
SSU rRNA	Subunidade Menor do Ribossomo (do inglês <i>Small subunit ribosomal ribonucleic acid</i> )
TBS	Tampão Tris-Salina (do inglês <i>Tris-buffered saline</i> )
TBS-leite 5%	TBS contendo 5% de leite em pó desnatado
TBS-T <sub>20</sub>	TBS contendo Tween 20 a 0,05%
TBS-T <sub>20</sub> -leite 1%	TBS-T <sub>20</sub> contendo 1% de leite em pó desnatado
TGFβ	Fator de Transformação do Crescimento (do inglês, <i>Transforming Growth Factor</i> )
TNFα	Fator de Necrose Tumoral (do inglês, <i>Tumour Necrosis Factor</i> )

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>16</b>
<b>2.1 Aspectos gerais da leishmaniose tegumentar</b> .....	<b>16</b>
<b>2.2 Cenário atual do diagnóstico da leishmaniose tegumentar</b> .....	<b>18</b>
<b>2.3 Imuno-hitosquímica para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar</b> .....	<b>22</b>
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>25</b>
<b>3.1 Objetivo geral</b> .....	<b>25</b>
<b>3.2 Objetivos específicos</b> .....	<b>25</b>
<b>4. METODOLOGIA</b> .....	<b>26</b>
<b>4.1 Identificação de potenciais alvos antigênicos</b> .....	<b>26</b>
4.1.1 Fontes de informação e seleção de estudos .....	26
4.1.2 Critérios de inclusão e exclusão.....	27
4.1.3 Processo de seleção e extração de dados e avaliação do risco de viés.....	27
4.1.4 Síntese dos dados .....	28
<b>4.2 Seleção dos alvos antigênicos</b> .....	<b>28</b>
<b>4.3 Produção dos antígenos recombinantes</b> .....	<b>29</b>
4.3.1 Clonagem dos genes que codificam os antígenos selecionados .....	29
4.3.2 Expressão, lise e desnaturação dos antígenos recombinantes .....	32
4.3.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE .....	33
4.3.4 Purificação dos antígenos recombinantes por cromatografia de afinidade .....	34
4.3.5 Técnica de <i>Western blotting</i> com anticorpo anti-His .....	35
<b>4.4 Produção dos anticorpos monoclonais</b> .....	<b>35</b>
4.4.1 Imunização de camundongo BALB/c com os antígenos recombinantes.....	35
4.4.2 Cinética da produção de anticorpo anti-antígeno recombinante.....	36
4.4.3 Coleta de células peritoneais.....	37
4.4.4 Esplenectomia e preparo das células esplênicas .....	37
4.4.5 Preparo de células mielomatosas .....	38
4.4.6 Hibridização somática por fusão celular .....	38
4.4.7 Seleção, cultivo e criopreservação dos hibridomas.....	39
4.4.8 Clonagem e expansão dos hibridomas .....	39
4.4.9 Purificação dos anticorpos monoclonais .....	40
4.4.10 Preparo dos antígenos solúveis de <i>Leishmania</i> sp. (AgSLs).....	40

4.4.11 Avaliação da imunoreatividade dos anticorpos monoclonais, através da técnica de <i>Western blotting</i> .....	41
<b>4.5 Técnica de imuno-histoquímica.....</b>	<b>42</b>
4.5.1 Avaliação da imunoreatividade dos anticorpos monoclonais, através da técnica de imuno-histoquímica .....	42
4.5.2 Padronização da técnica de imuno-histoquímica empregando anticorpo monoclonal anti-mTXNPx.....	43
4.5.3 Estudo de validação da técnica de imuno-histoquímica empregando anticorpo monoclonal anti-mTXNPx .....	47
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>51</b>
<b>5.1 Revisão Sistemática para identificação de potenciais alvos antigênicos.....</b>	<b>51</b>
5.1.1 Busca na literatura científica.....	51
5.1.2 Análise descritiva dos estudos incluídos .....	52
5.1.3 ELISA para diagnóstico de LT .....	55
5.1.4 ELISA para diagnóstico de LC .....	57
5.1.5 Outros testes imunológicos para diagnóstico de LC .....	59
5.1.6 ELISA para diagnóstico de LM .....	59
5.1.7 Avaliação do risco de viés .....	60
<b>5.2 Seleção dos antígenos recombinantes .....</b>	<b>61</b>
<b>5.2 Produção dos antígenos recombinantes.....</b>	<b>61</b>
<b>5.3 Produção dos anticorpos monoclonais .....</b>	<b>65</b>
<b>5.4 Avaliação da imunoreatividade dos anticorpos monoclonais, através da técnica de imuno-histoquímica .....</b>	<b>68</b>
<b>5.5 Estudo de validação da técnica de imuno-histoquímica utilizando anticorpo monoclonal anti-mTXNPx.....</b>	<b>71</b>
5.5.1 Análise descritiva dos pacientes incluídos no estudo.....	71
5.5.2 Desempenho dos testes diagnósticos avaliados .....	71
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>75</b>
<b>7. CONCLUSÃO .....</b>	<b>84</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>85</b>
<b>APÊNDICE 1 .....</b>	<b>105</b>
<b>APÊNDICE 2 .....</b>	<b>135</b>
<b>APÊNDICE 3 .....</b>	<b>156</b>
<b>APÊNDICE 4 .....</b>	<b>160</b>
<b>ANEXO 1.....</b>	<b>163</b>
<b>ANEXO 2.....</b>	<b>164</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose tegumentar (LT) é uma doença infecciosa crônica responsável por amplo espectro de manifestações clínicas, ocasionando desde lesões cutâneas (leishmaniose cutânea – LC) únicas, múltiplas ou difusas, até o acometimento das mucosas (leishmaniose mucosa – LM). Esta doença ocorre em pelo menos 92 países, sendo reportado apenas no Brasil durante a última década, mais de 200.000 casos, principalmente por *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) guyanensis*. O diagnóstico laboratorial permanece um dos grandes desafios para o controle da LT, devido à limitada acurácia dos métodos parasitológicos, à restrição de técnicas moleculares e à importância do diagnóstico diferencial com diversas doenças dermatológicas e sistêmicas. Desta forma, o eixo central desta tese é o desenvolvimento de uma técnica de imunohistoquímica (IHQ) usando anticorpo monoclonal (AcMo), para o diagnóstico da LC.

Inicialmente, foi realizada uma revisão sistemática visando identificar os alvos antigênicos que já foram utilizados em testes imunológicos para o diagnóstico da LT. Este estudo foi publicado na revista *PLoS One*, com o título *Potential antigenic targets used in immunological tests for diagnosis of tegumentary leishmaniasis: a systematic review* (Apêndice 1). Partindo deste universo de antígenos descritos na literatura, considerando características biológicas de algumas proteínas, além da disponibilidade prévia de alguns minigenes, foram selecionados antígenos que, com características distintas, foram considerados potenciais alvos para o diagnóstico através da técnica de IHQ. Os seis antígenos selecionados foram: triparedoxina mitocondrial peroxidase (mTXNPx); proteína homóloga do receptor para quinase C ativada de *Leishmania* (LACK, do inglês *Leishmania homologue of activated C kinase*); fosfatase ácida secretada (sAcP, do inglês *secretory acid phosphatase*); Proteína de membrana dos Kinetoplastídeos-11 (KMP-11, do inglês *Kinetoplastid membrane protein-11*); Proteína hipotética (LbPH) e Proteína quinase ativada por mitógeno 4 (MAPK4, do inglês *mitogen-activated protein kinase 4*).

Os antígenos selecionados foram produzidos através da tecnologia do DNA recombinante e utilizados como imunógenos para a produção dos AcMos. Através da técnica de *Western blotting*, foi avaliada a imunorreatividade dos AcMos contra os respectivos antígenos recombinantes e antígenos solúveis das principais espécies de *Leishmania* responsáveis pela LT no Brasil. O reconhecimento de formas amastigotas pelos AcMos foi analisado em fragmento de lesão de animais experimentalmente infectados com *L. braziliensis*,

*L. amazonensis* e *L. guyanensis*, demonstrando potencial aplicação do AcMo anti-mTXNPx e anti-LACK na técnica de IHQ.

A validação da técnica de IHQ em amostras de pacientes com suspeita de LC, foi realizada utilizando o AcMo anti-mTXNPx e dois sistemas de detecção. O estudo de desenvolvimento e validação da IHQ utilizando o AcMo anti-mTXNPx, foi publicado na revista *Frontiers in Microbiology*, com o título *Anti-mitochondrial trypanothione peroxidase (mTXNPx) monoclonal antibody-based immunohistochemistry for diagnosis of cutaneous leishmaniasis* (Apêndice 2).

Entendemos que em um país como o Brasil, que apresenta grande extensão territorial e diversidade de cenários e realidades, técnicas diagnósticas que apresentem elevada acurácia, devem ser amplamente disponibilizadas e empregadas de acordo com as diferentes realidades locais. Desta forma, este estudo busca adicionar ao contexto atual do diagnóstico da LC, uma estratégia promissora baseada na técnica de IHQ e ainda fornece inúmeras perspectivas futuras para o desenvolvimento de outras estratégias diagnósticas utilizando os produtos obtidos neste estudo.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Aspectos gerais da leishmaniose tegumentar

A LT é uma doença infecciosa crônica de alta incidência e ampla distribuição geográfica, causada por diferentes espécies de *Leishmania* sp. e que se manifesta através de diferentes formas clínicas. Esta doença constitui um importante problema de saúde pública, especialmente por afetar as populações mais vulneráveis de países em desenvolvimento, sendo considerada uma doença tropical negligenciada pela Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) e Organização Mundial da Saúde (OMS) (PAHO, 2019; WHO, 2010).

Segundo a OMS, a LT é endêmica em 88 países, com registro anual entre 0,6 a 1 milhão de novos casos, sendo que 85% ocorrem no Afeganistão, Argélia, Bolívia, Brasil, Colômbia, Irã, Iraque, Paquistão, República Árabe da Síria e Tunísia (WHO, 2020). No período entre 2001 a 2019, foram registrados nas Américas 1.028.054 casos, com média de 54.108 casos por ano, concentrados principalmente no Brasil e em países da região Andina (PAHO, 2020). No Brasil, casos autóctones da doença já foram registrados em todos os estados. Entre 2010 e 2019, foram notificados em média 20.265 casos por ano, sendo 43% registrados na região Norte, historicamente a região mais endêmica do país. Já na região Sudeste, Minas Gerais foi responsável por cerca de 75% dos casos registrados (BRASIL, 2021).

Diferentes espécies de *Leishmania* são reconhecidamente causadoras da LT no Brasil, sendo *L. braziliensis*, *L. amazonensis* e *L. guyanensis* as espécies de maior relevância epidemiológica. Outras espécies como *Leishmania (Viannia) lainsoni*, *Leishmania (Viannia) naiffi*, *Leishmania (Viannia) lindenbergi* e *Leishmania (Viannia) shawi* também foram identificadas como agente causador da LT no país, embora mais concentradas nas regiões Norte e Nordeste e com menor número de notificações (DA SILVA et al., 2006; FIGUEIRA et al., 2017; SILVEIRA et al., 2002). As diferentes espécies envolvidas na infecção, associadas aos vetores e resposta imune do hospedeiro, são responsáveis pelo amplo espectro clínico e diferentes graus de morbidade da doença (BRASIL, 2017).

Classicamente, a LT manifesta-se pelo comprometimento da pele e/ou mucosa, caracterizando a LC, a forma clínica mais frequente e LM, a mais severa. De acordo com as características clínicas e evolutivas a LC pode se apresentar nas seguintes formas: leishmaniose cutânea localizada (LCL), leishmaniose cutânea disseminada (LD) e leishmaniose cutânea difusa (LCD) (BRASIL, 2017; MARZOCHI & MARZOCHI, 1994).

A LCL, a forma mais comum, caracteriza-se pela presença de lesões cutâneas únicas ou múltiplas, de fundo granuloso e bordas elevadas, em geral do tipo de úlcera, que se localizam

na porta de entrada da infecção (CONVIT et al., 1993; SILVEIRA, LAINSON & CORBETT, 2004). Embora a cura espontânea seja frequentemente descrita, em estudo de revisão sistemática, apenas 6% de cura foi observada em infecção causada por *L. braziliensis* (COTA et al., 2016). A LD é relatada em cerca de 2% dos casos, quase exclusivamente no norte e nordeste do Brasil (CARVALHO et al., 1994; COSTA et al., 1986; GALVÃO et al., 1993; TURETZ et al., 2002). Após o desenvolvimento das lesões primárias, a disseminação do parasito pode ocorrer por via sanguínea ou linfática, ocorrendo diversas lesões em segmentos corporais distintos e conseqüentemente distantes do local da picada (CARVALHO et al., 1994). No Brasil, a maioria dos casos de LD ocorre por *L. braziliensis*, embora esteja também associada à *L. amazonensis* (TURETZ et al., 2002; SILVEIRA et al., 2005). A LCD é grave, rara e se inicia com uma mácula, pápula ou nódulo não ulcerado na porta de entrada da infecção, que se dissemina de forma lenta (CONVIT & KERDEL-VEGAS, 1965). Frequentemente, esta forma clínica está associada à deficiência na resposta imune celular aos antígenos de *Leishmania* e predomínio de resposta Th2 (CHRISTENSEN et al., 2019; SILVEIRA et al., 2009). No Brasil, é mais frequente na região Norte, sendo causada apenas por *L. amazonensis* (LEON et al., 1990).

A LM caracteriza-se por lesões localizadas nas mucosas das vias aéreas superiores, podendo ser graves e destrutivas, provavelmente devido à resposta imune celular exacerbada e indevidamente modulada (BACELLAR et al., 2002; CARVALHO et al., 1985). A lesão mucosa pode ocorrer após anos da cicatrização da lesão cutânea (forma tardia), de forma isolada (forma primária) ou ainda junto às lesões cutâneas, seja de forma adjacente (forma contígua) ou à distância (forma concomitante) (BRASIL, 2017). No Brasil, a LM corresponde a cerca de 6% dos casos de LT, com maior número registrado nas regiões Norte (37,6%) e Centro-Oeste (21%) (BRASIL, 2021). Em geral, é causada por *L. braziliensis*, entretanto, outras espécies como *L. amazonensis* e *L. guyanensis* parecem também estar associadas a esta forma clínica (BARRAL et al., 1991, 1996; GUERRA et al., 2011; NAIFF, TALHARI & BARRETT, 1988).

Observa-se que a LT é uma doença de complexa imunopatogênese, em que o perfil de resposta imune à infecção por *Leishmania* sp., influencia na gravidade e em seu desenvolvimento (CONVIT et al., 1993). Em geral, a resposta efetiva contra a infecção está associada à resposta Th1 mediada por citocinas pró-inflamatórias como interferon (IFN) $\gamma$ , fator de necrose tumoral (TNF $\alpha$ , do inglês *Tumour Necrosis Factor*) e interleucina (IL)1 e IL12, que levam a ativação dos macrófagos e à morte dos parasitos (FOLLADOR et al., 2002; NOVOA et al., 2011). Já a suscetibilidade e progressão da doença são mediadas por resposta Th2, com produção de IL4, IL5, IL10, IL13 e fator de transformação do crescimento (TGF $\beta$ , do inglês,

*Transforming Growth Factor*) favorecendo à replicação e persistência do parasito (CACERES-DITTMAR et al., 1993). No entanto, em humanos, a infecção nem sempre segue esta dicotomia, de modo que a resposta imune local apresenta-se frequentemente balanceada (Th1/Th2) com danos teciduais e persistência do parasito (CASTELLANO et al., 2009; COSTA-SILVA et al., 2014).

A importância da LT em termo de saúde pública está relacionada não apenas a sua alta incidência e ampla distribuição, mas também associada à possibilidade de desenvolvimento de formas clínicas crônicas, frequentemente relacionadas a cicatrizes faciais, problemas psicossociais e estigmatização, ocasionados por sequelas físicas e psicológicas da doença (BENNIS et al., 2017; TOLEDO et al., 2013). Para superar o impacto desta doença, são necessárias ações relacionadas à intensificação do diagnóstico e do manejo clínico do paciente. De acordo com a OMS, é urgente a redução do tempo entre a suspeita e o diagnóstico da LT, visando um tratamento mais efetivo. Desta forma, são necessários e estimulados, estudos inovadores que possam melhorar os métodos de diagnóstico e disponibilizar medicamentos mais eficazes e seguros (WHO, 2012).

## **2.2 Cenário atual do diagnóstico da leishmaniose tegumentar**

O diagnóstico da LT é realizado por critérios clínicos, epidemiológicos e por exames laboratoriais, através de métodos parasitológicos, imunológicos, moleculares e histopatológicos. O diagnóstico baseado nas características da lesão e dados epidemiológicos é de grande importância na suspeita de LT. No entanto, a constante expansão geográfica, associada às diferentes formas das lesões e semelhanças com outras doenças, torna a confirmação laboratorial imprescindível (ADRIANO et al., 2013; QUARESMA et al., 2018). Cerca de 20% de casos clinicamente suspeitos de LT, apresentam diagnóstico confirmatório de outra doença com apresentações clínicas semelhantes, como hanseníase, paracoccidiodomicose, carcinoma, micose subcutânea e sistêmica (TIRELLI et al., 2017). No entanto, entre 2010 e 2019 no Brasil, 18,2% dos casos notificados foram diagnosticados apenas por critério clínico-epidemiológico, o que demonstra a dificuldade de acesso ao diagnóstico laboratorial adequado, sendo ainda mais preocupante devido à elevada toxicidade do tratamento (BRASIL, 2021).

O método parasitológico é tradicionalmente empregado para o diagnóstico da LC, especialmente por seu baixo custo e fácil execução, podendo ser realizado pela pesquisa do parasito em exame direto ou cultivo *in vitro*. O exame direto realizado através da aposição de fragmento de biópsia de lesão cutânea, corado com Giemsa, apresenta sensibilidade entre 28,2

a 70% (DE MELLO et al., 2011; FABER et al., 2003; RAMIREZ et al., 2000; SCHUBACH et al., 2001). Já a partir de material biológico obtido por escarificação, a sensibilidade varia entre 42,5 a 90,4% (BOGGILD et al., 2010; DE MELLO et al., 2011; ESPIR et al., 2016; RAMIREZ et al., 2000; REIS et al., 2008). Para a forma mucosa o diagnóstico ainda é limitado, devido à escassez de parasitos na lesão (WEIGLE et al., 1987). Além do material biológico e da forma clínica, a sensibilidade pode também estar relacionada à experiência do profissional, local de amostragem e tempo de evolução da doença (DE MELLO et al., 2011; RAMIREZ et al., 2000; THOMAZ et al., 2021; WEIGLE et al., 1987).

No cultivo *in vitro*, o material biológico é inoculado em meio de cultura bifásico, em geral NNN (Novy, McNeal, Nicolle) associado ao LIT (do inglês *Liver Infusion Tryptose*) e examinado semanalmente, a fim de verificar a presença de formas promastigotas. Esta técnica é muito propensa à contaminação por fungos e bactérias, podendo ser necessário até 30 dias para obtenção de resultado conclusivo, com sensibilidade variando entre 50,7 a 75,6% (BOGGILD et al., 2008; ESPIR et al., 2016; POURMOHAMMADI et al., 2010; RAMIREZ et al., 2000). As tecnologias de mini e microcultura apresentam como vantagens o menor custo e maior praticidade, com desempenho variando de 75,0 a 100% (ALLAHVERDIYEV et al., 2004; BOGGILD et al., 2010; LUZ et al., 2009; PAGHEH et al., 2014).

Entre as técnicas imunológicas, a intradermoreação de Montenegro (IDRM), que traduz a resposta de hipersensibilidade tardia mediada por células T aos antígenos de *Leishmania*, era historicamente a mais utilizada no diagnóstico laboratorial da LT nas formas cutânea e mucosa (MONTENEGRO, 1926). Embora o resultado positivo possa estar associado à doença prévia ou infecção assintomática, sensibilidade entre 77% a 95,4% e especificidade entre 57 a 77,4% foram reportadas (BOGGILD et al., 2008; ESPIR et al., 2016; FABER et al., 2003; REIS et al., 2008; SCHUBACH et al., 2001). Por ser de simples execução e baixo custo, a IDRM era amplamente utilizada no Brasil (GUARÍN et al., 2006; SASSI et al., 1999). No entanto, a partir de 2016 a produção do antígeno de Montenegro foi interrompida devido à ausência da infraestrutura exigida pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) no Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos, onde o antígeno era produzido no país (BRAZ, 2019).

Na prática clínica, a utilização de testes imunológicos como reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA, do inglês *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) ainda é limitada, especialmente devido a presença de baixos níveis de anticorpos específicos em pacientes com LC (CARVALHO et al., 1994). No Brasil, a IFI Leishmaniose Humana, produzida por BioManguinhos, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), é o único teste disponível para o diagnóstico laboratorial na rede pública

(BRASIL, 2017). No entanto, é indicada somente para o diagnóstico complementar da LM, apresentando sensibilidade entre 65 e 75,4% e especificidade variando entre 70 e 89,2% (BARROSO-FREITAS et al., 2009; OLIVEIRA, 2018).

Na literatura científica, o uso de antígeno solúvel de *Leishmania* (AgSL) no ELISA é amplamente descrito, apresentando sensibilidade variável, principalmente devido as diversas metodologias de preparação do antígeno e diferenças antigênicas entre isolados e espécies de *Leishmania*. A ocorrência de reatividade cruzada com outras doenças infecciosas também dificulta sua aplicação (CELESTE et al., 2014; COELHO et al., 2016; DUARTE et al., 2015; LIMA et al., 2017). Atualmente, existe interesse crescente na identificação e caracterização de antígenos purificados, recombinantes ou até mesmo peptídeos sintéticos que possam ser utilizados para aumentar a sensibilidade e a especificidade dos testes sorológicos no diagnóstico da LT. Visando identificar potenciais candidatos para o diagnóstico, diferentes metodologias têm sido empregadas, como ferramentas de bioinformática (FLOREZ et al., 2017; MENEZES-SOUZA et al., 2014a, 2014b, 2015a, 2015b), biblioteca de expressão de cDNA (AMORIM et al., 1996), técnicas exibição de fago (COSTA et al., 2016; LINK et al., 2017), abordagem imunoproteômica (COELHO et al., 2016; DUARTE et al., 2015; LAGE et al., 2019; LIMA et al., 2017) e isolamento e purificação de glicoconjugados (DE SOUZA et al., 2018; GOMES-SILVA et al., 2008). Desta forma, a capacidade de diagnosticar maior número de pacientes através de uma técnica relativamente simples e potencialmente rápida, faz com que os testes imunológicos sejam promissores, podendo melhorar o cenário do diagnóstico da LT.

Um dos avanços recentes no diagnóstico laboratorial da LC foi à produção e comercialização do teste rápido *CL Detect*<sup>TM</sup> (InBios International Inc., Seattle, WA, EUA). Trata-se de um teste baseado em imunocromatografia de fluxo lateral que detecta a de *Leishmania* spp., utilizando anticorpo anti-antígeno específico. Em regiões onde LC é causada por *Leishmania (Leishmania) major* e *Leishmania (Leishmania) tropica*, este teste apresentou sensibilidade entre 59 e 73%, com mais de 90% de especificidade (BENNIS et al., 2018; VINK et al., 2018). Já no Sri Lanka e no Suriname, onde a LC é causado por *Leishmania (Leishmania) donovani* e *L. guyanensis*, respectivamente, sensibilidade próxima de 36% foi relatada (DE SILVA et al., 2017; SCHALLIG et al., 2019). Atualmente no Brasil, este teste não é comercializado, entretanto, o LSH Cutânea ECO Teste, (ECO Diagnóstica, Minas Gerais, Brasil), utiliza o mesmo princípio para detecção do mesmo antígeno, mas não foram encontrados na literatura, estudos avaliando o desempenho deste teste no país.

Métodos moleculares também constituem uma alternativa para o diagnóstico da LT, por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês *Polymerase chain reaction*)

convencional ou em tempo real (qPCR, do inglês *quantitative real time PCR*). Dependendo do alvo escolhido, a técnica pode apresentar alta sensibilidade e especificidade e até mesmo possibilitar a diferenciação das espécies através da PCR-RFLP (do inglês *Restriction fragment length polymorphism*), PCR-HRM (do inglês *High-Resolution Melting*) ou do sequenciamento genômico do fragmento amplificado (GARCIA et al., 2004; ROJAS-JAIMES et al., 2019; SCHÖNIAN et al., 2003). Entre os alvos mais utilizados para o diagnóstico da LT, estão diferentes regiões do DNA minicircular do cinetoplasto (kDNA), que têm apresentado sensibilidade maior que 94% (PIRMEZ et al., 1999; RODRIGUES et al., 2002; ROMERO et al., 2001). Outros alvos como a região intergênica do espaçador interno transcrito 1 (ITS1, do inglês *Internal transcribed spacer*), genes da subunidade menor do RNA ribossomal (SSU rRNA, do inglês *Small subunit ribosomal ribonucleic acid*), também são amplamente utilizados (SCHÖNIAN et al., 2003; VAN EYS et al., 1992). Visando a identificação de espécies de *Leishmania*, a clivagem enzimática de regiões do gene *hsp70* com a enzima de restrição *HaeIII*, tem se mostrado capaz de distinguir as espécies de *Leishmania* sp. patogênicas para o homem, que circulam no Brasil (GARCIA et al., 2004). Entretanto, estas técnicas moleculares, são complexas, de alto custo e ainda necessitam de padronização, estando restritas a centros de referência e pesquisa.

Um avanço entre os métodos moleculares foi o desenvolvimento da técnica de amplificação isotérmica de DNA através do LAMP (do inglês *loop-mediated isothermal amplification*) ou RPA (do inglês *recombinase polymerase amplification*) (COSSIO et al., 2021; LOBATO & O'SULLIVAN, 2018; NOTOMI et al., 2000; SALDARRIAGA et al., 2016). Para o diagnóstico da LC é comercializado em alguns países o teste Loopamp™ *Leishmania* Detection (Eiken Chemical Co. Tokyo, Japan), que utiliza como alvos o 18S rDNA e o kDNA, apresentando sensibilidade e especificidade variando entre 84,8 e 93,4% e entre 42,9 e 94,1%, respectivamente (SCHALLIG et al., 2019; VINK et al., 2018). No Brasil, ainda não existe nenhum kit comercial para o diagnóstico da LT baseado nessas técnicas.

O exame histopatológico (HE, do inglês *histopathological examination*), realizado a partir de material biológico parafinado e corado por hematoxilina-eosina é tradicionalmente utilizado para o diagnóstico da LT, como auxiliar no diagnóstico diferencial com outras doenças, como paracoccidiodomicose, hanseníase e neoplasias. O quadro histopatológico típico da LT é caracterizado por difuso infiltrado inflamatório rico em histiócitos, plasmócitos e linfócitos, com presença de granuloma e hiperplasia epidérmica (DUARTE & ROCHAEL, 2006; MAGALHÃES et al., 1986a). No entanto, estas alterações histopatológicas podem apresentar grande variabilidade em função do tempo de evolução da lesão, resposta terapêutica

e resposta imune do hospedeiro (BRYCESON, 1969; MAGALHÃES et al., 1986b; NICOLIS et al., 1978; RIDLEY et al., 1980). Desta forma, para a confirmação do diagnóstico é necessário à identificação de formas amastigotas do parasito, que nem sempre é de fácil visualização. MAGALHÃES et al. (1986a), por meio da técnica histopatológica, identificaram parasitos em apenas 63,7% dos pacientes com LC e 37,5% dos pacientes com LM. Nas lesões causadas por *L. braziliensis*, a escassez ou a degradação parcial dos parasitos dificultam ainda mais a análise e interpretação dos achados histopatológicos (BRUJIN et al., 1993; WEIGLE et al., 1987). Desta forma, diferentes técnicas têm sido propostas visando facilitar a identificação dos parasitos e, neste contexto, a técnica de IHQ se apresenta como valiosa ferramenta para auxiliar no diagnóstico laboratorial da LT.

### **2.3 Imuno-hitosquímica para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar**

A técnica de IHQ foi descrita por COONS, CREECH & JONES (1941) e permite identificar e localizar antígenos em cortes histológicos, através do uso de anticorpos específicos que, após revelação, produzem coloração visível ao microscópio ótico. Trata-se de uma técnica simples que tem sido aprimorada ao longo do tempo, especialmente nas etapas de recuperação antigênica e aperfeiçoamento no sistema de detecção (SHI, KEY & KALRA, 1991; SKALAND et al., 2010). Desta forma, a IHQ vem sendo amplamente utilizada, especialmente para o diagnóstico de neoplasias, doenças neurológicas, infecciosas e parasitárias (BASZLER et al., 1995; EYZAGUIRRE & HAQUE, 2008; RAMOS-VARA, 2005).

Na IHQ, o material biológico obtido a partir da biópsia é fixado, em geral com formol tamponado 10%, a fim de preservar estruturas e inativar enzimas (DAPSON, 1993; FOX et al., 1985; MASON & O'LEARY, 1991). Esta ação do formol pode acarretar redução da reatividade dos antígenos, sendo frequentemente necessário o emprego de técnicas de recuperação antigênica, seja através do calor, ação enzimática ou detergente. Estes procedimentos visam quebrar ligações cruzadas e recuperar a configuração estrutural do antígeno e, conseqüentemente, melhorar o reconhecimento pelo anticorpo específico (WERNER, WASIELEWSKI & KOMMINOTH, 1996).

Para a visualização da reação antígeno-anticorpo, em geral são utilizados sinalizadores como compostos fluorescentes ou mais frequentemente enzimas, como peroxidase ou fosfatase alcalina, que na presença de substrato específico e cromógeno, produzem precipitado colorido no local da reação (TAYLOR et al., 2006). Estes sinalizadores podem se ligar diretamente ao anticorpo primário (sistema de detecção direto) ou a anticorpos secundários ou terciários (sistema de detecção indireto), possibilitando amplificação do sinal (RAMOS-VARA, 2005).

Entre os sistemas de detecção indireta, estão o complexo avidina-biotina (ABC, do inglês *avidin-biotin complex*), avidina-biotina marcada (LAB, do inglês *labeled avidin-biotin*), estreptoavidina-biotina marcada (LSAB, do inglês *labeled streptavidin-biotin*), peroxidase anti-peroxidase (PAP), fosfatase alcalina anti-fosfatase alcalina (APAAP, do inglês *Alkaline Phosphatase Anti Alkaline Phosphatase*) e ainda sistemas de detecção por polímeros (ELIAS, MARGIOTTA & GABORC, 1989; HSU; RAINE & FANGER, 1981; SABATTINI et al., 1998).

Atualmente, os sistemas de detecção por polímero complexados com enzimas são amplamente utilizados, possibilitando redução do tempo da reação, maior diluição do anticorpo, além de apresentar sensibilidade igual ou superior aos sistemas tradicionais ABC, LAB ou LSAB com menor coloração de fundo, devido à ausência de reação inespecíficas da biotina ou avidina (SABATTINI et al., 1998; VOSSE et al., 2007). Entre os diferentes sistemas de detecção por polímero, variações na sensibilidade e especificidade da IHQ também são observadas (PETROSYAN et al., 2013; RAMOS-VARA, 2005; SKALAND et al., 2010).

Além do tipo de recuperação antigênica e sistema de detecção utilizado, outras variáveis analíticas ou pré-analíticas podem afetar drasticamente o desempenho da técnica de IHQ, como tempo de fixação, tipo e diluição do anticorpo e tempo de bloqueio (ENGEL & MOORE, 2011; LIN & CHEN, 2014). Entre tantas variáveis, a adequada padronização da IHQ é etapa essencial para garantir que o anticorpo reconheça adequadamente o antígeno pesquisado e possa alcançar um forte sinal de coloração, com pouca ou nenhuma coloração de fundo, utilizando a mais alta diluição do anticorpo e o menor tempo de reação possível (LIN & CHEN, 2014).

Para o diagnóstico da LT, a técnica de IHQ vem sendo utilizada desde a década de 80, apresentando superioridade em relação ao exame histopatológico, sobretudo em lesões contendo poucos parasitos (LIVNI et al., 1983; LYNCH et al., 1986; SELLS & BURTON, 1981). A IHQ, utilizando soro hiperimune anti-*Leishmania (Viannia) panamensis* e anti-*L. braziliensis*, foi avaliada para o diagnóstico de pacientes com LC proveniente de regiões onde predominam estas espécies, apresentando sensibilidade de 60,6% e 58,5%, respectivamente (SALINAS et al., 1989; SCHUBACH et al., 2001). Já empregando soro de coelho anti-*Leishmania (Leishmania) infantum*, recuperação antigênica induzida por calor e sistema de detecção do tipo LSAB, sensibilidade entre 68,8% a 80% foram reportadas (AMATO et al., 2009; QUINTELLA et al., 2009). Recentemente, GONZALEZ et al. (2019) utilizaram soro de camundongo anti-*L. amazonensis* na técnica IHQ para o diagnóstico de pacientes com LT no Panamá e reportaram sensibilidade de 76,1%, utilizando o mesmo sistema de detecção.

No Brasil, outros trabalhos reforçam o uso da IHQ no diagnóstico da LT. ALVES et al. (2013) utilizaram soro hiperimune de cães naturalmente infectados com *L. infantum* e sistema de detecção do tipo LSAB na técnica IHQ e reportaram sensibilidade de 91,8%. Posteriormente, MARQUES et al. (2017), em estudo multicêntrico com pacientes provenientes de três estados do país, usando o mesmo protocolo de IHQ descrito por ALVES et al. (2013), reportou sensibilidade de 70,5%.

Poucos estudos avaliaram o uso de AcMo na IHQ para o diagnóstico da LT. Na América Central, o AcMo G2D10 produzido contra antígeno de membrana de promastigotas de *Leishmania gerbilli*, foi empregado na IHQ para o diagnóstico de pacientes com LC, apresentando sensibilidade de 51% (KENNER et al. 1999). Estudos posteriores avaliaram o uso deste anticorpo na IHQ para o diagnóstico de leishmaniose dérmica pós-calazar (PKDL, do inglês *Post-kala-azar dermal leishmaniasis*) causada por *L. donovani* em pacientes da Índia, com sensibilidade entre 80 a 88% (BEENA, RAMESH & MUKHERJEE, 2003; SALOTRA et al., 2003). No Irã, AcMo anti-antígeno específico de *L. major* e *L. tropica* foi empregado na IHQ para o diagnóstico de pacientes com lesões cutâneas típicas e atípicas, apresentando sensibilidade de 97% e 94%, respectivamente. Na ocasião, o desempenho observado para IHQ, foi semelhante ao obtido para PCR (94% e 100%) e superior a histopatologia (70% e 71%) e a citologia (79% e 58%) (SHIRIAN et al. 2014).

Embora avanços na técnica de IHQ tenham sido descritos nas últimas décadas, para o diagnóstico da LT ainda são utilizados predominantemente soros hiperimunes e sistema de detecção baseado em biotina (ALVES et al., 2013; AMATO et al., 2009; GONZALEZ et al., 2019; LUNEDO et al., 2012; MARQUES et al., 2017; QUINTELLA et al., 2009; SALINAS et al., 1989; SCHUBACH et al., 2001). Diante do exposto, uma alternativa para o diagnóstico da LT no Brasil, pode estar relacionada ao desenvolvimento da técnica de IHQ, utilizando AcMo contra antígeno compartilhado entre as espécies de *Leishmania* mais prevalentes no Brasil e sistemas de detecção compostos por polímeros, contribuindo para melhorar a sensibilidade na detecção das formas amastigotas do parasito *in situ*, essencial para a confirmação do diagnóstico da LT.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Desenvolver e validar a técnica de IHQ utilizando AcMo para o diagnóstico da LC.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Identificar e selecionar potenciais alvos antigênicos para o diagnóstico da LT;
- Produzir os antígenos recombinantes selecionados;
- Produzir os anticorpos monoclonais contra os antígenos selecionados;
- Padronizar e validar a técnica de IHQ para o diagnóstico da LC;
- Comparar o desempenho da IHQ com das técnicas parasitológicas (exame direto e cultivo *in vitro*) e exame histopatológico, para o diagnóstico da LC.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 Identificação de potenciais alvos antigênicos

A fim de identificar potenciais alvos antigênicos para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar, foi realizada uma revisão sistemática desenvolvida com base no Manual de Revisões Sistemáticas para Acurácia de Testes Diagnósticos da Cochrane, seguindo as etapas propostas pelo manual PRISMA (do inglês *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses*) para acurácia de testes diagnóstico (HIGGINS & THOMAS, 2020; MCINNES et al., 2018). O protocolo desta revisão foi registrado em banco de dados internacional de revisões sistemáticas (PROSPERO: CRD42020213311).

#### 4.1.1 Fontes de informação e seleção de estudos

Foram realizadas buscas sistematizadas nas seguintes bases eletrônicas de dados: Medline (acessado via PubMed), LILACS (acessado via Biblioteca Virtual em Saúde – BVS), Embase e Cochrane, sem restrição de datas de publicação. Para a base de dados do Medline, foi utilizada estratégia de busca abrangente com palavras-chave e descritores *MeSH* (do inglês *Medical Subject Headings*) (Figura 1). Esta estratégia de busca foi adaptada para cada banco de dados e pesquisas complementares foram realizadas por meio da análise das referências incluídas nos artigos selecionados.

**Figura 1** Estratégia utilizada para busca no Medline

```
((((((((((("Leishmaniasis, Cutaneous"[MeSH Terms]) OR "Leishmaniasis, Cutaneous"[Title/Abstract]) OR "Cutaneous Leishmaniasis"[Title/Abstract]) OR "Leishmaniases, Cutaneous"[Title/Abstract]) OR "Cutaneous Leishmaniases"[Title/Abstract]) OR "Tegumentary Leishmaniasis"[Title/Abstract]) OR "Leishmania (Leishmania)"[Title/Abstract]) OR "Leishmania (Viannia)"[Title/Abstract]) OR "Leishmania amazonensis"[Title/Abstract]) OR "Leishmania panamensis"[Title/Abstract]) OR "Leishmania braziliensis"[Title/Abstract]) OR "Leishmania guyanensis"[Title/Abstract]) OR "Leishmania mexicana"[Title/Abstract]) OR "Leishmania major"[Title/Abstract]) OR "Leishmania tropica"[Title/Abstract]))) AND (((((((((((((((((((("Immunologic Tests"[MeSH Terms]) OR "Immunologic Tests"[Title/Abstract]) OR "Immunological Tests"[Title/Abstract]) OR "Immunodiagnosis"[Title/Abstract]) OR "Immunodiagnoses"[Title/Abstract]) OR "Serologic tests"[MeSH Terms]) OR "Serologic Tests"[Title/Abstract]) OR "Diagnostic Test"[Title/Abstract]) OR "Immunoassay"[MeSH Terms]) OR "Immunoassay"[Title/Abstract]) OR "Recombinant Proteins"[MeSH Terms]) OR "Recombinant Proteins"[Title/Abstract]) OR "Antigens"[MeSH Terms]) OR "Antigens"[Title/Abstract]) OR "Antigen"[Title/Abstract]) OR "Antibodies"[MeSH Terms]) OR "Antibodies"[Title/Abstract]))) AND (((((((((((("Enzyme-Linked Immunosorbent Assay"[MeSH Terms]) OR "Enzyme-Linked Immunosorbent Assay"[Title/Abstract]) OR "Enzyme Linked Immunosorbent Assay"[Title/Abstract]) OR "ELISA"[Title/Abstract]) OR "Blotting, Western"[MeSH Terms]) OR "Blotting, Western"[Title/Abstract]) OR "Immunochromatographic Assay"[Title/Abstract]) OR "Immunochromatographic"[Title/Abstract]) OR "rapid diagnostic test"[Title/Abstract]) OR "RDT"[Title/Abstract]) OR "Point-of-Care Systems"[MeSH Terms]) OR "point-of-care"[Title/Abstract]) OR "point of care"[Title/Abstract]) OR ("Sensitivity and Specificity"[MeSH Terms]) OR "Sensitivity"[Title/Abstract]) OR "Specificity"[Title/Abstract])
```

Fonte: elaborado pelo autor

#### 4.1.2 Critérios de inclusão e exclusão

Foram incluídos artigos originais de pesquisa que relatam o desempenho, em termo de sensibilidade e especificidade, de testes imunológicos baseados na detecção de anticorpos ou antígenos, usando proteínas purificadas ou recombinantes, peptídeos sintéticos, anticorpos policlonais ou monoclonais para o diagnóstico de LT, LC ou LM em humanos.

Foram considerados os seguintes critérios de exclusão: avaliação de testes sorológicos com base em AgSL; apenas amostras não-humanas foram testadas (por exemplo, amostras caninas); sensibilidade e especificidade dos testes imunológicos não foram apresentadas ou não puderam ser calculadas; menos de cinco amostras testadas; ausência de informação sobre o teste referência e antígeno não específico de *Leishmania*.

#### 4.1.3 Processo de seleção e extração de dados e avaliação do risco de viés

As publicações foram recuperadas de cada banco de dados e as duplicatas foram removidas, através do EndNote (LORENZETTI & GHALI, 2013). Com base nos critérios de inclusão e exclusão, dois revisores independentes analisaram o título e resumo de cada publicação, utilizando o programa Rayyan (OUZZANI et al., 2016). Foi realizada a leitura na íntegra dos estudos selecionados visando confirmar sua elegibilidade ou excluir, no caso da identificação de algum critério de exclusão. As discrepâncias foram resolvidas consensualmente após discussão.

Os dados foram extraídos independentemente por dois pesquisadores diretamente dos artigos completos e posteriormente confirmados por um terceiro pesquisador. Em caso de discordância, a decisão final foi tomada por consenso. Posteriormente, os dados foram compilados em tabelas de contingência 2x2, contendo os números de pacientes verdadeiros positivos, falsos positivos, verdadeiros negativos e falsos negativos. Além disso, foram extraídos os seguintes itens: procedência dos participantes (país de origem); teste imunológico utilizado; tipos de antígeno ou anticorpo; espécies de *Leishmania* e teste padrão de referência usado para confirmação da doença.

A fase de desenvolvimento de cada estudo foi avaliada de acordo com os critérios descritos por LEEFLANG & ALLERBERGER (2019). De forma simplificada: (a) Fase 1 - Validade científica: engloba os estudos de prova de conceito, em que a sensibilidade é estimada em pacientes doentes e a especificidade em amostras saudáveis; (b) Fase 2 - Validação técnica: avaliação da repetibilidade, reprodutibilidade, limites de detecção e ponto de corte; (c) Fase 3 - Desempenho clínico: avaliação de desempenho em pacientes sintomáticos na prática clínica; (d) Fase 4 - Ensaio clínico randomizado: avaliação do efeito do teste no desfecho do paciente.

Para avaliação do risco de viés e aplicabilidade dos estudos incluídos, foi utilizado o método QUADAS-2 (do inglês *Quality Assessment of Diagnostic Accuracy Studies*) (WHITING et al., 2011). Essa ferramenta permite verificar a semelhanças e diferenças entre os estudos através de questões estruturadas, que englobam quatro domínios principais: seleção de paciente, teste de índice, teste padrão de referência e fluxo/tempo. Cada domínio é avaliado de acordo com o risco de viés e os três primeiros domínios também são avaliados em relação à aplicabilidade do teste.

#### **4.1.4 Síntese dos dados**

Os desempenhos dos alvos antigênicos foram apresentados em quatro grupos, de acordo com o teste imunológico e a forma clínica, sendo: 1) ELISA para o diagnóstico da LT; 2) ELISA para o diagnóstico da LC; 3) Outros testes imunológicos para o diagnóstico da LC e 4) ELISA para o diagnóstico da LM. Os resultados de desempenho obtidos para cada antígeno ou anticorpo foram: sensibilidade (probabilidade de um teste positivo entre casos ou indivíduos com doença confirmada) e especificidade (probabilidade de um teste negativo entre controles ou indivíduos sem doença). Os gráficos de florestas que mostram os valores de sensibilidade e especificidade dos antígenos, incluindo intervalos de 95% de confiança (IC95%), foram criados usando Review Manager 5.4.

Vários estudos apresentam diferentes avaliações de desempenho para o mesmo antígeno, sendo considerado, por exemplo, diferentes pontos de corte (*cut-off*) ou diferentes grupos de pacientes não-caso, como pacientes saudáveis ou com outras doenças. Quando possível estes resultados foram agrupados e apenas uma taxa de sensibilidade e de especificidade, incluindo todos os pacientes avaliados foi apresentada. Quando não foi possível, optamos por apresentar os dados que refletem melhor a realidade, como por exemplo, grupo de pacientes não-caso composto por indivíduos com outras doenças ou o ponto de corte com melhor desempenho.

#### **4.2 Seleção dos alvos antigênicos**

Com base nos potenciais alvos antigênicos encontrados na revisão sistemática e considerando o papel biológico dos antígenos, assim como a disponibilidade prévia do minigene no laboratório, viabilizando a produção do antígeno recombinante, foram selecionados seis antígenos, que com características distintas, apresentam elevado potencial para serem empregados na técnica de IHQ. No Apêndice 3, encontra-se descrito algumas das

características que fizeram com que os seguintes antígenos fossem selecionados: mTXNPx, LACK, sAcP, KMP-11, LbPH e MAPK4.

A similaridade das sequências polipeptídicas dos antígenos de *L. braziliensis* foi analisada, contra sequências das principais espécies de *Leishmania* associadas à LT no país (*L. guyanensis*; *L. amazonensis*), além de *Homo sapiens* e *Mus musculus*, utilizando o algoritmo BLASTp (*Basic Local Alignment Search Tool*; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) (ALTSCHUL et al., 1997).

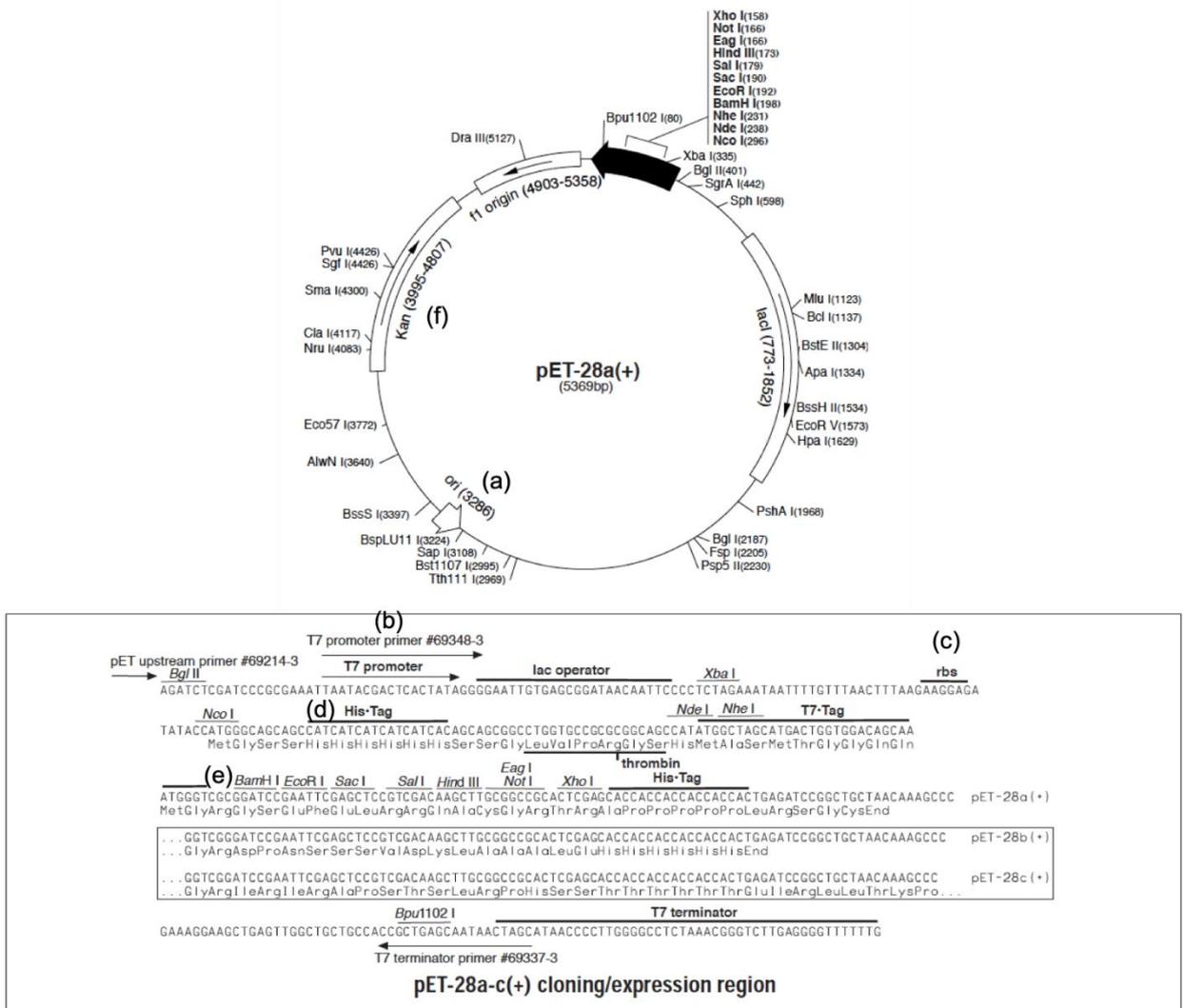
### 4.3 Produção dos antígenos recombinantes

#### 4.3.1 Clonagem dos genes que codificam os antígenos selecionados

As sequências de aminoácidos dos antígenos selecionados foram submetidas à predição de epítomos de células B, por meio dos programas preditores BCPRED (*B-cell epitope prediction server*) (CHEN et al., 2007; EL-MANZALAWY & HONAVAR, 2010; EL-MANZALAWY, DOBBS & HONAVAR, 2008) e BEPIPRED (*Immune Epitope Database Analysis Resource*) (PETERS et al., 2005), usando um ponto de corte 0,5 (*threshold=0,5*), para selecionar as regiões que agregavam maiores quantidade de epítomos. Dos antígenos selecionados, LACK e sAcP, tiveram suas sequências polipeptídicas redesenhadas. Os outros antígenos apresentaram epítomos distribuídos de forma regular por toda sequência polipeptídica, por isso foram mantidas as sequências gênicas nativas. A LACK apresentou três regiões potencialmente antigênicas, definidas pela localização de epítomos preditos, já a sAcP apresentou duas regiões antigênicas preditas. As sequências nucleotídicas foram obtidas por retrotradução das sequências de aminoácidos das regiões antigênicas selecionadas e foram construídos minigenes, utilizando o programa BioEdit (*Biological Sequence Alignment Editor*).

Foram inseridas na extremidade 5' (5 linha) de todas as sequências nucleotídicas, o sítio de clivagem para a enzima *Bam*HI e na extremidade 3' (3 linha), o código de parada e o sítio de clivagem para a enzima *Hind*III (Apêndice 4). As sequências nucleotídicas que codificam para os antígenos selecionados foram enviadas para a empresa GenScript (Piscataway, NJ, EUA), onde foram otimizadas e sintetizadas, exceto a sequência que codifica para a a. Neste estudo, foi utilizado o plasmídeo pET28a contendo a sequência da mTXNPx de *L. infantum*, adquirida previamente pelo nosso grupo de pesquisa. Esta sequência nucleotídica apresenta elevada identidade com a sequência de *L. braziliensis* (86,7%). As outras sequências também foram inseridas no plasmídeo pET28a, que tem como promotor o gene T7, além de um gene de resistência para kanamicina (Figura 2). Após a clonagem, os produtos das construções foram liofilizados e enviados para o Instituto René Rachou (IRR), FIOCRUZ.

**Figura 2** Plasmídeo de expressão em bactéria pET-28a.



Legenda: (a) Origem de replicação (Ori); (b) Região promotora (T7 promoter); (c) Sítio de ligação ao ribossomo; (d) Sequência que codifica para os resíduos de histidina; (e) Sítio de Múltipla clonagem; (f) Região que confere resistência à kanamicina. Fonte: Novagen. Disponível em: <[https://www.merckmillipore.com/BR/pt/product/pET-28a+-DNA-Novagen,EMD\\_BIO-69864#anchor\\_USP](https://www.merckmillipore.com/BR/pt/product/pET-28a+-DNA-Novagen,EMD_BIO-69864#anchor_USP)>. Acesso em: 26 abril 2021.

As construções foram denominadas pET28a-mTXNPx, pET28a-LACK, pET28a-sAcP, pET28a-KMP-11, pET28a-LbPH e pET28a-MAPK4. A Tabela 1 apresenta as especificações das construções em relação à sequência nucleotídica (número de pares de bases – pb) e ao antígeno gerado (número de aminoácidos e peso molecular).

**Tabela 1** Especificações das construções sintetizadas pela GenScript (Piscataway, NJ, EUA) e dos antígenos gerados.

\*Foi considerado o peso molecular médio de um aminoácido como 0,11 kDa. Fonte: elaborado pelo autor.

Antígenos	Número de acesso	Construções	Tamanho da sequência nucleotídica (pb)	Número de aminoácidos	Peso Molecular* (kDa)
mTXNPx	Q95U89_LEIIN	pET28a-mTXNPx	678	226	24,86
LACK	A4HGX7_LEIBR	pET28a-LACK	630	210	23,10
sAcP	A4HQG9_LEIBR	pET28a-sAcP	309	103	11,33
KPM11	A4HMP3_LEIBR	pET28a-KMP-11	276	92	10,12
LbPH	A4HIR9_LEIBR	pET28a-LbPH	1074	358	39,38
MAPK4	A4HA94_LEIBR	pET28a-MAPK4	1089	363	39,93

As construções foram transformadas em bactérias (*Escherichia coli* DH5 $\alpha$  ou *Escherichia coli* TOPO 10) para multiplicação dos plasmídeos recombinantes e em diferentes linhagens de expressão [*Escherichia coli* BL-21Star; *Escherichia coli* BL-21 (DE3) pLysS e *Escherichia coli* ArcticExpress (DE3)]. Para isso, 200 ng de cada construção foram adicionados em 100  $\mu$ L de bactérias competentes, que foram incubadas por 15 minutos (min) no gelo, 1 min a 42°C em banho-maria e 10 min no gelo. Após a transformação por choque térmico, foram adicionados 500  $\mu$ L de meio S.O.C. (Tryptona 2%; Extrato de levedura 0,5%; NaCl 8,55 mM; KCl 2,5 mM; MgCl<sub>2</sub> 20 mM; Glicose 20 mM; pH 7,0), seguido por incubação de 1 hora, a 37°C, sob agitação (200 rpm). As bactérias foram então plaqueadas em meio Luria Bertani (LB) ágar (Tryptona 1%; Extrato de levedura 1%; NaCl 85,5 mM; Ágar bacteriológico 1,5%; pH 7,0) contendo 30  $\mu$ g/mL de kanamicina e incubadas em estufa a 37°C, por aproximadamente 18 horas. Posteriormente, as colônias de bactérias transformadas, foram selecionadas e expandidas em LB líquido (Tryptona 0,5%; Extrato de levedura 5%; NaCl 85,5 mM; Glicose 11 mM; pH 7,0) contendo 30  $\mu$ g/mL de kanamicina e incubadas a 37°C sob agitação (200 rpm) por 18 horas.

A partir destes cultivos, o DNA plasmidial foi extraído utilizando o kit *PureYield™ Plasmid Midiprep System* (Promega - Madison, WI, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida, para confirmar a presença das sequências nucleotídicas foi realizada a clivagem enzimática das construções com 15  $\mu$ L DNA plasmidial, *Bam*HI (10U), *Hind*III (10U), 2  $\mu$ g albumina de soro bovino (BSA, do inglês *Bovine Serum Albumin*) e Tampão E. As reações foram incubadas no termociclador ProFlex™ (Thermo Fisher Scientific - Waltham, MA, EUA) por 2 horas a 37°C e 10 min a 65°C. Os produtos das reações de clivagem foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida 6% e corado com nitrato de prata 0,2%.

Após a confirmação da transformação das bactérias, através da visualização da banda com tamanho correspondente às sequências nucleotídicas, os cultivos foram aliqüotados com adição de 10% de glicerol estéril e armazenados a -70°C.

#### 4.3.2 Expressão, lise e desnaturação dos antígenos recombinantes

Para cada uma das construções, além das diferentes linhagens de bactérias de expressão, foram testadas também diferentes condições de cultivo, como meio de cultivo, concentração de isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG), temperatura e tempo de cultivo após indução. A melhor linhagem de bactéria de expressão para cada construção, foi cultivada em meio de cultivo contendo 30  $\mu$ g/mL de kanamicina e incubada a 37°C sob agitação (200 rpm) por 18 horas. Em seguida, o cultivo foi expandido (1:25) para volume final de 2 litros de meio de cultivo, contendo 30  $\mu$ g/mL de kanamicina e mantido nas mesmas condições (37°C e 200 rpm) até atingir densidade óptica (DO)<sub>590</sub> entre 0,6 e 0,8. A expressão dos antígenos recombinantes foi induzida com IPTG e o cultivo foi novamente incubado, sob agitação (200 rpm), de acordo com as condições previamente estabelecidas (Tabela 2).

**Tabela 2** Condições utilizadas para produção de cada antígeno recombinante.

Construções	Linhagem de bactérias de expressão	Meio de cultura	[IPTG]	T°C pós-indução	Tempo pós-indução
pET28a- mTXNPx	<i>E. coli</i> BL21 Star	LB líquido	1mM	37°C	18 horas
pET28a-LACK	<i>E. coli</i> BL21 Star	LB líquido	0,75mM	16°C	18 horas
pET28a-sAcP	<i>E. coli ArcticExpress (DE3)</i> <sup>a</sup>	2xYT	1mM	37°C	18 horas
pET28a-KMP-11	<i>E. coli</i> BL21 Star	LB líquido	1mM	37°C	4 horas
pET28a-LbPH	<i>E. coli ArcticExpress (DE3)</i> <sup>a</sup>	2xYT	1mM	37°C	18 horas
pET28a-MAPK4	<i>E. coli</i> BL21 Star	2xYT	1mM	37°C	18 horas

Legenda: [IPTG]: concentração de isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside; LB: Luria Bertani; 2xYT: (Tripton 1,6%; Extrato de levedura 1%; NaCl 85,5 mM; Glicose 11mM; pH 7,0); <sup>a</sup>adição de 25  $\mu$ g/mL de gentamicina. Fonte: elaborado pelo autor

Após o período de indução, as bactérias foram centrifugadas por 20 min, a 10.000g a 4°C, usando centrífuga Heraeus™ Megafuge™ 40R (Thermo Fisher Scientific). Para cada grama de sedimento bacteriano foram adicionados 12 mL de tampão de lise (NaCl 0,5 M; EDTA 0,2 mM; Sucrose 3%; Triton X 100 1%; Tris base 50 mM), 200  $\mu$ g/mL de lisozima (Sigma-Aldrich, San Luis, MO, EUA), 20  $\mu$ g/mL de DNase (Thermo Fisher Scientific) e 1 mL de coquetel inibidor de protease (Sigma-Aldrich). Em seguida, o extrato de bactérias foi incubado por 15 min, sob agitação no gelo e posteriormente submetido à ultrasonicação (VC-750, SONICS VIBRA-CELL – Sonics e Materials, Newton, CT, EUA) por cinco ciclos de 30 segundos (s), com intensidade de 40% e intervalos de 1 min entre os ciclos. O lisado de bactérias foi então

centrifugado por 40 min, a 13.000g a 4°C e o sobrenadante foi separado e armazenado. Esse procedimento foi repetido com o sedimento residual de bactérias para maximizar a extração dos antígenos solúveis. Em seguida, os antígenos que não se solubilizaram (fração insolúvel) foram submetidos a um protocolo de desnaturação com solução contendo reagentes caotrópicos. Para isso, cada grama do sedimento foi ressuspensionado com 4 mL de tampão de lavagem de corpos de inclusão (NaCl 0,5 M; EDTA 0,2 mM; Tris base 50 mM; Ureia 3 M), posteriormente incubado sob agitação por 15 min, em temperatura ambiente e submetido à sonicação, nas mesmas condições anteriores. Em seguida, a preparação foi centrifugada por 40 min, a 13.000g a 4°C, sendo o sedimento novamente ressuspensionado com tampão de lavagem de corpos de inclusão e os procedimentos de ultrasonicação repetidos. Após nova etapa de centrifugação a 13.000g, por 40 min a 4°C, cada grama de sedimento foi ressuspensionado com 20 mL de tampão de solubilização de corpos de inclusão [NaCl 0,2 M; Tris base 10 mM; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM; GuHCl 6M e 2-β-mercaptoetanol (BetOH) 10mM] e incubado por 18 horas sob agitação em geladeira (2 a 8°C).

Desta forma, a fim de avaliar a solubilidade de cada antígeno recombinante, inicialmente foi realizado o procedimento completo de lise e desnaturação e todos os lisados obtidos nessas etapas foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 15%. Foi então determinada a melhor condição de purificação para cada antígeno recombinante.

#### **4.3.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE**

A eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE foi realizada de acordo com LAEMMLI (1970). Brevemente, para o gel de empilhamento foi utilizado acrilamida-bisacrilamida a 5%; Tris 1M pH 6,8 (12,5%); SDS (0,1%); persulfato de amônio (1%); TEMED (0,01%) em água tipo I. Já para o gel de separação foi utilizado acrilamida-bisacrilamida (15%); Tris 1,5M pH 8,8 (25%); SDS (0,1%); persulfato de amônio (1%); TEMED (0,04%) em água tipo I. As amostras a serem analisadas foram adicionadas em tampão de amostra 2x (SDS 0,8%; Tris 1M pH 6,8 2,4%; azul de bromofenol 0,04%; glicerol 10% e BetOH 2%) e aquecidas por 5 min a 95°C. Em cada gel, foi aplicado o padrão de peso molecular Amersham ECL Rainbow Markers (GE Healthcare, Chicago, IL, EUA). A eletroforese foi realizada utilizando tampão de eletroforese (Tris base 25 mM; Glicina 0,2 M; SDS 0,01%), com voltagem inicial de 60V e posteriormente 150V. Os géis foram corados com solução de azul de Coomassie (Coomassie Brilliant Blue R-250 0,2%; metanol 45%; ácido acético 10%) por no mínimo 1 hora e descorados com solução aquosa de ácido acético PA (10%) e álcool etílico PA (26,25%).

#### 4.3.4 Purificação dos antígenos recombinantes por cromatografia de afinidade

Para purificação dos antígenos recombinantes foi utilizada resina Ni Sepharose High Performance (GE Healthcare). As diferentes condições de purificação serão apresentadas em detalhes abaixo:

##### a) Purificação dos antígenos recombinantes em condições nativas

A resina foi inicialmente lavada com tampão de lise e em seguida, incubada com o lisado contendo o antígeno recombinante, sob agitação em geladeira (2 a 8°C) por 1 hora. Posteriormente, a mistura foi centrifugada por 5 min, a 2.500 rpm a 4°C, o sobrenadante foi descartado, a resina foi resuspendida em 15mL de tampão de lavagem (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM; NaCl 300 mM; Imidazol 20 mM; pH 8,0) e incubada sob agitação por 5 min, em temperatura ambiente. Após essa etapa, a resina foi novamente centrifugada por 5 min, a 2.500 rpm e 4°C, o sobrenadante foi descartado e o procedimento de lavagem foi repetido por mais duas vezes. Após a última lavagem, a resina foi transferida para coluna Poly-Prep<sup>®</sup> Chromatography Columns (Bio-Rad Labs., Hercules, CA, EUA) e 1 mL de tampão de eluição (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM; NaCl 300 mM; Imidazol 250 mM; pH 8,0) foi adicionado para cada alíquota eluída.

##### b) Purificação dos antígenos recombinantes em condições desnaturantes

A resina foi inicialmente lavada com tampão de solubilização de corpos de inclusão, e em seguida, incubada sob agitação em temperatura ambiente por 1 hora com a preparação proteica contendo o antígeno recombinante. Posteriormente, a mistura foi centrifugada por 5 min, a 2.500 rpm a 4°C, o sobrenadante foi descartado, 15 mL de Tampão de Lavagem 1 (Tampão fosfato 20 mM; Imidazol 10 mM; Uréia 8 M; BetOH 10 mM; pH 7,8) foram adicionando e mantidos em incubação sob agitação a temperatura ambiente por 5 min. Após essa etapa, a resina foi novamente centrifugada por 5 min, a 2.500 rpm a 4°C, o sobrenadante, foi descartado e o processo de lavagem foi repetido por duas vezes com Tampão de Lavagem 1. Em seguida, o processo de lavagem foi realizado duas vezes com Tampão de Lavagem 2 (Tampão de Lavagem, pH 6,3) e duas vezes com Tampão de Lavagem 3 (Tampão de Lavagem, pH 5,9). Após essa etapa, a resina foi transferida para coluna Poly-Prep<sup>®</sup> Chromatography Columns (Bio-Rad Labs.) e 1 mL de Tampão de Eluição (Tampão fosfato 20 mM; Imidazol 10 mM; Uréia 8 M; BetOH 10 mM; pH 4,3) foi adicionado para cada alíquota de 1mL purificada.

Independente do procedimento de purificação, a dosagem proteica de cada alíquota purificada foi realizada através do método de Bradford, utilizando o ensaio colorimétrico *Bio-Rad Protein Assay* (Bio-Rad Labs), de acordo com as instruções do fabricante (BRADFORD,

1976). A eluição ocorreu até a obtenção de alíquotas com concentração proteica inferior a 50 µg/mL. Após a purificação as frações eluídas foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE a 15% (conforme item 4.3.3), e as alíquotas mais puras foram selecionadas para realização das próximas etapas.

#### **4.3.5 Técnica de *Western blotting* com anticorpo anti-His**

Após a purificação, os antígenos recombinantes produzidos foram analisados por *Western blotting* de acordo com TOWBIN, STAEHELIN & GORDON (1979) e BURNETTE (1981). Para isso, 2,5 µg das frações proteicas, purificadas de cada antígeno recombinante, foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 15% e transferidas para membrana de nitrocelulose 0,45 µm (GE Healthcare). A transferência foi realizada utilizando tampão de transferência (Tris base 25 mM, glicina 192 mM e metanol 20%) sob uma corrente elétrica de 300 mA, por 120 min. Os sítios livres da membrana foram bloqueados com Tampão Tris-Salina (TBS, do inglês *Tris-buffered saline*: NaCl 0,15 M; KCl 3 mM, Tris-base 250mM; pH 7,4), contendo 5% de leite em pó desnatado (TBS–leite 5%), sob agitação por cerca de 18 horas em geladeira (2 a 8°C). No dia seguinte, a membrana foi lavada três vezes com TBS contendo Tween 20 a 0,05% (TBS-T<sub>20</sub>) por 5 min, sob agitação. Logo após a membrana foi mantida a temperatura ambiente sob agitação por 1 hora, com 10 mL de solução contendo AcMo de camundongo anti-histidina (Thermo Fisher Scientific), diluído na proporção de 1:3.000 em TBS-T<sub>20</sub> contendo 1% de leite em pó desnatado (TBS–T<sub>20</sub>–leite 1%). Após nova etapa de lavagem, foram adicionados 10 mL de solução contendo anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase (Sigma-Aldrich), diluído na proporção de 1:30.000 em TBS–T<sub>20</sub>–leite 1%, sendo a membrana mantida a temperatura ambiente, sob agitação, por 1 hora. Após novas lavagens a reação antígeno-anticorpo foi revelada com ECL™ Prime *Western Blotting Detection* (GE Healthcare) e a imagem capturada no ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare).

### **4.4 Produção dos anticorpos monoclonais**

#### **4.4.1 Imunização de camundongo BALB/c com os antígenos recombinantes**

Neste estudo, os procedimentos que utilizaram camundongo da linhagem BALB/c, foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FIOCRUZ, registrado sob a licença LW-15/15 (Anexo 1). Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) fêmea, de 5-8 semanas, provenientes do Biotério de Produção (BIOP) do IRR/FIOCRUZ. Durante esta etapa, os animais foram mantidos no Biotério de Experimentação Animal (BIOTEX) da mesma

instituição em gaiolas forradas com maravalha autoclavada, sendo oferecido ambiente enriquecido, água e ração comercial *ad libitum*.

Para cada antígeno recombinante produzido foram imunizados dois camundongos, inoculando na região dorsal, por via subcutânea, 100 µL de solução antigênica contendo 20 µg do antígeno recombinante e adjuvante completo de Freund na proporção de 1:2. Outras quatro imunizações subsequentes foram realizadas a cada 15 dias, utilizando adjuvante incompleto de Freund na mesma proporção mencionada anteriormente. Em paralelo, como controle, dois camundongos foram imunizados com solução salina e adjuvante, seguindo as mesmas condições descritas. Antes de cada imunização foi coletado amostra de sangue total de cada animal por punção da veia submandibular, e após coagulação, o sangue foi centrifugado a 2500 rpm, por 15 min, para separação e obtenção do soro.

#### **4.4.2 Cinética da produção de anticorpo anti-antígeno recombinante**

A produção de anticorpos IgG anti-antígeno recombinante em amostras de soro dos camundongos imunizados, foi avaliada por meio de ELISA de acordo com GRENFELL et al. (2014), com modificações. Brevemente, cada poço da microplaca de ELISA (Nunc Maxisobert™, Thermo Fisher Scientific) foi sensibilizado com 50 µL de antígeno recombinante (1 µg/mL) diluído em tampão carbonato-bicarbonato (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 15 mM, NaHCO<sub>3</sub> 28,5 mM; pH 9,6), que foi incubado a 37°C, em câmara úmida, por 1 hora e, posteriormente, por 18 horas em geladeira (2 a 8°C). Após a sensibilização, cada poço foi lavado três vezes com 300 µL de Tampão Fosfato-Salino (PBS, do inglês *Phosphate-buffered saline*: NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,1 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8,3 mM; NaCl 0,15 mM; pH 7,3) contendo Tween 20 a 0,05% (PBS-T<sub>20</sub>). Os sítios livres foram bloqueados com 200 µL de PBS-T<sub>20</sub> contendo 5% de leite em pó desnatado (PBS-T<sub>20</sub>-leite 5%) e então, a microplaca foi incubada a 37°C por 2 horas, em câmara úmida. Em seguida, os poços da microplaca foram lavados conforme realizado anteriormente e em cada poço foram adicionados 50 µL das amostras, diluídos na proporção de 1:100 em PBS-T<sub>20</sub> contendo 1% de leite em pó desnatado (PBS-T<sub>20</sub>-leite 1%), mantendo sob incubação a 37°C, por 1 hora, em câmara úmida. Após novas etapas de lavagens, em cada poço da microplaca, foram adicionados 50 µL de solução contendo anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase (Sigma-Aldrich), diluído na proporção de 1: 20.000 em PBS-T<sub>20</sub>-leite 1%, mantendo sob incubação a 37°C, por 1 hora, em câmara úmida. Finalmente, a microplaca foi lavada e a reação antígeno-anticorpo revelada com a adição de 50 µL de TMB (3,3', 5,5'-Tetramethylbenzidine, Sigma-Aldrich) em cada poço. A microplaca foi incubada a temperatura ambiente, por 5 min, ao abrigo da luz e a reação foi interrompida pela adição de 50 µL de

solução de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$  1N) em cada poço e a leitura realizada em leitor de microplacas FlexStation® 3 Multi-Mode Microplate Reader (Molecular Devices - San José, Califórnia, EUA) em comprimento de onda de 450/620nm.

#### **4.4.3 Coleta de células peritoneais**

Em paralelo ao procedimento de esplenectomia realizado nos animais imunizados (mais detalhes serão apresentados no item 4.4.4), foram obtidas células peritoneais de dois camundongos BALB/c não imunizados. Os animais foram eutanasiados com 500 mg/Kg quetamina (Cetamin®, Syntec, Cotia, SP, Brasil) em associação com 50 mg/Kg xilazina (Anasedan®; Ceva Saúde Animal Ltda, Paulina, SP, Brasil). Inicialmente, foi realizada a anssepsia da região ventral com álcool etílico 70%, em cabine de segurança biológica e, com auxílio de tesouras e pinças estéreis, a membrana peritoneal do camundongo foi exposta. Em seguida, 5 mL de meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Sigma-Aldrich), suplementado com 1% de PenStrep, foram inoculados no abdômen dos animais e, após homogeneização com pipeta de transferência estéril tipo Pasteur, o líquido peritoneal foi aspirado. Este processo foi repetido no mínimo cinco vezes por animal.

A suspensão de células peritoneais foi centrifugada durante 3 min, a 400g a 4°C, desprezando o sobrenadante e ressuspensando o sedimento celular em 100 mL de meio DMEM suplementado com 20% de SFB, 1% de PenStrep e 2% de meio de suplementação hipoxantina-aminoptericina-timidina (HAT – Sigma-Aldrich). A suspensão de células foi distribuída em microplacas de cultivo celular de 96 poços (Costar®, Corning Incorporated - Corning, NY, EUA), que foram incubadas em estufa a 37°C e 5% de  $CO_2$ , durante 24 horas.

#### **4.4.4 Esplenectomia e preparo das células esplênicas**

Quinze dias após a quinta imunização, uma dose de reforço foi administrada intraperitonealmente nas mesmas condições das doses anteriores e, após três dias os animais foram eutanasiados, de forma semelhante ao descrito anteriormente. Posteriormente, foi realizada a esplenectomia e o baço foi transferido para tubo estéril contendo 15 mL de meio DMEM.

Para obtenção dos esplenócitos, o baço foi macerado em filtro celular de nylon (70 µm Cell Strainer, BD Bioscience, San Jose, CA) e a suspensão de células foi centrifugada por 9 min, a 250g a 4°C. O sedimento foi ressuspensado em 2 mL de Tampão de Lise (Sigma-Aldrich) e 8 mL de DMEM, novamente centrifugado nas mesmas condições descritas. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensado com 10 mL de DMEM, novamente macerado em

filtro celular de nylon e centrifugado. Após descartar o sobrenadante, o sedimento foi ressuspendido com 2 mL de DMEM e as células foram contadas em contador automático de células Countess™ Automated Cell Counter (Invitrogen™, Carlsbad, CA, EUA).

#### **4.4.5 Preparo de células mielomatosas**

Células mielomatosas da linhagem Sp2/0-IL6 foram cultivadas em garrafa de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> acrescidas de meio DMEM, suplementado com 20% SFB e 1% de PenStrep, mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Cinco dias antes do procedimento de hibridização somática por fusão celular, as células mielomatosas foram expandidas para no mínimo cinco garrafas de 150 cm<sup>2</sup>, a fim de se obter alta concentração de células viáveis. No dia da fusão celular, o sobrenadante das garrafas foi descartado e as células aderidas foram ressuspendidas em 15 mL de meio DMEM. A suspensão celular foi centrifugada por 3 min, a 300g, e em seguida, as células foram ressuspendidas em 2 mL de meio DMEM e contadas em contador automático de célula Countess™ Automated Cell Counter (Invitrogen™).

#### **4.4.6 Hibridização somática por fusão celular**

A hibridização somática por fusão dos esplenócitos com as células mielomatosas foi realizada de acordo com HARN, MITSUYAMA & DAVID (1984) e KENNETT et al. (1979), com modificações. Inicialmente,  $3,5 \times 10^7$  esplenócitos e  $7 \times 10^6$  células mielomatosas foram adicionadas em 20 mL de meio DMEM. A suspensão celular foi centrifugada por 3 min a 300g e o sobrenadante desprezado. Em seguida, foram adicionados 700 µL de polietilenoglicol/dimetilsulfóxido (PEG/DMSO Solution HYBRI-MAX – Sigma-Aldrich) por gotejamento sob suave agitação. A suspensão celular foi mantida em repouso por 90 s e posteriormente, 15 mL de DMEM foram adicionados por gotejamento. As células foram centrifugadas nas mesmas condições descritas anteriormente, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspendido com 30 mL de meio DMEM, suplementado com 20% de SFB e 1% de PenStrep. O cultivo celular foi transferido para garrafa de cultivo de 150 cm<sup>2</sup> e mantido em estufa a 37°C, com 5% CO<sub>2</sub>, por 24 horas. As células aderidas foram ressuspendidas e centrifugadas por 10 min a 350g, o sobrenadante foi descartado e ao sedimento foram adicionados 100 mL de meio DMEM contendo 20% SFB, 1% PenStrep, 2% HAT e 1% ITS (0,5 mg/mL insulina; 0,5 mg/mL transferrina; 0,5 ng/mL de selenito de sódio). Em seguida, as células foram transferidas para as microplacas de cultivo celular, contendo camada de células peritoneal previamente preparada, conforme descrito no item 4.4.3. Após sete dias da fusão

celular, o meio de cultivo foi substituído por meio DMEM, contendo 20% SFB, 1% PenStrep, 2% de meio de suplementação hipoxantina-timidina (HT – Sigma-Aldrich) e 1% ITS.

#### **4.4.7 Seleção, cultivo e criopreservação dos hibridomas**

A seleção de clones produtores de anticorpos anti-antígeno recombinante foi feita por ensaios de ELISA, de forma semelhante ao descrito no item 4.4.2. No entanto, após o bloqueio e lavagem das microplacas previamente sensibilizadas, foram adicionados 50 µL de sobrenadante, provenientes das microplacas de cultivo que apresentavam quantidade e viabilidade celular adequada, confirmada por microscopia óptica.

As células presentes nos poços das microplacas, cujo sobrenadante do cultivo celular apresentaram  $DO_{450/620} > 0,600$  no ensaio de ELISA, foram selecionadas e expandidas para microplacas de cultivo celular de 24 poços (Costar<sup>®</sup>, Corning Incorporated). De acordo com o crescimento e viabilidade dos hibridomas, os ensaios de ELISA foram repetidos a fim de confirmar a produção de anticorpos específicos. As células presentes nos poços, cujo sobrenadante do cultivo celular apresentaram maiores absorbâncias no ensaio de ELISA, foram congeladas em meio DMEM, contendo 10% DMSO e 20% SFB. O hibridoma mais promissor, ou seja, aquele em que o sobrenadante apresentou maior absorbância no ensaio de ELISA, bom crescimento e viabilidade celular, foi selecionado para expansão e produção dos AcMos.

#### **4.4.8 Clonagem e expansão dos hibridomas**

A clonagem dos hibridomas foi realizada por diluição limitante. Para isso, os hibridomas mais promissores, cultivados em microplaca de 24 poços, foram ressuspensos com 1 mL de meio DMEM e 100 µL desta suspensão celular foram transferidos para um tubo estéril de polipropileno contendo 1,5 mL de meio de clonagem (DMEM contendo 20% SBF, 1% PenStrep e 1% ITS), ou seja, diluição de 1:16. Em seguida, 150 µL desta diluição foram transferidos para outro tubo estéril contendo 1,5 mL de meio de clonagem, proporção de 1:11 para segunda diluição. Após homogeneização, 400 µL desta diluição foram transferidos para outro tubo estéril contendo 4 mL de meio de clonagem, na proporção de 1:11, de modo que ao final, a diluição total dos hibridomas foi de 1936x. Em uma microplaca para cultivo celular de 96 poços, foram adicionados 50 µL da suspensão celular de cada uma das três diluições a cada 32 poços. Em seguida, foram adicionados 200 µL de meio de clonagem em todos os poços da placa, que foi incubada em estufa a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub>. Toda a microplaca foi analisada por microscopia óptica a fim de confirmar a presença de uma única célula por poço.

A viabilidade e o crescimento dos hibridomas foram analisados por microscopia óptica a cada 48 horas. As células presentes nos poços, cujo sobrenadante do cultivo celular apresentaram maiores leituras de absorbância no ensaio de ELISA, foram expandidas e congeladas. O hibridoma mais promissor, seguindo o parâmetro já descrito anteriormente, foi expandido para garrafas de 150 cm<sup>2</sup> e o sobrenadante contendo AcMo foi coletado, até o volume de 1 L.

#### 4.4.9 Purificação dos anticorpos monoclonais

O sobrenadante da cultura celular contendo AcMo foi concentrado com sistema de filtração Amicon<sup>®</sup> Stirred Cells com ultrafiltros Diaflo (Amicon Div., W. R. Grace and Co., Massachusetts, EUA). Em seguida, os anticorpos foram purificados em coluna HiTrap Blue HP e HiTrap rProtein A FF (GE Healthcare) de acordo com instrução do fabricante.

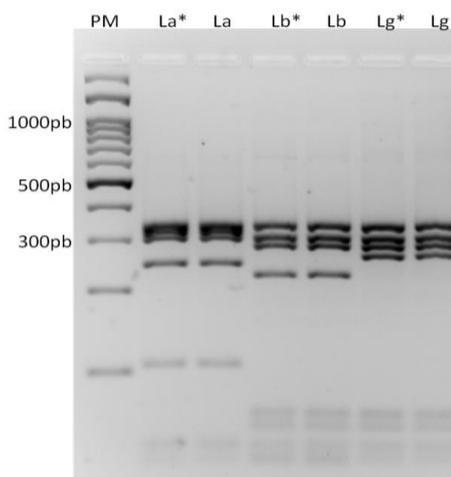
#### 4.4.10 Preparo dos antígenos solúveis de *Leishmania* sp. (AgSLs)

Para analisar o reconhecimento dos antígenos nativos pelos AcMos produzidos, AgSLs foram preparados a partir da fase estacionária de cultura de promastigotas de *L. amazonensis* (AgSLa) (IFLA/BR/67/PH8), *L. braziliensis* (AgSLb) (MHOM/BR/75/M2903) e *L. guyanensis* (AgSLg) (MHOM/BR/75/M4147).

As linhagens de *Leishmania* utilizadas neste estudo encontravam-se criopreservadas em nitrogênio líquido (-196 °C) e foram descongeladas, cultivadas em meio NNN/LIT e mantidas em estufa B.O.D a 25°C ± 1°C. Usando como alvo uma região do gene *hsp70*, as linhagens utilizadas foram caracterizadas em nível de espécie, por meio da técnica de PCR-RFLP, de acordo com GARCIA et al. (2004). Inicialmente o DNA genômico dos parasitos foi extraído utilizando QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida, foi preparada a reação de PCR para um volume final de 25 µL contendo 50 ng de DNA extraído por amostra, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM dNTP, 1,25 U Taq DNA polimerase, tampão de reação, e 10 pmol de cada um dos iniciadores *hsp70sen* 5'GACGGTGCCTGCCTACTTCAA3' e *hsp70ant* 5'CCGCCCATGCTCTGGTACATC3'. A reação de amplificação foi processada no termociclador ProFlex™ (Thermo Fisher Scientific), sob uma ciclagem composta por desnaturação inicial a 94°C por 5 min, seguida de 35 ciclos alternados de desnaturação a 94°C por 30 s, anelamento a 61°C por 1 min e extensão a 72°C por 3 min e extensão final a 72°C por 10 min. Como controle positivo da reação de PCR foi usado DNA extraído de formas promastigotas das linhagens referências das respectivas espécies de interesse. Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de

agarose 1,5% e corado com brometo de etídio (10 mg/mL). Após a confirmação da banda específica de 1300 pb, 10 µL do produto amplificado foram submetidos à clivagem com 0,65 U da enzima *HaeIII*, em tampão próprio (Promega). A reação foi incubada por 2 horas, em termociclador a 37°C e os perfis de restrição analisados em gel de agarose 3%, conforme demonstrado na Figura 3.

**Figura 3** Gel de agarose 3%, corado com brometo de etídio, mostrando a caracterização das espécies de *Leishmania* sp., utilizadas neste estudo.



Legenda: PM. Padrão de marcador molecular de 100pb; La\* – DNA de linhagem referência de *L. amazonensis*; La – cultura de *L. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8); Lb\* – DNA de linhagem referência de *L. braziliensis*; Lb – cultura de *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903); Lg\* – DNA de linhagem referência de *L. guyanensis*; Lg – cultura de *L. guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147). Fonte: elaborado pelo autor

Após caracterização, os parasitos foram lavados duas vezes com PBS por centrifugação de 10 min, a 2.000g a 4°C, removendo os sobrenadantes após cada centrifugação. Os parasitos foram ressuspensos em tampão de lise (Hepes 20 mM, KCl 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, sacarose 250 mM, DTT 1 mM, PMSF 0,1 mM) e submetidos a 10 ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e aquecimento a 37 °C. Após centrifugação, as células foram submetidas à ultrasonicação em cinco ciclos de pulso de 30 s, a 40% de intensidade e então, foram centrifugadas por 15 min, a 2.000g a 4 °C.

#### 4.4.11 Avaliação da imunoreatividade dos anticorpos monoclonais, através da técnica de *Western blotting*

O reconhecimento dos antígenos recombinantes e dos antígenos nativos presentes no AgSLs das principais espécies de *Leishmania* associadas à LT no Brasil, pelos AcMos produzidos, foi avaliado através da técnica de *Western blotting*. Inicialmente, 2,5 µg dos antígenos recombinantes e 5 µg de cada AgSL, foram submetidos à eletroforese em gel de

poliacrilamida SDS-PAGE 15% e transferidos para membrana de nitrocelulose. Após o bloqueio e lavagem das membranas, foram adicionados 10 mL de solução contendo os AcMos anti-antígenos específicos, diluído na proporção de 1:100 em TBS-T20-leite 1%. A adição do conjugado e revelação da reação antígeno-anticorpo, foi realizada conforme protocolo descrito item 4.3.5

#### **4.5 Técnica de imuno-histoquímica**

##### **4.5.1 Avaliação da imunoreatividade dos anticorpos monoclonais, através da técnica de imuno-histoquímica**

Neste estudo, os procedimentos que utilizaram hamsters foram submetidos e aprovados pelo CEUA-FIOCRUZ, registrado sob a licença LW4/18 (Anexo 2). Foram utilizados hamsters machos com idade variando entre 4-6 semanas, provenientes do BIOP do IRR/FIOCRUZ. Os hamsters foram mantidos no BIOTEX da mesma instituição, em gaiolas forradas com maravalha autoclavada, sendo oferecido ambiente enriquecido, água e ração comercial *ad libitum*, durante todo o período experimental.

Para avaliar a capacidade dos AcMo de reconhecer amastigotas *in situ* em lesões dérmicas causadas pelas principais espécies de *Leishmania* associadas à LT no Brasil, por meio da técnica de IHQ, foi realizada infecção experimental em hamsters (*Mesocricetus auratus*), com as linhagens de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. guyanensis*, previamente caracterizadas.

As espécies de *Leishmania* foram inicialmente utilizadas para infecção dos hamsters, com o objetivo de recuperar a infectividade dos parasitos, tendo em vista as passagens em meio de cultura e a manutenção inicial das linhagens sob condição de criopreservação. Para isso, no sétimo dia de crescimento *in vitro*, 4 mL de cultivo de cada espécie de *Leishmania*, foram transferidos para um tubo estéril de polipropileno de 15 mL, contendo 10 mL de PBS estéril. Os parasitos foram centrifugados por 10 min, a 2.500 rpm, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensionado em 5 mL de PBS estéril.

No BIOTEX, foi realizada assepsia local dos hamsters com álcool etílico 70% e em seguida, os animais foram anestesiados via intraperitoneal, com 200 mg/Kg de quetamina (Cetamin<sup>®</sup>, Syntec) e 10 mg/Kg de xilazina (Anasedan<sup>®</sup>; Ceva Saúde Animal Ltda). Após a constatação do plano anestésico, 200 µL de suspensão de cada espécie de *Leishmania* foram inoculados na pata posterior direita de dois animais. Os hamsters foram acompanhados até o surgimento e estabelecimento da infecção e então, foram eutanasiados com 1000 mg/Kg de quetamina (Cetamin<sup>®</sup>, Syntec) e 50 mg/Kg de xilazina (Anasedan<sup>®</sup>; Ceva Saúde Animal Ltda).

O material biológico proveniente da lesão dérmica foi coletado e armazenado em solução de PBS estéril, contendo penicilina (200 u/mL), estreptomicina (200 µg/mL) e antifúngico (0,25 mg/L 5-fluorocitosina, Sigma-Aldrich), por no mínimo 24 horas. Posteriormente, os fragmentos das lesões foram macerados em placa de Petri estéril e inoculados em meio de cultura NNN/LIT suplementado com 20% SFB, mantidos em estufa B.O.D a 25°C ± 1°C. A viabilidade dos parasitos e ausência de agentes contaminantes foi verificada semanalmente, antes do repique.

Após a terceira passagem *in vitro*, as suspensões de parasitos foram preparadas nas mesmas condições descritas anteriormente. Os parasitos foram contados em câmara de Neubauer e a concentração ajustada com PBS para 1 x 10<sup>6</sup> parasitos/mL. Após anestesia, quatro animais foram infectados nas patas posteriores com 200 µL de suspensão de cada espécie de *Leishmania* sp. Após trinta dias da infecção, os hamsters foram eutanasiados e os fragmentos das lesões foram retirados, mantidos em formaldeído 10% tamponado (pH 7,2) por 24 horas e posteriormente processados, conforme descrito no item 4.5.3.4. Posteriormente, a imunorreatividade dos AcMos produzidos foi avaliada nos cortes histológicos de material obtido das lesões dos animais experimentalmente infectados com *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. guyanensis*, empregando o protocolo de IHQ padrão de cada sistema de detecção, descrito no item a seguir.

#### **4.5.2 Padronização da técnica de imuno-histoquímica empregando anticorpo monoclonal anti-mTXNPx**

A técnica de IHQ foi realizada utilizando dois sistemas de detecção compostos por polímeros livres de biotina. O sistema *Novolink Polymer Detection System* (Leica Microsystems, Newcastle, UK), emprega anticorpos conjugados à peroxidase e usa peróxido de hidrogênio e 3,3'-diaminobenzidina como substrato-cromógeno. Nesse sistema de detecção, a reação antígeno-anticorpo é visualizada na cor marrom. As reações de IHQ realizada neste estudo, onde se utilizou esse sistema de detecção será denominada a partir de então, como IHQ-POD. Já o sistema *Bond Polymer Refine Red Detection* (Leica Microsystems, Newcastle, UK), emprega anticorpos conjugados à fosfatase alcalina contendo solução *Fast Red* como substrato-cromógeno. Neste sistema de detecção a reação antígeno-anticorpo é visualizada na cor vermelho. As reações de IHQ realizadas neste estudo, que utilizaram esse sistema de detecção serão denominadas a partir de então, como IHQ-FA.

A partir dos resultados de imunorreatividade, foi realizada a padronização da reação de IHQ usando o AcMo anti-mTXNPx, com material proveniente de lesões de hamsters infectados com *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. guyanensis* e de fragmentos de lesão de três pacientes

com diagnóstico de LC, confirmado por meio do exame parasitológico direto, cultura e histopatológico. A partir do protocolo inicial padrão, foram alterados parâmetros relevantes, como: método de recuperação antigênica, diluição do anticorpo, tempo de bloqueio e tempo de incubação com substrato/cromógeno. Na Tabela 3 encontra-se descrita a sequência dos parâmetros avaliados para padronização da técnica de IHQ, empregando o AcMo anti-mTXNPx até o protocolo final utilizado na validação.

**Tabela 3** Etapas da padronização da técnica de imuno-histoquímica, empregando o anticorpo monoclonal anti- mTXNPx.

	Passos da IHQ	Protocolo Padrão	Teste 1	Teste 2	Teste 3	Protocolo Final
<b>IHQ-POD<sup>1</sup></b>	<b>Fixação</b>	56°C por 18 horas	56°C por 18 horas	56°C por 18 horas	56°C por 18 horas	56°C por 18 horas
	<b>Desparafinização</b>	Xilol: 2x 20'	Xilol: 2x 20'	Xilol: 2x 20'	Xilol: 2x 20'	<b>Xilol: 2x 20'</b>
	<b>Reidratação</b>	Etanol: 3x 5' / Água corrente 3'	Etanol: 3x 5' / Água corrente 3'	Etanol: 3x 5' / Água corrente 3'	Etanol: 3x 5' / Água corrente 3'	<b>Etanol: 3x 5' / Água corrente 3'</b>
	<b>Recuperação antigênica</b>	Citrato de sódio 10 mmol/L pH 6 (30' vaporizador)	Tampão Tris/EDTA pH 9 (30' vaporizador)	Citrato de sódio 10 mmol/L pH 6 (30' vaporizador)	Citrato de sódio 10 mmol/L pH 6 (30' vaporizador)	<b>Citrato de sódio 10 mmol/L pH 6 (30' vaporizador)</b>
	<b>Bloqueio da Peroxidase</b>	10'	10'	20' / 40'	20'	<b>20'</b>
	<b>Bloqueio de Proteína</b>	10'	10'	40' / 60'	40'	<b>40'</b>
	<b>Diluição do anticorpo</b>	1:100; 1:300; 1:500; 1:1000	1:100; 1:300; 1:500; 1:1000	1:300	1:300	<b>1:300</b>
	<b>Anticorpo pós primário (min)</b>	30'	30'	30'	30'	<b>30'</b>
	<b>Polímero (min)</b>	30'	30'	30'	30'	<b>30'</b>
<b>Substrato/Cromógeno (min)</b>	50''	50''	50''	15''; 30''; 50''	<b>30''</b>	
<b>IHQ-FA<sup>2</sup></b>	<b>Fixação</b>	56°C por 18 horas	56°C por 18 horas	56°C por 18 horas	56°C por 18 horas	56°C por 18 horas
	<b>Desparafinização</b>	Solução Trilogy <sup>3</sup> (20' vaporizador)	Xilol: 2x 20'	Solução Trilogy <sup>3</sup> (20' vaporizador)	Solução Trilogy <sup>3</sup> (20' vaporizador)	Solução Trilogy <sup>3</sup> (20' vaporizador)
	<b>Reidratação</b>		Etanol: 3x 5' / Água corrente 3'			
	<b>Recuperação antigênica</b>		Citrato de sódio 10 mmol/L pH 6 (30' vaporizador)			
	<b>Bloqueio de Proteína</b>	30'	30'	30'	30'	<b>30'</b>
	<b>Diluição do anticorpo</b>	1:100; 1:300; 1:500; 1:1000	1:100; 1:300; 1:500; 1:1000	1:500	1:500	<b>1:500</b>
	<b>Anticorpo pós primário (min)</b>	30'	30'	30'	30'	<b>30'</b>
	<b>Polímero (min)</b>	30'	30'	30'	30'	<b>30'</b>
	<b>Substrato/Cromógeno (min)</b>	A(1:5); B(1:25); C (1:25) diluído em D por 3'	A(1:5); B(1:25); C (1:25) diluído em D por 3'	A(1:5); B(1:25); C (1:25) diluído em D por 3' / A(1:10); B(1:50); C (1:50) diluído em D por 3'	A(1:10); B(1:50); C (1:50) diluído em D por 3' / A(1:20); B(1:100); C (1:100) diluído em D por 3'	<b>A(1:10); B(1:50); C (1:50)</b> diluído em D por 3'

Legenda: Após a etapa de recuperação do antígeno as reações foram lavadas três vezes em solução de Tris (5mmol/L Tris; 140mM NaCl; pH 7,6) e entre cada uma das etapas subsequentes. Fonte: elaborado pelo autor

Os protocolos finais utilizados encontram-se detalhadamente descritos a seguir:

**a) Técnica de Imuno-histoquímica realizada com sistemas de detecção compostos por polímeros conjugados a peroxidase (IHQ-POD)**

Após a montagem das lâminas, foi realizado a desparafinização do material biológico, e para isso, as lâminas foram mantidas em estufa a 56°C por 16 horas e, em seguida, foram incubadas em xilol por 20 min. Posteriormente, as lâminas foram lavadas três vezes com álcool 100% e com água corrente por 3 min, para hidratação dos tecidos. As lâminas foram incubadas por 30 min em vaporizador a 96°C em solução de ácido cítrico 10mM (pH 6,0) e resfriadas por 20 min, em temperatura ambiente. Logo após as lâminas foram lavadas três vezes com tampão Tris (5mM Tris base; 140mM NaCl; pH 7,6). Os cortes foram delimitados com caneta hidrofóbica (PAP pen, Zymed, São Francisco, CA, EUA) e cada corte histológico foi incubado com 100 µL de *Peroxidase Block*, por 20 min em temperatura ambiente. Após novas lavagens, foram adicionados 100 µL de *Protein Block* em cada corte contido na lâmina, que foi incubada por 40 min, em temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram novamente lavadas, conforme descrito anteriormente, e foram adicionados sobre os cortes 100 µL do AcMo anti-peroxidoxin diluído 1:300 em solução diluente (1% BSA e 0,05% de azida sódica em PBS), incubando-se por 1 hora, em temperatura ambiente. Seguida de outra série de lavagem, 100 µL do reagente *Post Primary* foram adicionados em cada corte e a lâmina foi incubada por 30 min, em temperatura ambiente. A lâmina foi lavada novamente, e 100 µL do Polímero (*Novolink™ Polymer*) foram adicionados em cada corte, incubando-se por 30 min, em temperatura ambiente. Após repetição do procedimento de lavagem, foi adicionado sobre a lâmina o substrato/cromógeno na diluição de 1:100 do *DAB Chromogen* em *Novolink™ DAB Substrate Buffer*, que foi incubada por 30s, em temperatura ambiente. Logo após, a lâmina foi lavada com tampão Tris e corada com *Hematoxylin* por 2 min. Finalmente, as lâminas foram lavadas com água corrente por 3 min, imersas cinco vezes em álcool 100%, secas em estufa a 56°C e montadas com lamínula e Entellan® (Merck).

**b) Técnica de Imuno-histoquímica realizada com sistemas de detecção compostos por polímeros conjugados fosfatase alcalina (IHQ-FA)**

Após a montagem, as lâminas foram mantidas em estufa a 56°C por 16 horas, foram incubadas com solução Trilogy (Cell Marque, Rocklin, CA, United States) diluído 1:100 por 30 min em vaporizador a 96°C e, em seguida, foram resfriadas por 45 min, em temperatura ambiente imersa em outra solução de Trilogy diluído 1:100. Logo após, as lâminas foram

lavadas três vezes com tampão Tris. Os cortes foram delimitados com caneta hidrofóbica (PAP pen) e cada corte histológico foi incubado com 100 µL de PBS-T<sub>20</sub>-leite 5%, por 30 min em temperatura ambiente. Após novas lavagens, foram adicionados sobre os cortes 100 µL do AcMo anti-peroxidoxin diluído 1:500 em solução diluente, incubando-se por 1 hora, em temperatura ambiente. Seguida de outra serie de lavagem, 100 µL do reagente *Post Primary AP* foram adicionados em cada corte e a lâmina foi incubada por 30 min, em temperatura ambiente. A lâmina foi lavada novamente, e 100 µL do Polímero (*Polymer AP*) foram adicionados em cada corte, incubando-se por 30 min, em temperatura ambiente. Após repetição do procedimento de lavagem, foi adicionado sobre a lâmina o substrato/cromógeno na proporção de 1:10 do *RED part A*, 1:50 do *RED part B*, 1:50 do *RED part C* diluídos em *RED part D*, que foi incubado por 3 min, em temperatura ambiente. Logo após, a lâmina foi lavada com tampão Tris e corada com *Hematoxylin* por 2 min. Finalmente, as lâminas foram lavadas com água corrente por 3 min, imersas cinco vezes em álcool 100%, secas em estufa a 56°C e montadas com lamínula e Entellan® (Merck).

Para ambos os protocolos, as lâminas foram examinadas em microscópio Zeiss (Hallbergmoos, Alemanha) em ampliações de 100x, 400x e 1000x, analisando a presença das marcações das formas amastigotas, coloração de fundo e reações inespecíficas.

#### **4.5.3 Estudo de validação da técnica de imuno-histoquímica empregando anticorpo monoclonal anti-mTXNPx**

A validação da técnica de IHQ foi realizada, empregando o AcMo anti-mTXNPx, utilizando protocolo final padronizado para os dois sistemas de detecção (IHQ-POD e IHQ-FA).

##### **4.5.3.1 Aspectos éticos**

Esse estudo foi conduzido seguindo as normas de pesquisas envolvendo seres humanos contidas na Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde, para salvaguardar os direitos e o bem-estar dos participantes e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do IRR/FIOCRUZ, através do CAEE 56188716.5.0000.5091 (parecer 1.598.850) e da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) através do CAEE 14887414.0.0000.5149.

##### **4.5.3.2 Cálculo amostral**

De acordo com FLAHAULT, CADILHAC & THOMAS (2005), considerando como premissa a prevalência de 57,8% de infecção por *Leishmania* sp. no Centro de Referência em

Leishmaniose (CRL) IRR/FIOCRUZ em 2019, limite de confiança de 0,75 e especificidade esperada de 95%, foi estimada a amostra mínima necessária de 34 controles e 47 casos para validação da técnica de IHQ.

#### 4.5.3.3 Participantes do estudo

No total, foram incluídos 86 pacientes com suspeita de LC atendidos no CRL (IRR/FIOCRUZ) e na Clínica de Dermatologia Osvaldo Costa do Hospital das Clínicas (CDOC-HC) da UFMG. Deste total, 49 pacientes preenchem o critério de definição de caso, definido a partir detecção molecular de *Leishmania* sp. através da qPCR. Estes pacientes apresentavam também, resultados de exame direto e cultura de *Leishmania* sp. realizados como diagnóstico de rotina no CRL (IRR/FIOCRUZ). No grupo não caso, foram incluídos 37 indivíduos portadores de outra doença infecciosa como esporotricose, paracoccidiodomicose, micobacteriose e dermatite. Todas as amostras foram anonimizadas de modo que os pesquisadores, diretamente envolvidos na realização da técnica de IHQ, desconheciam o diagnóstico dos participantes.

#### 4.5.3.4 Coleta e processamento das amostras

A biópsia das lesões dos participantes, com suspeita de LC, foi realizada por profissional médico, de acordo com o procedimento de rotina de cada instituição. Após assepsia e anestesia, o fragmento de tecido foi coletado na borda da lesão utilizando instrumento cirúrgico cortante circular (*punch*) de três milímetros de diâmetro. Para os pacientes atendidos no CRL (IRR/FIOCRUZ), parte do material obtido da biópsia foi destinada para confecção de lâminas para exame parasitológico direto e, em seguida, congelado para realização da PCR. A segunda parte do fragmento da lesão foi armazenada em formaldeído 10% tamponado (pH 7,2). Já a cultura *in vitro* foi realizada a partir de material biológico obtido através do aspirado intradérmico da lesão. Para os pacientes atendidos no CDOC (HC/UFMG), após a biópsia e secção do fragmento, uma das partes foi destinada para cultura específica do agente patogênico suspeito e a outra foi armazenada em formaldeído 10% tamponado (pH 7,2), por período mínimo de 24 horas.

Os fragmentos de pele armazenados em formaldeído foram acondicionados em cassette histológico e então submetidos ao processamento usando o Processador Automático de Tecidos PT05 (Lupetec, São Paulo, SP, Brasil). Durante esse procedimento, os fragmentos de tecidos passaram por doze etapas com duração de 1 hora cada, compostas por: duas soluções de formaldeído 10%; etanol 70%; duas soluções de etanol 95%; etanol 99,5%; acetato de butila;

três etapas de xilol PA; 2 soluções de parafina a 56°C. Após o processamento, os fragmentos de tecido foram incluídos em blocos de parafina e com auxílio de micrótomo, cortes histológicos com 4 µm de espessura foram obtidos e dispostos em lâminas silanizadas carregadas positivamente (ImmunoSlides - EasyPath, São Paulo, SP, Brasil) para realização da IHQ e dispostos em lâminas foscas lapidadas (Global Glass, Guarulhos, SP, Brasil) para realização do HE.

#### 4.5.3.5 Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR)

O DNA dos fragmentos de biópsia de pele dos pacientes foi extraído utilizando o conjunto de reagentes Wizard® SV Genomic DNA Purification System (Promega), de acordo com as instruções do fabricante.

A qPCR foi utilizada para detectar e quantificar o DNA de *Leishmania* sp. presente nas amostras dos pacientes, utilizando o sistema de detecção com intercalantes não específicos SYBR Green. A amplificação foi realizada no aparelho *Step One Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), utilizando os iniciadores descritos por DEGRAVE et al. (1994) e PASSOS et al. (1996) para a amplificação de um fragmento de 120 pb de região conservada do kDNA de *Leishmania* sp. As reações foram preparadas em microplacas (MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate, Thermo Fisher Scientific) adicionando 12,5 µL de SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA); 0,3 pmoles de cada iniciador; 5,0 µL de DNA a 10 ng/µL e 6 µL de água estéril para completar o volume final de 25 µL. A amplificação foi realizada com uma etapa inicial de desnaturação a 95°C por 10 min; seguido de 30 ciclos de 95°C por 15 s e 60°C por 1 min. Após a amplificação a análise de dissociação foi realizada em um ciclo adicional com aumento da temperatura de 60°C a 95°C a uma taxa de 0,3°C por segundo, com aquisição de fluorescência contínua. Controles negativos da reação (reagentes da PCR sem DNA) e da extração de DNA (reagentes da extração sem o material biológico) foram incluídos em cada ensaio. A curva padrão foi construída através de diluições seriadas de DNA de *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), partindo da concentração de 1 ng até 1x10<sup>-6</sup> ng (fator de diluição 1:10).

Para o cálculo da carga parasitária foram considerados 83,15 fg de DNA de *Leishmania* como equivalente a um parasito (JARA et al., 2013). O seguinte cálculo foi considerado: (equivalentes de DNA do parasita por reação / quantidade de DNA de tecido por reação) × 10<sup>3</sup>, expresso como o número de parasitos *Leishmania* por µg de DNA de tecido (SEVILHA-SANTOS et al., 2019; SUÁREZ et al., 2015).

#### 4.5.3.6 Exame histopatológico

Os cortes histológicos dispostos em lâminas foscas lapidadas, foram desparafinados em xilol por 10 min, e incubados em três soluções de álcool etílico PA, por 5 min cada e então, foram hidratados em água corrente por 5 min. Em seguida, os cortes foram corados com hematoxilina por 5 min, novamente lavados em água corrente por 5 min e posteriormente corados com eosina por 15 s, sendo por fim banhados em água corrente e desidratados em duas soluções de álcool etílico PA, por 5 min cada. As lâminas foram montadas com lamínulas utilizando o meio de montagem Entellan<sup>®</sup> (Merck, Darmstadt, Alemanha) e examinadas em microscópio Zeiss (Hallbergmoos, Alemanha) em ampliações de 400x e 1000x, analisando a presença de formas amastigotas.

#### 4.5.3.7 Análise de dados

Os parâmetros sensibilidade, especificidade acurácia diagnóstica e seus intervalos de 95% de confiança foram calculados através da tabela de contingência 2x2, usando Open-Epi (DEAN, SULLIVAN & SOE, 2015). Esses parâmetros foram comparados usando o teste Qui-quadrado, através do MedCalc versão 15.0 para Windows (MedCalc Software, Ostend, Bélgica).

Utilizando o Minitab 17 (State College, Pennsylvania, EUA), foi realizada análise de regressão logística binária para avaliar modelo de influencia das seguintes variáveis predictoras: sexo, idade, número de lesões, tempo de evolução da lesão e carga parasitária, no resultado ou positividade dos testes. A partir de um modelo inicial com todas as variáveis, foi utilizado o método stepwise: forward para selecionar preditores significativos, com base no valor de  $P < 0,25$ . Entre as variáveis selecionadas, o modelo contendo os preditores tempo de evolução da doença e carga parasitária foi significativo e possibilitou o cálculo das razões de chance e seus intervalos de confiança de 95%.

A relação do tempo de evolução da lesão e da carga parasitária, com a positividade dos testes, foi também analisada através do GraphPad Prism 6.0 (Prism Software, Irvine, CA, USA). A normalidade dos dados foi verificada através do teste Kolmogorov-Smirnov e então realizada análise de variância (ANOVA one-way) seguida do teste de Tukey, para comparação entre as cargas parasitárias e o teste Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn, para comparação entre o tempo de evolução da lesão.

As imagens dos cortes histológicos que ilustram este trabalho, foram obtidas através do microscópio automatizado Leica DM5000B.

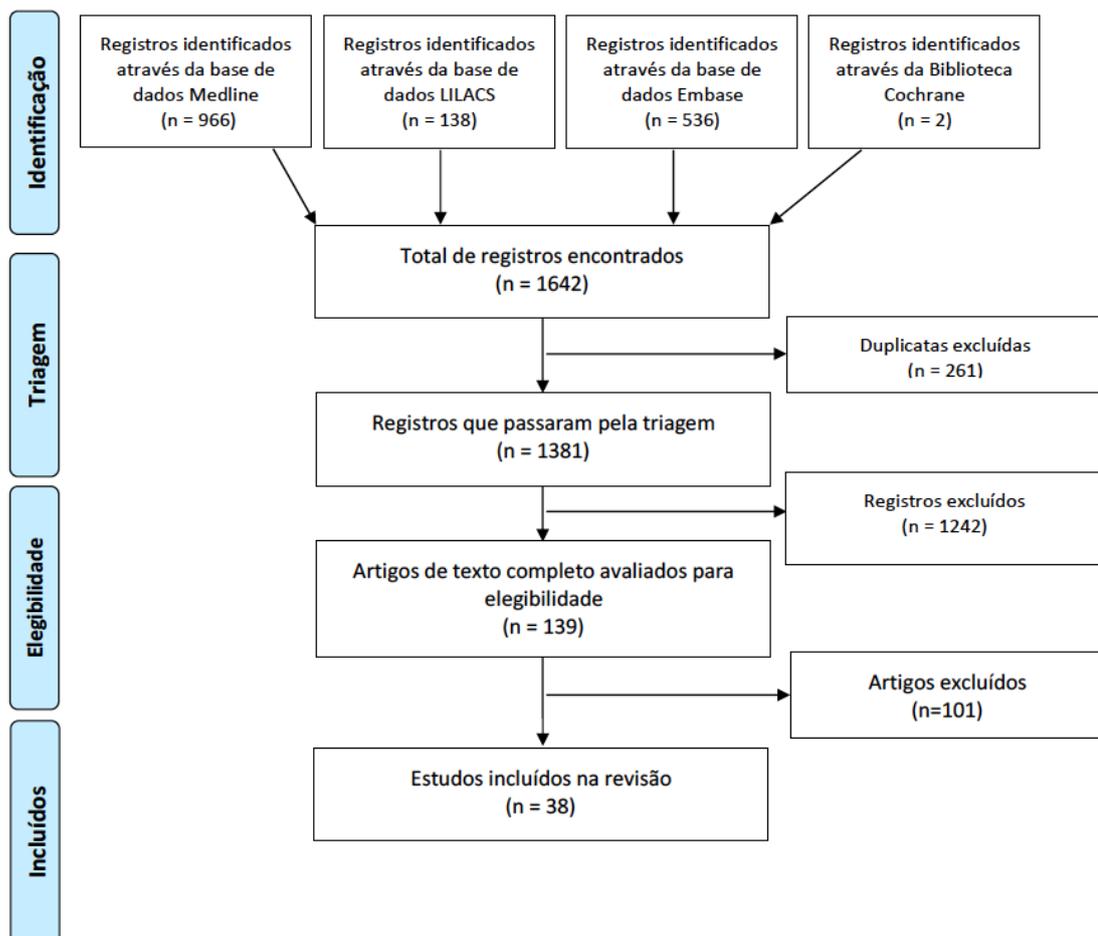
## 5. RESULTADOS

### 5.1 Revisão Sistemática para identificação de potenciais alvos antigênicos

#### 5.1.1 Busca na literatura científica

No total, 1.642 artigos provenientes de quatro bases de dados foram identificados, sendo excluídos 261 artigos que estavam em duplicatas. O título e o resumo dos 1.381 artigos remanescentes foram analisados, sendo selecionados 139 artigos para a leitura na íntegra. Critérios de exclusão estavam presentes em 101 artigos, de modo que 38 artigos foram por fim incluídos (Figura 4).

**Figura 4** Diagrama de fluxo ilustrando o processo de seleção de estudos de acordo com PRISMA.



Fonte: elaborado pelo autor

### 5.1.2 Análise descritiva dos estudos incluídos

As características gerais dos estudos incluídos estão apresentadas na Tabela 4. Os testes imunológicos foram avaliados para o diagnóstico da LC, LM e/ou LT. Nos diferentes estudos, foram incluídos entre 18 a 257 pacientes no grupo de casos, já o tamanho amostral do grupo não caso variou de 8 a 261 pacientes. Na maioria dos estudos incluídos (84,2%) foi avaliado o desempenho de ensaio de ELISA empregando diferentes proteínas purificadas ou recombinantes e peptídeos sintéticos, para detecção de anticorpos específicos anti-*Leishmania*. Já a detecção de antígenos do parasito, foi avaliada por teste rápido ou IHQ, utilizando anticorpos monoclonais. Os padrões de referência utilizados também foram diversos, sendo utilizada associação de testes em pelo menos 22 estudos incluídos. Em trinta e um estudos (81,6%), pelo menos um método parasitológico foi considerado como teste referência, como exame direto ou cultura. Nos sete estudos remanescentes (18,4%), diferentes testes imunológicos ou moleculares foram considerados padrão de referência. Em relação à fase de desenvolvimento dos testes avaliados, 89,5% dos estudos (34 de 38) foram classificados como de estudo de fase I (prova de conceito) e os 10,5% restantes (4 de 38) foram classificados como de estudo de fase III.

**Tabela 4** Características dos estudos incluídos na revisão sistemática.

Referência	País / Origem das amostras	Casos (n)	Não-casos (n)	Teste padrão de referência	Metodologia	Alvo proteico	Tipo	Forma clínica	Fase do estudo
BENNIS et al. (2018)	Marrocos	136	83	Exame direto e/ou PCR	Teste rápido	Peroxidoxina	AcPo	LC	III
CARMELO et al. (2002)	Peru	24	44	Exame direto e cultura	ELISA	H1 e 7 peptídeos	PR / PS	LC	I
CARVALHO et al. (2017)	Brasil	57	55	Exame direto e PCR	ELISA	PH (XP_001469551.1)	PR	LT	I
CELESTE et al. (2004)	Brasil	26	20	IRDM e/ou histopatologia e RIFI	ELISA	HSP83	PR	LC e LM	I
CELESTE et al. (2014)	Brasil	26	109	Exame direto e teste imunológico	ELISA	HSP83	PR	LC e LM	I
COELHO et al. (2016)	Brasil	24	28	Exame direto e PCR	ELISA	Citocromo c oxidase e Fator de liberação de histamina de IgE	PR	LT	I
COSTA et al. (2016)	Brazil	50	10	Exame direto e PCR	ELISA	A10, C11, C12 B10, B7 e H7	PS	LT	I
DE SILVA et al. (2017)	Sri Lanka	59	22	PCR	Teste rápido	Peroxidoxina	AcPo	LC	III
DUARTE et al. (2015)	Brasil	43	40	Exame direto, PCR e IRDM	ELISA	Enolase; fator de iniciação eucariótica 5a; PH (LbrM.30.3350); triparedoxina peroxidase e $\beta$ -tubulina	PR	LT	I
GOMES-SILVA et al. (2008)	Brasil	58	171	Exame direto e teste imunológico	ELISA	Fração ligada a Concanavalina-A e Jacalina	PP	LT	I
CARMELO et al. (2002)	Peru	20	19	Exame direto e cultura	ELISA	23085, 23089 e 23083	PS	LT	I
JENSEN et al. (1996)	Sudão	33	88	Exame direto e histopatológico	ELISA	GPB e Gp63	PS / PP	LC	I
KENNER et al. (1999)	América Central	41	20	Cultura	IHQ	G2D10	AcMo	LC	I
LAGE et al. (2019)	Brasil	50	75	Exame direto e PCR	ELISA	A2 e PH (XP_003886492.1)	PR	LT	I
LIMA et al. (2017b)	Brasil	45	50	Exame direto, PCR e IRDM	ELISA	PH (XP_001566959.1)	PR	LT, LC e LM	I
LIMA et al., (2018)	Brasil	40	143	Exame direto e PCR	ELISA	Enolase; fator de iniciação eucariótica 5a; PH (XP_001566959.1) e $\beta$ -tubulina	PR	LT	I
LINK et al. (2017)	Brasil	57	30	ELISA	ELISA	P1 e MIX (P1 + P2 + P3)	PS	LC	I
LONGONI et al. (2014)	Colômbia	51	10	Exame direto	ELISA	Ferro-superóxido dismutase	PP	LC	I
MARIN et al. (2009)	Espanha	113	32	Exame direto	ELISA	Ferro-superóxido dismutase	PP	LC e LM	I
MENEZES-SOUZA et al. (2014a)	Brasil	65	70	Exame direto e PCR	ELISA	Peroxidoxina	PR	LT, LC e LM	I
MENEZES-SOUZA et al. (2014b)	Brasil	65	70	Exame direto e PCR	ELISA	HSP83 e 3 peptídeos	PR/PS	LT, LC e LM	I
MENEZES-SOUZA et al. (2015a)	Brasil	65	70	Exame direto e PCR	ELISA	MAPK3 e MAPK4	PR / PS	LT	I

MENEZES-SOUZA et al. (2015b)	Brasil	65	70	Exame direto e PCR	ELISA	Catepsina L-like e peptídeo	PR	LT	I
MONTOYA et al. (1997)	Colômbia / Peru	78	39	Teste sorológico	ELISA	T26-U2 e T26-U4	PR	LT	I
PADILLA; MONTOYA, (2003)	Peru	18	8	ELISA	ELISA	Proteínas ribossomais ácidas P2 $\beta$	PR	LT	I
SALLES et al. (2019)	Brasil	40	100	Exame direto e PCR	ELISA	Proteína-3 miristoilada e peptídeo	PR/PS	LT	I
SATO et al. (2017)	Brasil	219	281	Exame direto, PCR e/ou histopatologia	ELISA	LB6H e Lb8E	PR	LT	I
SCHALLIG et al. (2019)	Suriname	79	14	Exame direto e PCR	Teste rápido	Peroxidoxina	AcPo	LC	III
SHIRIAN et al. (2014)	Irã	100	30	Citologia ou histologia e PCR	IHQ	IS2-2B4 (A11) e XLVI-5B8- B3 (T1)	AcMo	LC	I
SKRABA et al. (2014)	Brasil	60	177	Exame direto	ELISA	Mix (36 e 48–56 kDa)	PP	LC	I
SOTO et al. (1996)	Espanha	21	30	Exame direto e RIFI	ELISA	Família de proteínas ribossômicas ácidas (LiP2a-Q e LiP2b-Q)	PR	LM	I
SOUZA et al. (2013)	Brasil	102	180	IRDM, teste imunológico, histopatologia e/ou prova terapêutica	ELISA	H2A; H2B; H3; H4; HSP70; KMP-11	PR	LT, LC e LM	I
DE SOUZA et al. (2018)	Brasil	30	119	Exame direto e cultura	ELISA	NGP 0204; NGP2333; NGP 2334; NGP 2203	PP	LC	I
DE SOUZA et al. (2019)	Brasil	74	63	Exame direto	ELISA	Lbk39	PR	LC	I
VIDIGAL et al. (2008)	Brasil	48	114	Exame direto, IRDM e RIFI	ELISA	Fração 8 - pico 2	PP	LC	I
VINK et al. (2018)	Afganistão	257	17	Exame direto e/ou PCR	Teste rápido	Peroxidoxina	AcPo	LC	III
YEGANEH et al. (2009)	Irã	30	41	Exame direto	ELISA	Ferro-superóxido dismutase-B1	PR	LC	I
ZURITA et al. (2003)	Peru	50	36	Cultura	ELISA	HSP70 e 5 peptídeos	PR	LT, LC e LM	I

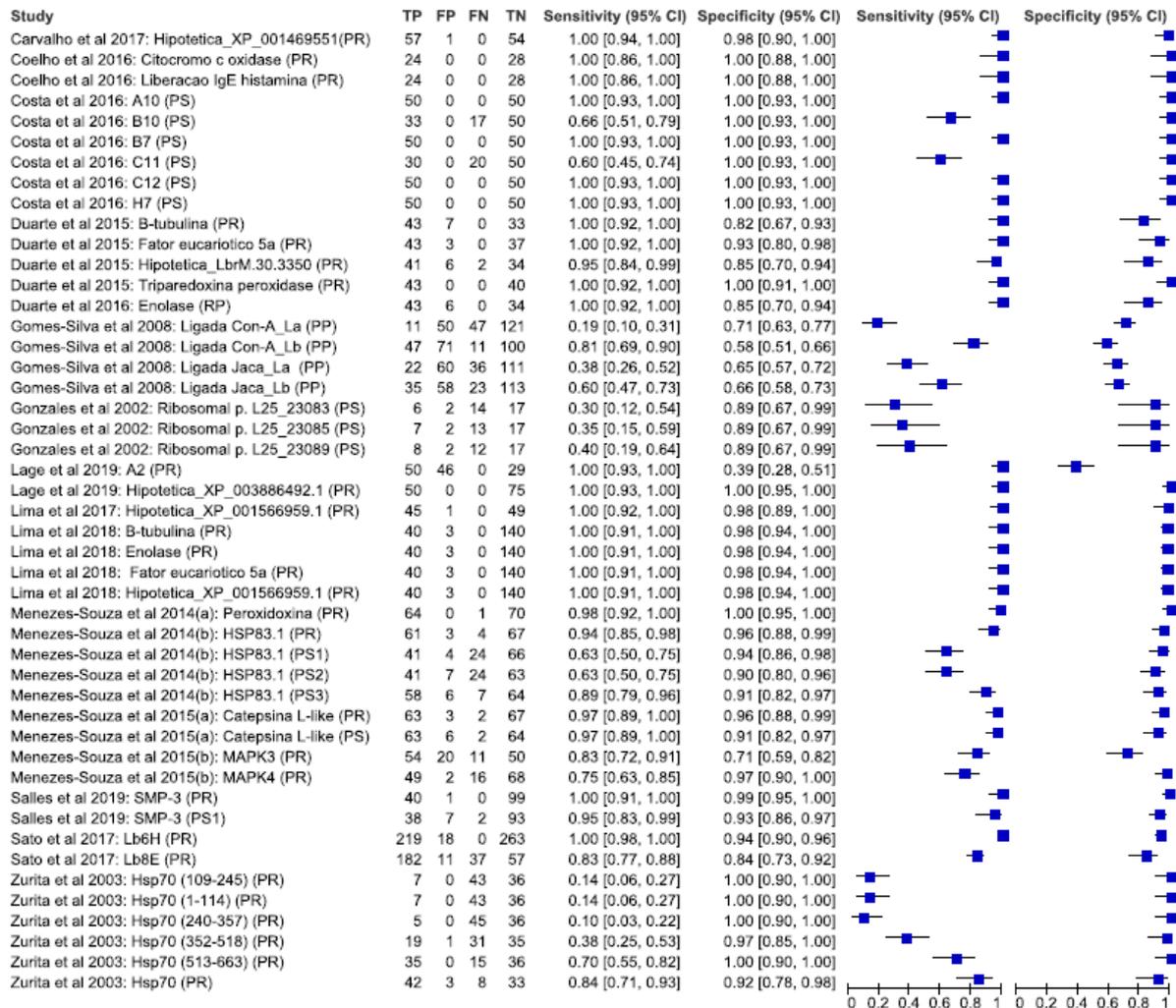
Legenda: LC – Leishmaniose Cutânea; LM – Leishmaniose Mucosa; LT – Leishmaniose Tegumentar; PH – Proteína Hipotética; PR – Proteína Recombinante; PP – Proteína Purificada; PS – Peptídeo Sintético. Fonte: elaborado pelo autor

### 5.1.3 ELISA para diagnóstico de LT

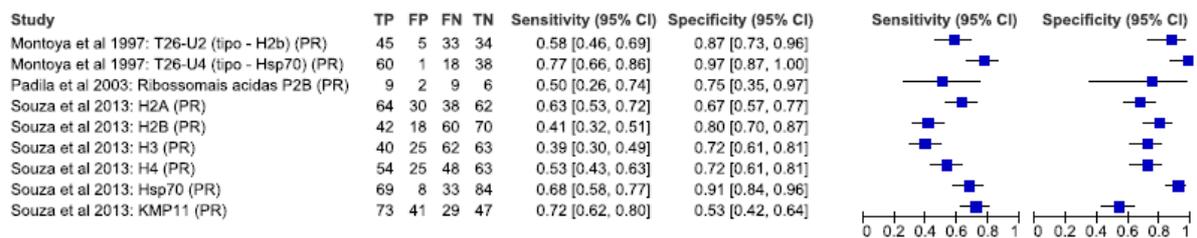
Dezenove estudos avaliaram o desempenho do ensaio de ELISA usando total de 56 antígenos para o diagnóstico de LT, sem distinção da forma clínica (Figura 5). Foram avaliados 38 proteínas recombinantes, 14 peptídeos sintéticos e 4 proteínas purificadas. O número de pacientes com LT variou entre 20 a 219 e o número de pacientes não-casos variou de 8 a 281. Quarenta e sete antígenos (82,1%) foram avaliados em estudos que consideraram pelo menos um método parasitológico como teste padrão de referência. Nestes estudos, o maior desempenho (100% de sensibilidade e especificidade) foi relatado para quatro proteínas recombinantes (citocromo c oxidase; proteína hipotética XP\_003886492.1; fator de liberação de histamina de IgE; triparedoxina peroxidase) e quatro peptídeos sintéticos (A10, B7, C12 e H7) selecionados pela técnica de exibição de fago (COELHO et al., 2016; DUARTE et al., 2015; LAGE et al., 2019; SALDARRIAGA et al., 2016). Outros 14 antígenos (12 proteínas recombinantes e 2 peptídeos sintéticos), apresentaram sensibilidade e especificidade superior a 90% nos trabalhos avaliados. Estudos que consideraram pelo menos um método imunológico como teste padrão de referência, avaliaram 9 antígenos, com sensibilidade variando de 39,8% a 77% e especificidade de 53,4% a 97%.

**Figura 5** Antígenos utilizados nos ensaios imunoenzimático de ELISA para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar.

ELISA para diagnóstico LT - métodos parasitológicos como padrão de referência



ELISA para diagnóstico LT - outros testes como padrão de referência



Legenda: PR – Proteína Recombinante; PP – Proteína Purificada; PS – Peptídeo Sintético; La – *L. amazonensis*; Lb – *L. braziliensis*; Li – *L. infantum*; Lp – *L. peruviana*; Fonte: elaborado pelo autor.

#### **5.1.4 ELISA para diagnóstico de LC**

Em 17 estudos, o desempenho do ensaio de ELISA, usando 44 antígenos, foi avaliado para o diagnóstico de LC, sendo 20 proteínas recombinantes, 13 peptídeos sintéticos e 11 proteínas purificadas (Figura 6). Trinta e cinco (79,5%) antígenos foram avaliados por ensaio de ELISA, em estudos que consideraram pelo menos um método parasitológico como teste padrão de referência. Nestes estudos, o tamanho amostral variou de 12 a 74 para pacientes com LC e para pacientes não-caso de 10 a 177. Nove antígenos (20,5%) foram avaliados em estudos que consideraram pelo menos um teste imunológico como padrão de referência. Nestes estudos, o tamanho amostral variou de 12 a 57 para pacientes com LC e para pacientes não-caso de 20 a 92. Sensibilidade e especificidade de 100% foram reportadas em ensaios de ELISA utilizando rPeroxidoxina e rHSP83 (CELESTE et al., 2004; MENEZES-SOUZA et al., 2014a). Outros estudos também reportaram sensibilidade e especificidade superior a 90% em ensaios de ELISA realizados com rHSP83 (CELESTE et al., 2014; MENEZES-SOUZA et al., 2014b).

**Figura 6** Antígenos utilizados no ensaio imunoenzimático de ELISA para o diagnóstico da leishmaniose cutânea.

**ELISA para diagnóstico LC - métodos parasitológicos como padrão de referência**

Study	TP	FP	FN	TN	Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)	Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)
Carmelo et al 2002: H1_23061 (PS1)	3	0	21	44	0.13 [0.03, 0.32]	1.00 [0.92, 1.00]		
Carmelo et al 2002: H1_23063 (PS2)	0	0	24	44	0.00 [0.00, 0.14]	1.00 [0.92, 1.00]		
Carmelo et al 2002: H1_23065 (PS3)	3	0	21	44	0.13 [0.03, 0.32]	1.00 [0.92, 1.00]		
Carmelo et al 2002: H1_23067 (PS4)	11	4	13	40	0.46 [0.26, 0.67]	0.91 [0.78, 0.97]		
Carmelo et al 2002: H1_23069 (PS5)	5	0	19	44	0.21 [0.07, 0.42]	1.00 [0.92, 1.00]		
Carmelo et al 2002: H1_23071 (PS6)	3	1	21	43	0.13 [0.03, 0.32]	0.98 [0.88, 1.00]		
Carmelo et al 2002: H1_23073 (PS7)	0	0	24	44	0.00 [0.00, 0.14]	1.00 [0.92, 1.00]		
Carmelo et al 2002: H1 (PR)	16	4	8	40	0.67 [0.45, 0.84]	0.91 [0.78, 0.97]		
Celeste et al 2014: HSP83 (PR)	12	2	0	77	1.00 [0.74, 1.00]	0.97 [0.91, 1.00]		
Jensen et al 1996: Gp63 Ld (PP)	17	11	16	45	0.52 [0.34, 0.69]	0.80 [0.68, 0.90]		
Jensen et al 1996: Gp63 Lm (PP)	13	9	20	47	0.39 [0.23, 0.58]	0.84 [0.72, 0.92]		
Jensen et al 1996: GPB (PS)	27	6	6	109	0.82 [0.65, 0.93]	0.95 [0.89, 0.98]		
Lima et al 2017: Hipotetica_XP_001566959.1 (PR)	20	1	0	49	1.00 [0.83, 1.00]	0.98 [0.89, 1.00]		
Longoni et al 2014: Ferro supero. dismutase La(PP)	42	0	9	10	0.82 [0.69, 0.92]	1.00 [0.69, 1.00]		
Longoni et al 2014: Ferro supero. dismutase Lp(PP)	6	0	45	10	0.12 [0.04, 0.24]	1.00 [0.69, 1.00]		
Marin et al 2009: Supero. dismutase (PP)	60	21	8	11	0.88 [0.78, 0.95]	0.34 [0.19, 0.53]		
Menezes-Souza et al 2014(a): Peroxidoxina (PR)	45	0	0	70	1.00 [0.92, 1.00]	1.00 [0.95, 1.00]		
Menezes-Souza et al 2014(b): HSP83.1 (PR)	43	3	2	67	0.96 [0.85, 0.99]	0.96 [0.88, 0.99]		
Menezes-Souza et al 2014(b): HSP83.1 (PS1)	32	4	13	66	0.71 [0.56, 0.84]	0.94 [0.86, 0.98]		
Menezes-Souza et al 2014(b): HSP83.1 (PS2)	29	7	16	63	0.64 [0.49, 0.78]	0.90 [0.80, 0.96]		
Menezes-Souza et al 2014(b): HSP83.1 (PS3)	43	6	2	64	0.96 [0.85, 0.99]	0.91 [0.82, 0.97]		
Skraba et al 2014: 36 kDa e 48 to 56 kDa (PP)	56	55	4	122	0.93 [0.84, 0.98]	0.69 [0.62, 0.76]		
Souza et al 2018: NGP 0204 (PP1)	21	47	9	72	0.70 [0.51, 0.85]	0.61 [0.51, 0.69]		
Souza et al 2018: NGP 2203 (PP2)	28	58	2	61	0.93 [0.78, 0.99]	0.51 [0.42, 0.61]		
Souza et al 2018: NGP 2333 (PP3)	28	42	2	77	0.93 [0.78, 0.99]	0.65 [0.55, 0.73]		
Souza et al 2018: NGP 2334 (PP4)	27	49	3	70	0.90 [0.73, 0.98]	0.59 [0.49, 0.68]		
Souza et al 2019: Lbk39 (PR)	65	1	9	62	0.88 [0.78, 0.94]	0.98 [0.91, 1.00]		
Vidgal et al 2008: Fracao 8 pico 2 (PP)	41	10	7	104	0.85 [0.72, 0.94]	0.91 [0.84, 0.96]		
Yeganeg et al 2009: Supero. dismutase (PR)	16	1	14	40	0.53 [0.34, 0.72]	0.98 [0.87, 1.00]		
Zurita et al 2013: Hsp70 (109 - 245) (PR 3)	1	0	29	36	0.03 [0.00, 0.17]	1.00 [0.90, 1.00]		
Zurita et al 2013: Hsp70 (1 - 114) (PR2)	2	0	28	36	0.07 [0.01, 0.22]	1.00 [0.90, 1.00]		
Zurita et al 2013: Hsp70 (240 - 357) (PR4)	0	0	30	36	0.00 [0.00, 0.12]	1.00 [0.90, 1.00]		
Zurita et al 2013: Hsp70 (352 - 518) (PR5)	9	1	21	35	0.30 [0.15, 0.49]	0.97 [0.85, 1.00]		
Zurita et al 2013: Hsp70 (513 - 663) (RP6)	22	0	8	36	0.73 [0.54, 0.88]	1.00 [0.90, 1.00]		
Zurita et al 2013: Hsp70 (PR1)	25	3	5	33	0.83 [0.65, 0.94]	0.92 [0.78, 0.98]		

**ELISA para diagnóstico LC - outros testes como padrão de referência**

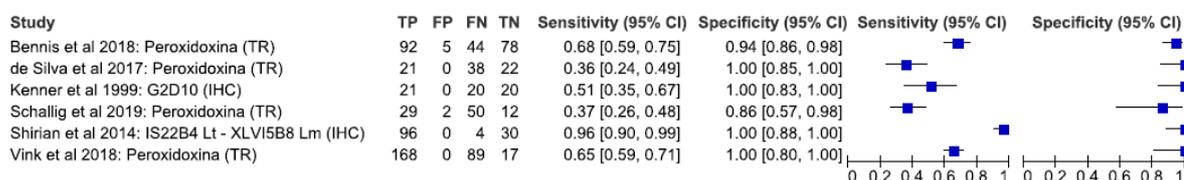
Study	TP	FP	FN	TN	Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)	Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)
Celeste et al 2004: HSP83 (PR)	12	0	0	20	1.00 [0.74, 1.00]	1.00 [0.83, 1.00]		
Link et al 2017: MIX (P1 + P2 + P3) (PS)	45	3	12	27	0.79 [0.66, 0.89]	0.90 [0.73, 0.98]		
Link et al 2017: P1_ tipo Gp63 (PS)	41	4	16	26	0.72 [0.58, 0.83]	0.87 [0.69, 0.96]		
Souza et al 2013: H2A (PR)	34	30	15	62	0.69 [0.55, 0.82]	0.67 [0.57, 0.77]		
Souza et al 2013: H2B (PR)	38	34	11	54	0.78 [0.63, 0.88]	0.61 [0.50, 0.72]		
Souza et al 2013: H3 (PR)	25	39	24	49	0.51 [0.36, 0.66]	0.56 [0.45, 0.66]		
Souza et al 2013: H4 (PR)	30	40	19	48	0.61 [0.46, 0.75]	0.55 [0.44, 0.65]		
Souza et al 2013: HsP70 (PR)	31	12	18	80	0.63 [0.48, 0.77]	0.87 [0.78, 0.93]		
Souza et al 2013: Kmp11 (PR)	27	41	22	47	0.55 [0.40, 0.69]	0.53 [0.42, 0.64]		

Legenda: PR – Proteína Recombinante; PP – Proteína Purificada; PS – Peptídeo Sintético; La – *L. amazonensis*; Lb – *L. braziliensis*; Li – *L. infantum*; Lp – *L. peruvian*. Fonte: elaborado pelo autor.

### 5.1.5 Outros testes imunológicos para diagnóstico de LC

O desempenho do teste rápido *CL Detect*<sup>™</sup> (InBios International Inc., Seattle, WA, EUA), foi avaliado em quatro estudos realizados em diferentes países. A sensibilidade variou entre 35,6 a 67,6% e especificidade foi superior a 80%. Dois estudos avaliaram a IHQ empregando AcMos para detecção de antígenos em biópsia de pele. O melhor desempenho foi relatado para o AcMo IS22B4 / XLVI5B8, com 96% e 100% de sensibilidade e especificidade, respectivamente (SHIRIAN et al., 2014) (Figura 7).

**Figura 7** Antígenos utilizados em outros testes imunológicos para diagnóstico da leishmaniose cutânea.



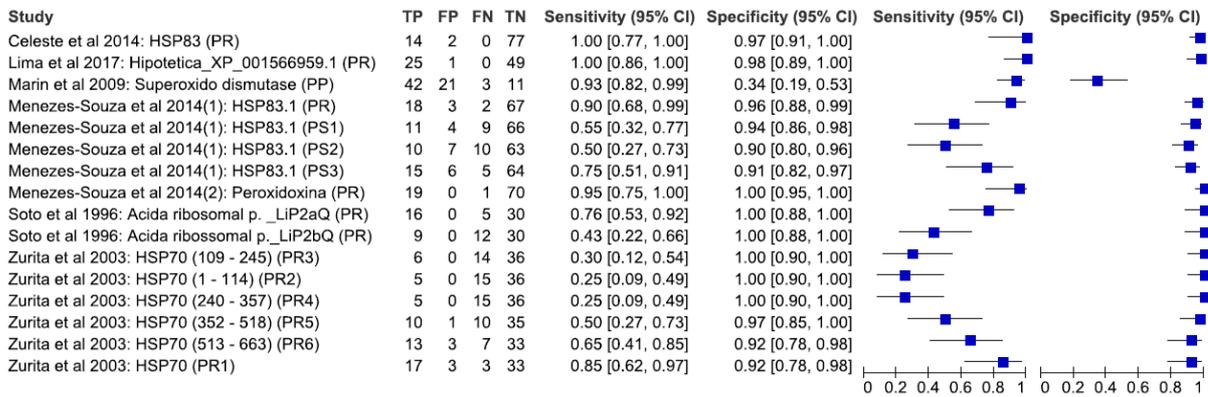
Legenda: Lt – *Leishmania tropica*; Lm – *Leishmania major*; Lg – *Leishmania gerbilli*; TR – Teste rápido; IHC – Imuno-histoquímica. Fonte: elaborado pelo autor.

### 5.1.6 ELISA para diagnóstico de LM

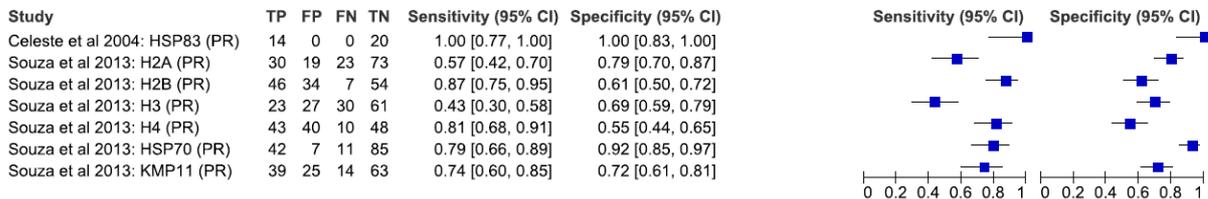
Em nove estudos, foi avaliado o desempenho do ensaio de ELISA utilizando 23 antígenos para o diagnóstico de LM, compreendendo 19 proteínas recombinantes, três peptídeos sintéticos e uma proteína purificada (Figura 8). Dezesesseis antígenos foram avaliados por ensaio de ELISA, em estudos que consideraram pelo menos um método parasitológico como teste padrão de referência. Nestes estudos, o tamanho amostral variou de 14 a 45 para pacientes com LM e para pacientes não-caso de 30 a 79. Sete antígenos foram avaliados em estudos que consideraram pelo menos um teste imunológico como padrão de referência. Nestes estudos, o tamanho amostral variou de 14 a 53 para pacientes com LM e para pacientes não-caso de 20 a 92. O melhor desempenho (100% de sensibilidade e especificidade), também foi observado para a rHSP83 (CELESTE et al., 2004). Elevada sensibilidade e especificidade também foram reportados em ensaios de ELISA empregando outros antígenos, como proteína hipotética XP\_001467126.1, com 100% e 98% de sensibilidade e especificidade, respectivamente (LIMA et al., 2017), seguida pelo HSP83 com 100% e 97,5% (CELESTE et al., 2014) e peroxidoxina com 95% e 100%, respectivamente (MENEZES-SOUZA et al., 2014a).

**Figura 8** Antígenos utilizados no ensaio imunoenzimático de ELISA para o diagnóstico da leishmaniose mucosa.

ELISA para diagnóstico LM - métodos parasitológicos como padrão de referência



ELISA para diagnóstico LM - outros testes como padrão de referência

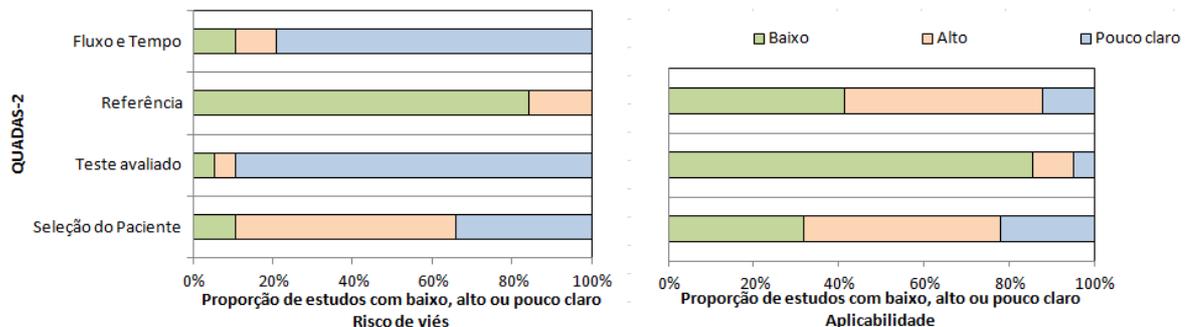


Legenda: PR – Proteína Recombinante; PP – Proteína Purificada; PS – Peptídeo Sintético; Fonte: elaborado pelo autor.

### 5.1.7 Avaliação do risco de viés

A avaliação do risco de viés e aplicabilidade dos estudos incluídos está apresentada na Figura 9. Dos 38 estudos avaliados, 21 apresentaram alto risco de viés na seleção dos pacientes. O risco não estava claro para o teste avaliado em 34 estudos e para 30 estudos, com relação ao fluxo e tempo. Dezenove estudos mostraram grande preocupação em relação à aplicabilidade dos critérios de seleção de pacientes.

**Figura 9** Risco de viés avaliado pela ferramenta QUADAS-2, de acordo com as diferentes características do estudo.



Fonte: elaborado pelo autor.

## 5.2 Seleção dos antígenos recombinantes

Os resultados de identidade e *e-value* obtidos por meio do alinhamento local das sequências selecionadas, estão demonstrados na tabela 5. Os antígenos selecionados apresentam elevada identidade entre as principais espécies de *Leishmania*, responsáveis pela LT no Brasil e baixa identidade com sequências de *Homo sapiens* e *Mus musculus*.

**Tabela 5** Alinhamento local das sequências polipeptídicas de antígenos de *Leishmania braziliensis*, selecionadas com proteínas de *L. guyanensis*, *L. amazonensis*, *Homo sapiens* e *Mus musculus*.

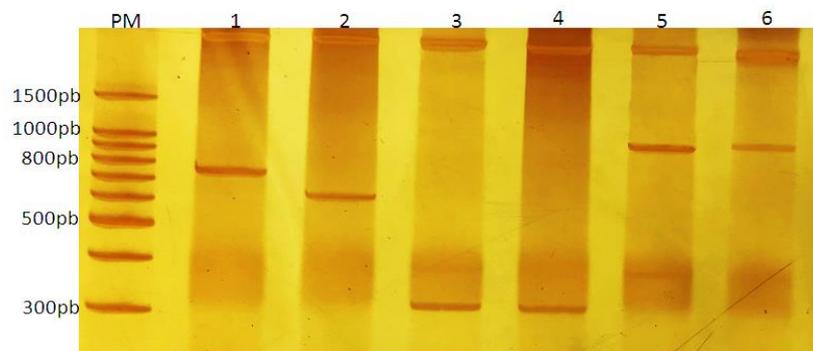
Antígenos	ID	<i>Leishmania guyanensis</i>		<i>Leishmania amazonensis</i>		<i>Homo sapiens</i>		<i>Mus musculus</i>	
		<i>e-value</i>	Ident (%)	<i>e-value</i>	Ident. (%)	<i>e-value</i>	Ident. (%)	<i>e-value</i>	Ident. (%)
mTXNPx	A4HCL7_LEIBR	4e-168	98,2	5e-151	87,1	1e-83	56,0	2e-83	57,7
LACK	A4HGX7_LEIBR	0,0	100,0	0,0	96,79	9e-103	46,9	1e-102	46,9
sAcP	A4HQG9_LEIBR	0,0	98,8	-	-	4e-09	38,61	3e-08	36,6
KMP-11	Q7KQ25_LEIBR	2e-60	100,0	1e-57	94,6	-	-	-	-
LbPH	A4HIR9_LEIBR	0,0	99,2	-	-	3e-31	33,7	4e-29	32,59
MAPK4	A4HA94_LEIBR	0,0	99,7	-	-	7e-94	43,9	3e-93	44,4

Fonte: elaborado pelo autor.

## 5.2 Produção dos antígenos recombinantes

A transformação das bactérias de expressão com cada uma das construções foi confirmada após a extração dos plasmídeos e restrição enzimática com as enzimas *Bam*HI e *Hind*III e está apresentada na Figura 10. No gel de poliacrilamida 6%, é possível verificar a presença dos fragmentos de DNA que correspondem à região codificadora de cada antígeno, com tamanho próximo ao esperado, sendo para mTXNPx 678 pb, LACK 630 pb; sAcP 309 pb; KMP-11 276 pb; LbPH 1074 pb e MAPK4 1089 pb. Em todas as construções analisadas verificamos a presença de um fragmento de aproximadamente 5344 pb, referente ao plasmídeo pET28a.

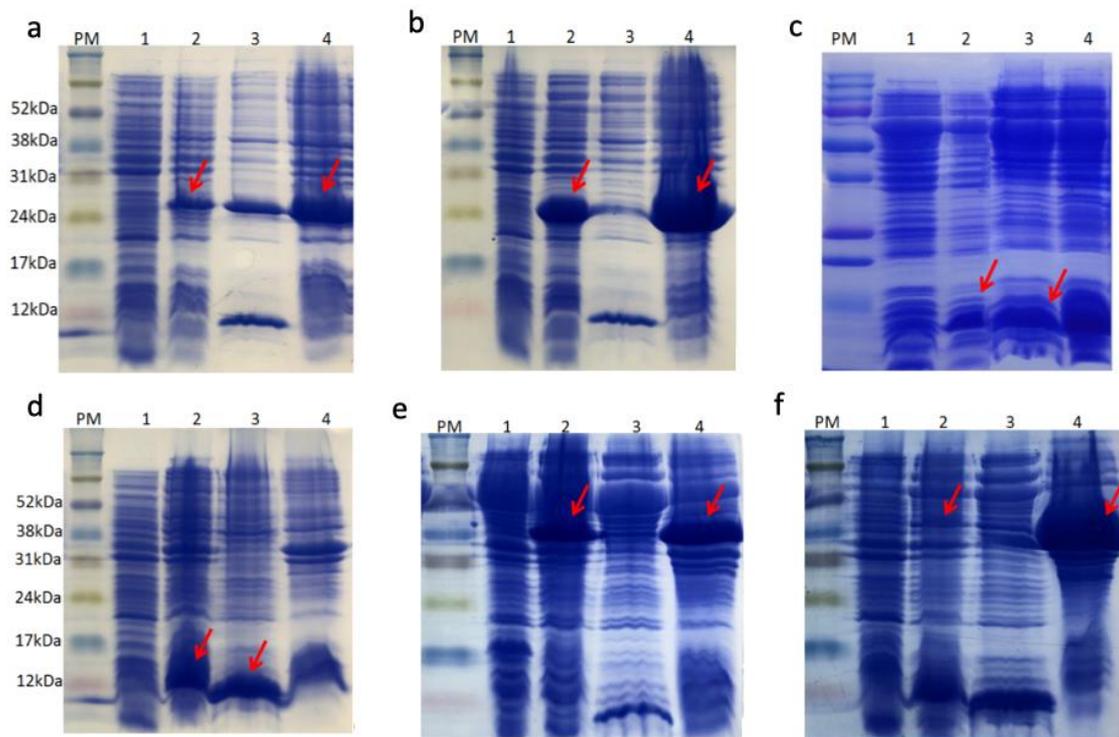
**Figura 10** Gel de poliacrilamida 6%, corado com nitrato de prata 0,2%, apresentando os perfis de restrição das construções clivadas com as enzimas *Bam*HI e *Hind*III



Legenda: (PM) padrão de pares de base; (1) pET28a-mTXNPx; (2) pET28a-LACK; (3) pET28a-sAcP; (4) pET28a-KMP-11; (5) pET28a-LbPH e (6) pET28a-MAPK4. Fonte: elaborado pelo autor.

Após o estabelecimento das condições ideais de expressão para produção de cada antígeno recombinante, foi realizado o teste de solubilidade. O perfil eletroforético do lisado bacteriano, antes e após a indução com IPTG e as frações solúveis e insolúveis, obtidas após o processo de lise e desnaturação estão apresentadas na Figura 11. A mTXNPx está presente nas frações solúvel e insolúvel. Apesar da presença do antígeno na forma solúvel, optou-se pela purificação da fração insolúvel, a fim de obter um maior rendimento. Os antígenos LACK, LbPH e MAPK4 (Figura 11b, e, f) foram também purificados a partir da fração insolúvel. Já a sAcP e KMP-11 foram purificados a partir da fração solúvel.

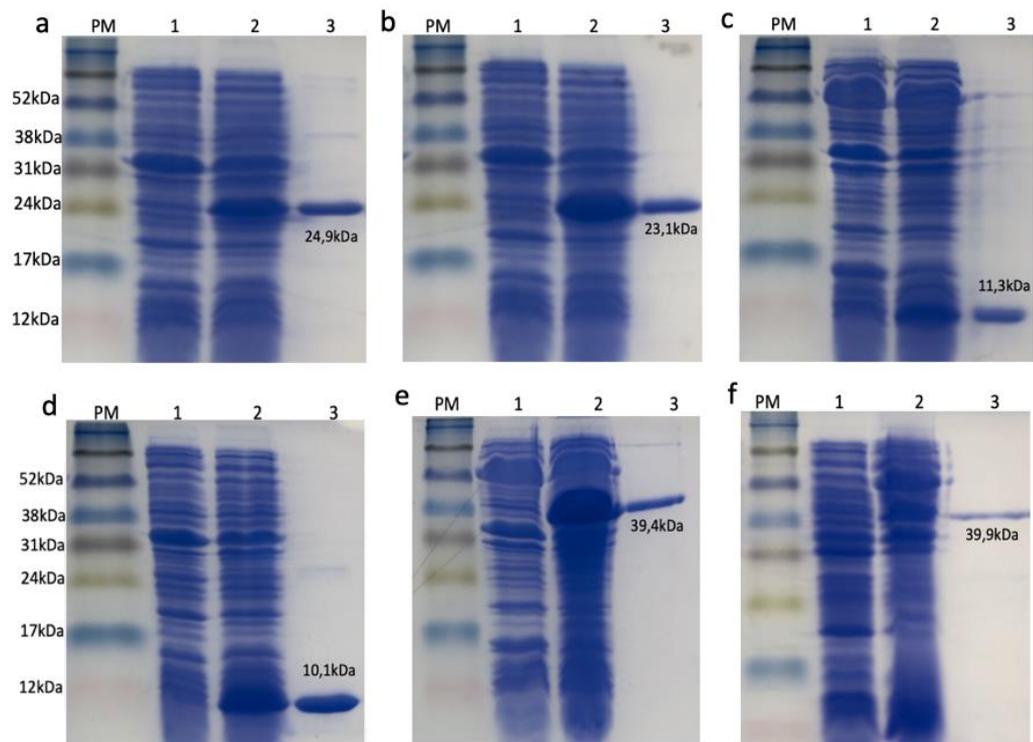
**Figura 11** Gel de poliacrilamida 15% corado com azul de Coomassie, demonstrando a solubilidade dos antígenos recombinantes



Legenda: (a) mTXNPx; (b) LACK; (c) sAcP; (d) KMP-11; (e) LbPH; (f) MAPK4. Em cada uma das figuras, constam sobretítulos: PM: padrão de peso molecular (GE Healthcare); Linha 1: lisado bacteriano antes da indução com IPTG; Linha 2: lisado bacteriano após indução com IPTG; Linha 3: fração solúvel e Linha 4: fração insolúvel. Setas em vermelho indicam o antígeno expresso no lisado bacteriano, após indução com IPTG e na fração que foi purificada. Fonte: elaborado pelo autor.

Determinada a solubilidade (solúvel ou insolúvel), os antígenos foram purificados conforme demonstrado na Figura 12, representada por um gel de poliacrilamida SDS-PAGE, no qual é possível verificar que, após a purificação, os antígenos rmTXNPx (24,9kDa), rLACK (23,1kDa); rSAcP (11,3kDa); rKMP-11 (10,1kDa); rLbPH (39,4kDa) e MAPK4 (39,9kDa), apresentaram pesos moleculares próximos aos esperados.

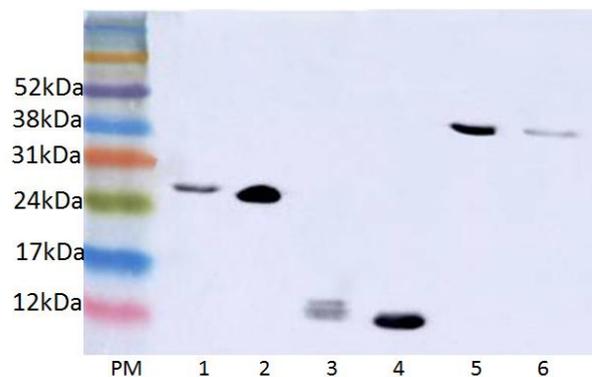
**Figura 12** Gel de poliacrilamida 15% corado com azul de Coomassie, demonstrando a pureza dos antígenos recombinantes



Legenda: (a) rmTXNPx; (b) rLACK; (c) rSAcP; (d) rKMP-11; (e) rLbPH; (f) rMAPK4. Em cada uma das figuras, constam sobresscritos: PM: padrão de peso molecular (GE Healthcare); Linha 1: lisado bacteriano antes da indução com IPTG; Linha 2: lisado bacteriano após indução com IPTG e Linha 3: antígeno recombinante após purificação. Fonte: elaborado pelo autor.

O reconhecimento dos antígenos com tamanho próximo ao esperado, através do *Western blotting* com anticorpo contra a cauda de histidina, confirma a obtenção de cada um dos antígenos recombinantes produzidos (Figura 13).

**Figura 13** Técnica de *Western blotting* demonstrando o reconhecimento dos antígenos recombinantes pelo AcMo anti-histidina

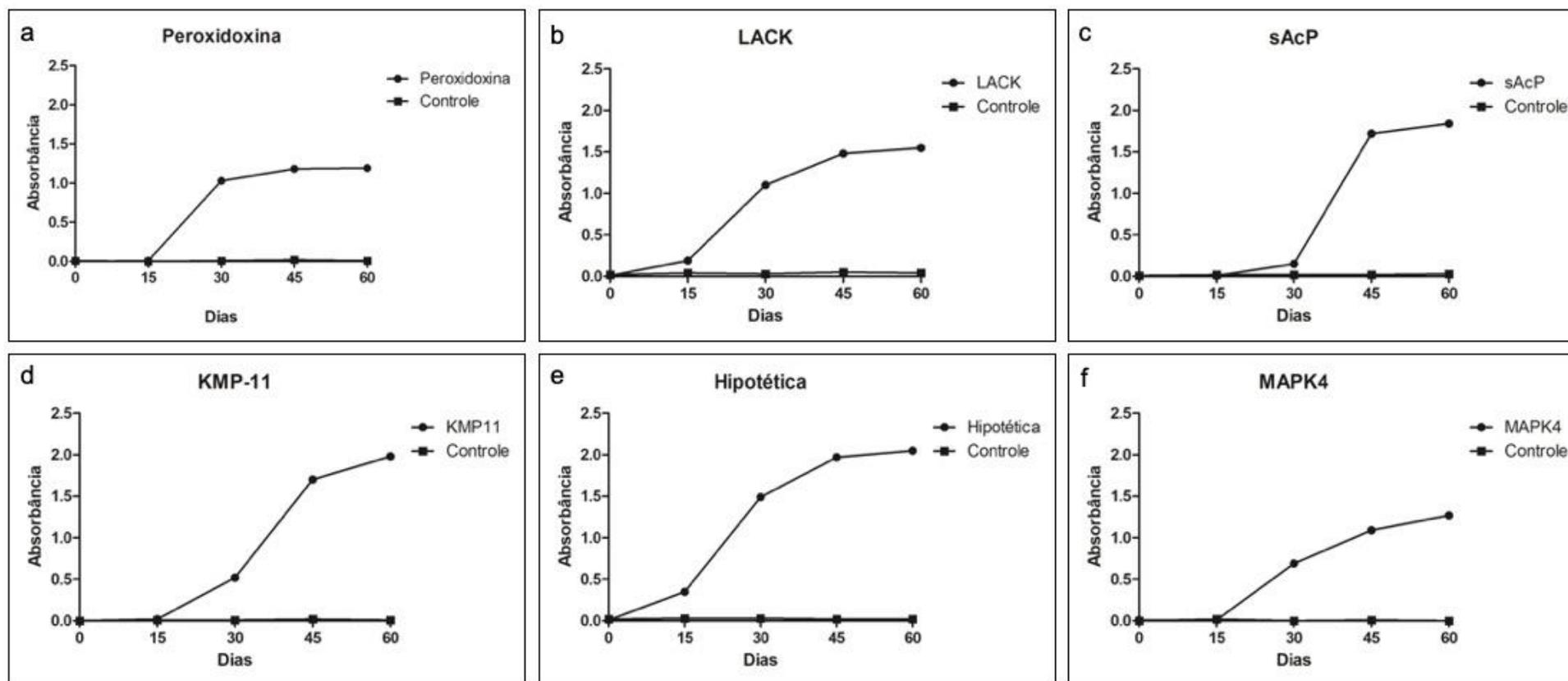


Legenda: (PM) padrão de peso molecular (GE Healthcare); (1) rmTXNPx; (2) rLACK; (3) rSAcP; (4) rKMP-11; (5) rLbPH; (6) rMAPK4. Fonte: elaborado pelo autor.

### **5.3 Produção dos anticorpos monoclonais**

A cinética da produção de anticorpos IgG total pelos camundongos imunizados com cada um dos antígenos recombinantes produzidos foi avaliada por meio do ensaio de ELISA e está representada na Figura 14.

**Figura 14** Cinética da produção de anticorpos IgG anti-antígenos recombinantes pelos camundongos imunizados

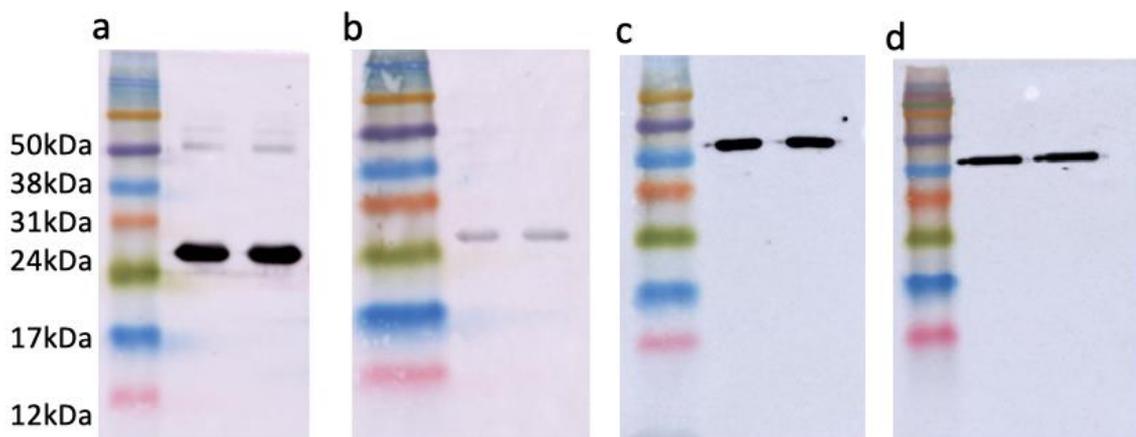


Legenda: As coletas de sangue foram realizadas imediatamente antes da 1ª imunização (D0), da 2ª imunização (D15); da 3ª imunização (D30); da 4ª imunização (D45) e da 5ª imunização (D60). Fonte: elaborado pelo autor.

Anticorpos específicos contra todos os antígenos avaliados foram detectados em níveis crescentes a partir da segunda semana de imunização. Os maiores índices de imunorreatividades foram obtidas pelos camundongos imunizados com os antígenos rSAcP e rKMP-11 (sAcP  $DO_{450/620} = 1,84$ ; KMP-11  $DO_{450/620} = 1,98$ ).

Após a esplenectomia dos camundongos imunizados, foi realizada a hibridização somática, através da fusão dos esplenócitos com as células mielomatosas. A produção de anticorpos pelos hibridomas foi então avaliada por ELISA. No entanto, após a fusão dos esplenócitos dos camundongos imunizados com os antígenos rSAcP e rKMP-11, não foram identificados hibridomas produtores de anticorpos específicos contra estes antígenos. Desta forma, não foi possível concluir a produção dos AcMo anti-sAcP e anti-KMP-11. Já a partir dos esplenócitos dos camundongos imunizados com rmTXNPx, rLack, rLbPH e rMAPK, foi possível obter e purificar os AcMos específicos. A confirmação de que estes AcMos reconhecem seus respectivos antígenos recombinantes, foi realizada por *Western blotting* e está demonstrada na Figura 15.

**Figura 15** Técnica de *Western blotting* demonstrando o reconhecimento dos antígenos recombinantes pelos anticorpos monoclonais anti-antígenos específicos.

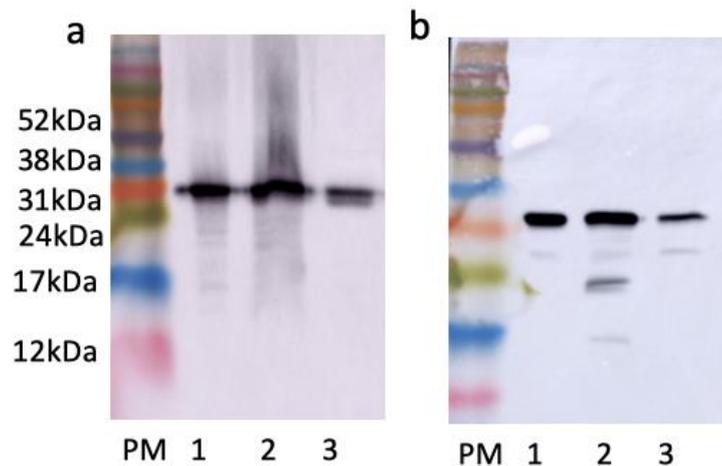


Legenda: (a) reconhecimento de rmTXNPx pelo AcMo anti-mTXNPx; (b) reconhecimento do rLACK pelo AcMo anti-LACK; (c) reconhecimento do rLbPH pelo AcMo anti-LbPH e (d) reconhecimento rMAPK4 pelo AcMo anti-MAPK4. PM: padrão de peso molecular (GE Healthcare). Fonte: elaborado pelo autor.

A capacidade dos AcMos produzidos reconhecerem antígenos presentes no AgSL, proveniente das principais espécies associadas a LT no Brasil, foi também avaliada por *Western blotting*. Foi possível identificar que os AcMos anti-mTXNPx e anti-LACK conseguiram reconhecer os antígenos com tamanho próximo a proteína nativa presente no AgSLa, AgSLb e AgSLg (Figura 16), sendo para mTXNPx e LACK, 24,9kDa e 35,3kDa, respectivamente. Já os

AcMos anti-LbPH e anti-MAPK4, não reconheceram os respectivos antígenos presentes nos AgSLs (dados não apresentados).

**Figura 16** Técnica de *Western blotting* demonstrando o reconhecimento de antígenos específicos presentes no antígeno solúvel de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. guyanensis*, pelos anticorpos monoclonais anti-mTXNPx e anti-LACK.

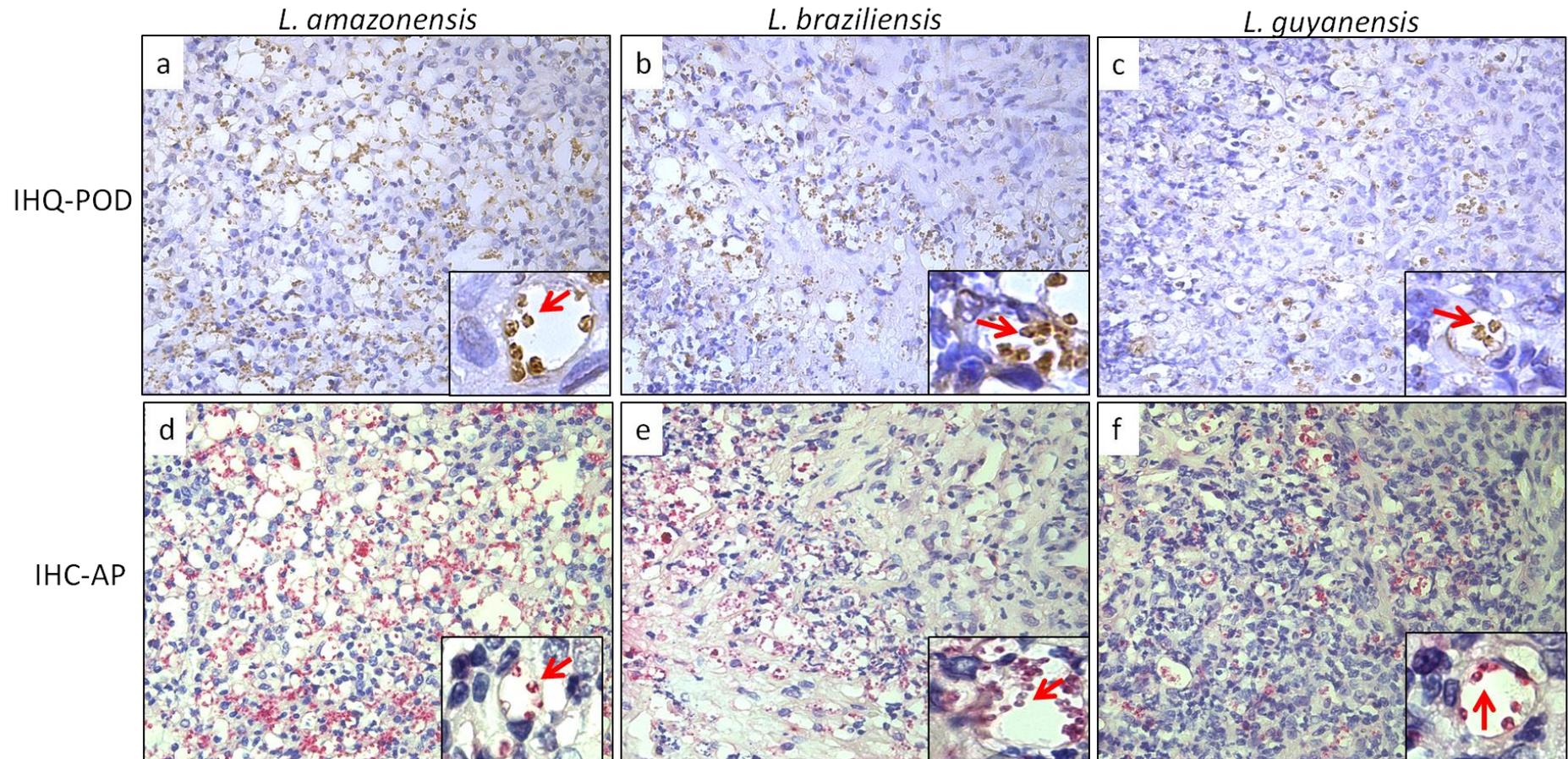


Legenda: Reconhecimento do AcMO anti-mTXNPx(a) e anti-LACK (b), no antígeno solúvel de *Leishmania amazonensis* (1); *Leishmania braziliensis* (2) e *Leishmania guyanensis* (3). PM: padrão de peso molecular (GE Healthcare). Fonte: elaborado pelo autor.

#### 5.4 Avaliação da imunorreatividade dos anticorpos monoclonais, através da técnica de imuno-histoquímica

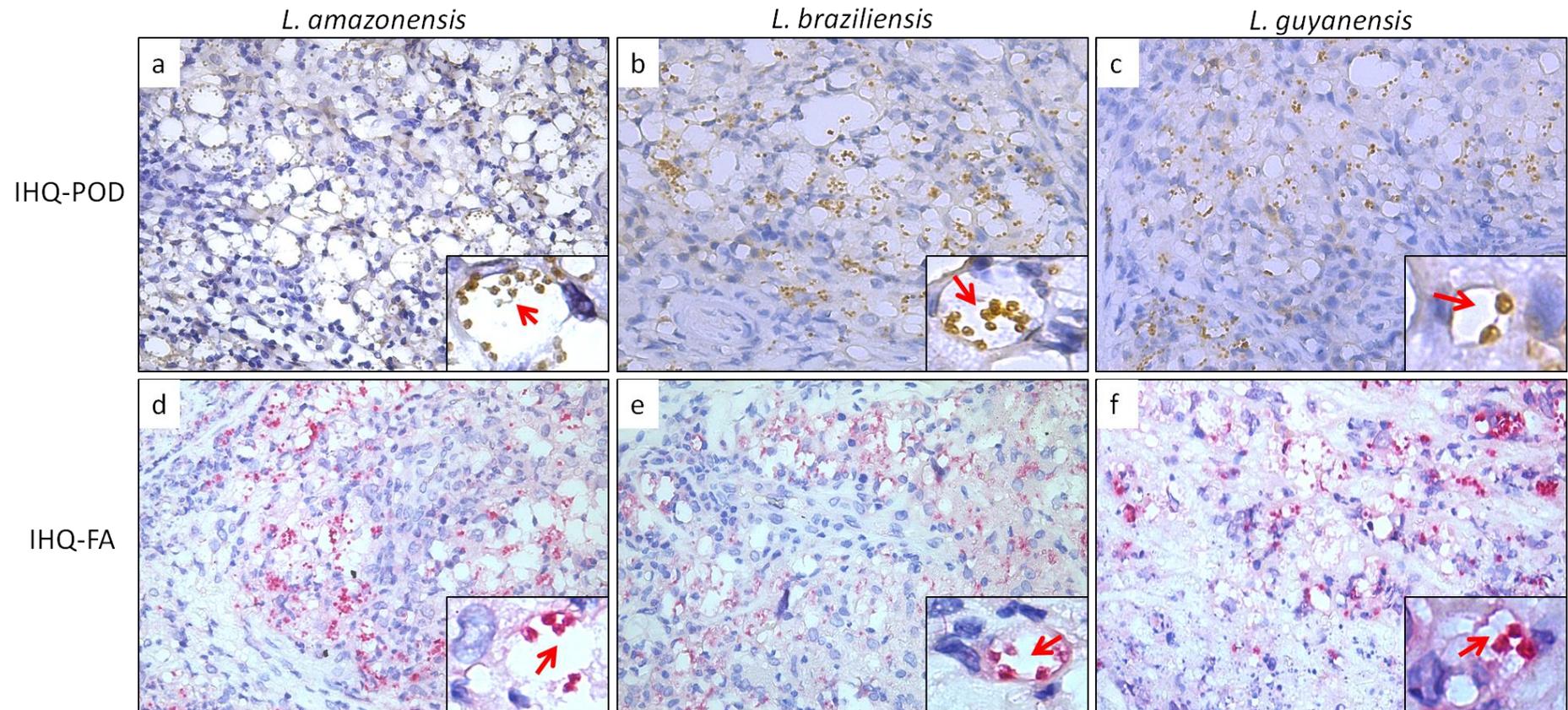
A partir dos fragmentos de lesões cutâneas de hamsters experimentalmente infectados, foi possível confirmar que, através da IHQ os AcMo anti-mTXNPx (Figura 17) e anti-LACK (Figura 18) produzidos, conseguem identificar e marcar formas amastigotas de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. guyanensis*, utilizando dois sistemas de detecção (IHQ-POD e IHQ-FA). No entanto, empregando os AcMos anti-LbPH e anti-MAPK4, não foi verificada a marcação das formas amastigotas nos fragmentos de lesões cutâneas dos hamsters experimentalmente infectados com nenhuma das três espécies de *Leishmania* (dados não apresentados).

**Figura 17** Cortes histológicos de lesões cutâneas de hamsters, experimentalmente infectados com *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. guyanensis*, apresentando a marcação de formas amastigotas, através da técnica de IHQ, usando AcMo anti-mTXNPx e dois sistemas de detecção.



Legenda: IHQ-POD: Novolink Polymer Detection System (a-c) e IHQ-FA: Bond Polymer Detection System (d-f). Imagem no aumento de 280x e detalhe no aumento de 700x. Seta: formas amastigotas de *Leishmania*. Fonte: elaborado pelo autor.

**Figura 18** Cortes histológicos de lesões cutâneas de hamsters, experimentalmente infectados com *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. guyanensis*, apresentando a marcação de formas amastigotas, através da técnica de IHQ, usando AcMo anti-LACK e dois sistemas de detecção.



Legenda: IHQ-POD: Novolink Polymer Detection System (a-c) e IHQ-FA: Bond Polimer Detection System (d-f). Imagem no aumento de 280x e detalhe no aumento de 700x. Seta: formas amastigotas de *Leishmania*. Fonte: elaborado pelo autor.

## 5.5 Estudo de validação da técnica de imuno-histoquímica utilizando anticorpo monoclonal anti-mTXNPx

### 5.5.1 Análise descritiva dos pacientes incluídos no estudo

Os pacientes que preencheram o critério de definição de caso, apresentaram média de idade de 44,8 anos, variando entre 3 a 84 anos, sendo 75,5% (37/49) do sexo masculino. Em média, estes participantes apresentavam duas lesões cutâneas, variando entre 1 e 15 lesões. Com relação à localização, 61,9% das lesões encontravam-se nas extremidades inferiores, seguido pelas extremidades superiores (23,8%) e face (9,5%). O tempo médio de evolução das lesões foi de 4 meses (variando entre 1 e 18 meses).

### 5.5.2 Desempenho dos testes diagnósticos avaliados

A sensibilidade, especificidade e acurácia dos testes diagnósticos estão demonstradas na Tabela 6. A IHQ-FA foi o único teste que apresentou sensibilidade acima de 80%, significativamente maior do que o observado para HE ( $p = 0,02$ ) e cultura ( $p = 0,001$ ). Já em relação à especificidade, não foram observadas diferenças significativas entre HE, IHQ-POD e IHQ-FA. No geral, IHQ-POD e IHQ-FA exibiram maiores taxas de acurácia, de modo que apenas a IHQ-FA apresentou diferença significativa quando comparada ao HE ( $p = 0,02$ ). Não houve diferença significativa entre IHQ-POD e IHQ-FA entre todos os parâmetros avaliados.

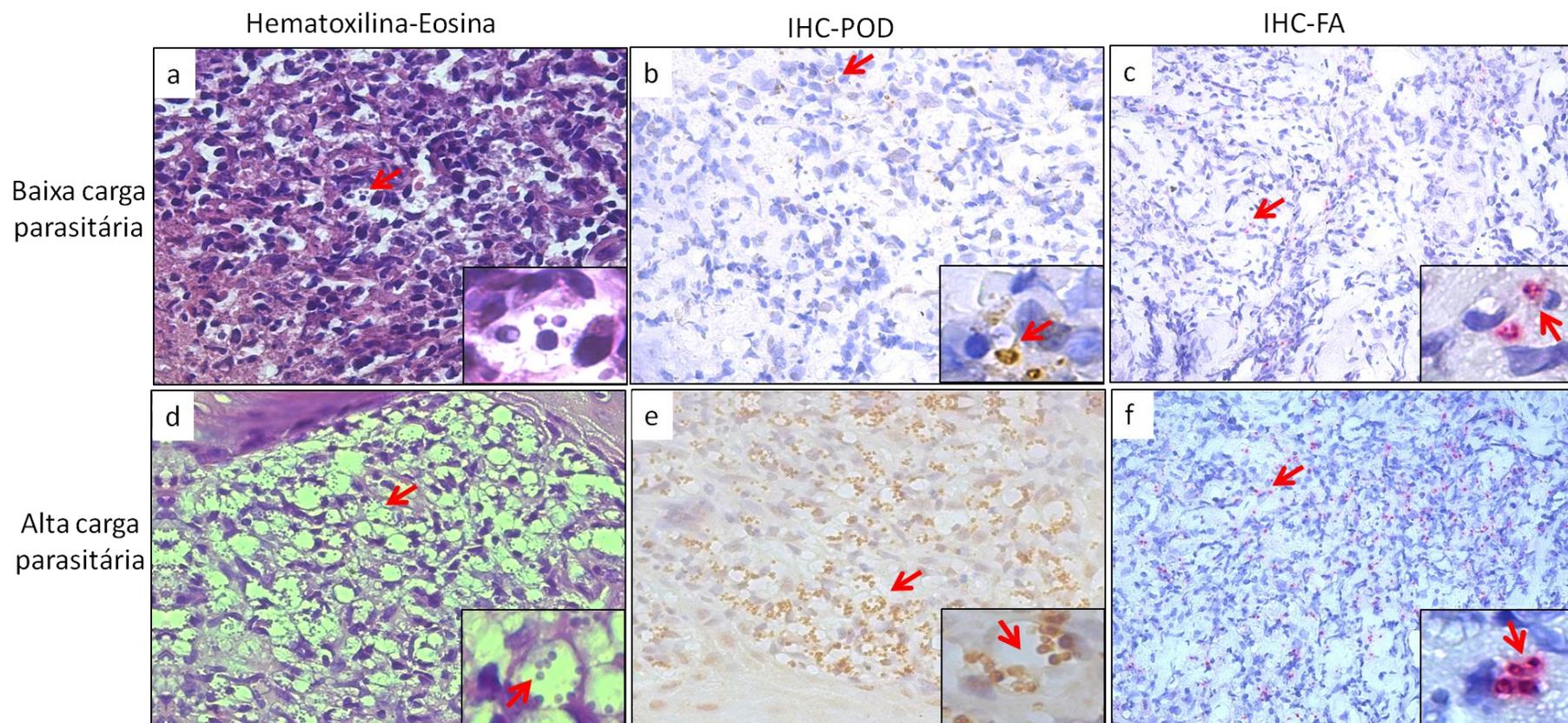
**Tabela 6** Desempenho do exame direto, cultura, exame histopatológico (HE) e imuno-histoquímica (IHQ) usando dois sistemas de detecção.

Testes	Sensibilidade (%) [IC 95%] (n =49)	Especificidade (%) [IC 95%] (n =37)	Acurácia (%) [IC 95%]
HE	65,3 [51,3 – 77,1] (32/49)	94,6 [82,3 – 98,5] (35/37)	77,9 [68,1 – 85,4] (67/86)
IHQ-POD	79,6 [66,4 – 88,5] (39/49)	94,6 [82,3 – 98,5] (35/37)	86,1 [77,2 – 91,8] (74/86)
IHQ-FA	85,7 [73,3 – 92,9] (42/49)	97,3 [86,2 – 99,6] (36/37)	90,7 [82,7 – 95,2] (78/86)
Exame direto*	77,6 [64,1 – 87,0] (38/49)	-	-
Cultura*	49,0 [35,6 – 62,5] (24/49)	-	-

\* O exame direto e a cultura não foram realizados para o grupo não caso, portanto, a especificidade e a acurácia não foram calculadas.

A grande vantagem da técnica de IHQ é a facilidade na visualização de formas amastigotas nos cortes histológicos, quando comparados ao HE, principalmente em pacientes com baixa carga parasitária (Figura 19).

**Figura 19** Cortes histológicos de lesões cutâneas de paciente com baixa e alta cargas parasitárias, corados por Hematoxilina-Eosina, e submetidos às IHQ-POD e IHQ-FA.



Legenda: IHQ-POD: *Novolink Polymer Detection System* (b, e) e IHQ-FA: *Bond Polimer Detection System* (c, f). Imagem no aumento de 280x e detalhe no aumento de 700x. Seta: formas amastigotas de *Leishmania*. Fonte: elaborado pelo autor.

As taxas de positividade obtidas através da combinação dos diferentes testes diagnósticos avaliados estão apresentadas na Tabela 7. De forma geral, associar a técnica de IHQ aos outros testes diagnósticos, independente do protocolo utilizado (IHQ-POD ou IHQ-FA), aumenta significativamente a taxa de positividade no diagnóstico de pacientes com LC. A taxa de positividade para LC aumentou significativamente quando os resultados do exame direto foram associados aos da IHQ-FA (95,9%;  $p = 0,008$ ). Já a taxa de positividade do HE e da cultura aumentou quando os resultados foram combinados com os da IHQ-POD e IHQ-FA, resultando em mais de 85% de positividade.

**Tabela 7** Taxas de positividade obtidas com a combinação de resultados das técnicas de diagnóstico

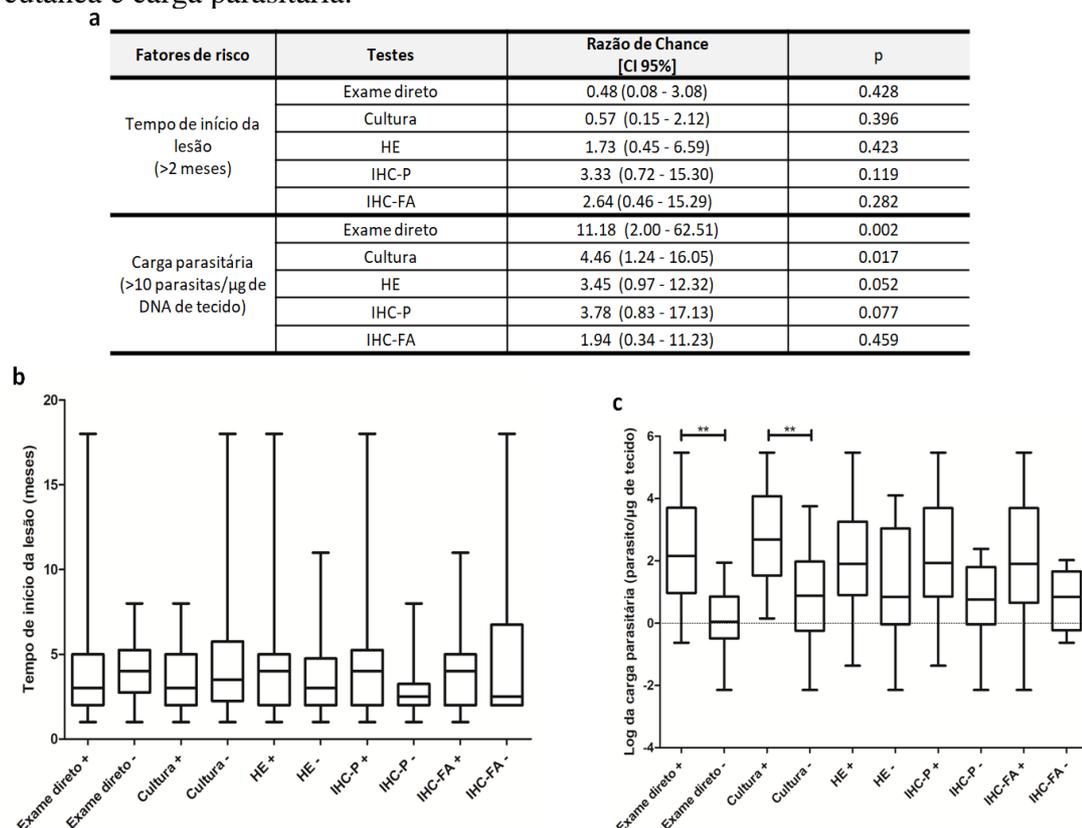
Combinação dos testes diagnósticos		Taxa de positividade (%) (n=49)	p	
2 testes	Exame direto 77,6%	Cultura	83,7 (41)	0,4470
		HE	87,8 (43)	0,1842
		IHQ-P	91,8 (45)	0,0521
		IHQ-FA	95,9 (47)	0,0079*
	Cultura 49%	HE	85,7 (42)	0,0001*
		IHQ-FA	87,8 (43)	<0,0001*
HE 65,3%	IHQ-P	85,7 (42)	0,0195*	
	IHQ-FA	93,9 (46)	0,0005*	
3 testes	Exame Direto + Cultura 83,7%	HE	93,9 (46)	0,1112
		IHQ-P	98,0 (48)	0,0146*
		IHQ-FA	98,0 (48)	0,0146*
	Exame Direto + HE 87,8%	IHQ-P	91,8 (45)	0,5151
		IHQ-FA	95,9 (47)	0,1449
	Cultura + HE 85,7%	IHQ-P	95,9 (47)	0,0822
IHQ-FA		95,9 (47)	0,0822	
4 testes	Exame Direto + Cultura + HE 93,9%	IHQ-P	98,0 (48)	0,3057
		IHQ-FA	98,0 (48)	0,3057

\*  $p < 0,05$

A influência dos fatores de risco relevantes nas taxas de positividade das técnicas diagnósticas foi avaliada e está apresentada na Figura 20. O tempo de início da lesão cutânea (menor ou maior que 2 meses) e a carga parasitária (menor ou maior que 10 parasitas/ $\mu\text{g}$  de DNA de tecido) foram correlacionados com a positividade das técnicas diagnósticas. Embora todos os testes tenham sido influenciados pelo tempo de evolução da lesão, esse parâmetro não

foi determinante para a positividade. No entanto, a maior carga parasitária ( $\geq 10$  parasitos/ $\mu\text{g}$  de DNA de tecido) foi significativamente associada à maior taxa de positividade para o exame direto e cultura. Em relação ao exame direto, a chance de positividade em pacientes com  $>10$  parasitos/ $\mu\text{g}$  de DNA de tecido foi 11,18 vezes maior do que em pacientes com menor carga parasitária. No entanto, essa relação não foi observada para HE e IHQ, sugerindo que a assertividade desses testes não foi influenciada pela carga parasitária (Figura 20a). Desta forma, não foi observada diferença significativa entre o tempo de evolução da lesão e o resultado dos testes avaliados (Figura 20b). Já em relação à carga parasitária, foi observada diferença significativa entre a carga parasitária dos pacientes que tiveram resultados positivos e negativos, diagnosticados através do exame direto e cultura (Figura 20c).

**Figura 20** Relação entre a positividade das técnicas diagnósticas com o tempo de evolução da lesão cutânea e carga parasitária.



Legenda: (a) análise de regressão logística binária; (b) tempo de evolução da lesão cutânea e (c) carga parasitária de acordo com o resultado do teste diagnóstico. \*\*  $P \leq 0,001$ . Fonte: elaborado pelo autor.

## 6. DISCUSSÃO

Classificada como uma das 17 doenças tropicais negligenciadas pela OMS, a LT continua sendo um problema de saúde pública relevante, especialmente em países endêmicos, com sistemas de saúde frágeis (WHO, 2021). Um dos muitos desafios para o enfrentamento e redução no impacto dessa doença é o diagnóstico precoce e correto, muitas vezes prejudicado pela ampla gama de manifestações clínicas, ausência de teste padrão-ouro e limitada disponibilidade de recursos. De acordo com plano de ação da Organização Pan Americana da Saúde (OPAS), uma das metas visando à eliminação da doença como problema de saúde pública é atingir 80% dos casos diagnosticados por exames laboratoriais (PAHO, 2017). Na última década, o Brasil atingiu o limiar proposto, no entanto, esta é uma realidade em apenas oito estados que compõem a federação (BRASIL, 2021).

De acordo com o Programa Especial para Pesquisa e Treinamento em Doenças Tropicais (TDR) da OMS, o teste diagnóstico ideal deveria ser acessível, sensível, específico, fácil de usar, rápido, realizado sem equipamento e entregue aos usuários finais (MABEY et al., 2004). Além destas características desejáveis, critérios adicionais referentes à conectividade em tempo real e facilidade de coleta de amostras, foram sugeridos, para serem incorporados às estratégias de controle, compondo o acrônimo em inglês *REASSURED* (LAND et al., 2019). Para o diagnóstico de doenças como HIV, tuberculose, sífilis e malária, foram desenvolvidos testes imunocromatográficos que satisfazem, total ou parcialmente, os critérios estabelecidos (LAWN et al., 2012; PAI et al., 2007; POYER et al., 2015; TUCKER et al., 2010). Já para o diagnóstico da LT, em que os recursos financeiros são escassos, não existem testes que englobam estes critérios, entretanto, a identificação de alvos antigênicos sensíveis e específicos parece ser um passo promissor para o desenvolvimento destas ferramentas (NOYA et al., 2003).

A LT não é uma doença caracterizada por produção elevada de anticorpos específicos anti-*Leishmania*. Níveis de anticorpos mais elevados são relatados para pacientes com LM e LCD em comparação com pacientes com LC, que se caracteriza por uma resposta imune Th1 moderada (CARVALHO et al., 2012; SANTOS; BRODSKYN, 2014). Desta forma, os baixos níveis de anticorpos circulantes, que ocasionam reações falso-negativas e/ou falso-positivas, fizeram com que, os testes imunológicos não tivessem destaque relevante para o diagnóstico da LT (SATO et al., 2017). No entanto, na revisão sistemática realizada, encontramos diferentes antígenos que apresentaram elevado potencial para aplicação no diagnóstico da LT e até mesmo para LC. Estes resultados sugerem que as técnicas imunológicas podem ser uma importante

aliada para o diagnóstico da LT, utilizando alvos sensíveis e procedimentos bem padronizados, seja para detecção de antígenos ou anticorpos.

Os estudos analisados na revisão sistemática foram realizados no período entre 1996 a 2019, porém, quase 50% deles foram conduzidos nos últimos cinco anos, principalmente no Brasil ou em outros países da América Latina. O aumento do número de estudos neste período pode estar relacionado ao fortalecimento de áreas como genômica e proteômica, e consequentes avanços das abordagens imunoproteômicas (FULTON et al., 2013). Este período coincide também com a interrupção da produção do antígeno de Montenegro no Brasil a partir de 2015, que tornou ainda mais escasso o cenário dos testes para o diagnóstico da LC no país (BRAZ, 2019). Direta ou indiretamente, estes fatos podem ter impulsionado pesquisas voltadas para a busca de novos testes de diagnóstico para LT.

Em estudos de acurácia diagnóstica, a escolha do teste de referência e a seleção de pacientes elegíveis, são pontos críticos que influenciam diretamente nos resultados obtidos (IRWIG et al., 2002; KOREVAAR et al., 2019). Embora não exista padrão ouro para o diagnóstico da LT, os testes parasitológicos são frequentemente utilizados devido à sua alta especificidade. No entanto, sua limitada sensibilidade pode superestimar a sensibilidade dos testes avaliados (DE MELLO et al., 2011; FABER et al., 2003; RAMIREZ et al., 2000; SCHUBACH et al., 2001). A PCR foi considerada um dos padrões de referência em 47,4% (18/38) dos estudos incluídos, sendo provavelmente o padrão de referência mais adequado. Entretanto, em relação ao diagnóstico molecular, cabe destacar que uma padronização do método ainda é necessária, haja vista os diferentes protocolos de extração de DNA e alvos moleculares que têm sido usados ao longo do tempo (OLIVEIRA et al., 2011).

A inclusão de participantes que não apresentam a condição alvo também compreende um importante grupo em estudos de acurácia diagnóstica. Entre os estudos incluídos, observou-se com frequência a inclusão de pacientes saudáveis ou com condições que não se assemelham ao quadro clínico da LT. A inclusão de pacientes com doença de Chagas, por exemplo, se justifica pela proximidade filogenética dos agentes etiológicos e sobreposição desta doença em áreas endêmicas para LT (GUIMARAES et al., 1981). Indivíduos saudáveis de área endêmica também foram incluídos com frequência nos estudos, provavelmente devido à possibilidade do contato prévio com parasito sem o desenvolvimento da doença. No entanto, em estudos de avaliação de desempenho de teste com finalidade diagnóstica, deve ser estimulada a inclusão de pacientes com doenças que representam fatores de confusão na prática clínica, que no universo da LT incluem: esporotricose, paracoccidioidomicose, hanseníase, vasculite, sífilis, úlceras de estase e outras doenças dérmicas ou mucosas (TIRELLI et al., 2017). A inclusão

deste tipo de participante foi verificada, em apenas 47,4% (18/38) dos estudos. Neste sentido, observa-se que a grande maioria dos estudos encontrados são estudos prova de conceito, ou seja, estudos de fase 1, em que os pacientes incluídos para avaliação de sensibilidade e especificidade não apresentavam a mesma condição clínica. Embora o risco de resultados tendenciosos, estudos de prova de conceito são essenciais para o desenvolvimento de testes diagnósticos, visto que os resultados iniciais promissores, devem incentivando estudos posteriores mais abrangentes (LEEFLANG; ALLERBERGER, 2019).

Na revisão sistemática foram encontrados 79 antígenos, sendo 40 proteínas recombinantes, 24 peptídeos sintéticos e 15 proteínas purificadas. Em contraste com os AgSL, a principal vantagem do uso de proteínas recombinantes e peptídeos sintéticos se refere a composição antigênica mais pura, permitindo o desenvolvimento de técnicas mais padronizadas e com menos reações cruzadas. Além disso, a produção desses antígenos não requer a manutenção do parasito, proporciona maior reprodutibilidade entre lotes e permite a utilização de diferentes antígenos juntos para aumentar a sensibilidade do teste diagnóstico (HOLEC-GASIOR, 2013).

Em comum, observa-se que todos os antígenos recombinantes avaliados para o diagnóstico da LT, foram produzidos em sistemas de expressão procarióticos, utilizando *Escherichia coli*. A ausência de modificações pós-traducionais dos antígenos expressos por bactérias poderia ser uma limitação para o emprego dessa biotecnologia no imunodiagnóstico (BRONDYK, 2009; WINGFIELD, 2015), no entanto, este não foi um fator altamente limitante, visto que diferentes antígenos recombinantes, apresentaram resultados promissores, como rMTXNPx, rHSP83r, rCatepsina L-like, rCitocromo c oxidase, rFator de liberação de histamina de IgE, rFator de iniciação eucariótica 5a, bem como algumas proteínas hipotéticas (CELESTE et al., 2004, 2014; COELHO et al., 2016; LAGE et al., 2019; MENEZES-SOUZA et al., 2014a, 2015b; SOUZA et al., 2013). Outras limitações do uso de antígenos recombinantes foram reportadas, como a instabilidade e degradação, sendo considerada impeditivo para uso de rHSP83 na prática (CELESTE et al., 2014; SATO et al., 2017).

Uma das vantagens do uso de pequenos fragmentos como alvos antigênicos, como por exemplo, os peptídeos sintéticos, está relacionada, sobretudo a capacidade de minimizar reações não específicas. LINK et al. (2017) identificaram três peptídeos por técnica de exibição de fago, provavelmente derivado da glicoproteína GP63, apresentando sensibilidade de 79% em ELISA. COSTA et al. (2016) selecionaram três clones (A10, C12 e H7) com alto poder na discriminação entre pacientes com LT, doença de Chagas, leishmaniose visceral e indivíduos saudáveis, sendo reportado 100% de sensibilidade e especificidade. No entanto, os peptídeos

lineares curtos apresentam algumas desvantagens, como incapacidade de identificar anticorpos séricos que reconhecem epítomos conformacionais, além de adsorção limitada em microplacas de ELISA e problemas de reprodutibilidade (PARMLEY & SMITH, 1988; SMITH, 1985).

As proteínas purificadas podem representar vantagens significativas, principalmente no que diz respeito à imunorreatividade. O ferro-superóxido dismutase, por exemplo, foi uma proteína purificada que apresentou resultados interessantes, com mais de 80% de sensibilidade para o diagnóstico de LC ou LM, quando aplicado no ELISA. Porém, quando se utiliza proteínas purificadas, a sensibilidade e a especificidade podem variar de acordo com o tipo, fonte e pureza do antígeno utilizado (LONGONI; MARIN; SANCHEZ-MORENO, 2014; MARIN et al., 2009).

Os únicos estudos de fase III incluídos na revisão avaliaram o teste rápido *CL Detect*<sup>TM</sup>, sendo neste caso, estudos de validação pós-comercialização. Apesar da limitada sensibilidade reportada (entre 35 – 70%), estudos realizados no Marrocos e Afeganistão ressaltam a possibilidade de sua utilização devido a simples execução e alta especificidade, reduzindo assim o número de pacientes com LC encaminhados para confirmação diagnóstica (BENNIS et al., 2018; VINK et al., 2018). Este fato demonstra a limitação e necessidade de testes diagnósticos, com estas características. O anticorpo monoclonal espécie-específico (IS2-2B4 - A11 / XLVI-5B8-B3) empregado em IHQ, também demonstrou elevada sensibilidade e especificidade (96% e 100%, respectivamente) (SHIRIAN et al., 2014). Desta forma, estudos mais robustos utilizando anticorpos monoclonais ou policlonais, para o diagnóstico de LT em diferentes plataformas, devem ser estimulados.

Um dos fatores que devem ser destacados na revisão da literatura é o emprego de uma estratégia de busca abrangente com quatro bases de dados. Em contrapartida, uma das limitações pode ser o número reduzido de estudos avaliando a mesma proteína alvo, sendo fator impeditivo para a realização de uma meta-análise dos dados. Além disso, é importante considerar que o risco de viés para muitos dos estudos incluídos não era claro e/ou era alto para parâmetros como: “Seleção do paciente”, “Fluxo e tempo” e “Teste índice”. Em geral, identificamos número relevante de alvos antigênicos que podem ser aplicados em diferentes plataformas para auxiliar no diagnóstico clínico. No entanto, o alto número de estudos de prova de conceito, destaca a necessidade de desenvolver estudos mais amplos e principalmente prospectivos, incluindo pacientes com suspeita clínica de LT e utilizando testes de referência mais sensíveis, para, desta forma, avaliar sua aplicação na prática clínica.

Diante deste universo de antígenos já descritos e identificados na literatura e, considerando também características biológicas de algumas proteínas bem como a

disponibilidade do minigene, foram selecionados seis antígenos, que por apresentarem características distintas foram considerados potenciais alvos na técnica de IHQ. A elevada identidade entre as espécies de *Leishmania* e limitada identidade com as sequências de *Homo sapiens* e *Mus musculus*, também sugeriram que os antígenos selecionados poderiam ser considerados bons alvos para serem detectados em amastigotas de *Leishmania* sp. usando a técnica de IHQ. A fim de que o AcMo produzido pudesse ser utilizado para o diagnóstico da LC causada pelas diferentes espécies, era desejada elevada identidade entre as espécies de *Leishmania*. Já a elevada identidade com *Homo sapiens* poderia favorecer a ocorrência de reação cruzada na técnica de IHQ e com *Mus musculus*, poderia comprometer o reconhecimento pelo sistema imune do camundongo e prejudicar a produção dos anticorpos específicos após a imunização destes animais. Embora estas premissas tenham sido respeitadas, não foi possível a produção dos AcMos anti-sAcP e anti-KMP-11. Cabe destacar que, rSAcP e rKMP-11 produzidas, apresentaram algumas características em comum, como o baixo peso molecular (sAcP: 11,33kDa e KMP-11: 10,12kDa), terem sido purificadas a partir da fração solúvel do extrato bacteriano e apresentarem níveis maiores de anticorpos antígeno-específico no dia da última imunização, mensurados por meio do ensaio de ELISA. A princípio, tais características poderiam ser vistas como vantagens para produção dos anticorpos específicos, entretanto, não foram identificados hibridomas produtores de anticorpos específicos contra rSAcP e rKMP-11.

Após confirmar a imunorreatividade dos AcMos produzidos frente a seus antígenos recombinantes, avaliamos a capacidade dos AcMos reconhecerem seus antígenos nativos no AgSLa, AgSLb e AgSLg através da técnica de *Western blotting*. Os AcMos anti-mTXNPx e anti-LACK foram capazes de identificar antígenos específicos no AgSLs das três espécies, confirmando a imunorreatividade dos anticorpos produzidos e a presença destes antígenos em formas promastigotas, assim como reportado previamente (BENTEL et al., 2003; COELHO et al., 2012). Embora WANG et al. (2005), utilizando soro hiperimune de coelho imunizado com a região carboxiterminal de MAPK4, identificaram este antígeno em AgS de *Leishmania mexicana*, o AcMo anti-MAPK4, produzido neste estudo, não foi capaz de reconhecer o antígeno específico nos AgSL de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. guyanensis*. A proteína hipotética, LbPH também havia sido descrita em ambos os estágios do parasito, sendo reconhecida por anticorpos presentes no soro de pacientes com LC e LM (DUARTE et al., 2015), mas o AcMo anti-LbPH não reconheceu o antígeno específico nos AgSL destas espécies.

O reconhecimento ou não do antígeno específico no AgSL pelos AcMos produzidos, não seria fator impeditivo para sua utilização na IHQ, visto que o AgSL é produzido a partir de formas promastigotas do parasito, já para uso na IHQ é necessário que os antígenos estejam

expressos nas formas amastigotas. Desta forma, a técnica de IHQ foi também avaliada em lesão de animal experimentalmente infectado com as principais espécies de *Leishmania* associadas à LC no Brasil. No entanto, também não foi comprovada a imunorreatividade dos AcMos anti-LbPH e anti-MAPK4 na IHQ. O não reconhecimento pode estar relacionado ao baixo nível de expressão destes antígenos nos parasitos das espécies aqui avaliadas, ou ainda a possibilidade destes anticorpos monoclonais identificarem epítomos lineares, para os quais foram produzidos pela imunização com antígenos recombinantes na forma desnaturada (RAMOS-VARA, 2005). É possível também que esses epítomos não estejam acessíveis nas proteínas na forma nativa, encontradas nos amastigotas de *Leishmania* spp. (MIGHELL; HUME; ROBINSON, 2008). A seleção de outros hibridomas produtores de anticorpos, poderia ser avaliada futuramente a fim de obter AcMos que reconheçam outros epítomos.

Diferentes estudos têm demonstrado a importância da técnica de IHQ como ferramenta auxiliar para o diagnóstico da LC (SALOTRA et al., 2003; SHIRIAN et al., 2014). No entanto, apesar dos avanços reportados, grande parte dos estudos utilizam soro anti-*Leishmania* sp. obtido a partir de animais imunizados com AgSLs e sistemas de detecção usando ABC ou LSAB, fatores que podem acarretar menor acurácia da técnica (AMATO et al., 2009; MARQUES et al., 2017; MIGHELL; HUME; ROBINSON, 2008; QUINTELLA et al., 2009; SALINAS et al., 1989; SCHUBACH et al., 2001). O uso AcMo e sistemas de detecção compostos por polímeros, pode apresentar-se como uma alternativa para contornar esta limitação, visto que é de simples realização, apresenta maior sensibilidade e menor coloração de fundo quando comparada aos sistemas tradicionais compostos por biotina (RAMOS-VARA, 2005).

A escolha dos dois sistemas de detecção de polímeros distintos está relacionada ao fato da enzima peroxidase, utilizada na IHQ-POD, ser a mais comumente empregada e a enzima fosfatase alcalina, utilizada na IHQ-FA, ser mais recomendada para o diagnóstico de doenças infecciosas (LIANG et al., 2007; RAMOS-VARA et al., 2008). Embora IHQ-POD e IHQ-FA tenham apresentado resultados satisfatórios para o diagnóstico da LC, sem diferença estatística, verificamos melhor contraste para a visualização das formas amastigotas usando a IHQ-FA. Por vezes, verificamos também pigmentos marrons (hemossiderina) dentro dos macrófagos, que nas reações com IHQ-POD, atuam como fator de confusão com a marcação marrom obtida com DAB, como já relatado anteriormente (RAMOS-VARA, 2005).

Neste estudo, a IHQ-POD e IHQ-FA apresentaram sensibilidade de 79,6% e 85,7%, respectivamente, considerando a qPCR como teste padrão de referência. Estudos avaliando a IHQ para o diagnóstico da LC, considerando métodos parasitológicos como padrão de

referência e utilizando soros policlonais e sistemas de detecção baseado em biotina, reportaram sensibilidade entre 58,5% a 83,3% (AMATO et al., 2009; MARQUES et al., 2017; QUINTELLA et al., 2009; SCHUBACH et al., 2001). O sistema de detecção e o uso de AcMos podem aumentar a sensibilidade da técnica de IHQ, tendo em vista a amplificação de sinal e as marcações específicas, devido a identificação das formas amastigotas que nem sempre apresentam morfologia característica (MIGHELL, HUME & ROBINSON, 2008; RAMOS-VARA, 2005). Vale ressaltar também, a limitação do uso de métodos parasitológicos como padrão de referência devido à baixa sensibilidade, que pode estar associada à quantidade de material biológico avaliado e a necessidade de visualização das formas amastigotas. Por outro lado, elevada sensibilidade da qPCR, possibilita a inclusão de pacientes que poderiam não ser diagnosticados por métodos parasitológicos.

O limitado uso de AcMos para o diagnóstico da LC através da técnica de IHQ, pode estar relacionado a relativa dificuldade de obtenção, além do custo superior, ao comparar com os soros hiperimunes. No entanto a alta pureza e especificidade podem representar vantagens significativas. Empregando AcMo anti- *L. gerbilli*, sensibilidade de 51% foi reportada (KENNER et al., 1999). No Brasil, ALVES et al. (2013), reportaram sensibilidade de 71,2% utilizando AcMo anti-lipofosfoglicano (LPG). Já no Iran, onde a LC é causada principalmente por *L. major* e *L. tropica*, sensibilidade superior a 90% foi reportada para a técnica de IHQ utilizando AcMo contra proteína específica destas espécies (SHIRIAN et al., 2014). No geral, esses resultados sugerem que a IHQ utilizando AcMos pode ser um teste sensível e eficaz para o diagnóstico de LC.

A associação de diferentes testes diagnósticos é frequentemente recomendada a fim melhorar o diagnóstico final dos pacientes com suspeita de LT (GOTO et al., 2010; SCHUBACH et al., 2001). Através da associação dos resultados das técnicas aqui avaliadas, verificamos significativo aumento da taxa de positividade para o diagnóstico para LC. Na rotina diagnóstica, a IHQ frequentemente é realizada junto com HE, neste estudo, a taxa de positividade do HE foi de 65,3% e atingiu mais de 93,9% quando associada à IHQ-FA. Outros estudos também reportaram aumento da positividade do HE quando usado em associação com a IHQ, com taxa de positividade aumentando de 50% para 76,1% e de 53,3% para 80%, respectivamente (GONZALEZ et al., 2019; QUINTELLA et al., 2009). Desta forma, o uso da IHQ em laboratórios com infraestruturas e equipamentos adequados para o diagnóstico histopatológico de rotina pode facilitar a identificação do parasito, melhorando consideravelmente a acurácia do diagnóstico de LC. Verificamos também aumento significativo na taxa de positividade quando os resultados do exame direto foram associados

aos da IHQ-FA (de 77,6% para 95,9%), demonstrado que na disponibilidade de serviços de patologias, estas técnicas podem ser utilizadas em associação.

Em geral, observa-se correlação inversa entre o tempo de evolução da lesão cutânea e a sensibilidade das técnicas parasitológicas para o diagnóstico de LC (GUTIERREZ et al., 1991; RAMIREZ et al., 2000; WEIGLE et al., 1987). No entanto, neste estudo, através da análise de regressão logística, verificamos que os testes avaliados foram influenciados pelo tempo de evolução das lesões cutâneas, mas essa variável não foi estritamente determinante para a sensibilidade desses testes. É importante destacar que o tempo de evolução da lesão foi informado pelos pacientes e, portanto, é uma variável subjetiva. Em contraste, a carga parasitária foi significativamente determinante para a positividade do exame direto e da cultura, mas não influenciou na positividade do HE e da IHQ, usando os dois sistemas de detecção. Desta forma, o uso das técnicas de HE e de IHQ pode ser recomendado independente da carga parasitária dos pacientes com LC, fator preponderante para o diagnóstico de rotina.

Neste estudo, a partir da seleção e produção de seis antígenos recombinantes, foram produzidos AcMos e comprovada a imunorreatividade dos AcMos anti-mTXNPx e anti-LACK. Desmonstramos aqui, a primeira avaliação da IHQ usando o AcMo anti-mTXNPx, para o diagnóstico de LC, com resultados promissores obtidos a partir de sistemas de detecção compostos por polímeros conjugados à peroxidase (IHQ-POD) e à fosfatase alcalina (IHQ-FA). Destacamos como perspectiva inicial, a validação da IHQ utilizando o AcMo anti-LACK, que ainda não pode ser concluída. Diante dos resultados obtidos, sugerimos que a IHQ-FA deve ser priorizada, principalmente devido ao melhor contraste para visualização das formas amastigotas. Os promissores resultados obtidos, resultaram na incorporação da IHQ-FA utilizando o AcMo anti-mTXNPx como estratégia complementar para o diagnóstico de pacientes com suspeita de LC atendidos no CRL (IRR/FIOCRUZ). Verificamos que a IHQ utilizando AcMo anti-mTXNPx é capaz de melhorar a detecção de *Leishmania* sp. nas análises histopatológicas e desta forma, acreditamos que a disponibilização desta técnica em hospitais e laboratórios com serviço de patologia disponível, pode ser uma importante estratégia para auxiliar no diagnóstico da LC, até mesmo fora dos centros de referência. Destacamos a necessidade de estudos multicêntricos utilizando IHQ-POD e IHQ-FA, bem como avaliação de desempenho para o diagnóstico da LM. Novos estudos também devem ser encorajados, especialmente em áreas endêmicas onde outras espécies de *Leishmania* são encontradas como agentes etiológicos. Por fim, destacamos também o uso potencial dos insumos biotecnológicos aqui produzidos, desde as proteínas recombinantes até os AcMos que apresentam elevado

potencial de aplicação em outras técnicas diagnósticas, como testes rápidos de detecção de antígeno.

## 7. CONCLUSÃO

- Diversos alvos antigênicos foram identificados com potencial aplicabilidade para o diagnóstico imunológico da LT e de suas formas clínicas. No entanto, o elevado número de estudos de prova de conceito reforça a necessidade de avaliações mais amplas;
- A confirmada imunoreatividade dos AcMo anti-mTXNPx e anti-LACK, sugerem seu uso potencial no imunodiagnóstico da LT;
- Para o diagnóstico da IHQ utilizando AcMo anti-mTXNPx, sensibilidade e especificidade de 79,6 e 94,6% foram obtidas para IHQ-POD e 85,7 e 97,3% para IHQ-FA, respectivamente;
- A IHQ-FA apresentou sensibilidade significativamente maior que HE ( $p = 0,02$ ) e cultura ( $p = 0,001$ ), sem diferença estatística em relação o exame direto.
- A combinação dos resultados da IHQ-FA com o exame direto ou com o HE aumentou significativamente a positividade do diagnóstico da LC, com taxa de positividade  $> 93\%$ .

## REFERÊNCIAS

- ADRIANO, A. L. et al. American tegumentary leishmaniasis: an uncommon clinical and histopathological presentation. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 88, n. 2, p. 260–2, 2013.
- ALLAHVERDIYEV, A. M. et al. A sensitive new microculture method for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 70, n. 3, p. 294–297, 2004.
- ALTSCHUL, S. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 17, p. 3389–3402, 1997.
- ALVES, C. F. et al. American Tegumentary Leishmaniasis: Effectiveness of an Immunohistochemical Protocol for the Detection of *Leishmania* in Skin. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, p. e63343, 2013.
- AMATO, V. S. et al. Immunohistochemistry and polymerase chain reaction on paraffin-embedded material improve the diagnosis of cutaneous leishmaniasis in the Amazon region. **International Journal of Dermatology**, v. 48, n. 10, p. 1091–1095, 2009.
- AMORIM, A. G. et al. Identification of the C-terminal region of 70 kDa heat shock protein from *Leishmania (Viannia) braziliensis* as a target for the humoral immune response. **Cell Stress Chaperones**, v. 1, n. 3, p. 177–187, 1996.
- BACELLAR, O. et al. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. v. 70, n. 12, 2002.
- BARR, S. D.; GEDAMU, L. Cloning and characterization of three differentially expressed peroxidoxin genes from *Leishmania chagasi*. Evidence for an enzymatic detoxification of hydroxyl radicals. **The Journal of biological chemistry**, v. 276, n. 36, p. 34279–87, 2001.
- BARR, S. D.; GEDAMU, L. Role of Peroxidoxins in *Leishmania chagasi* Survival. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 12, p. 10816–10823, 2003.
- BARRAL, A. et al. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: Evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 44, n. 5, p. 536–546, 1991.
- BARRAL, A. et al. Biological behavior of *Leishmania amazonensis* isolated from Humans with cutaneous, mucosal, or visceral leishmaniasis in Balb/C Mice. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 54, n. 2, p. 178–184, 1996.
- BARROSO-FREITAS, A. P. T. et al. Accuracy of an ELISA and indirect immunofluorescence for the laboratory diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 103, n. 4, p. 383–389, 2009.

BASZLER, T. V. et al. Diagnosis of naturally occurring bovine viral diarrhoea virus infections in ruminants using monoclonal antibody-based immunohistochemistry. **Veterinary Pathology**, v. 32, n. 6, p. 609–618, 1995.

BATES, P. A.; DWYER, D. M. Biosynthesis and secretion of acid phosphatase by *Leishmania donovani* promastigotes. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 26, n. 3, p. 289–296, 1987.

BEENA, K. R.; RAMESH, V.; MUKHERJEE, A. Identification of parasite antigen, correlation of parasite density and inflammation in skin lesions of post kala-azar dermal leishmaniasis. **Journal of Cutaneous Pathology**, v. 30, n. 10, p. 616–620, 2003.

BENNIS, I. et al. “The mosquitoes that destroy your face”. Social impact of Cutaneous Leishmaniasis in South-eastern Morocco, A qualitative study. **PLOS ONE**, v. 12, n. 12, p. e0189906, 2017.

BENNIS, I. et al. Accuracy of a rapid diagnostic test based on antigen detection for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis in patients with suggestive skin lesions in Morocco. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 99, n. 3, p. 716–722, 2018.

BENTEL, M. et al. Developmentally induced changes of the proteome in the protozoan parasite *Leishmania donovani*. **Proteomics**, v. 3, n. 9, p. 1811–1829, 2003.

BHAUMIK, S. et al. KMP-11 DNA immunization significantly protects against *L. donovani* infection but requires exogenous IL-12 as an adjuvant for comparable protection against *L. major*. **Vaccine**, v. 27, n. 9, p. 1306–1316, 2009.

BOGGILD, A. K. et al. Optimization of microculture and evaluation of miniculture for the isolation of *Leishmania* parasites from cutaneous lesions in Peru. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 79, n. 6, p. 847–852, 2008.

BOGGILD, A. K. et al. Clinical and demographic stratification of test performance: a pooled analysis of five laboratory diagnostic methods for American cutaneous leishmaniasis. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 83, n. 2, p. 345–350, 2010.

BRADFORD, M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.

BRASIL. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Tegumentar**. 1ª ed. Brasília: Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, 2017.

BRASIL. **Sistema de informação sobre mortalidade**. Disponível em: <<http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0203r.def>>. Acesso em: 13 maio. 2021.

BRAZ, L. M. A. Tegumentary leishmaniasis diagnosis: What happened with MST

(Montenegro skin test) in Brazil? **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 61, n. 0, p. e17, mar. 2019.

BRONDYK, W. H. Selecting an Appropriate Method for Expressing a Recombinant Protein. In: **Methods in Enzymology**. [s.l.] Academic Press Inc., 2009. v. 463p. 131–147.

BRUJIN, M. H. DE et al. A comparative study of diagnosis by the polymerase chain reaction and by current clinical methods using biopsies from Colombian patients with suspected leishmaniasis. **Trop Med Parasitological**, p. 201–207, 1993.

BRYCESON, A. D. M. Diffuse cutaneous leishmaniasis in Ethiopia I. The clinical and histological features of the disease. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 63, n. 6, p. 708–737, 1969.

BURNETTE, W. N. “Western Blotting”: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. **Analytical Biochemistry**, v. 112, n. 2, p. 195–203, 1981.

CACERES-DITTMAR, G. et al. Determination of the cytokine profile in American cutaneous leishmaniasis using the polymerase chain reaction. **Clin Exp Immunol**, v. 91, p. 500–505, 1993.

CAMPOS-NETO, A. et al. Protection against cutaneous leishmaniasis induced by recombinant antigens in murine and nonhuman primate models of the human disease. **Infection and immunity**, v. 69, n. 6, p. 4103–8, 2001.

CARMELO, E. et al. Antigenicity of *Leishmania braziliensis* histone H1 during cutaneous leishmaniasis: localization of antigenic determinants. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 9, n. 4, p. 808–811, 2002.

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

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

CARVALHO, E. M. et al. Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. **Acta tropica**, v. 56, n. 4, p. 315–25, 1994.

CARVALHO, L. P. et al. Protective and pathologic immune responses in human tegumentary leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 3, p. 301, 2012.

CASTELLANO, L. R. et al. Th1/Th2 immune responses are associated with active cutaneous leishmaniasis and clinical cure is associated with strong interferon- $\gamma$  production. **Human**

**Immunology**, v. 70, n. 6, p. 383–390, 2009.

CASTRO, H. et al. Specificity and kinetics of a mitochondrial peroxiredoxin of *Leishmania infantum*. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 33, n. 11, p. 1563–1574, 2002.

CELESTE, B. J. et al. *Leishmania infantum* heat shock protein 83 for the serodiagnosis of tegumentary leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 11, p. 1591–1593, nov. 2004.

CELESTE, B. J. et al. Recombinant *Leishmania infantum* Heat Shock Protein 83 for the Serodiagnosis of Cutaneous, Mucosal, and Visceral Leishmaniasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 90, n. 5, p. 860–865, 2014.

CHEN, J. et al. Prediction of linear B-cell epitopes using amino acid pair antigenicity scale. **Amino Acids**, v. 33, n. 3, p. 423–428, 2007.

CHRISTENSEN, S. M. et al. Host and parasite responses in human diffuse cutaneous leishmaniasis caused by *L. amazonensis*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 3, p. e0007152, 2019.

COELHO, E. et al. Evaluation of two recombinant *Leishmania* proteins identified by an immunoproteomic approach as tools for the serodiagnosis of canine visceral and human tegumentary leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 215, p. 63–71, 2016.

COELHO, V. T. S. et al. Identification of proteins in promastigote and amastigote-like *Leishmania* using an immunoproteomic approach. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 1, p. 1–10, 2012.

CONVIT, J. et al. The clinical and immunological spectrum of American cutaneous leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 87, n. 4, p. 444–448, 1993.

CONVIT, J.; KERDEL-VEGAS, F. Disseminated Cutaneous Leishmaniasis. **Archives of Dermatology**, v. 91, n. 5, p. 439, 1965.

COONS, A. H.; CREECH, H. J.; JONES, R. N. Immunological properties of an antibody containing a fluorescent Group. **Experimental Biology and Medicine**, v. 47, n. 2, p. 200–202, 1941.

COSSIO, A. et al. Diagnostic performance of a Recombinant Polymerase Amplification Test-Lateral Flow (RPA-LF) for cutaneous leishmaniasis in an endemic setting of Colombia. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 15, n. 4, p. e0009291, 2021.

COSTA-SILVA, M. F. et al. Gene expression profile of cytokines and chemokines in skin lesions from Brazilian Indians with localized cutaneous leishmaniasis. **Molecular Immunology**, v. 57, n. 2, p. 74–85, 2014.

- COSTA, J. M. et al. Disseminated cutaneous leishmaniasis in a field clinic in Bahia, Brazil: a report of eight cases. **The Journal of tropical medicine and hygiene**, v. 89, n. 6, p. 319–23, 1986.
- COSTA, L. E. et al. New serological tools for improved diagnosis of human tegumentary leishmaniasis. **Journal of Immunological Methods**, v. 434, p. 39–45, 2016.
- COTA, G. F. et al. The cure rate after placebo or no therapy in American Cutaneous Leishmaniasis: a systematic review and meta-analysis. **PLOS ONE**, v. 11, n. 2, p. e0149697, 2016.
- CUERVO, P. et al. Proteomic characterization of the released/secreted proteins of *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigotes. **Journal of proteomics**, v. 73, n. 1, p. 79–92, 2009.
- DA SILVA, A. C. T. et al. Species diversity causing human cutaneous leishmaniasis in Rio Branco, state of Acre, Brazil. **Tropical medicine & international health**, v. 11, n. 9, p. 1388–1398, 2006.
- DAPSON, R. W. Fixation for the 1990's: a Review of Needs and Accomplishments. **Biotechnic & Histochemistry**, v. 68, n. 2, p. 75–82, 1993.
- DE MELLO, C. X. et al. Comparison of the sensitivity of imprint and scraping techniques in the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis in a referral centre in Rio de Janeiro, Brazil. **Parasitology Research**, v. 109, n. 3, p. 927–933, 2011.
- DE MENDONÇA, S. C. F.; CYSNE-FINKELSTEIN, L.; MATOS, D. C. DE S. Kinetoplastid membrane protein-11 as a vaccine candidate and a virulence factor in *Leishmania*. **Frontiers in Immunology**, v. 6, n. 8, p. 1–6, 2015.
- DE SILVA, G. et al. Efficacy of a new rapid diagnostic test kit to diagnose Sri Lankan cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania donovani*. **PLoS ONE**, v. 12, n. 11, p. e0187024, 2017.
- DE SOUZA, L. M. B. et al. Analysis of *Leishmania* mimetic neoglycoproteins for the cutaneous leishmaniasis diagnosis. **Parasitology**, v. 145, n. 14, p. 1938–1948, 2018.
- DE SOUZA, L. M. B. et al. Production of a kinesin-related recombinant protein (Lbk39) from *Leishmania braziliensis* by *Leishmania tarentolae* promastigotes and its application in the serodiagnosis of leishmaniasis. **One Health**, v. 8, p. 100111, 2019.
- DEAN, A. G.; SULLIVAN, K. M.; SOE, M. M. OpenEpi: Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health [Software]. **Recuperado de**, 2015.
- DEGRAVE, W. et al. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania*--a mini-review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 89, n. 3, p. 463–469, 1994.

DOS SANTOS, I. B. et al. Higher sensitivity of immunohistochemistry for bona fide diagnosis of dog *Leishmania (Viannia) braziliensis*-driven American tegumentary leishmaniasis: description of an optimized immunohistochemistry method. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 109, n. 7, p. 469–476, 2015.

DOYLE, P. S.; DWYER, D. *Leishmania*: immunochemical comparison of the secretory (extracellular) acid phosphatases from various species. **Experimental parasitology**, v. 74, p. 435–444, 1993.

DUARTE, M. C. et al. Proteins selected in *Leishmania (Viannia) braziliensis* by an immunoproteomic approach with potential serodiagnosis applications for tegumentary leishmaniasis. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 22, n. 11, p. 1187–1196, 2015.

DUARTE, M. L.; ROCHAEL, M. C. Perfil histopatológico e imuno-histoquímico da leishmaniose tegumentar americana com ênfase nos dendrócitos dérmicos FXIIIa+. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 81, n. 6, p. 541–548, 2006.

EL-MANZALAWY, Y.; HONAVAR, V. Recent advances in B-cell epitope prediction methods. **Immunome research**, v. 6, n. 2, p. S2, 2010.

EL-MANZALAWY, Y.; DOBBS, D.; HONAVAR, V. Predicting linear B-cell epitopes using string kernels. **Journal of Molecular Recognition**, v. 21, n. 4, p. 243–255, 2008.

ELIAS, J. M.; MARGIOTTA, M.; GABORC, D. Sensitivity and Detection Efficiency of the Peroxidase Antiperoxidase (PAP), Avidin–Biotin Peroxidase Complex (ABC), and Peroxidase-Labeled Avidin–Biotin (LAB) Methods. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 92, n. 1, p. 62–67, 1989.

ELLIS, S. L.; SHAKARIAN, A. M.; DWYER, D. M. *Leishmania*: Amastigotes synthesize conserved secretory acid phosphatases during human infection. **Experimental Parasitology**, v. 89, n. 2, p. 161–168, 1998.

ENGEL, K. B.; MOORE, H. M. Effects of preanalytical variables on the detection of proteins by immunohistochemistry in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. **Archives of pathology & laboratory medicine**, v. 135, n. 5, p. 537–43, 2011.

ESPIR, T. et al. Evaluation of different diagnostic methods of American Cutaneous Leishmaniasis in the Brazilian Amazon. **Experimental Parasitology**, v. 167, p. 1–6, 2016.

EYZAGUIRRE, E.; HAQUE, A. K. Application of immunohistochemistry to infections. **Archives of pathology & laboratory medicine**, v. 132, n. 3, p. 424–31, 2008.

FABER, W. R. et al. Value of diagnostic techniques for cutaneous leishmaniasis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 49, n. 1, p. 70–74, 2003.

FERNANDES, A. C. S. et al. Different secreted phosphatase activities in *Leishmania amazonensis*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 340, n. 2, p. 117–128, 2013.

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

FLAHAULT, A.; CADILHAC, M.; THOMAS, G. Sample size calculation should be performed for design accuracy in diagnostic test studies. **Journal of Clinical Epidemiology**, v. 58, n. 8, p. 859–862, 2005.

FLOHÉ, L. et al. Tryparedoxin peroxidase of *Leishmania donovani*: Molecular cloning, heterologous expression, specificity, and catalytic mechanism. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 397, n. 2, p. 324–335, 2002.

FLOREZ, M. M. et al. Synthetic peptides derived from ribosomal proteins of *Leishmania* spp. in mucocutaneous leishmaniasis: Diagnostic usefulness. **Protein and Peptide Letters**, v. 24, n. 10, p. 982–988, 2017.

FOLLADOR, I. et al. Epidemiologic and immunologic findings for the subclinical form of *Leishmania braziliensis* infection. **Clinical infectious diseases**, v. 34, n. 11, p. E54-8, 2002.

FOX, C. H. et al. Formaldehyde fixation. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 33, n. 8, p. 845–853, 1985.

FULTON, K. M. et al. Methods and applications of serological proteome analysis. **Methods in Molecular Biology**, v. 1061, p. 97–112, 2013.

GALVÃO, C. E. et al. Disseminated cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania viannia braziliensis* in the state of Maranhao, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 26, n. 2, p. 121–123, 1993.

GARCIA, L. et al. Culture-Independent Species Typing of Neotropical *Leishmania* for Clinical Validation of a PCR-Based Assay Targeting Heat Shock Protein 70 Genes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 5, p. 2294–2297, 2004.

GOMES-SILVA, A. et al. Serological reactivity of different antigenic preparations of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and the *Leishmania braziliensis* complex TT. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**, v. 41, n. 2, p. 135–141, 2008.

GOMEZ-ARREAZA, A. et al. *Leishmania mexicana*: LACK (*Leishmania* homolog of receptors for activated C-kinase) is a plasminogen binding protein. **Experimental parasitology**, v. 127, n. 4, p. 752–761, 2011.

GONZALEZ-ASEGUINOLAZA, G. et al. Molecular cloning, cell localization and binding affinity to DNA replication proteins of the p36/LACK protective antigen from *Leishmania infantum*. **European journal of biochemistry**, v. 259, n. 3, p. 909–16, 1999.

GONZALEZ, K. et al. Performance of immunohistochemistry as a useful tool for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis in Panama, Central America. **Parasitology International**, v. 71, p. 46–52, 2019.

GRENFELL, R. F. Q. et al. Newly established monoclonal antibody diagnostic assays for *Schistosoma mansoni* direct detection in areas of low endemicity. **PLOS ONE**, v. 9, n. 1, p. e87777, 2014.

GUARÍN, N. et al. Comparative immunohistological analysis of the Montenegro skin test reaction in asymptomatic infection and in acute and chronic cutaneous leishmaniasis. **Biomédica**, 2006.

GUERRA, J. A. DE O. et al. Mucosal Leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Viannia) guyanensis* in the Brazilian Amazon. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 3, p. e980, 2011.

GUIMARAES, M. C. et al. Immunoenzymatic assay (ELISA) in mucocutaneous leishmaniasis, kala-azar, and Chagas' disease: an epimastigote *Trypanosoma cruzi* antigen able to distinguish between anti-*Trypanosoma* and anti-*Leishmania* antibodies. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 30, n. 5, p. 942–947, 1981.

GUTIERREZ, Y. et al. Correlation between histopathology, immune response, clinical presentation, and evolution in *Leishmania braziliensis* infection. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 45, n. 3, p. 281–289, 1991.

HARDER, S. et al. Expression of a mitochondrial peroxiredoxin prevents programmed cell death in *Leishmania donovani*. **Eukaryotic cell**, v. 5, n. 5, p. 861–70, 2006.

HARN, D. A.; MITSUYAMA, M.; DAVID, J. R. Anti-egg monoclonal antibodies protect against cercarial challenge in vivo. **The Journal of experimental medicine**, v. 154, n. 5, p. 1371–1387, 1984.

HIGGINS, J.; THOMAS, J. **Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions | Cochrane Training**, 2020. Disponível em: <<https://training.cochrane.org/handbook/current>>. Acesso em: 11 nov. 2020

HOFMAN, V. et al. Immunostaining of visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* using monoclonal antibody (19-11) to the *Leishmania* homologue of receptors for activated C-kinase. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 120, n. 4, p. 567–574, 2003.

HOLEC-GASIOR, L. Toxoplasma gondii recombinant antigens as tools for serodiagnosis of human toxoplasmosis: Current status of studies. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 20, n. 9, p. 1343–1351, 2013.

HSU, S. M.; RAINE, L.; FANGER, H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 29, n. 4, p. 577–580, 1981.

IRWIG, L. et al. Evidence base of clinical diagnosis: designing studies to ensure that estimates of test accuracy are transferable. **British Medical Journal**, v. 324, n. 7338, p. 669–671, 2002.

JARA, M. et al. Real-time PCR assay for detection and quantification of *Leishmania* (*Viannia*) organisms in skin and mucosal lesions: Exploratory study of parasite load and clinical parameters. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 6, p. 1826–1833, 2013.

JARDIM, A. et al. Isolation and structural characterization of the *Leishmania donovani* kinetoplastid membrane protein-11, a major immunoreactive membrane glycoprotein. **Biochemical Journal**, v. 305, n. 1, p. 307–313, 1995.

JENSEN, A. T. R. et al. Serodiagnosis of cutaneous leishmaniasis: Assessment of an enzyme-linked immunosorbent assay using a peptide sequence from gene B protein. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 55, n. 5, p. 490–495, 1996.

JENSEN, A. T. R. et al. Humoral and cellular immune responses to synthetic peptides of the *Leishmania donovani* kinetoplastid membrane protein-11. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 48, n. 1, p. 103–109, 1998.

JIRATA, D. et al. Identification, sequencing and expression of peroxidoxin genes from *Leishmania aethiopica*. **Acta Tropica**, v. 99, n. 1, p. 88–96, 2006.

KARIN, M.; CHANG, L. Mammalian MAP kinase signaling cascades. **Nature**, v. 410, p. 37–40, 2001.

KATAKURA, K.; KOBAYASHI, A. Acid phosphatase activity of virulent and avirulent clones of *Leishmania donovani* promastigotes. **Infection and immunity**, v. 56, n. 11, p. 2856–60, 1988.

KELLY, B. L.; STETSON, D. B.; LOCKSLEY, R. M. *Leishmania major* LACK Antigen Is Required for Efficient Vertebrate Parasitization. **Journal of Experimental Medicine**, v. 198, n. 11, p. 1689–1698, 2003.

KENNER, J. R. et al. Immunohistochemistry to identify *Leishmania* parasites in fixed tissues. **Journal of Cutaneous Pathology**, v. 26, n. 3, p. 130–136, 1999.

KENNETT, R. H. et al. Hybrid plasmacytoma production: fusions with adult spleen cells, monoclonal spleen fragments, neonatal spleen cells and human spleen cells. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 81, p. 77–91, 1979.

KOREVAAR, D. A. et al. Targeted test evaluation: a framework for designing diagnostic accuracy studies with clear study hypotheses. **Diagnostic and Prognostic Research**, v. 3, n. 1, p. 1–10, 2019.

LAEMMLI, U. Most commonly used discontinuous buffer system for SDS electrophoresis. **Nature**, v. 227, p. 680–686, 1970.

LAGE, D. P. et al. A biomarker for tegumentary and visceral leishmaniasis based on a recombinant *Leishmania* hypothetical protein. **Immunobiology**, v. 224, n. 4, p. 477–484, 2019.

LAND, K. J. et al. REASSURED diagnostics to inform disease control strategies, strengthen health systems and improve patient outcomes. **Nature Microbiology**, v. 4, n. 1, p. 46–54, 2019.

LAWN, S. D. et al. Diagnostic accuracy of a low-cost, urine antigen, point-of-care screening assay for HIV-associated pulmonary tuberculosis before antiretroviral therapy: A descriptive study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 12, n. 3, p. 201–209, 2012.

LEEFLANG, M. M. G.; ALLERBERGER, F. How to: evaluate a diagnostic test. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 25, n. 1, p. 54–59, 2019.

LEON, L. L. et al. Antigenic differences of *Leishmania amazonensis* isolates causing diffuse cutaneous leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 84, n. 5, p. 678–680, 1990.

LEVICK, M. P. et al. Identification and characterisation of a functional peroxidoxin from *Leishmania major*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 96, n. 1–2, p. 125–137, 1998.

LIANG, C. T. et al. A Non-biotin Polymerized Horseradish-peroxidase Method for the Immunohistochemical Diagnosis of Canine Distemper. **Journal of Comparative Pathology**, v. 136, n. 1, p. 57–64, 2007.

LIMA, M. P. et al. Evaluation of a hypothetical protein for serodiagnosis and as a potential marker for post-treatment serological evaluation of tegumentary leishmaniasis patients. **Parasitology Research**, v. 116, n. 4, p. 1197–1206, 2017.

LIMA, M. P. et al. Diagnostic application of recombinant *Leishmania* proteins and evaluation of their in vitro immunogenicity after stimulation of immune cells collected from tegumentary leishmaniasis patients and healthy individuals. **Cellular Immunology**, v. 334, p. 61–69, 2018.

LIN, F.; CHEN, Z. Standardization of Diagnostic Immunohistochemistry: Literature Review and Geisinger Experience. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 138, n. 12, p. 1564–1577, 2014.

LINK, J. S. et al. Synthetic Peptides as Potential Antigens for Cutaneous Leishmaniasis Diagnosis. **Journal of Immunology Research**, v. 2017, p. 5871043, 2017.

LIVNI, N. et al. Immunoperoxidase method of identification of *Leishmania* in routinely prepared histological sections. **Virchows Archiv A Pathological Anatomy and Histopathology**, v. 401, n. 2, p. 147–151, 1983.

LOBATO, I. M.; O’SULLIVAN, C. K. Recombinase polymerase amplification: Basics, applications and recent advances. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 98, p. 19–35, 2018.

LONGONI, S. S.; MARIN, C.; SANCHEZ-MORENO, M. Excreted *Leishmania peruviana* and *Leishmania amazonensis* iron-superoxide dismutase purification: Specific antibody detection in Colombian patients with cutaneous leishmaniasis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 69, p. 26–34, abr. 2014.

LORENZETTI, D. L.; GHALI, W. A. Reference management software for systematic reviews and meta-analyses: An exploration of usage and usability. **BMC Medical Research Methodology**, v. 13, n. 1, p. 141, 2013.

LUNEDO, S. N. et al. Immunocytochemical and immunohistochemical methods as auxiliary techniques for histopathological diagnosis of cutaneous leishmaniasis. **Acta Histochemica**, v. 114, n. 3, p. 252–258, 2012.

LUZ, Z. M. P. et al. Lesion aspirate culture for the diagnosis and isolation of *Leishmania* spp. from patients with cutaneous leishmaniasis. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 1, p. 62–66, 2009.

LYNCH, N. R. et al. In situ detection of amastigotes in American cutaneous leishmaniasis, using monoclonal antibodies. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 80, n. 1, p. 6–9, 1986.

MAALEJ, I. A. et al. Comparative evaluation of ELISAs based on ten recombinant or purified *Leishmania* antigens for the serodiagnosis of Mediterranean visceral leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 68, n. 3, p. 312–320, 2003.

MABEY, D. et al. Diagnostics for the developing world. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 3, p. 231–240, 2004.

MAGALHÃES, A. V. et al. 1.Histopatologia da leishmaniose tegumentar por *Leishmania braziliensis braziliensis*: 1. Padrões histopatológicos e estudo evolutivo das lesões. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 28, n. 4, p. 253–262, 1986a.

MAGALHÃES, A. V. et al. 4.Histopatologia da leishmaniose tegumentar por *Leishmania braziliensis braziliensis*: 4. Classificação histopatológica. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 28, n. 6, p. 421–430, 1986b.

MARIN, C. et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for superoxide dismutase-excreted antigen in diagnosis of sylvatic and andean cutaneous leishmaniasis of Peru. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 80, n. 1, p. 55–60, 2009.

MARQUES, F. A. et al. Effectiveness of an immunohistochemical protocol for *Leishmania* detection in different clinical forms of American tegumentary leishmaniasis. **Parasitology International**, v. 66, n. 1, p. 884–888, 2017.

MARZOCHI, M. C. DE A.; MARZOCHI, K. B. F. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil: emerging anthroponosis and possibilities for their control. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 10, n. 2, p. S359–S375, 1994.

- MASON, J. T.; O'LEARY, T. J. Effects of formaldehyde fixation on protein secondary structure: a calorimetric and infrared spectroscopic investigation. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 39, n. 2, p. 225–229, 1991.
- MATOS, D. C. S. et al. Kinetoplastid membrane protein-11 is present in promastigotes and amastigotes of *Leishmania amazonensis* and its surface expression increases during metacyclogenesis. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 3, p. 341–347, 2010.
- MCINNES, M. D. F. et al. Preferred Reporting Items for a Systematic Review and Meta-analysis of Diagnostic Test Accuracy Studies The PRISMA-DTA Statement. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, v. 319, n. 4, p. 388–396, 2018.
- MENEZES-SOUZA, D. et al. Mapping B-cell epitopes for the peroxidoxin of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and its potential for the clinical diagnosis of tegumentary and visceral leishmaniasis. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, p. e99216, 2014a.
- MENEZES-SOUZA, D. et al. Epitope mapping of the HSP83.1 protein of *Leishmania braziliensis* discloses novel targets for immunodiagnosis of tegumentary and visceral clinical forms of leishmaniasis. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 21, n. 7, p. 949–959, 2014b.
- MENEZES-SOUZA, D. et al. Linear B-cell epitope mapping of MAPK3 and MAPK4 from *Leishmania braziliensis*: implications for the serodiagnosis of human and canine leishmaniasis. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 3, p. 1323–1336, 2015a.
- MENEZES-SOUZA, D. et al. Improving Serodiagnosis of Human and Canine Leishmaniasis with Recombinant *Leishmania braziliensis* Cathepsin L-like Protein and a Synthetic Peptide Containing Its Linear B-cell Epitope. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 1, p. e3426, 2015b.
- MIGHELL, A.; HUME, W.; ROBINSON, P. An overview of the complexities and subtleties of immunohistochemistry. **Oral Diseases**, v. 4, n. 3, p. 217–223, 2008.
- MONTENEGRO, J. Cutaneous Reaction in Leishmaniasis. **Archives of Dermatology**, v. 13, n. 2, p. 187, 1926.
- MONTOYA, Y. et al. Recombinant antigens for specific and sensitive serodiagnosis of Latin American tegumentary leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 91, n. 6, p. 674–676, 1997.
- MOUGNEAU, E. et al. Expression cloning of a protective *Leishmania* antigen. **Science**, v. 268, n. 5210, p. 563–566, 1995.
- NAIFF, R. D.; TALHARI, S.; BARRETT, T. V. Isolation of *Leishmania guyanensis* from lesions of the nasal mucosa. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 83, n. 4, p. 529–530, 1988.
- NICOLIS, G. D. et al. A clinical and histological study of cutaneous leishmaniasis. **Acta**

**dermato-venereologica**, v. 58, n. 6, p. 521–5, 1978.

NOTOMI, T. et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 12, p. 63e – 63, 2000.

NOVOA, R. et al. IL-17 and Regulatory Cytokines (IL-10 and IL-27) in *L. braziliensis* Infection. **Parasite immunology**, v. 33, n. 2, p. 132–136, 2011.

NOYA, O. et al. Immunodiagnosis of Parasitic Diseases with Synthetic Peptides. **Current Protein & Peptide Science**, v. 4, n. 4, p. 299–308, 2003.

OLIVEIRA, D. M. DE et al. Comparison of different primers for PCR-based diagnosis of cutaneous leishmaniasis. **The Brazilian journal of infectious diseases**, v. 15, n. 3, p. 204–210, 2011.

OLIVEIRA, D. S. DE. **Aplicabilidade de testes sorológicos para diagnóstico da forma mucosa da leishmaniose tegumentar**. Belo Horizonte: Instituto René Rachou, 2018.

OUZZANI, M. et al. Rayyan-a web and mobile app for systematic reviews. **Systematic Reviews**, v. 5, n. 1, p. 1–10, 2016.

PADILLA, C.; MONTOYA, Y. Caracterización e inmunoreactividad de la proteína ácida ribosomal P2 $\beta$  de *L. (V.) braziliensis*. **Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica**, v. 20, n. 2, p. 92–96, 2003.

PAGHEH, A. et al. An improved microculture method for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. **Journal of parasitic diseases : official organ of the Indian Society for Parasitology**, v. 38, n. 4, p. 347–351, 2014.

PAHO. **Plan of Action to Strengthen the Surveillance and Control of Leishmaniasis in the Americas 2017-2022**, 2017. Disponível em:

<<https://iris.paho.org/handle/10665.2/34144>>. Acesso em: 9 mar. 2021

PAHO. **Neglected Infectious Diseases (NID)**, 2019. Disponível em:

<<https://www.paho.org/salud-en-las-americas-2017/?p=1244>>

PAHO. LEISHMANIOSES: Informe epidemiológico das Américas. 2020.

PAI, N. P. et al. Rapid point-of-care HIV testing in pregnant women: a systematic review and meta-analysis. **Tropical Medicine & International Health**, v. 12, n. 2, p. 162–173, 2007.

PARMLEY, S. F.; SMITH, G. P. Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes. **Gene**, v. 73, n. 2, p. 305–318, 1988.

PASSOS, S. et al. Recombinant *Leishmania* antigens for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 12, n. 10, p. 1164–

1167, 2005.

PASSOS, V. M. et al. Natural infection of a domestic cat (*Felis domesticus*) with *Leishmania (Viannia)* in the metropolitan region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 91, n. 1, p. 19–20, 1996.

PETERS, B. et al. The design and implementation of the immune epitope database and analysis resource. **Immunogenetics**, v. 57, n. 5, p. 326–336, 2005.

PETROSYAN, H. A. et al. Neutralization of inhibitory molecule NG2 improves synaptic transmission, retrograde transport, and locomotor function after spinal cord injury in adult rats. **Journal of Neuroscience**, v. 33, n. 9, p. 4032–4043, 2013.

PIRMEZ, C. et al. Use of PCR in diagnosis of human american tegumentary leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of clinical microbiology**, v. 37, n. 6, p. 1819–1823, 1999.

POURMOHAMMADI, B. et al. Comparison of three methods for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. **Iranian journal of parasitology**, v. 5, n. 4, p. 1–8, 2010.

POYER, S. et al. Availability and price of malaria rapid diagnostic tests in the public and private health sectors in 2011: results from 10 nationally representative cross-sectional retail surveys. **Tropical Medicine & International Health**, v. 20, n. 6, p. 744–756, 2015.

QUARESMA, P. F. et al. Distinct genetic profiles of *Leishmania (Viannia) braziliensis* associate with clinical variations in cutaneous-leishmaniasis patients from an endemic area in Brazil. **Parasitology**, v. 145, n. 9, p. 1161–1169, 2018.

QUINTELLA, L. P. et al. Immunoperoxidase technique using an anti-*Leishmania (L. ) chagasi* hyperimmune serum in the diagnosis of culture-confirmed American tegumentary leishmaniasis. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 51, n. 2, p. 83–86, 2009.

RAMIREZ, J. R. et al. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis in Colombia: the sampling site within lesions influences the sensitivity of parasitologic diagnosis. **Journal of clinical microbiology**, v. 38, n. 10, p. 3768–3773, 2000.

RAMÍREZ, J. R. et al. Molecular and Antigenic Characterization of the *Leishmania (Viannia) panamensis* Kinetoplastid Membrane Protein-11. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, n. 2, p. 247–254, 1998.

RAMOS-VARA, J. A. Technical Aspects of Immunohistochemistry. **Veterinary Pathology**, v. 42, n. 4, p. 405–426, 2005.

RAMOS-VARA, J. A. et al. Suggested Guidelines for Immunohistochemical Techniques in Veterinary Diagnostic Laboratories. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 20, n. 4, p. 393–413, 2008.

REIS, L. DE C. et al. Clinical, epidemiological and laboratory aspects of patients with American cutaneous leishmaniasis in the State of Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 5, p. 439–443, 2008.

RIDLEY, D. S. et al. A histological classification of mucocutaneous leishmaniasis in Brazil and its clinical evaluation. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 74, n. 4, p. 508–514, 1980.

RODRIGUES, E. H. G. et al. Evaluation of PCR for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis in an area of endemicity in northeastern Brazil. **Journal of clinical microbiology**, v. 40, n. 10, p. 3572–3576, 2002.

RODRÍGUEZ-CORTÉS, A. et al. Vaccination with plasmid DNA encoding KMPII, TRYP, LACK and GP63 does not protect dogs against *Leishmania infantum* experimental challenge. **Vaccine**, v. 25, n. 46, p. 7962–7971, 2007.

ROJAS-JAIMES, J. et al. *Leishmania* species in biopsies of patients with different clinical manifestations identified by high resolution melting and nested PCR in Endemic district in Peru. **Parasite Epidemiology and Control**, v. 4, p. e00095, 1 fev. 2019.

ROMERO, G. A. . et al. Sensitivity of the polymerase chain reaction for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) guyanensis*. **Acta Tropica**, v. 79, n. 3, p. 225–229, 2001.

SABATTINI, E. et al. The EnVision++ system: a new immunohistochemical method for diagnostics and research. Critical comparison with the APAAP, ChemMate, CSA, LABC, and SABC techniques. **Journal of Clinical Pathology**, v. 51, n. 7, p. 506–511, 1998.

SALDARRIAGA, O. A. et al. An Innovative Field-Applicable Molecular Test to Diagnose Cutaneous *Leishmania Viannia* spp. Infections. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 4, p. e0004638, 2016.

SALINAS, G. et al. Detección de amastigotas en Leishmaniasis cutánea y mucocutánea por el método de inmunoperoxidasa, usando anticuerpo policlonal: sensibilidad y especificidad comparadas con métodos convencionales de diagnóstico. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 84, n. 1, p. 53–60, 1989.

SALLES, B. C. S. et al. 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**, v. 224, n. 1, p. 163–171, 2019.

SALOTRA, P. et al. Parasite detection in patients with post kala-azar dermal leishmaniasis in India: A comparison between molecular and immunological methods. **Journal of Clinical Pathology**, v. 56, n. 11, p. 840–843, 2003.

SANTOS, C. DA S.; BRODSKYN, C. I. The role of CD4 and CD8 T cells in human

cutaneous leishmaniasis. **Frontiers in Public Health**, v. 2, p. 165, 2014.

SANTOS, D. M. et al. Towards development of novel immunization strategies against leishmaniasis using PLGA nanoparticles loaded with kinetoplastid membrane protein-11. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, p. 2115–2127, 2012.

SASSI, A. et al. Leishmanin skin test lymphoproliferative responses and cytokine production after symptomatic or asymptomatic *Leishmania major* infection in Tunisia. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 116, n. 1, p. 127–132, 1999.

SATO, C. M. et al. Use of recombinant antigens for sensitive serodiagnosis of American tegumentary leishmaniasis caused by different leishmania species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 55, n. 2, p. 495–503, 2017.

SCHALLIG, H. D. F. H. et al. Evaluation of point of care tests for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis in Suriname. **BMC infectious diseases**, v. 19, n. 1, p. 25, 2019.

SCHÖNIAN, G. et al. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 47, n. 1, p. 349–358, 2003.

SCHUBACH, A. et al. Leishmanial antigens in the diagnosis of active lesions and ancient scars of American tegumentary leishmaniasis patients. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 7, p. 987–996, 2001.

SELLS, P. G.; BURTON, M. Identification of *Leishmania* amastigotes and their antigens in formalin fixed tissue by immunoperoxidase staining. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 75, n. 3, p. 461–468, 1981.

SEVILHA-SANTOS, L. et al. Accuracy of qPCR for quantifying *Leishmania* kDNA in different skin layers of patients with American tegumentary leishmaniasis. **Clinical microbiology and infection**, v. 25, n. 2, p. 242–247, 2019.

SHAKARIAN, A. M. et al. Two tandemly arrayed genes encode the (histidine) secretory acid phosphatases of *Leishmania donovani*. **Gene**, v. 196, n. 1–2, p. 127–137, 1997.

SHAKARIAN, A. M. et al. Members of a unique histidine acid phosphatase family are conserved amongst a group of primitive eukaryotic human pathogens. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 245, n. 1–2, p. 31–41, 2003.

SHI, S. R.; KEY, M. E.; KALRA, K. L. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 39, n. 6, p. 741–748, 1991.

SHIRIAN, S. et al. Comparison of conventional, molecular, and immunohistochemical methods in diagnosis of typical and atypical cutaneous leishmaniasis. **Archives of Pathology**

and **Laboratory Medicine**, v. 138, n. 2, p. 235–240, 2014.

SILVEIRA, F. T. et al. An outbreak of cutaneous leishmaniasis among soldiers in Belém, Pará State, Brazil, caused by *Leishmania (Viannia) lindenbergi* n. sp. A new leishmanial parasite of man in the Amazon region. **Parasite**, v. 9, n. 1, p. 43–50, 2002.

SILVEIRA, F. T. et al. Immunopathogenic competences of *Leishmania (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 31, n. 8, p. 423–431, 2009.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; CORBETT, C. E. P. Clinical and immunopathological spectrum of american cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil - A review. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 3, p. 239–251, 2004.

SILVERMAN, J. M. et al. An exosome-based secretion pathway is responsible for protein export from *Leishmania* and communication with macrophages. **Journal of Cell Science**, v. 123, n. 6, p. 842–852, 2010.

SKALAND, I. et al. Evaluation of 5 different labeled polymer immunohistochemical detection systems. **Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology**, v. 18, n. 1, p. 90–96, 2010.

SKRABA, C. M. et al. Diagnosis of American cutaneous leishmaniasis by enzyme immunoassay using membrane antigens of *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 78, n. 4, p. 411–417, 2014.

SMITH, G. P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. **Science**, v. 228, n. 4705, p. 1315–1317, 1985.

SOTO, M. et al. Specific serodiagnosis of human leishmaniasis with recombinant *Leishmania* P2 acidic ribosomal proteins. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 3, n. 4, p. 387–391, 1996.

SOULAT, D.; BOGDAN, C. Function of Macrophage and Parasite Phosphatases in Leishmaniasis. **Frontiers in immunology**, v. 8, p. 1838, 2017.

SOUZA, A. P. et al. Towards a More Precise Serological Diagnosis of Human Tegumentary Leishmaniasis Using *Leishmania* Recombinant Proteins. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, p. e66110, 2013.

STEBECK, C. E. et al. Kinetoplastid membrane protein-11 (KMP-11) is differentially expressed during the life cycle of African trypanosomes and is found in a wide variety of kinetoplastid parasites. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 71, n. 1, p. 1–13, 1995.

SUÁREZ, M. et al. Quantification of *Leishmania (Viannia)* Kinetoplast DNA in Ulcers of Cutaneous Leishmaniasis Reveals Inter-site and Inter-sampling Variability in Parasite Load.

**PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 7, p. e0003936, 2015.

TABATABAIE, F. et al. Th1 Platform Immune Responses Against *Leishmania major* Induced by Thiol-Specific Antioxidant-Based DNA Vaccines. **Jundishapur journal of microbiology**, v. 7, n. 2, p. e8974, 2014.

TAYLOR, C. R. et al. Techniques of Immunohistochemistry: Principles, Pitfalls and Standardization. In: **Diagnostic Immunohistochemistry**. [s.l.] Elsevier, 2006. p. 1–42.

THOMAZ, C. et al. Comparison of parasite load by qPCR and histopathological changes of inner and outer edge of ulcerated cutaneous lesions of cutaneous leishmaniasis. **PLoS ONE**, v. 16, p. 1–15, 2021.

TIRELLI, F. et al. Final diagnosis of 86 cases included in differential diagnosis of American tegumentary leishmaniasis in a Brazilian sample: a retrospective cross-sectional study. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 92, n. 5, p. 642–648, 2017.

TODOLÍ, F. et al. Seroreactivity against raw insect-derived recombinant KMPII, TRYP, and LACK *Leishmania infantum* proteins in infected dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 164, n. 2–4, p. 154–161, 2009.

TOLEDO, A. C. et al. Assessment of the quality of life of patients with cutaneous leishmaniasis in Belo Horizonte, Brazil, 2009-2010. A pilot study. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 107, n. 5, p. 335–336, 2013.

TOLSON, D. L. et al. The kinetoplastid membrane protein 11 of *Leishmania donovani* and African trypanosomes is a potent stimulator of T-lymphocyte proliferation. **Infection and immunity**, v. 62, n. 11, p. 4893–9, 1994.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 76, n. 9, p. 4350–4, 1979.

TUCKER, J. D. et al. Accelerating worldwide syphilis screening through rapid testing: a systematic review. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 10, n. 6, p. 381–386, 2010.

TURETZ, M. L. et al. Disseminated Leishmaniasis: A New and Emerging Form of Leishmaniasis Observed in Northeastern Brazil. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 186, n. 12, p. 1829–1834, 2002.

VAN EYS, G. J. J. M. et al. Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of *Leishmania* parasites. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 51, n. 1, p. 133–142, 1992.

VIDIGAL, C. DE P. et al. Enzyme immunoassay using *Leishmania (Viannia) braziliensis* antigens for laboratorial diagnosis of American cutaneous leishmaniasis. **Acta Tropica**, v.

107, n. 2, p. 208–212, 2008.

VINK, M. M. T. et al. Evaluation of point-of-care tests for cutaneous leishmaniasis diagnosis in Kabul, Afghanistan. **EBioMedicine**, v. 37, p. 453–460, 2018.

VOSSE, B. A. H. et al. Background staining of visualization systems in immunohistochemistry: Comparison of the avidin-biotin complex system and the EnVision+ system. **Applied Immunohistochemistry and Molecular Morphology**, v. 15, n. 1, p. 103–107, 2007.

WANG, Q. et al. LmxMPK4, a mitogen-activated protein (MAP) kinase homologue essential for promastigotes and amastigotes of *Leishmania mexicana*. **Kinetoplastid Biology and Disease**, v. 4, p. 1–9, 2005.

WEBB, J. R. et al. Human and murine immune responses to a novel *Leishmania major* recombinant protein encoded by members of a multicopy gene family. **Infection and immunity**, v. 66, n. 7, p. 3279–89, 1998.

WEIGLE, K. A. et al. Diagnosis of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Colombia: a comparison of seven methods. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 36, n. 3, p. 489–496, 1987.

WERNER, M.; WASIELEWSKI, R.; KOMMINOTH, P. Antigen retrieval, signal amplification and intensification in immunohistochemistry. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 105, n. 4, p. 253–260, 1996.

WHITING, P. F. et al. Quadas-2: A revised tool for the quality assessment of diagnostic accuracy studies. **Annals of Internal Medicine**, v. 155, n. 8, p. 529–536, 2011.

WHO. **Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases: First WHO report on Neglected Tropical Diseases**, 2010. Disponível em: <[https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44440/9789241564090\\_eng.pdf](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44440/9789241564090_eng.pdf)>

WHO. **Regional Strategic Framework for Elimination of Kala-azar from the South-East Asia Region**, 2012. Disponível em: <[http://www.searo.who.int/entity/world\\_health\\_day/2014/KA\\_CD239.pdf](http://www.searo.who.int/entity/world_health_day/2014/KA_CD239.pdf)>. Acesso em: 28 set. 2018

WHO. Global leishmaniasis surveillance, 2017–2018, and first report on 5 additional indicators. **Weekly epidemiological record**, v. 95, n. 25, p. 265–280, 2020.

WHO. **Leishmaniasis**. Disponível em: <[https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab_1)>. Acesso em: 10 maio. 2021.

WIESE, M. A mitogen-activated protein (MAP) kinase homologue of *Leishmania mexicana* is essential for parasite survival in the infected host. **EMBO Journal**, v. 17, n. 9, p. 2619–2628, 1998.

WINGFIELD, P. T. Overview of the purification of recombinant proteins. **Current Protocols in Protein Science**, v. 2015, p. 6.1.1-6.1.35, 2015.

YEGANEH, F. et al. Cloning and expression of *Leishmania major* superoxide dismutase b1: A potential target antigen for serodiagnosis of leishmaniasis. **Iranian Journal of Immunology**, v. 6, n. 3, p. 130–140, 2009.

ZURITA, A. et al. Cloning and characterization of the *Leishmania (viannia) braziliensis* HSP70 gene. Diagnostic use of the C-terminal fragment rlb70(513-663). **Journal of Parasitology**, v. 89, n. 2, p. 372–378, 2003.

**APÊNDICE 1**

**Título:** *Potential antigenic targets used in immunological tests for diagnosis of tegumentary leishmaniasis: A systematic review*

**Revista:** Plos one (Fator de Impacto: 3.2)

**Status:** Artigo publicado

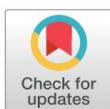
## RESEARCH ARTICLE

# Potential antigenic targets used in immunological tests for diagnosis of tegumentary leishmaniasis: A systematic review

Mariana Lourenço Freire <sup>\*</sup>, Felipe Dutra Rêgo <sup>○</sup>, Gláucia Cota <sup>○</sup>, Marcelo Antônio Pascoal-Xavier, Edward Oliveira

Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

\* marianalfreire@hotmail.com



## OPEN ACCESS

**Citation:** Freire ML, Rêgo FD, Cota G, Pascoal-Xavier MA, Oliveira E (2021) Potential antigenic targets used in immunological tests for diagnosis of tegumentary leishmaniasis: A systematic review. PLoS ONE 16(5): e0251956. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0251956>

**Editor:** Albert Schriefer, Universidade Federal da Bahia, BRAZIL

**Received:** January 6, 2021

**Accepted:** May 6, 2021

**Published:** May 27, 2021

**Copyright:** © 2021 Freire et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the manuscript and its [Supporting information files](#).

**Funding:** Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, grant number 301159/2016-5 to Edward Oliveira Conselho. Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, grant number 301384/2019-3 to Gláucia Cota. Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, grant number Finance Code 001 to Mariana Lourenço Freire. Conselho Nacional de

## Abstract

Immunological tests may represent valuable tools for the diagnosis of human tegumentary leishmaniasis (TL) due to their simple execution, less invasive nature and potential use as a point-of-care test. Indeed, several antigenic targets have been used with the aim of improving the restricted scenario for TL-diagnosis. We performed a worldwide systematic review to identify antigenic targets that have been evaluated for the main clinical forms of TL, such as cutaneous (CL) and mucosal (ML) leishmaniasis. Included were original studies evaluating the sensitivity and specificity of immunological tests for human-TL, CL and/or ML diagnosis using purified or recombinant proteins, synthetic peptides or polyclonal or monoclonal antibodies to detect *Leishmania*-specific antibodies or antigens. The review methodology followed PRISMA guidelines and all selected studies were evaluated in accordance with QUADAS-2. Thirty-eight original studies from four databases fulfilled the selection criteria. A total of 79 antigens were evaluated for the detection of antibodies as a diagnostic for TL, CL and/or ML by ELISA. Furthermore, three antibodies were evaluated for the detection of antigen by immunochromatographic test (ICT) and immunohistochemistry (IHC) for CL-diagnosis. Several antigenic targets showed 100% of sensitivity and specificity, suggesting potential use for TL-diagnosis in its different clinical manifestations. However, a high number of proof-of-concept studies reinforce the need for further analysis aimed at verifying true diagnostic accuracy in clinical practice.

## Introduction

Tegumentary Leishmaniasis (TL) is a neglected tropical disease caused by different species of the genus *Leishmania* (Kinetoplastea: Trypanosomatidae), transmitted to vertebrate hosts by sand flies (Diptera: Psychodidae) [1]. TL is considered an emergent and re-emergent disease, since a worrisome increase in its incidence has been reported [1]. On a global scale, the number of new autochthonous TL cases reported annually to the World Health Organization

Desenvolvimento Científico e Tecnológico, grant number 155839/2018-7 to Felipe Dutra Rêgo.

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

(WHO) increased from 71,486 to 251,553 during 1998 to 2018 [2]. Several factors are involved with the spread of TL, such as human migration from rural to urban areas, conflicts and wars, disturbances in microenvironments due to climate change and human intervention and deterioration of socioeconomic conditions in endemic countries [3].

TL comprises a broad spectrum of clinical manifestations ranging from single or multiple ulcerative skin lesions (cutaneous leishmaniasis—CL), to diffuse (diffuse leishmaniasis—DL) and mucosal (mucosal leishmaniasis—ML) lesions, with the last two being typical in the Americas. TL is associated with physical deformities and psychological alterations, affecting the health and wellness of the patient [4, 5].

The range of clinical manifestations can hinder rapid and accurate diagnoses, a key step to initiate treatment promptly and control the disease. Although several advances, TL-diagnosis remains based on the triad of epidemiological background, clinical signs and laboratory diagnosis, including direct and histopathological examination of skin biopsy and molecular detection of *Leishmania* DNA. Despite high specificity, low sensitivities have been described for direct and histopathological examination, especially in New World countries, where chronic cases and ML are frequent [6–9]. Molecular techniques are complex, expensive, still without a standardized protocol for routine use and are restricted to reference and research centers. Therefore, these limitations make the TL-diagnosis scenario restricted, particularly in resource limited settings [10–12].

In this sense, immunological tests may present remarkable advantages for TL-diagnosis, due to the use of less invasive sampling compared to skin biopsy and their potential to be automated, quantitative and used as point-of-care tests. The anti-*Leishmania* delayed-type hypersensitivity reaction, known as the Montenegro skin test (MST), has been the most used immunological test for CL-diagnosis in Brazil, even though it presents significant limitations such as positive results associated with previous leishmaniasis or asymptomatic infections [13, 14]. Nonetheless, the production of the MST antigen was discontinued in Brazil, hampering even more CL-diagnosis in the country [15]. Other immunological tests, mainly Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), have presenting promising results in the Americas and beyond [7].

Several studies using soluble *Leishmania* antigen (SLA) in ELISA for TL-diagnosis, have presented variable sensitivity especially due to antigen preparation and antigenic differences among *Leishmania* isolates and species. Moreover, reduced specificity due to the cross-reactivity with other infectious diseases has been frequently reported [16–18]. Since CL-patients commonly produce low levels of anti-*Leishmania* antibodies, there is growing interest in high sensitivity antigens for immunological tests. Different methodologies have been employed, such as bioinformatics tools [19–23], cDNA expression library [24], phage display [25, 26], immunoproteomic approach [18, 27–32] and isolation and purification of glycoconjugates [33, 34] to identify potential antigens. Furthermore, immunological tools have already been used to detect *Leishmania* antigens using monoclonal and polyclonal antibodies by immunochromatographic test (ICT) or immunohistochemistry (IHC), such as the CL Detect Rapid Test (InBios International Inc., Seattle, WA, USA), which detects peroxidoxin from *Leishmania* and has been used especially in Old World countries, with limited sensitivity [35, 36].

In this sense, we consider immunodiagnosis as potential tools to increase the access and improve TL-diagnosis. Although systematic reviews have been conducted on some aspects of this form of diagnosis, it is essential to identify potential antigenic targets that have been evaluated as TL-immunodiagnostic, point out knowledge gaps that still remain and encourage other studies to allow its application in clinical practice [37, 38]. In this way, we performed a worldwide systematic review to identify potential antigenic targets, with reported sensitivity and specificity, used as TL-immunodiagnostic.

## Material and methods

### Protocol and registration

The review protocol was registered in the International Prospective Record of Systematic Reviews (PROSPERO: CRD42020213311) and was developed based on the Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Diagnostic Test Accuracy [39]. This review followed the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) (S1 Table) [40].

### Information sources and study selection

Structured searches were conducted in the following databases: MEDLINE, Virtual Health Library, Embase and Cochrane. A comprehensive list of key terms including tegumentary leishmaniasis and its different clinical forms AND immunological diagnosis or targets (antigens and antibodies) AND techniques or outcomes (sensitivity and specificity), was constructed in MEDLINE (S1 Fig). Similar searches were adapted to each database. Complementary searches were performed by analysis of reference lists of selected articles. Searches were performed on 23<sup>rd</sup> March 2020, without restriction of publication date.

### Inclusion and exclusion criteria

Original research articles reporting on the performance (sensitivity and specificity) of immunological tests based on the detection of antibodies or antigens using purified or recombinant proteins, synthetic peptides or polyclonal or monoclonal antibodies for diagnosis of human-TL, CL or ML were included. Exclusion criteria were: evaluation of serological tests based on SLA; only non-human samples were tested (e.g. canine samples); both sensitivity and specificity of the immunological tests were not presented or were impossible to be calculated; less than five samples were tested; the absence of information about the reference test and a non-specific *Leishmania* antigen was used.

### Selection process

For each database, all publications were retrieved and duplicate citations were excluded by EndNote software [41]. Based on the inclusion and exclusion criteria, two independent reviewers analyzed each publication by title and abstract using Rayyan software [42]. Articles with no reason for rejection were included for full text reading. All discrepancies were solved by consensus after discussion. Selected studies were read in full to confirm their eligibility, to extract data or to exclude if exclusion criteria were identified during this step.

### Data extraction

Data were independently extracted by two researchers (MLF and FDR) directly from full-length articles and were checked by a third researcher (EO). In case of disagreements, the final decision was reached by consensus. In this study, data were extracted and a 2x2 contingency table set up for immunological tests, containing the true positives, false positives, true negatives and false negatives. Furthermore, the following items were extracted: origin of the participants; the immunological test used; antigen or antibody types; *Leishmania* species and reference standard test used for disease confirmation. The phase of development of each study was classified according to Leeflang & Allerberger (2019) [43].

### Study quality assessment

The quality of the studies was assessed using the second version of Quality Assessment of Studies of Diagnostic Accuracy Approach (QUADAS-2) [44]. This tool allows a more transparent rating of risk of bias for studies included in systematic reviews on diagnostic accuracy.

### Data synthesis

The performance of antigenic targets was presented in four groups according immunological tests and clinical form: 1) ELISA for TL; 2) ELISA for CL; 3) Other immunological tests for CL and 4) ELISA for ML. The performance outcomes for each antigen or antibody were sensitivity (probability of a positive test among cases or disease confirmed individuals) and specificity (probability of a negative test among controls or individuals without disease). Forest plots showing sensitivity and specificity values of all antigens, including 95% confidence intervals (CI) and Summary Receiver Operating Characteristic (SROC) curves were created using RevMan 5.3.

Several studies considered a set of results for the same antigen (e.g. different cut-off points were available or different non-case groups were used in the analysis, such as healthy patients and those with other diseases). If possible, these results were grouped and only one sensitivity rate and one specificity rate including all evaluated patients. When impossible, we chose to present data that reflect the best field conditions (e.g. non-case group of patients with other diseases) or the better performance (e.g. cut-off point with best performance).

## Results

### Literature search

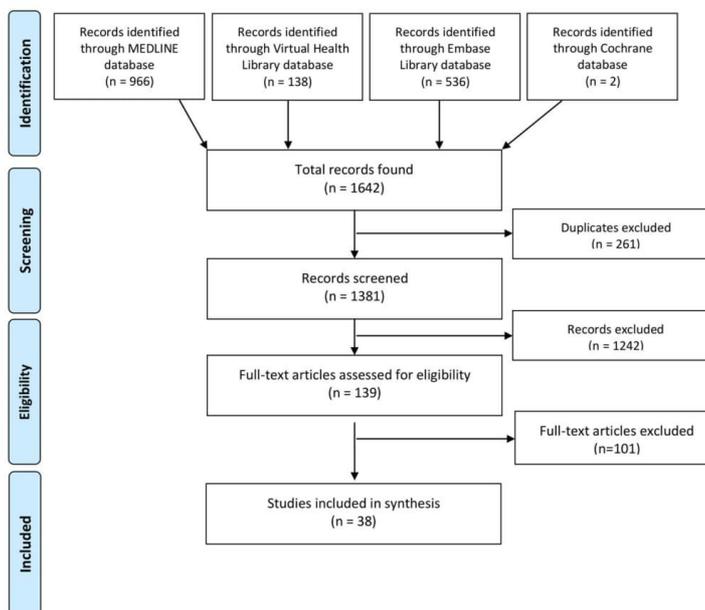
A total of 1642 articles from four databases were initially identified. Of this total, 261 were excluded due to duplicity (the same study was found in different databases). The title and abstract of each of the 1381 articles were checked and 139 were selected for full text reading. Finally, 98 articles presented exclusion criteria and so 38 were included (Fig 1).

### Descriptive analysis of included studies

The characteristics of all included studies are presented in Table 1. In several studies, test performance was analyzed according to the clinical form (CL and ML) or globally (TL). In 19 studies, the antigenic targets were evaluated for TL-diagnosis, in 21 for CL and in 9 for ML. Sample size ranged from 26 to 500 patients. A total of three different immunological tests using purified or recombinant proteins, synthetic peptides or polyclonal or monoclonal antibodies were reported: ELISA, ICT and IHC. Different reference standard tests were used to confirm leishmaniasis cases. Thirty-one studies (81.6%) considered at least one parasitological method as a reference standard test, such as microscopy examination or *in vitro* culture for isolation of the parasite. On the other hand, seven studies (18.4%) considered some immunological or molecular tests as a reference standard. A total of 89.5% (34 out of 38) of the studies was classified as phase I (proof-of-concept), and the remaining 10.5% (4 out of 38) was classified as phase III.

### ELISA for TL diagnosis

Nineteen studies used ELISA to evaluate the performance of a total of 56 antigens for TL-diagnosis, without specification of the clinical form (CL or ML). These studies evaluated 38 recombinant proteins, 14 synthetic peptides and 4 purified proteins. Forty-seven antigens were evaluated in studies that considered at least one parasitological method, such as microscopy



**Fig 1. Flow diagram illustrating the study selection process according to PRISMA.**

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0251956.g001>

examination or *in vitro* culture isolation of the parasite, as a reference standard test. The number of TL-patients ranged from 20 to 219 and the number of non-TL patients ranged from 8 to 281. The highest performance (100% of sensitivity and specificity) was reported for four recombinant proteins (cytochrome c oxidase; hypothetical protein XP\_003886492.1; putative IgE histamine releasing factor; trypanodioxin peroxidase) and four synthetic peptides (A10, B7, C12 and H7) selected by the phage display technique [18, 25, 27, 30]. Nine other antigens were evaluated in studies that considered at least one immunological method as a reference standard test. For these antigens the sensitivity ranged from 39.8% to 76.9% and the specificity from 53.4% to 97%. The forest plots for sensitivity and specificity of ELISA considering parasitological methods and other tests as reference standard tests for TL-diagnosis are presented in Fig 2; more details about each evaluated antigen are available in S2 Table.

### ELISA for CL diagnosis

Seventeen studies used ELISA to evaluate the performance of 44 antigens for CL-diagnosis, which comprised 20 recombinant proteins, 13 synthetic peptides and 11 purified proteins. The performance of 35 antigens was evaluated considering at least one parasitological method as a reference standard test. Among these, the sample size for studies of CL-patients ranged from 12 to 74 and for non-CL-patients from 10 to 177. Peroxidoxin was the only antigen presenting 100% sensitivity and specificity [19]. Nine antigens were evaluated considering at least one immunological test as a reference standard. Overall, HSP83 presented the highest performance (100% sensitivity and specificity) [46] (Fig 3, S3 Table).

Table 1. Characteristics of the studies included in the systematic review.

Reference	Country	Case (n)	No-case (n)	Reference standard test	Test platform	Protein targets	Type	Clinical form evaluated	Phase
Bennis et al., 2018 [35]	Morocco	136	83	Microscopy and/or PCR	ICT	Peroxidoxin	pAb	CL	III
Carmelo et al., 2002 [45]	Peru	24	44	Microscopy and culture	ELISA	H1 and 7 peptides	RP / SP	CL	I
Carvalho et al., 2017 [29]	Brazil	57	55	Microscopy and PCR	ELISA	HP (XP_001469551.1)	RP	TL	I
Celeste et al., 2004 [46]	Brazil	26	20	MST and/or histopathology and IFAT	ELISA	HSP83	RP	CL and ML	I
Celeste et al., 2014 [47]	Brazil	26	109	Microscopy and Immunological	ELISA	HSP83	RP	CL and ML	I
Coelho et al., 2016 [30]	Brazil	24	28	Microscopy and PCR	ELISA	Cytochrome c oxidase and Putative IgE histamine releasing factor	RP	TL	I
Costa et al., 2016 [25]	Brazil	50	10	Microscopy and PCR	ELISA	A10, C11, C12 B10, B7 and H7	SP	TL	I
de Silva et al., 2017 [48]	Sri Lanka	59	22	PCR	ICT	Peroxidoxin	pAb	CL	III
Duarte et al., 2015 [27]	Brazil	43	40	Microscopy, PCR and MST	ELISA	Enolase; eukaryotic initiation factor 5a; HP (LbrM.30.3350); trypanredoxin peroxidase and $\beta$ -tubulin	RP	TL	I
Gomes-Silva et al., 2008 [33]	Brazil	58	171	Microscopy and immunological	ELISA	Con-A and Jaca bound fraction	PP	TL	I
González et al., 2002 [49]	Peru	20	19	Microscopy and culture	ELISA	23085, 23089 and 23083	SP	TL	I
Jensen et al., 1996 [50]	Sudan	33	88	Microscopy and histopathology	ELISA	GPB and Gp63	SP / PP	CL	I
Kenner et al., 1999 [51]	Central America	41	20	Culture	IHC	G2D10	mAb	CL	I
Lage et al., 2019 [18]	Brazil	50	75	Microscopy and PCR	ELISA	A2 and HP (XP_003886492.1)	RP	TL	I
Lima et al., 2017 [52]	Brazil	45	50	Microscopy, PCR and MST	ELISA	HP (XP_001566959.1)	RP	TL, CL and ML	I
Lima et al., 2018 [31]	Brazil	40	143	Microscopy and PCR	ELISA	Enolase; eukaryotic initiation factor 5a; HP (XP_001566959.1) and $\beta$ -tubulin	RP	TL	I
Link et al., 2017 [26]	Brazil	57	30	ELISA	ELISA	P1 and MIX (P1 + P2 + P3)	SP	CL	I
Longoni et al., 2014 [53]	Colombia	51	10	Microscopy	ELISA	Fe-SOD	PP	CL	I
Marin et al., 2009 [54]	Spain	113	32	Microscopy	ELISA	Fe-SOD	PP	CL and ML	I
Menezes-Souza et al., 2014a [19]	Brazil	65	70	Microscopy and PCR	ELISA	Peroxidoxin	RP	TL, CL and ML	I
Menezes-Souza et al., 2014b [20]	Brazil	65	70	Microscopy and PCR	ELISA	HSP83 and 3 peptides	RP / SP	TL, CL and ML	I
Menezes-Souza et al., 2015a [21]	Brazil	65	70	Microscopy and PCR	ELISA	Cathepsin L-like and peptide	RP / SP	TL	I
Menezes-Souza et al., 2015b [22]	Brazil	65	70	Microscopy and PCR	ELISA	MAPK3 and MAPK4	RP	TL	I
Montoya et al., 1997 [55]	Colombia/ Peru	78	39	Serologic	ELISA	T26-U2 and T26-U4	RP	TL	I
Padilla et al., 2003 [56]	Peru	18	8	ELISA	ELISA	Acidic ribosomal P2 $\beta$ proteins	RP	TL	I

(Continued)

Table 1. (Continued)

Reference	Country	Case (n)	No-case (n)	Reference standard test	Test platform	Protein targets	Type	Clinical form evaluated	Phase
Salles et al., 2019 [32]	Brazil	40	100	Microscopy and PCR	ELISA	Small myristoylated protein-3 and peptide	RP/SP	TL	I
Sato et al., 2017 [57]	Brazil	219	281	Microscopy, PCR and/or histopathology	ELISA	LB6H e Lb8E	RP	TL	I
Schallig et al., 2019 [58]	Suriname	79	14	Microscopy or PCR	ICT	Peroxidoxin	pAb	CL	III
Shirian et al., 2014 [59]	Iran	100	30	Cytology or histology and PCR	IHC	IS2-2B4 (A11) and XLVI-5B8- B3 (T1)	mAb	CL	I
Skraba et al., 2014 [60]	Brazil	60	177	Microscopy	ELISA	Mix (36 and 48–56 kDa)	PP	CL	I
Soto et al., 1996 [61]	Spain	21	30	Microscopy and IFAT	ELISA	Acidic ribosomal protein family (LiP2a-Q and LiP2b-Q)	RP	ML	I
Souza et al., 2013 [62]	Brazil	102	180	MST, immunologic, histopathology and/or therapeutic test	ELISA	H2A; H2B; H3; H4; HSP70; KMP11	RP	TL, CL and ML	I
de Souza et al., 2018 [34]	Brazil	30	119	Microscopy and culture	ELISA	NGP 0204; NGP2333; NGP 2334; NGP 2203	PP	CL	I
de Souza et al., 2019 [63]	Brazil	74	63	Microscopy	ELISA	Lbk39	RP	CL	I
Vidigal et al., 2008 [64]	Brazil	48	114	Microscopy, MST and IFAT	ELISA	Fraction 8—peak 2	PP	CL	I
Vink et al., 2018 [36]	Afghanistan	257	17	Microscopy and/or PCR	ICT	Peroxidoxin	pAb	CL	III
Yeganeg et al., 2009 [65]	Iran	30	41	Microscopy	ELISA	Fe SOD-B1	RP	CL	I
Zurita et al., 2003 [66]	Peru	50	36	Culture	ELISA	HSP70 and 5 peptides	RP	TL, CL and ML	I

CL—cutaneous leishmaniasis; ML—mucosal leishmaniasis; TL—tegumentary leishmaniasis; HP—hypothetical protein; RP—recombinant protein; PP—purified protein; SP—synthetic peptide; mAb—monoclonal antibody; pAb—polyclonal antibody.

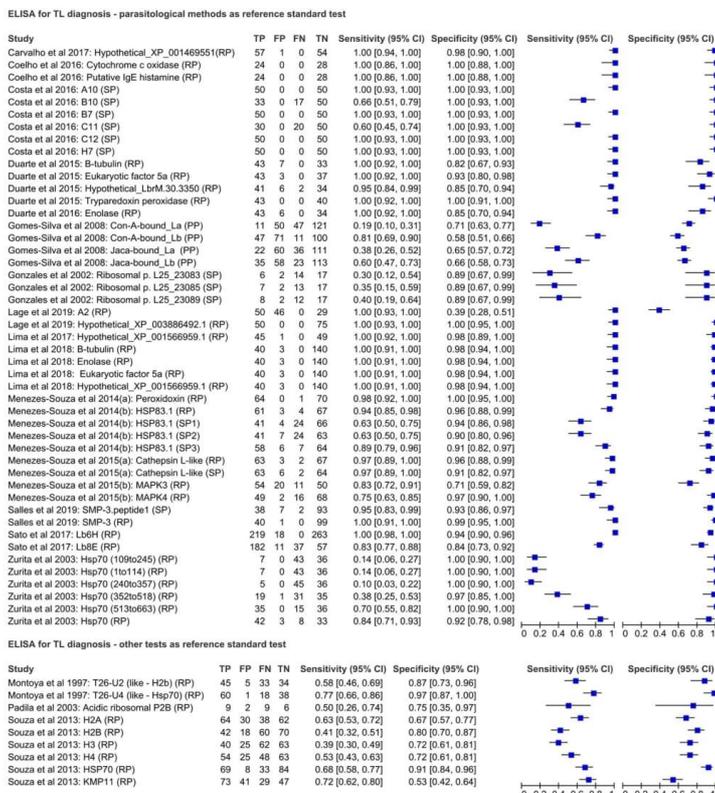
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0251956.t001>

### Other immunological tests for CL diagnosis

The performance of ICT and IHC using different monoclonal and/or polyclonal antibodies is presented in Fig 4 and detailed in S4 Table. Four studies evaluated the CL Detect Rapid Test (InBios International Inc., Seattle, WA, USA) in different countries. The sensitivity ranged from 35.6 to 67.6 and the specificity was higher than 80%. For IHC, two monoclonal antibodies were employed to detect antigens in fixed skin fragments. The highest performance was reported for IS22B4/XLVI5B8 mAbs, with 96% and 100% sensitivity and specificity, respectively [59].

### ELISA for ML results

Nine studies used ELISA to evaluate the performance of 23 antigens for ML-diagnosis, which comprised 19 recombinant proteins, three synthetic peptides and one purified protein. The sample size from ML-patients in these studies ranged from 14 to 53 and from non-ML-patients from 20 to 92. At least one parasitological method was used as a reference standard test for the evaluation of sixteen antigens. The highest performance was obtained for Hypothetical protein XP\_001467126.1, with 100% sensitivity and 98% specificity [27]. Seven antigens were evaluated in studies considering at least one immunological test as a reference standard. As noted for



**Fig 2.** Forest plot representing sensitivity and specificity indices of ELISA using different antigenic targets for TL diagnosis.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0251956.g002>

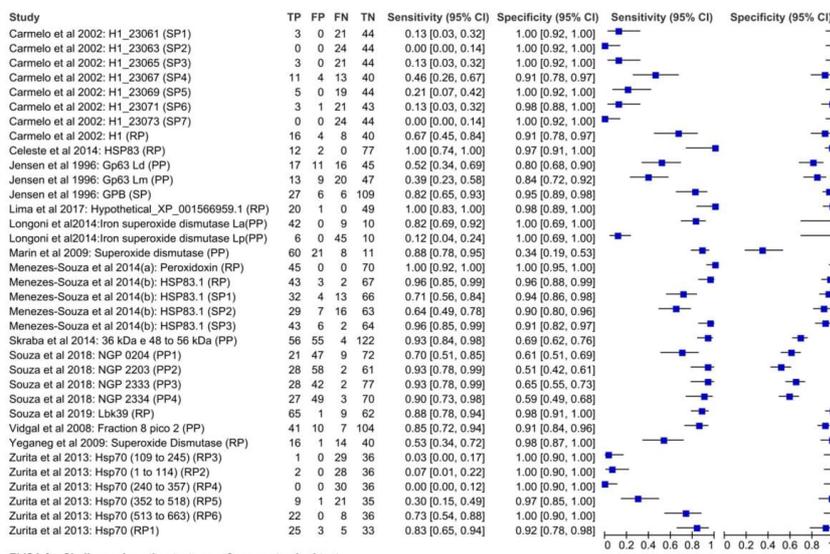
CL-diagnosis, 100% sensitivity and specificity were reported for HSP83 [46]. The performance of these antigens is presented in Fig 5 and more details are available in S5 Table.

The SROC curves with the antigen performances for the diagnostic of different clinical forms, using parasitological or other tests (such as ELISA and MST) as a reference standard, are presented in Fig 6. The antigens tended to have greater accuracy in studies that have used the parasitological methods as reference standard tests, regardless of TL-clinical manifestation.

### Quadas-2 based quality assessment

Quality assessment of the study according to risk of bias and concern with applicability (low, high and unclear) is shown in Fig 7. Of the 38 studies assessed, 21 had high risk of bias in patient selection. The risk was unclear for the index test in 34 studies and for flow and timing in 30 studies. Nineteen studies had high concerns regarding applicability of patient selection criteria.

ELISA for CL diagnosis - parasitological methods as reference standard test



ELISA for CL diagnosis - other tests as reference standard test

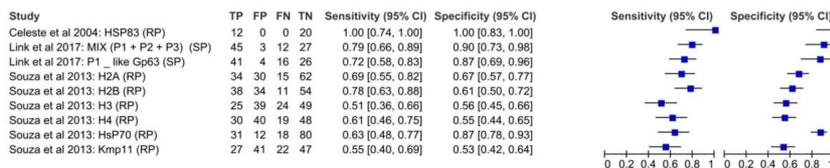


Fig 3. Forest plot representing sensitivity and specificity indices of ELISA using different antigenic targets for CL diagnosis.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0251956.g003>

### Discussion

TL is considered a multifactorial disease, responsible for psychological and social impacts due to scars and mutilating lesions generating stigma and self-deprecation in affected patients [67]. Improvements in healthcare access and laboratory diagnosis are needed to overcome the impacts of this disease and should be encouraged [68]. According to WHO's Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR), the ideal test must be

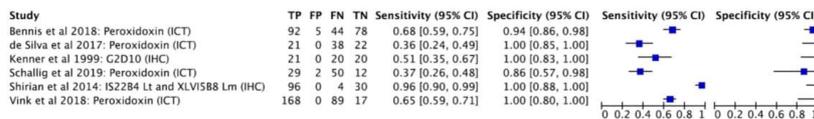


Fig 4. Forest plot representing sensitivity and specificity indices of other immunological tests using different antigenic targets for CL diagnosis.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0251956.g004>

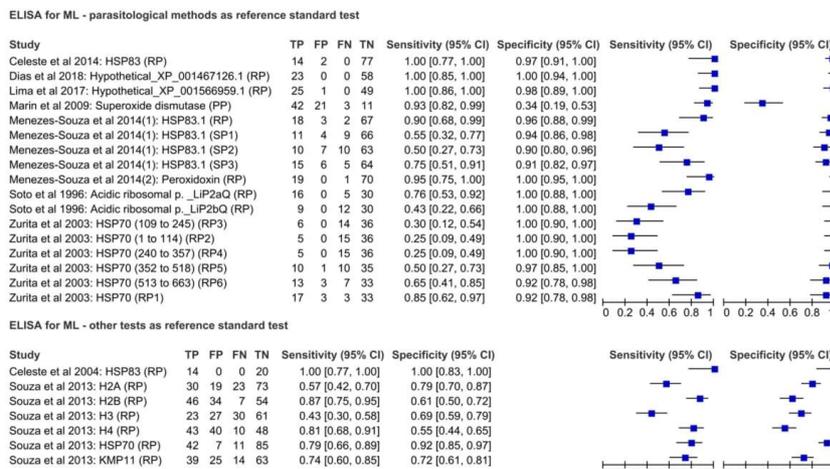


Fig 5. Forest plot representing sensitivity and specificity indexes of other immunological tests using different antigenic targets for ML-diagnosis.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0251956.g005>

affordable, sensitive, specific, user-friendly, rapid, equipment-free and delivered to end-users (ASSURED) [69]. Immunological tests may fill these criteria since they are usually easy to perform, accessible and require minimally invasive sample collection. Therefore, the identification of sensitive and specific antigenic targets seems to be a promising step toward the improvement of TL-diagnosis.

The studies analyzed here were conducted from 1996 to 2019, however, almost 50% of them were conducted in the last five years, mostly in Brazil or another country in the Americas. The increase in the number of studies is coincident with the interruption of the production of MST antigen in Brazil in 2015, which extinguished the simple and rapid immunodiagnostic for TL [15]. This fact may have boosted research aimed at finding new diagnostic tools.

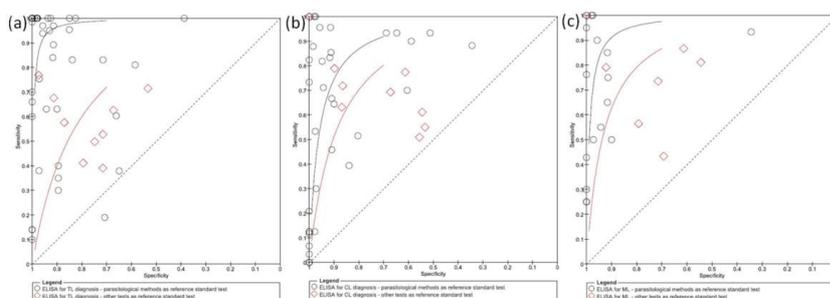
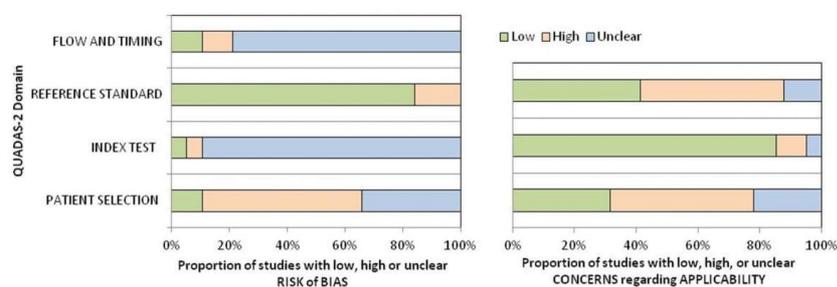


Fig 6. SROC curve for diagnosis of TL (a), CL (b) and ML (c) according to reference standard test.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0251956.g006>



**Fig 7. Risk of bias assessed by the QUADAS-2 tool according to different study characteristics (patient selection, index test, reference standard and flow and timing).**

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0251956.g007>

Parasitological diagnosis was considered a reference standard test in 89.5% of the studies. Despite this technique being highly specific for TL-diagnosis, its sensitivity is limited and inversely correlated with disease duration [9, 70]. However, no test seems to present sufficiently high sensitivity and specificity to be used as a gold standard test. We observed a tendency for index tests to be more accurate if parasitological tests were used as a reference standard than other reference test such as MST and histopathology (Fig 6). Polymerase chain reaction (PCR) was used as a reference standard test in 18 studies, generally in association with parasitological diagnosis. Overall, PCR appears to be a more suitable reference test, however, a standard protocol is urgently needed and encouraged, since distinct extraction methods, protocols and molecular targets have been used overtime [71].

The ability to accurately identify TL-patients is essential for a diagnostic test, in view of the range of clinical forms, disease severity and treatment toxicity. Several studies have included patients with Chagas disease as non-TL cases, however, despite phylogenetic proximity, the inclusion of patients with clinical signs that do not resemble TL is at least questionable. For tests with diagnostic purposes, a better sample panel needs to be encouraged, including diseases such as sporotrichosis, paracoccidioidomycosis, hanseniasis, vasculitis, syphilis and other dermal or mucosal diseases, that represent confounding factors in clinical practice.

Despite the distinct profiles in immune response usually reported for each clinical form of TL, some antigens presented high values of sensitivity, even for CL-patients. In general, higher levels of antibodies have been reported for ML-patients compared to CL-patients, the latter being characterized by a moderate Th1 immune response [72, 73]. In this way, it seems that problems related to antibody detection in CL-patients may be reduced by using sensitive targets and well-standardized procedures [16]. Some antigenic targets were evaluated for TL-diagnosis without distinction of clinical form and, consequently, immune response profile. We believe that the accuracy of these antigenic targets may be improperly estimated in these specific cases.

This systematic literature review found 79 different antigens, comprising 40 recombinant proteins, 24 synthetic peptides and 15 purified proteins. The identification and more refined selection of protein targets using recombinant proteins or synthetic peptides allows the development of more standardized techniques due to the possibility of generating the purest inputs. Some protein-families have been widely evaluated as antigenic targets for TL-immunodiagnosis, such as heat shock proteins (HSPs), histones and peroxiredoxins, with promising results.

HSPs represent a highly conserved family of intracellular proteins of varying molecular weights in prokaryotic and eukaryotic cells, including cytosolic, mitochondrial, nuclear and endoplasmic reticulum resident proteins. They act as a chaperon in peptide folding and in the translocation of proteins to organelles, the prevention of protein aggregation, and the stabilization and degradation of proteins [74, 75]. HSPs have usually been identified by amino acid sequence homology and molecular weight, with HSP70 and HSP83 being the most abundant [76, 77]. These proteins are constitutively expressed throughout the life cycle of *Leishmania*, increasing expression in the vertebrate host due to variation in temperature and pH [78]. The recombinant proteins HSP70 and HSP83, and the synthetic peptides extracted from those proteins, have been widely evaluated for TL-diagnosis [20, 24, 46, 47, 62, 66]. The performance of these targets seems to be promising, with HSP83 presenting sensitivity of over 90% and high specificity with few cross reactions [20, 46, 47].

Histones are conserved proteins bound to DNA establishing chromatin structure in eukaryotes. Several biological functions have been described for histones during *Leishmania* infection in susceptible hosts. Core nucleosomal *Leishmania* histones have been proposed as prominent intracellular pathoantigens, since immunological responses against histones seem to be involved in the pathological mechanisms of visceral leishmaniasis (VL) [79, 80]. In this way, this protein family has been extensively employed in ELISA for both human and canine VL [81–84]. The presence of antibodies against rH2B of *L. peruviana* [55], rH1 of *L. braziliensis* [45] and rH2A, rH2B, rH3 and rH4 of *L. infantum* have been detected in sera from CL or ML patients. CARMELO et al. (2002) demonstrated that the antibody against histone H1 was specific for the parasite without cross reaction with human histones. However, moderate cross reactivity has been observed in a sample panel composed of Systemic Lupus Erythematosus (SLE) and Chagas disease [45, 55, 62].

Peroxidoxin, also known as thiol-specific antioxidant protein, as well as tryparedoxin peroxidase, are peroxiredoxins, an antioxidant enzyme family [85–87]. This protein family has been described in a wide variety of organisms and several biological functions have been reported for *Leishmania* parasites, such as virulence factor and protection against reactive oxygen and nitrogen species [88]. In this manner, they are directly associated with cell proliferation, senescence, apoptosis, and circadian rhythms [89]. These proteins have been described in the secretome of *L. braziliensis* and the antigenicity of tryparedoxin peroxidase has also been evaluated for both human and canine VL-diagnosis [90–92]. Peroxidoxin is the protein target identified by the CL Detect Rapid Test (InBios International Inc.) for CL-diagnosis. Variable performance has been reported for this ICT, according to endemic region and, consequently, the *Leishmania* species involved, with better results for infections caused by *L. tropica*, with sensitivity ranging 65.4–73% and specificity 92–100% [35, 36]. This test, however, has not been evaluated in Brazil.

Other recombinant proteins, such as cytochrome c oxidase, putative IgE histamine releasing factor, prohibitin, eukaryotic initiation factor 5a, cathepsin L-like peptide and small myristoylated protein-3, as well as hypothetical proteins, were evaluated in preliminary studies demonstrating potential as candidates for TL-immunodiagnosis, and so more studies are desirable [27, 29, 30, 93].

Some promising synthetic peptides have been identified and employed in ELISA. The use of small fragments containing potent antigenic determinants is able to minimize non-specific reactions. LINK et al. (2017) identified three peptides by phage display, probably from GP63 glycoprotein, and presented 79% sensitivity in ELISA [26]. COSTA et al. (2016) found high performance for three clones (A10, C12 and H7) in discriminating TL-patients from patients with other diseases and healthy individuals (100% sensitivity and specificity) [25]. However, these short linear peptides may have some drawbacks, such as limited passive adsorption on

polystyrene titration plates (ELISA-standard procedure), inability to identify serum antibodies that recognize conformational epitopes and problems considering reproducibility due to variation in inter-assay reactivity producing different batches [94].

Despite the advantages, the absence of post-translational modifications of bacterially-expressed and chemically synthesized proteins comprises an important limitation for the employment of this biotechnology for immunodiagnosis. In this way, purified proteins can represent significant advantages, especially regarding immunoreactivity. This review found iron-superoxide dismutase to be a purified protein with interesting results, with more than 80% sensitivity for CL or ML diagnosis. However, being purified proteins, sensitivity and specificity may vary according to the type, source, and purity of the antigen used [53, 54].

Three polyclonal and monoclonal antibodies were evaluated for detecting *Leishmania* antigen by ICT and IHC [35, 36, 48, 51, 58, 59]. The phase III studies included were ICT tests, that is, prospective studies in which the index and reference test were performed simultaneously in patients with clinical suspicion [35, 36, 48, 58]. This is a commercial test that, despite its low sensitivity, has been useful in some localities due to the simple realization and high specificity, reducing the number of CL patients referred for diagnosis confirmation. High performance was observed in phase I studies for species-specific monoclonal antibody (IS2-2B4—A11/XLVI-5B8-B3) employed in IHC, with 96% sensitivity and 100% specificity [59]. More robust studies using monoclonal or polyclonal antibodies for TL-diagnosis need to be encouraged evaluating the performance in clinical practice.

The strength of the present literature review is that it employed a comprehensive search strategy with four databases. One of the meaningful limitations may be the limited number of studies evaluating the same protein target, and so results need to be interpreted with caution. For this reason, a meta-analysis was not performed here. Additionally, it is important to consider that the risk of bias for many of the included studies was unclear and/or was high for some of the evaluated parameters: "Patient selection", "Flow and Timing" and "Index test". Here, we identified a large number of antigenic targets that could help clinical diagnosis. However, the high number of proof-of-concept and phase I studies highlights the need to move forward with more refined and mainly prospective studies including patients with clinical suspicion of TL from different endemic regions and the most sensitive reference standard tests, to evaluate the diagnostic accuracy of antigenic targets reported in clinical practice.

## Supporting information

### S1 Fig. Terms used in MEDLINE search.

(TIF)

### S1 Table. PRISMA checklist.

(DOCX)

### S2 Table. Antigenic targets used in ELISA for diagnosis of tegumentary leishmaniasis.

(DOCX)

### S3 Table. Antigenic targets used in ELISA for diagnosis of cutaneous leishmaniasis.

(DOCX)

### S4 Table. Antigenic targets for diagnosis of cutaneous leishmaniasis by other tests.

(DOCX)

### S5 Table. Antigenic targets used in ELISA for diagnosis of mucosal leishmaniasis.

(DOCX)

## Acknowledgments

We are grateful for support from the Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde of the Instituto René Rachou and Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES).

## Author Contributions

**Conceptualization:** Mariana Lourenço Freire, Marcelo Antônio Pascoal-Xavier, Edward Oliveira.

**Data curation:** Mariana Lourenço Freire, Felipe Dutra Rêgo, Edward Oliveira.

**Formal analysis:** Mariana Lourenço Freire, Felipe Dutra Rêgo, Gláucia Cota, Edward Oliveira.

**Funding acquisition:** Edward Oliveira.

**Methodology:** Mariana Lourenço Freire, Felipe Dutra Rêgo, Gláucia Cota, Edward Oliveira.

**Project administration:** Marcelo Antônio Pascoal-Xavier, Edward Oliveira.

**Supervision:** Edward Oliveira.

**Writing – original draft:** Mariana Lourenço Freire, Felipe Dutra Rêgo, Gláucia Cota, Marcelo Antônio Pascoal-Xavier, Edward Oliveira.

**Writing – review & editing:** Mariana Lourenço Freire, Felipe Dutra Rêgo, Gláucia Cota, Marcelo Antônio Pascoal-Xavier, Edward Oliveira.

## References

1. PAHO/WHO. Leishmaniasis. Epidemiological Report of the Americas. 2019.: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/51734>
2. WHO. Global leishmaniasis surveillance, 2017–2018, and first report on 5 additional indicators. *Wkly Epidemiol Rec.* 2020; 95: 265–280. <https://www.who.int/publications/item/who-wer9525>
3. Reithinger R, Dujardin JC, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis.* 2007; 7: 581–596. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(07\)70209-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(07)70209-8) PMID: 17714672
4. d. C Toledo AC, da Silva RE, Carmo RF, Amaral TA, Luz ZMP, Rabello A. Assessment of the quality of life of patients with cutaneous leishmaniasis in Belo Horizonte, Brazil, 2009–2010. A pilot study. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2013; 107: 335–336. <https://doi.org/10.1093/trstmh/trt021> PMID: 23474473
5. Chahed MK, Bellali H, Ben Jemaa S, Bellaj T. Psychological and Psychosocial Consequences of zoonotic cutaneous leishmaniasis among women in Tunisia: Preliminary findings from an exploratory study. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016; 10: e0005090. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005090> PMID: 27788184
6. Al-Hucheimi SN, Sultan BA, Al-Dhalimi MA. A comparative study of the diagnosis of Old World cutaneous leishmaniasis in Iraq by polymerase chain reaction and microbiologic and histopathologic methods. *Int J Dermatol.* 2009; 48: 404–408. <https://doi.org/10.1111/j.1365-4632.2009.03903.x> PMID: 19335428
7. Goto H, Lindoso JAL. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2010; 8: 419–433. <https://doi.org/10.1586/eri.10.19> PMID: 20377337
8. Sotto MN, Yamashiro-Kanashiro EH, da Matta VLR, de Brito T. Cutaneous leishmaniasis of the New World: diagnostic immunopathology and antigen pathways in skin and mucosa. *Acta Trop.* 1989; 46: 121–130. [https://doi.org/10.1016/0001-706x\(89\)90006-5](https://doi.org/10.1016/0001-706x(89)90006-5) PMID: 2565073
9. Weigle KA, de Davalos M, Heredia P, Molineros R, Saravia NG, D'Alessandro A. Diagnosis of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Colombia: a comparison of seven methods. *Am J Trop Med Hyg.* 1987; 36: 489–496. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1987.36.489> PMID: 2437815
10. Kar K. Serodiagnosis of leishmaniasis. *Crit Rev Microbiol.* 1995; 21: 123–152. <https://doi.org/10.3109/10408419509113537> PMID: 7639932
11. Reithinger R, Coleman PG. Treating cutaneous leishmaniasis patients in Kabul, Afghanistan: cost-effectiveness of an operational program in a complex emergency setting. *BMC Infect Dis.* 2007; 7: 3. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-7-3> PMID: 17263879

12. de Paiva-Cavalcanti M, de Morais RCS, Pessoa-e-Silva R, Trajano-Silva LAM, Gonçalves-de-Albuquerque S da C, Tavares D de HC, et al. Leishmaniasis diagnosis: An update on the use of immunological and molecular tools. *Cell and Bioscience*. BioMed Central Ltd.; 2015. pp. 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13578-015-0021-2> PMID: 26097678
13. Guarín N, Palma G, Pirmez C, Valderrama L, Tovar R, Saravia N. Comparative immunohistological analysis of the Montenegro skin test reaction in asymptomatic infection and in acute and chronic cutaneous leishmaniasis. *Biomédica*. 2006. [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0120-41572006000500006](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-41572006000500006). Accessed 29 Mar 2021. PMID: 17361840
14. Sassi A, Louzir H, Ben-Salah A, Mokni M, Ben-Osman A, Dellagi K. Leishmanin skin test lymphoproliferative responses and cytokine production after symptomatic or asymptomatic *Leishmania major* infection in Tunisia. *Clin Exp Immunol*. 1999; 116: 127–132. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.1999.00844.x> PMID: 10209516
15. Braz LMA. Tegumentary leishmaniasis diagnosis: What happened with MST (Montenegro skin test) in Brazil? *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2019; 61: 1–3. <https://doi.org/10.1590/S1678-9946201961017> PMID: 30864622
16. Romero GAS, Orge M de la GO, de F Guerra MV, Paes MG, de O Macêdo V, de Carvalho EM. Antibody response in patients with cutaneous leishmaniasis infected by *Leishmania (Viannia) braziliensis* or *Leishmania (Viannia) guyanensis* in Brazil. *Acta Trop*. 2005; 93: 49–56. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2004.09.005> PMID: 15589797
17. Caballero ZC, Sousa OE, Marques WP, Saez-Alquezar A, Umezawa ES. Evaluation of serological tests to identify *Trypanosoma cruzi* infection in humans and determine cross-reactivity with *Trypanosoma rangeli* and *Leishmania* spp. *Clin Vaccine Immunol*. 2007; 14: 1045–1049. <https://doi.org/10.1128/CVI.00127-07> PMID: 17522327
18. Lage DP, Machado AS, Ramos FF, Silveira PC, Dias DS, Ribeiro PAF, et al. A biomarker for tegumentary and visceral leishmaniasis based on a recombinant *Leishmania* hypothetical protein. *Immunobiology*. 2019; 224: 477–484. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2019.05.008> PMID: 31164242
19. Menezes-Souza D, De Oliveira Mendes TA, Pinto Nagem RA, De Oliveira Santos TT, Teixeira Silva AL, Santoro MM, et al. Mapping B-cell epitopes for the peroxidoxin of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and its potential for the clinical diagnosis of tegumentary and visceral leishmaniasis. *PLoS One*. 2014; 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099216> PMID: 24921246
20. Menezes-Souza D, De Mendes TAO, De Gomes MS, Reis-Cunha JL, Nagem RAP, Carneiro CM, et al. Epitope mapping of the HSP83.1 protein of *Leishmania braziliensis* discloses novel targets for immunodiagnosis of tegumentary and visceral clinical forms of leishmaniasis. *Clin Vaccine Immunol*. 2014; 21: 949–959. <https://doi.org/10.1128/CVI.00151-14> PMID: 24807053
21. Menezes-Souza D, de O Mendes TA, de S Gomes M, Bartholomeu DC, Fujiwara RT. Improving serodiagnosis of human and canine leishmaniasis with recombinant *Leishmania braziliensis* Cathepsin L-like protein and a synthetic peptide containing its linear B-cell epitope. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015; 9: e3426. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003426> PMID: 25569432
22. Menezes-Souza D, de Oliveira Mendes TA, de Araújo Leão AC, de Souza Gomes M, Fujiwara RT, Bartholomeu DC. Linear B-cell epitope mapping of MAPK3 and MAPK4 from *Leishmania braziliensis*: implications for the serodiagnosis of human and canine leishmaniasis. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2015; 99: 1323–1336. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6168-7> PMID: 25359475
23. Florez MM, de Oliveira CI, Puerta C, Guzman F, Ayala M, Montoya G, et al. Synthetic peptides derived from ribosomal proteins of *Leishmania* spp. in mucocutaneous leishmaniasis: Diagnostic usefulness. *Protein Pept Lett*. 2017; 24: 982–988. <https://doi.org/10.2174/0929866524666170728143924> PMID: 28758598
24. Amorim AG, Carrington M, Miles MA, Barker DC, Almeida LC, de Almeida ML. Identification of the C-terminal region of 70 kDa heat shock protein from *Leishmania (Viannia) braziliensis* as a target for the humoral immune response. *Cell Stress Chaperones*. 1996; 1: 177–187. PMID: 9222603
25. Costa LE, Salles BCS, Alves PT, Dias ACS, Vaz ER, Ramos FF, et al. New serological tools for improved diagnosis of human tegumentary leishmaniasis. *J Immunol Methods*. 2016; 434: 39–45. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2016.04.005> PMID: 27090730
26. Link JS, Alban SM, Soccol CR, Pereira GVM, Thomaz Soccol V. Synthetic peptides as potential antigens for cutaneous leishmaniasis diagnosis. *J Immunol Res*. 2017; 2017: 5871043. <https://doi.org/10.1155/2017/5871043> PMID: 28367456
27. Duarte MC, Pimenta DC, Menezes-Souza D, Magalhães RDM, Diniz JLCP, Costa LE, et al. Proteins selected in *Leishmania (Viannia) braziliensis* by an immunoproteomic approach with potential serodiagnosis applications for tegumentary leishmaniasis. *Clin Vaccine Immunol*. 2015; 22: 1187–1196. <https://doi.org/10.1128/CVI.00465-15> PMID: 26376929

28. Lima BSS, Pires SFF, Fialho LCCJ, Oliveira EJJ, Machado-de-Avila RAA, Chavez-Olortegui C, et al. A proteomic road to acquire an accurate serological diagnosis for human tegumentary leishmaniasis. *J Proteomics*. 2017; 151: 174–181. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.05.017> PMID: 27262223
29. Carvalho AMRSS, Costa LE, Salles BCSS, Santos TTO, Ramos FF, Lima MP, et al. An ELISA immunoassay employing a conserved *Leishmania* hypothetical protein for the serodiagnosis of visceral and tegumentary leishmaniasis in dogs and humans. *Cell Immunol*. 2017; 318: 42–48. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2017.06.001> PMID: 28602279
30. Coelho EAF, Costa LE, Lage DP, Martins VT, Garde E, de Jesus Pereira NC, et al. Evaluation of two recombinant *Leishmania* proteins identified by an immunoproteomic approach as tools for the serodiagnosis of canine visceral and human tegumentary leishmaniasis. *Vet Parasitol*. 2016; 215: 63–71. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.11.006> PMID: 26790739
31. Lima MP, Costa LE, Lage DP, Dias DS, Ribeiro PAF, Machado AS, et al. Diagnostic application of recombinant *Leishmania* proteins and evaluation of their *in vitro* immunogenicity after stimulation of immune cells collected from tegumentary leishmaniasis patients and healthy individuals. *Cell Immunol*. 2018; 334: 61–69. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2018.09.006> PMID: 30287082
32. Salles BCS, Dias DS, Steiner BT, Lage DP, Ramos FF, Ribeiro PAF, et al. 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*. 2019; 224: 163–171. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2018.09.003> PMID: 30266201
33. Gomes-Silva A, Souza MA, Afonso-Cardoso SR, Andrade LR, Dietze R, Lemos E, et al. Serological reactivity of different antigenic preparations of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and the *Leishmania braziliensis* complex. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2008; 41: 135–141. <https://doi.org/10.1590/s0037-86822008000200001> PMID: 18545832
34. De Souza LMB, Thomaz Soccol V, Petterle RR, Bates MD, Bates PA, et al. Analysis of *Leishmania* mimetic neoglycoproteins for the cutaneous leishmaniasis diagnosis. *Parasitology*. 2018; 145: 1938–1948. <https://doi.org/10.1017/S0031182018000720> PMID: 29806570
35. Bennis I, Verdonck K, el Khalfaoui N, Riyad M, Fellah H, Dujardin JC, et al. Accuracy of a rapid diagnostic test based on antigen detection for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis in patients with suggestive skin lesions in Morocco. *Am J Trop Med Hyg*. 2018; 99: 716–722. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.18-0066> PMID: 29988004
36. Vink MMT, Nahzat SM, Rahimi H, Buhler C, Ahmadi BA, Nader M, et al. Evaluation of point-of-care tests for cutaneous leishmaniasis diagnosis in Kabul, Afghanistan. *EBioMedicine*. 2018; 37: 453–460. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.10.063> PMID: 30396855
37. Zanetti ADS, Sato CM, Longhi FG, Ferreira SMB, Espinosa OA. Diagnostic accuracy of enzyme-linked immunosorbent assays to detect anti-leishmania antibodies in patients with American tegumentary leishmaniasis: A systematic review. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2019; 61: e42. <https://doi.org/10.1590/S1678-9946201961042> PMID: 31432991
38. Pena HP, Belo VS, Xavier-Junior JCC, Teixeira-Neto RG, Melo SN, Pereira DA, et al. Accuracy of diagnostic tests for American tegumentary leishmaniasis: a systematic literature review with meta-analyses. *Trop Med Int Heal*. 2020; 25: 1168–1181. <https://doi.org/10.1111/tmi.13465> PMID: 32677284
39. Higgins J, Thomas J. *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions* | Cochrane Training. 2020. <https://training.cochrane.org/handbook/current>
40. McInnes MDF, Moher D, Thoms BD, McGrath TA, Bossuyt PM, Clifford T, et al. Preferred reporting items for a systematic review and meta-analysis of diagnostic test accuracy studies the PRISMA-DTA Statement. *JAMA—J Am Med Assoc*. 2018; 319: 388–396. <https://doi.org/10.1001/jama.2017.19163> PMID: 29362800
41. Lorenzetti DL, Ghali WA. Reference management software for systematic reviews and meta-analyses: An exploration of usage and usability. *BMC Med Res Methodol*. 2013; 13: 141. <https://doi.org/10.1186/1471-2288-13-141> PMID: 24237877
42. Ouzzani M, Hammady H, Fedorowicz Z, Elmagarmid A. Rayyan—a web and mobile app for systematic reviews. *Syst Rev*. 2016; 5: 1–10.
43. Leeftang MMG, Allerberger F. How to evaluate a diagnostic test. *Clin Microbiol Infect*. 2019; 25: 54–59. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.06.011> PMID: 29906592
44. Whiting PF, Rutjes AWS, Westwood ME, Mallett S, Deeks JJ, Reitsma JB, et al. Quadas-2: A revised tool for the quality assessment of diagnostic accuracy studies. *Ann Intern Med*. 2011; 155: 529–536. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-155-8-201110180-00009> PMID: 22007046
45. Carmelo E, Martinez E, Gonzalez AC, Pinero JE, Patarroyo ME, Del Castillo A, et al. Antigenicity of *Leishmania braziliensis* histone H1 during cutaneous leishmaniasis: localization of antigenic determinants. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2002; 9: 808–811. <https://doi.org/10.1128/cdli.9.4.808-811.2002> PMID: 12093677

46. Celeste BJ, Angel SO, Castro LGM, Gidlund M, Goto H. *Leishmania infantum* heat shock protein 83 for the serodiagnosis of tegumentary leishmaniasis. *Brazilian J Med Biol Res.* 2004; 37: 1591–1593. <https://doi.org/10.1590/s0100-879x2004001100001> PMID: 15517072
47. Celeste BJ, Sanchez MCA, Ramos-Sanchez EM, Castro LGM, Costa FAL, Goto H. Recombinant *Leishmania infantum* heat shock protein 83 for the serodiagnosis of cutaneous, mucosal, and visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 2014; 90: 860–865. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.13-0623> PMID: 24615136
48. De Silva G, Somaratne V, Senaratne S, Vipuladasa M, Wickremasinghe R, et al. Efficacy of a new rapid diagnostic test kit to diagnose Sri Lankan cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania donovani*. Gannavaram S, editor. *PLoS One.* 2017; 12: 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187024> PMID: 29135995
49. González AC, Martínez E, Carmelo E, Piñero JE, Alonso V, Del Castillo A, et al. Analysis of NLS and rRNA binding motifs in the L25 ribosomal protein from *Leishmania (Viannia) braziliensis*: Investigation of its diagnostic capabilities. *Parasitology.* 2002; 125: 51–57. <https://doi.org/10.1017/s0031182002001804> PMID: 12166520
50. Jensen AT, Gaafar A, Ismail A, Christensen CB, Kemp M, Hassan AM, et al. Serodiagnosis of cutaneous leishmaniasis: Assessment of an enzyme-linked immunosorbent assay using a peptide sequence from gene B protein. *Am J Trop Med Hyg.* 1996; 55: 490–495. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1996.55.490> PMID: 8940979
51. Kenner JR, Aronson NE, Bratthauer GL, Turnicky RP, Jackson JE, Tang DB, et al. Immunohistochemistry to identify *Leishmania* parasites in fixed tissues. *Journal of Cutaneous Pathology* 1999 pp. 130–136. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0560.1999.tb01817.x> PMID: 10235378
52. Lima MP, Costa LE, Duarte MC, Menezes-Souza D, Salles BCS, de Oliveira Santos TT, et al. Evaluation of a hypothetical protein for serodiagnosis and as a potential marker for post-treatment serological evaluation of tegumentary leishmaniasis patients. *Parasitol Res.* 2017; 116: 1197–1206. <https://doi.org/10.1007/s00436-017-5397-y> PMID: 28150041
53. Longoni SS, Marin C, Sánchez-Moreno M, Longoni SS, Marin C, Sanchez-Moreno M, et al. Excreted *Leishmania peruviana* and *Leishmania amazonensis* iron-superoxide dismutase purification: Specific antibody detection in Colombian patients with cutaneous leishmaniasis. *Free Radic Biol Med.* 2014; 69: 26–34. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.01.012> PMID: 24440468
54. Marin C, Longoni SS, Urbano JJ, Minaya G, Mateo H, De Diego JA, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for superoxide dismutase-excreted antigen in diagnosis of sylvatic and andean cutaneous leishmaniasis of Peru. *Am J Trop Med Hyg.* 2009; 80: 55–60. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2009.80.55> PMID: 19141840
55. Montoya Y, Leon C, Talledo M, Nolasco O, Padilla C, Muñoz-Najar U, et al. Recombinant antigens for specific and sensitive serodiagnosis of Latin American tegumentary leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1997; 91: 674–676. [https://doi.org/10.1016/s0035-9203\(97\)90520-4](https://doi.org/10.1016/s0035-9203(97)90520-4) PMID: 9580116
56. Padilla R. C, Montoya P. Y. Characterization and immunoreactivity of *Leishmania braziliensis* P2B acidic ribosomal protein. *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* 2003; 20: 92–96.
57. Sato CM, Sanchez MCA, Celeste BJ, Duthie MS, Guderian J, Reed SG, et al. Use of recombinant antigens for sensitive serodiagnosis of American tegumentary leishmaniasis caused by different *Leishmania* species. *J Clin Microbiol.* 2017; 55: 495–503. <https://doi.org/10.1128/JCM.01904-16> PMID: 27927927
58. Schallig H, Hu RVPF, Kent AD, van Loenen M, Menting S, Picado A, et al. Evaluation of point of care tests for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis in Suriname. *BMC Infect Dis.* 2019; 19: 25. <https://doi.org/10.1186/s12879-018-3634-3> PMID: 30616544
59. Shirian S, Oryan A, Hatam G-RR, Panahi S, Daneshbod Y, et al. Comparison of conventional, molecular, and immunohistochemical methods in diagnosis of typical and atypical cutaneous leishmaniasis. *Arch Pathol Lab Med.* 2014; 138: 235–240. <https://doi.org/10.5858/arpa.2013-0098-OA> PMID: 24476521
60. Skraba CM, Pedrosa RB, Fiorini A, Rosado FR, Aristides SMA, Lonardon MVC, et al. Diagnosis of American cutaneous leishmaniasis by enzyme immunoassay using membrane antigens of *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2014; 78: 411–417. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.08.020> PMID: 24485589
61. Soto M, Requena JM, Quijada L, Alonso C. Specific serodiagnosis of human leishmaniasis with recombinant *Leishmania* P2 acidic ribosomal proteins. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1996; 3: 387–391. PMID: 8807201
62. Souza AP, Soto M, Costa JMLL, Boaventura VS, de Oliveira CI, Cristal JR, et al. Towards a more precise serological diagnosis of human tegumentary leishmaniasis using *Leishmania* recombinant proteins. *PLoS One.* 2013; 8: e66110. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066110> PMID: 23776617

63. de Souza LMB, Carvalho J, Bates MD, Petterle RR, Thomaz-Soccol V, Bates PA, et al. Production of a kinesin-related recombinant protein (Lbk39) from *Leishmania braziliensis* by *Leishmania tarentolae* promastigotes and its application in the serodiagnosis of leishmaniasis. *One Heal*. 2019; 8: 100111. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2019.100111> PMID: 31788531
64. Vidigal CP, Marcussi VM, Marcussi LM, Mikcha JMG, Arraes SMAA, Lonardoni MVC, et al. Enzyme immunoassay using *Leishmania (Viannia) braziliensis* antigens for laboratorial diagnosis of American cutaneous leishmaniasis. *Acta Trop*. 2008; 107: 208–212. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2008.04.026> PMID: 18561892
65. Yeganeh F, Barkhordari F, Omid M, Samiei A, Adeli A, Mahboudi F, et al. Cloning and expression of *Leishmania major* superoxide dismutase b1: A potential target antigen for serodiagnosis of leishmaniasis. *Iran J Immunol*. 2009; 6: 130–140. PMID: 19801786
66. Zurita AI, Rodriguez J, Pinero JE, Pacheco R, Carmelo E, del Castillo A, et al. Cloning and characterization of the *Leishmania (Viannia) braziliensis* HSP70 gene. Diagnostic use of the C-terminal fragment rb70(513–663). *J Parasitol*. 2003; 89: 372–378. [https://doi.org/10.1645/0022-3395\(2003\)089\[0372:CACOTL\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2003)089[0372:CACOTL]2.0.CO;2) PMID: 12760657
67. Bennis I, Belaid L, De Brouwere V, Filali H, Sahibi H, Boelaert M. The mosquitoes that destroy your face. Social impact of cutaneous leishmaniasis in south-eastern Morocco. A qualitative study. *Fortin A, editor. PLoS One*. 2017; 12: e0189906. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189906> PMID: 29261762
68. WHO. Accelerating work to overcome the global impact of neglected tropical diseases. 2012. [https://www.who.int/neglected\\_diseases/NTD\\_RoadMap\\_2012\\_Fullversion.pdf](https://www.who.int/neglected_diseases/NTD_RoadMap_2012_Fullversion.pdf)
69. Land KJ, Boeras DI, Chen XS, Ramsay AR, Peeling RW. REASSURED diagnostics to inform disease control strategies, strengthen health systems and improve patient outcomes. *Nat Microbiol*. 2019; 4: 46–54. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0295-3> PMID: 30546093
70. Jara M, Adauí V, Valencia BM, Martínez D, Alba M, Castrillon C, et al. Real-time PCR assay for detection and quantification of *Leishmania (Viannia)* organisms in skin and mucosal lesions: Exploratory study of parasite load and clinical parameters. *J Clin Microbiol*. 2013; 51: 1826–1833. <https://doi.org/10.1128/JCM.00208-13> PMID: 23554201
71. De Oliveira DM, Valdrinez M, Lonardoni C, Teodoro U, Gomes T, Silveira V, et al. Comparison of different primers for PCR-based diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Brazilian J Infect Dis*. 2011; 15: 204–210. [https://doi.org/10.1016/s1413-8670\(11\)70176-3](https://doi.org/10.1016/s1413-8670(11)70176-3)
72. Cuba CC, Llanos-Cuentas EA, Barreto AC, Magalhães A V., Lago EL, Reed SG, et al. Human mucocutaneous leishmaniasis in Três Braços, Bahia—Brazil: an area of *Leishmania braziliensis braziliensis* transmission. I. Laboratory diagnosis. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1984; 17: 161–167. <https://doi.org/10.1590/s0037-86821984000400002>
73. Pedrosa Valli LC, Azeredo Passos VM, Dietze R, Lee Callahan H, Berman JD, Grogil M. Humoral immune responses among mucosal and cutaneous leishmaniasis patients caused by *Leishmania braziliensis*. *J Parasitol*. 1999; 85: 1076–1083. <https://doi.org/10.2307/3285671> PMID: 10647040
74. Stewart GR, Young DB. Heat-shock proteins and the host-pathogen interaction during bacterial infection. *Curr Opin Immunol*. 2004; 16: 506–510. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2004.05.007> PMID: 15245747
75. Priya S, Sharma SK, Goloubinoff P. Molecular chaperones as enzymes that catalytically unfold misfolded polypeptides. *FEBS Lett*. 2013; 587: 1981–1987. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.05.014> PMID: 23684649
76. Clare DK, Saibil HR. ATP-driven molecular chaperone machines. *Wittinghofer A, editor. Biopolymers*. 2013; 99: 846–859. <https://doi.org/10.1002/bip.22361> PMID: 23877967
77. Wiesgigl M, Clos J. Heat shock protein 90 homeostasis controls stage differentiation in *Leishmania donovani*. *Mol Biol Cell*. 2001; 12: 3307–3316. <https://doi.org/10.1091/mbc.12.11.3307> PMID: 11694568
78. Zilka A, Garlapati S, Dahan E, Yaolsky V, Shapira M. Developmental regulation of heat shock protein 83 in *Leishmania*: 3' processing and mRNA stability control transcript abundance, and translation is directed by a determinant in the 3'-untranslated region. *J Biol Chem*. 2001; 276: 47922–47929. <https://doi.org/10.1074/jbc.M108271200> PMID: 11598129
79. Chang KP, McGwire BS. Molecular determinants and regulation of *Leishmania* virulence. *Kinetoplastid Biol Dis*. 2002; 1: 1. <https://doi.org/10.1186/1475-9292-1-1> PMID: 12234388
80. Chang KP, Reed SG, McGwire BS, Soong L. *Leishmania* model for microbial virulence: The relevance of parasite multiplication and pathoantigenicity. *Acta Tropica*. *Acta Trop*; 2003. pp. 375–390. [https://doi.org/10.1016/s0001-706x\(02\)00238-3](https://doi.org/10.1016/s0001-706x(02)00238-3) PMID: 12659975
81. Maalej IA, Chenik M, Louzir H, Ben Salah A, Bahloul C, Amri F, et al. Comparative evaluation of ELISAs based on ten recombinant or purified *Leishmania* antigens for the serodiagnosis of Mediterranean visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*. 2003; 68: 312–320. PMID: 12685637

82. Soto M, Requena JM, Quijada L, García M, Guzman F, Patarroyo ME, et al. Mapping of the linear antigenic determinants from the *Leishmania infantum* histone H2A recognized by sera from dogs with leishmaniasis. *Immunol Lett*. 1995; 48: 209–214. [https://doi.org/10.1016/0165-2478\(95\)02473-5](https://doi.org/10.1016/0165-2478(95)02473-5) PMID: 8867853
83. Soto M, Requena JM, Quijada L, Gomez LC, Guzman F, Patarroyo ME, et al. Characterization of the antigenic determinants of the *Leishmania infantum* histone H3 recognized by antibodies elicited during canine visceral leishmaniasis. *Clin Exp Immunol*. 1996; 106: 454–461. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.1996.d01-865.x> PMID: 8973612
84. Soto M, Requena JM, Quijada L, Perez MJ, Nieto CG, Guzman F, et al. Antigenicity of the *Leishmania infantum* histones H2B and H4 during canine viscerocutaneous leishmaniasis. *Clin Exp Immunol*. 1999; 115: 342–349. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.1999.00796.x> PMID: 9933463
85. Jirata D, Kuru T, Genetu A, Barr S, Hailu A, Aseffa A, et al. Identification, sequencing and expression of peroxidoxin genes from *Leishmania aethiopica*. *Acta Trop*. 2006; 99: 88–96. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2006.08.001> PMID: 16962062
86. Levick MP, Tetaud E, Fairlamb AH, Blackwell JM. Identification and characterisation of a functional peroxidoxin from *Leishmania major*. *Mol Biochem Parasitol*. 1998; 96: 125–137. [https://doi.org/10.1016/s0166-6851\(98\)00122-4](https://doi.org/10.1016/s0166-6851(98)00122-4) PMID: 9851612
87. Webb JR, Campos-Neto A, Ovendale PJ, Martin TI, Stromberg EJ, Badaro R, et al. Human and murine immune responses to a novel *Leishmania major* recombinant protein encoded by members of a multi-copy gene family. *Infect Immun*. 1998; 66: 3279–89. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9632596> <https://doi.org/10.1128/IAI.66.7.3279-3289.1998>
88. Barr SD, Gedamu L. Role of peroxidoxins in *Leishmania chagasi* survival. Evidence of an enzymatic defense against nitrosative stress. *J Biol Chem*. 2003; 278: 10816–10823. <https://doi.org/10.1074/jbc.M212990200> PMID: 12529367
89. Castro H, Rocha MI, Silva R, Oliveira F, Gomes-Alves AG, Cruz T, et al. Functional insight into the glycosomal peroxidoxin of *Leishmania*. *Acta Trop*. 2020; 201: 105217. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.105217> PMID: 31605692
90. Cuervo P, De Jesus JB, Saboia-Vahia L, Mendonça-Lima L, Domont GB, Cupolillo E. Proteomic characterization of the released/secreted proteins of *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigotes. *J Proteomics*. 2009; 73: 79–92. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2009.08.006> PMID: 19703603
91. Santarém N, Silvestre R, Cardoso L, Schallig H, Reed SG, Cordeiro-da-Silva A. Application of an improved enzyme-linked immunosorbent assay method for serological diagnosis of canine leishmaniasis. *J Clin Microbiol*. 2010; 48: 1866–74. <https://doi.org/10.1128/JCM.02402-09> PMID: 20164286
92. Todolí F, Pérez-Filgueira M, Galindo I, Gómez-Sebastián S, Escibano JM, Rodríguez-Cortés A, et al. Seroreactivity against raw insect-derived recombinant KMP11, TRYP, and LACK *Leishmania infantum* proteins in infected dogs. *Vet Parasitol*. 2009; 164: 154–161. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.05.032> PMID: 19570612
93. Rodrigues MR, Santos LMO, Miyazaki CK, Martins VT, Ludolf FR, Kursancew AC, et al. 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*. 2019; 474: 112641. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2019.112641> PMID: 31400411
94. Gomara M, Haro I. Synthetic peptides for the immunodiagnosis of human diseases. *Curr Med Chem*. 2007; 14: 531–546. <https://doi.org/10.2174/092986707780059698> PMID: 17346145

## S1 Fig

```

((((((((("Leishmaniasis, Cutaneous"[MeSH Terms]) OR "Leishmaniasis, Cutaneous"[Title/Abstract]) OR "Cutaneous Leishmaniasis"[Title/Abstract]) OR "Leishmaniases, Cutaneous"[Title/Abstract]) OR "Cutaneous Leishmaniases"[Title/Abstract]) OR "Tegumentary Leishmaniasis"[Title/Abstract]) OR "Leishmania (Leishmania)"[Title/Abstract]) OR "Leishmania (Viannia)"[Title/Abstract]) OR "Leishmania amazonensis"[Title/Abstract]) OR "Leishmania panamensis"[Title/Abstract]) OR "Leishmania braziliensis"[Title/Abstract]) OR "Leishmania guyanensis"[Title/Abstract]) OR "Leishmania mexicana"[Title/Abstract]) OR "Leishmania major"[Title/Abstract]) OR "Leishmania tropica"[Title/Abstract]))) AND
((((((((((((((((((((("Immunologic Tests"[MeSH Terms]) OR "Immunologic Tests"[Title/Abstract]) OR "Immunological Tests"[Title/Abstract]) OR "Immunodiagnosis"[Title/Abstract]) OR "Immunodiagnoses"[Title/Abstract]) OR "Serologic tests"[MeSH Terms]) OR "Serologic Tests"[Title/Abstract]) OR "Diagnostic Test"[Title/Abstract]) OR "Immunoassay"[MeSH Terms]) OR "Immunoassay"[Title/Abstract]) OR "Recombinant Proteins"[MeSH Terms]) OR "Recombinant Proteins"[Title/Abstract]) OR "Antigens"[MeSH Terms]) OR "Antigens"[Title/Abstract]) OR "Antigen"[Title/Abstract]) OR "Antibodies"[MeSH Terms]) OR "Antibodies"[Title/Abstract]))) AND
((((((((((((((((("Enzyme-Linked Immunosorbent Assay"[MeSH Terms]) OR "Enzyme-Linked Immunosorbent Assay"[Title/Abstract]) OR "Enzyme Linked Immunosorbent Assay"[Title/Abstract]) OR "ELISA"[Title/Abstract]) OR "Blotting, Western"[MeSH Terms]) OR "Blotting, Western"[Title/Abstract]) OR "Immunochromatographic Assay"[Title/Abstract]) OR "Immunochromatographic"[Title/Abstract]) OR "rapid diagnostic test"[Title/Abstract]) OR "RDT"[Title/Abstract]) OR "Point-of-Care Systems"[MeSH Terms]) OR "point-of-care"[Title/Abstract]) OR "point of care"[Title/Abstract]) OR ("Sensitivity and Specificity"[MeSH Terms]) OR "Sensitivity"[Title/Abstract]) OR "Specificity"[Title/Abstract])

```

S2 Table

Section/topic	#	PRISMA-DTA Checklist Item	Reported on page #
<b>TITLE / ABSTRACT</b>			<b>1</b>
Title	1	Identify the report as a systematic review (+/- meta-analysis) of diagnostic test accuracy (DTA) studies.	1
Abstract	2	Abstract: See PRISMA-DTA for abstracts.	1
<b>INTRODUCTION</b>			<b>2-4</b>
Rationale	3	Describe the rationale for the review in the context of what is already known.	4
Clinical role of index test	D1	State the scientific and clinical background, including the intended use and clinical role of the index test, and if applicable, the rationale for minimally acceptable test accuracy (or minimum difference in accuracy for comparative design).	3
Objectives	4	Provide an explicit statement of question(s) being addressed in terms of participants, index test(s), and target condition(s).	4
<b>METHODS</b>			<b>4-7</b>
Protocol and registration	5	Indicate if a review protocol exists, if and where it can be accessed (e.g., Web address), and, if available, provide registration information including registration number.	4
Eligibility criteria	6	Specify study characteristics (participants, setting, index test(s), reference standard(s), target condition(s), and study design) and report characteristics (e.g., years considered, language, publication status) used as criteria for eligibility, giving rationale.	5
Information sources	7	Describe all information sources (e.g., databases with dates of coverage, contact with study authors to identify additional studies) in the search and date last searched.	5
Search	8	Present full search strategies for all electronic databases and other sources searched, including any limits used, such that they could be repeated.	5
Study selection	9	State the process for selecting studies (i.e., screening, eligibility, included in systematic review, and, if applicable, included in the meta-analysis).	6
Data collection process	10	Describe method of data extraction from reports (e.g., piloted forms, independently, in duplicate) and any processes for obtaining and confirming data from investigators.	6
Definitions for data extraction	11	Provide definitions used in data extraction and classifications of target condition(s), index test(s), reference standard(s) and other characteristics (e.g. study design, clinical setting).	6
Risk of bias and applicability	12	Describe methods used for assessing risk of bias in individual studies and concerns regarding the applicability to the review question.	7
Diagnostic accuracy measures	13	State the principal diagnostic accuracy measure(s) reported (e.g. sensitivity, specificity) and state the unit of assessment (e.g. per-patient, per-lesion).	7
Synthesis of results	14	Describe methods of handling data, combining results of studies and describing variability between studies. This could include, but is not limited to: a) handling of multiple definitions of target condition. b) handling of multiple thresholds of test positivity, c) handling multiple index test readers, d) handling of indeterminate test results, e) grouping and comparing tests, f) handling of different reference standards	7

Section/topic	#	PRISMA-DTA Checklist Item	Reported on page #
Meta-analysis	D2	Report the statistical methods used for meta-analyses, if performed.	
Additional analyses	16	Describe methods of additional analyses (e.g., sensitivity or subgroup analyses, meta-regression), if done, indicating which were pre-specified.	7
<b>RESULTS</b>			<b>8-15</b>
Study selection	17	Provide numbers of studies screened, assessed for eligibility, included in the review (and included in meta-analysis, if applicable) with reasons for exclusions at each stage, ideally with a flow diagram.	8
Study characteristics	18	For each included study provide citations and present key characteristics including: a) participant characteristics (presentation, prior testing), b) clinical setting, c) study design, d) target condition definition, e) index test, f) reference standard, g) sample size, h) funding sources	9
Risk of bias and applicability	19	Present evaluation of risk of bias and concerns regarding applicability for each study.	15
Results of individual studies	20	For each analysis in each study (e.g. unique combination of index test, reference standard, and positivity threshold) report 2x2 data (TP, FP, FN, TN) with estimates of diagnostic accuracy and confidence intervals, ideally with a forest or receiver operator characteristic (ROC) plot.	12-14
Synthesis of results	21	Describe test accuracy, including variability; if meta-analysis was done, include results and confidence intervals.	12-14
Additional analysis	23	Give results of additional analyses, if done (e.g., sensitivity or subgroup analyses, meta-regression; analysis of index test: failure rates, proportion of inconclusive results, adverse events).	12-14
<b>DISCUSSION</b>			<b>15-22</b>
Summary of evidence	24	Summarize the main findings including the strength of evidence.	16
Limitations	25	Discuss limitations from included studies (e.g. risk of bias and concerns regarding applicability) and from the review process (e.g. incomplete retrieval of identified research).	21
Conclusions	26	Provide a general interpretation of the results in the context of other evidence. Discuss implications for future research and clinical practice (e.g. the intended use and clinical role of the index test).	21
<b>FUNDING</b>			<b>22</b>
Funding	27	For the systematic review, describe the sources of funding and other support and the role of the funders.	22

S2 Table

Antigen ( <i>Leishmania</i> species)	Antigen Type	Origin of samples	Reference standard test	TL patients	Control (total)	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Reference
A2 (Li)	RP	Brazil	Microscopy and PCR	TL=50 (CL=25/ML=25)	75 (HC=25/DC=50)	100.0	38.6	Lage et al., 2019
Acidic ribosomal P2β proteins (Lb)	RP	Peru	ELISA	TL=18 (CL=5/ML=13)	DC=8	50.0	75.0	Padilla et al., 2003
Cathepsin L-like (Lb) <sup>#</sup>	RP	Brazil	Microscopy and PCR	TL=65 (CL=45/ML=20)	70 (HC=50/DC=20)	96.9	95.7	Menezes-Souza et al., 2015
Cathepsin L-like_peptide (Lb) <sup>#</sup>	SP	Brazil	Microscopy and PCR	TL=65 (CL=45/ML=20)	70 (HC=50/DC=20)	96.9	91.4	Menezes-Souza et al., 2015
Cytochrome c oxidase (Li) <sup>#</sup>	RP	Brazil	Microscopy and PCR	TL=24 (CL=12/ML=12)	28 (HC=20/DC=8)	100.0	100.0	Coelho et al. 2016
Enolase (Lb)	RP	Brazil	Microscopy, PCR and MST	TL=43 (CL=23/ML=20)	40 (HC=30/DC=10)	100.0	85.0	Duarte et al., 2015
Enolase (Lb) <sup>#</sup>	RP	Brazil	Microscopy and PCR	TL=40 (CL=15/ML=25)	143 (HC=75/DC=68)	100.0	97.8	Lima et al., 2018
Eukaryotic initiation factor 5a (Lb) <sup>#</sup>	RP	Brazil	Microscopy, PCR and MST	TL=43 (CL=23/ML=20)	40 (HC=30/DC=10)	100.0	92.5	Duarte et al., 2015
Eukaryotic initiation factor 5a (Lb) <sup>#</sup>	RP	Brazil	Microscopy and PCR	TL=40 (CL=15/ML=25)	143 (HC=75/DC=68)	100.0	97.8	Lima et al., 2018
H2A (Li)	RP	Brazil	MST, serologic, histopathology and/or therapeutic test	TL=102 (CL=49/ML=53)	DC=92	62.9	67.0	Souza et al., 2013
H2B (Li)	RP	Brazil	MST, serologic, histopathology and/or therapeutic test	TL=102 (CL=49/ML=53)	HC=88	41.2	79.5	Souza et al., 2013
H3 (Li)	RP	Brazil	MST, serologic, histopathology and/or therapeutic test	TL=102 (CL=49/ML=53)	HC=88	39.8	71.5	Souza et al., 2013
H4 (Li)	RP	Brazil	MST, serologic, histopathology and/or therapeutic test	TL=102 (CL=49/ML=53)	HC=88	52.5	71.5	Souza et al., 2013
HSP70 (Li)	RP	Brazil	MST, serologic, histopathology and/or therapeutic test	TL=102 (CL=49/ML=53)	DC=92	67.9	91.3	Souza et al., 2013

HSP70 (Lb)	RP	Peru	Culture	TL=50 (CL=30/ML=20)	36 (HC=20/DC=16)	84.0	91.7	Zurita et al., 2003
HSP70 (1–114) (Lb)	RP	Peru	Culture	TL=50 (CL=30/ML=20)	36 (HC=20/DC=16)	14.0	100.0	Zurita et al., 2003
HSP70 (109–245) (Lb)	RP	Peru	Culture	TL=50 (CL=30/ML=20)	36 (HC=20/DC=16)	14.0	100.0	Zurita et al., 2003
HSP70 (240–357) (Lb)	RP	Peru	Culture	TL=50 (CL=30/ML=20)	36 (HC=20/DC=16)	10.0	100.0	Zurita et al., 2003
HSP70 (352–518) (Lb)	RP	Peru	Culture	TL=50 (CL=30/ML=20)	36 (HC=20/DC=16)	38.0	97.2	Zurita et al., 2003
HSP70 (513–663) (Lb)	RP	Peru	Culture	TL=50 (CL=30/ML=20)	36 (HC=20/DC=16)	70.0	100.0	Zurita et al., 2003
HSP83.1 (Lb) #	RP	Brazil	Microscopy and PCR	TL=65 (CL=45/ML=20)	70 (HC=50/DC=20)	93.9	95.7	Menezes-Souza et al., 2014
HSP83.peptide1 (Lb)	SP	Brazil	Microscopy and PCR	TL=65 (CL=45/ML=20)	70 (HC=50/DC=20)	63.1	94.3	Menezes-Souza et al., 2014
HSP83.peptide2 (Lb)	SP	Brazil	Microscopy and PCR	TL=65 (CL=45/ML=20)	70 (HC=50/DC=20)	63.1	90.0	Menezes-Souza et al., 2014
HSP83.peptide3 (Lb)	SP	Brazil	Microscopy and PCR	TL=65 (CL=45/ML=20)	70 (HC=50/DC=20)	89.2	91.4	Menezes-Souza et al., 2014
HP_LbrM.30.3350 (Lb)	RP	Brazil	Microscopy, PCR and MST	TL=43 (CL=23/ML=20)	40 (HC=30/DC=10)	95.4	85.0	Duarte et al., 2015
HP_XP_001469551.1 (Li) #	RP	Brazil	Microscopy and PCR	TL=57 (CL=27/ML=30)	55 (HC=40/DC=15)	100.0	98.2	Carvalho et al., 2017
HP_XP_001566959.1 (Lb) #	RP	Brazil	Microscopy, MST and PCR	TL=45 (CL=20/ML=25)	HC=50	100.0	98.0	Lima et al., 2017
HP_XP_001566959.1 (Lb) #	RP	Brazil	Microscopy and PCR	TL=40 (CL=15/ML=25)	143 (HC=75/DC=68)	100.0	97.8	Lima et al., 2018
HP_XP_003886492.1 (Li) #	RP	Brazil	Microscopy and PCR	TL=50 (CL=25/ML=25)	75 (HC=25/DC=50)	100.0	100.0	Lage et al. 2019
T26-U2 (like - H2b) (Lp)	RP	Colombia and Peru	Serologic	TL=78	DC=39	58.0	87.0	Montoya et al., 1997
T26-U4 (like - HSP70) (Lp)	RP	Colombia and Peru	Serologic	TL=78	DC=39	76.9	97.0	Montoya et al., 1997
Kmp11 (Li)	RP	Brazil	MST, serologic, histopathology and/or therapeutic test	TL=102 (CL=49/ML=53)	HC=88	71.7	53.4	Souza et al., 2013

Lb6H (Lb) #	RP	Brazil	Microscopy, PCR and/or histopathology	TL=219	281 (HC=68/DC=213)	100.0	93.6	Sato et al., 2017
Lb8E (Lb)	RP	Brazil	Microscopy, PCR and/or histopathology	TL=219	HC=68	83.3	83.3	Sato et al., 2017
MAPK3 (Lb)	RP	Brazil	Microscopy and PCR	TL=65 (CL=45/ML=20)	70 (HC=50/DC=20)	83.1	71.4	Menezes-Souza et al., 2015
MAPK4 (Lb)	RP	Brazil	Microscopy and PCR	TL=65 (CL=45/ML=20)	70 (HC=50/DC=20)	75.4	97.1	Menezes-Souza et al. 2015
Peroxidoxin (Lb) #	RP	Brazil	Microscopy and PCR	TL=65 (CL=45/ML=20)	70 (HC=50/DC=20)	98.5	100.00	Menezes-Souza et al., 2014a
Putative IgE histamine releasing factor (Li) #	RP	Brazil	Microscopy and PCR	TL=24 (CL=12/ML=12)	28 (HC=20/DC=8)	100.0	100.0	Coelho et al. 2016
Ribosomal protein L25 (23083) (Lb)	SP	Peru	Microscopy and culture	TL=20	19 (HC=9/DC=10)	30.0	89.5	González et al., 2002
Ribosomal protein L25 (23085) (Lb)	SP	Peru	Microscopy and culture	TL=20	19 (HC=9/DC=10)	35.0	89.5	González et al., 2002
Ribosomal protein L25 (23089) (Lb)	SP	Peru	Microscopy and culture	TL=20	19 (HC=9/DC=10)	40.0	89.5	González et al., 2002
Small myristoylated protein-3 (Li) #	RP	Brazil	Microscopy and PCR	TL=40 (CL=15/ML=25)	100 (HC=35/DC=65)	100.0	99.0	Salles et al., 2019
Small myristoylated protein-3.peptide 1#	SP	Brazil	Microscopy and PCR	TL=40 (CL=15/ML=25)	100 (HC=35/DC=65)	94.50	92.50	Salles et al., 2019
Tryparedoxin peroxidase (Lb) #	RP	Brazil	Microscopy, PCR and MST	TL=43 (CL=23/ML=20)	40 (HC=30/DC=10)	100.0	100.0	Duarte et al., 2015
β-tubulin (Lb) #	RP	Brazil	Microscopy and PCR	TL=40 (CL=15/ML=25)	143 (HC=75/DC=68)	100.0	97.8	Lima et al., 2018
β-tubulin (Lb)	RP	Brazil	Microscopy, PCR and MST	TL=43 (CL=23/ML=20)	40 (HC=30/DC=10)	100.0	82.5	Duarte et al., 2015
A10 (Lb) #	SP	Brazil	Microscopy and PCR	TL=50 (CL=20/ML=30)	DC=10	100.0	100.0	Costa et al., 2016
B7 (Lb) #	SP	Brazil	Microscopy and PCR	TL=50 (CL=20/ML=30)	DC=10	100.0	100.0	Costa et al., 2016
B10 (Lb)	SP	Brazil	Microscopy and PCR	TL=50 (CL=20/ML=30)	DC=10	66.0	100.0	Costa et al., 2016
C11 (Lb)	SP	Brazil	Microscopy and PCR	TL=50 (CL=20/ML=30)	DC=10	60.0	100.0	Costa et al., 2016

C12 (Lb) #	SP	Brazil	Microscopy and PCR	TL=50 (CL=20/ML=30)	DC=10	100.0	100.0	Costa et al., 2016
H7 (Lb) #	SP	Brazil	Microscopy and PCR	TL=50 (CL=20/ML=30)	DC=10	100.0	100.0	Costa et al., 2016
Con-A-bound fraction (Lb)	PP	Brazil	Microscopy and Serologic	TL=58	171 (HC=49/DC=122)	81.0	58.0	Gomes-Silva et al., 2008
Con-A-bound fraction (La)	PP	Brazil	Microscopy and Serologic	TL=58	171 (HC=49/DC=122)	19.0	71.0	Gomes-Silva et al., 2008
Jaca-bound fraction (Lb)	PP	Brazil	Microscopy and Serologic	TL=58	171 (HC=49/DC=122)	60.0	66.0	Gomes-Silva et al., 2008
Jaca-bound fraction (La)	PP	Brazil	Microscopy and Serologic	TL=58	171 (HC=49/DC=122)	38.0	65.0	Gomes-Silva et al., 2008

HP – hypothetical protein; HC – healthy control; DC – disease control; RP – recombinant protein; PP – purified protein; SP – synthetic peptide; La – *L. amazonensis*; Lb – *L. braziliensis*; Li – *L. infantum*; Lp – *L. peruviana*; # – antigenic target presenting sensitivity and specificity above 90%

**S3 Table**

Antigen ( <i>Leishmania</i> species)	Antigen Type	Origin of samples	Reference standard test	CL patients	Control (total)	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Reference
Gp63 (Ld)	PP	Sudan	Microscopy or histopathology	33	56 (HC=20/DC=36)	52.0	80.4	Jensen et al., 1996
Gp63 (Lm)	PP	Sudan	Microscopy or histopathology	33	56 (HC=20/DC=36)	39.0	83.9	Jensen et al., 1996
GPB (Lm)	SP	Sudan	Microscopy or histopathology	33	115 (HC=36/DC=79)	82.0	94.8	Jensen et al., 1996
H1 (Lb)	RP	Peru	Microscopy and culture	24	44 (HC=12/DC=32)	66.6	90.9	Carmelo et al., 2002
H1_peptide 23061 (Lb)	SP	Peru	Microscopy and culture	24	44 (HC=12/DC=32)	12.5	100.0	Carmelo et al., 2002
H1_peptide 23063 (Lb)	SP	Peru	Microscopy and culture	24	44 (HC=12/DC=32)	0.0	100.0	Carmelo et al., 2002
H1_peptide 23065 (Lb)	SP	Peru	Microscopy and culture	24	44 (HC=12/DC=32)	11.7	100.0	Carmelo et al., 2002
H1_peptide 23067 (Lb)	SP	Peru	Microscopy and culture	24	44 (HC=12/DC=32)	46.8	90.9	Carmelo et al., 2002
H1_peptide 23069 (Lb)	SP	Peru	Microscopy and culture	24	44 (HC=12/DC=32)	18.8	100.0	Carmelo et al., 2002
H1_peptide 23071 (Lb)	SP	Peru	Microscopy and culture	24	44 (HC=12/DC=32)	12.9	97.7	Carmelo et al., 2002
H1_peptide 23073 (Lb)	SP	Peru	Microscopy and culture	24	44 (HC=12/DC=32)	0.0	100.0	Carmelo et al., 2002
H2A (Li)	RP	Brazil	MST, serologic, histopathology and/ or therapeutic test	49	DC=92	69.8	67.0	Souza et al., 2013

H2B (Li)	RP	Brazil	MST, serologic, histopathology and/ or therapeutic test	49	HC=88	77.8	61.3	Souza et al., 2013
H3 (Li)	RP	Brazil	MST, serologic, histopathology and/ or therapeutic test	49	HC=88	50.6	55.6	Souza et al., 2013
H4 (Li)	RP	Brazil	MST, serologic, histopathology and/ or therapeutic test	49	HC=88	60.4	54.5	Souza et al., 2013
HSP70 (Li)	RP	Brazil	MST, serologic, histopathology and/ or therapeutic test	49	DC=92	64.1	86.9	Souza et al., 2013
HSP70 (Lb)	RP	Peru	Culture	30	36 (HC=20/DC=16)	83.3	91.7	Zurita et al., 2003
HSP70 (1–114) (Lb)	RP	Peru	Culture	30	36 (HC=20/DC=16)	6.6	100.0	Zurita et al., 2003
HSP70 (109–245) (Lb)	RP	Peru	Culture	30	36 (HC=20/DC=16)	3.3	100.0	Zurita et al., 2003
HSP70 (240–357) (Lb)	RP	Peru	Culture	30	36 (HC=20/DC=16)	0.0	100.0	Zurita et al., 2003
HSP70 (352–518) (Lb)	RP	Peru	Culture	30	36 (HC=20/DC=16)	30.0	97.2	Zurita et al., 2003
HSP70 (513–663) (Lb)	RP	Peru	Culture	30	36 (HC=20/DC=16)	73.3	100.0	Zurita et al., 2003
HSP83 (Li) <sup>#</sup>	RP	Brazil	MST and/or histopathology and IFAT	12	20 (HC=10/DC=10)	100.0	100.0	Celeste et al., 2004
HSP83 (Li) <sup>#</sup>	RP	Brazil	Microscopy and Immunological	12	DC=79	100.0	97.5	Celeste et al., 2014
HSP83.1 (Lb) <sup>#</sup>	RP	Brazil	Microscopy and PCR	45	70 (HC=50/DC=20)	95.6	95.7	Menezes-Souza et al., 2014b
HSP83.peptide1 (Lb)	SP	Brazil	Microscopy and PCR	45	70 (HC=50/DC=20)	71.1	94.3	Menezes-Souza et al., 2014b
HSP83.peptide2 (Lb)	SP	Brazil	Microscopy and PCR	45	70 (HC=50/DC=20)	64.4	90.0	Menezes-Souza et al., 2014b
HSP83.peptide3 (Lb) <sup>#</sup>	SP	Brazil	Microscopy and PCR	45	70 (HC=50/DC=20)	95.6	91.4	Menezes-Souza et al., 2014b
HP_XP_001566959.1) (Lb) <sup>#</sup>	RP	Brazil	Microscopy, IDRM and PCR	20	HC=50	100.0	98.0	Lima et al., 2017
Kmp11 (Li)	RP	Brazil	MST, serologic, histopathology and/ or therapeutic test	49	HC=88	55.7	53.4	Souza et al., 2013
Lbk39 (Lb)	RP	Brazil	Microscopy	74	63 (HC=50/DC=13)	88.0	98.0	Souza et al., 2019
NGP 0204	PP	Brazil	Microscopy and culture	30	119 (HC=60/DC=59)	70.0	60.5	Souza et al., 2018
NGP 2203	PP	Brazil	Microscopy and culture	30	119 (HC=60/DC=59)	93.3	51.3	Souza et al., 2018
NGP 2333	PP	Brazil	Microscopy and culture	30	119 (HC=60/DC=59)	93.3	64.7	Souza et al., 2018
NGP 2334	PP	Brazil	Microscopy and culture	30	119 (HC=60/DC=59)	90.0	58.8	Souza et al., 2018

Peroxidoxin (Lb) <sup>#</sup>	RP	Brazil	Microscopy and PCR	45	70 (HC=50/DC=20)	100.0	100.0	Menezes-Souza et al., 2014a
Superoxide Dismutase (Lm)	RP	Iran	Microscopy	30	41 (HC=20/DC=21)	53.6	97.6	Yeganeg et al., 2009
Superoxide dismutase (Lp)	PP	Peru	Micorscopy	68	32 (HC=12/DC=20)	88.2	33.3	Marin et al., 2009
iron-superoxide dismutase (La)	PP	Colombia	Microscopy	51	HC=10	82.4	100.0	Longoni et al., 2014
iron-superoxide dismutase (Lp)	PP	Colombia	Microscopy	51	HC=10	11.7	100.0	Longoni et al., 2014
P1 _ like Gp63 (Lb)	SP	Brazil	ELISA	57	DC=30	72.0	86.6	Link et al ,2017
MIX (P1 + P2 + P3) _ like Gp63 (Lb)	SP	Brazil	ELISA	57	DC=30	79.0	90.0	Link et al ,2017
36 kDa e 48–56 kDa (Lb)	PP	Brazil	Microscopy	60	177 (HC=66/DC=111)	93.3	68.9	Skraba et al., 2014
Fraction 8 - Peak 2 (Lb)	PP	Brazil	Microscopy, MST and IFAT	48	114 (HC=48/DC=66)	85.4	91.2	Vidgal et al., 2008

HC - healthy control; DC - disease control; RP - recombinant protein; PP - purified protein; SP - synthetic peptide; <sup>#</sup> - antigenic target presenting sensitivity and specificity above 90%.

**S4 Table**

Antigen ( <i>Leishmania</i> species)	Test format evaluated	Origin of samples	Reference standard test	CL patients	Control (total)	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Reference
Peroxidoxin (pAb and mAb)	ICT	Suriname	Microscopy	79	DC=14	36.7	85.7	Schallig et al., 2019
Peroxidoxin (pAb and mAb)	ICT	Afghanistan	Microscopy and/or PCR	257	DC=17	65.4	100.0	Vink et al., 2018
Peroxidoxin (pAb and mAb)	ICT	Morocco	Microscopy and/or PCR	136	DC=83	67.6	94.0	Bennis et al., 2018
Peroxidoxin (pAb and mAb)	ICT	Sri Lanka	PCR	59	HC=22	35.6	100.0	de Silva et al., 2017
IS2-2B4 - A11 (Lt) and XLVI-5B8-B3 (Lm) (mAb) <sup>#</sup>	IHC	Iran	Cytology or histopathology and PCR	100	DC=30	96.0	100.0	Shirian et al., 2014
G2D10 (Lg) (mAb)	IHC	Central America	Culture	41	DC=20	51.2	100.0	Kenner et al., 1999

HC - healthy control; DC - disease control; mAb - monoclonal antibody; pAb - polyclonal antibody; Lt - *Leishmania tropica*; Lm - *Leishmania major*; Lg - *Leishmania gerbilli*; <sup>#</sup> - antigenic target presenting sensitivity and specificity above 90%.

S5 Table

Antigen ( <i>Leishmania</i> species)	Antigen Type	Origin of samples	Reference standard test	ML patients	Control (total)	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Reference
Acidic ribosomal protein family_LiP2aQ ( <i>Li</i> )	RP	Colombia / Peru	Microscopy and IFAT	21	DC=30	76.0	100.0	Soto et al., 1996
Acidic ribosomal protein family_LiP2bQ ( <i>Li</i> )	RP	Colombia/Peru	Microscopy and IFAT	21	DC=30	42.0	100.0	Soto et al., 1996
H2A ( <i>Li</i> )	RP	Brazil	MST, serologic, histopathology and/ or therapeutic test	53	DC=92	56.3	79.1	Souza et al., 2013
H2B ( <i>Li</i> )	RP	Brazil	MST, serologic, histopathology and/ or therapeutic test	53	HC=88	86.0	61.3	Souza et al., 2013
H3 ( <i>Li</i> )	RP	Brazil	MST, serological, histopathology and/ or therapeutic test	53	HC=88	42.9	69.3	Souza et al., 2013
H4 ( <i>Li</i> )	RP	Brazil	MST, serologic, histopathology and/ or therapeutic test	53	HC=88	80.3	54.5	Souza et al., 2013
HSP70 ( <i>Li</i> )	RP	Brazil	MST, serologic, histopathology and/ or therapeutic test	53	DC=92	79.2	92.3	Souza et al., 2013
HSP70 ( <i>Lb</i> )	RP	Peru	Culture	20	36 (HC=20/DC=16)	85.0	91.7	Zurita et al., 2003
HSP70 (1–114) ( <i>Lb</i> )	RP	Peru	Culture	20	36 (HC=20/DC=16)	25.0	100.0	Zurita et al., 2003
HSP70 (109–245) ( <i>Lb</i> )	RP	Peru	Culture	20	36 (HC=20/DC=16)	30.0	100.0	Zurita et al., 2003
HSP70 (240–357) ( <i>Lb</i> )	RP	Peru	Culture	20	36 (HC=20/DC=16)	25.0	100.0	Zurita et al., 2003
HSP70 (352–518) ( <i>Lb</i> )	RP	Peru	Culture	20	36 (HC=20/DC=16)	50.0	97.2	Zurita et al., 2003
HSP70 (513–663) ( <i>Lb</i> )	RP	Peru	Culture	20	36 (HC=20/DC=16)	65.0	100.0	Zurita et al., 2003
HSP83 ( <i>Li</i> ) <sup>#</sup>	RP	Brazil	MST and/or histopathology and IFAT	14	20 (HC=10/DC=10)	100.0	100.0	Celeste et al., 2004
HSP83 ( <i>Li</i> ) <sup>#</sup>	RP	Brazil	Microscopy and Immunological	14	DC=79	100.0	97.5	Celeste et al., 2014
HSP83.1 ( <i>Lb</i> ) <sup>#</sup>	RP	Brazil	Microscopy and PCR	20	70 (HC=50/DC=20)	90.0	95.7	Menezes-Souza et al., 2014b
HSP83.peptide1 ( <i>Lb</i> )	SP	Brazil	Microscopy and PCR	20	70 (HC=50/DC=20)	55.0	94.3	Menezes-Souza et al., 2014b

HSP83.peptide2 ( <i>Lb</i> )	SP	Brazil	Microscopy and PCR	20	70 (HC=50/DC=20)	50.0	90.0	Menezes-Souza et al., 2014b
HSP83.peptide3 ( <i>Lb</i> )	SP	Brazil	Microscopy and PCR	20	70 (HC=50/DC=20)	75.0	91.4	Menezes-Souza et al., 2014b
Kmp11	RP	Brazil	MST, serologic, histopathology and/ or therapeutic test	53	HC=88	74.0	71.5	Souza et al., 2013
HP_XP_001566959.1 ( <i>Lb</i> ) <sup>#</sup>	RP	Brazil	Microscopy, MST and PCR	25	HC=50	100.0	98.0	Lima et al., 2017
HP_XP_001467126.1 ( <i>L.i</i> ) <sup>#</sup>	RP	Brazil	Microscopy and PCR	23	58 (HC=35/DC=23)	100.0	100.0	Dias et al., 2018
Peroxidoxin ( <i>Lb</i> ) <sup>#</sup>	RP	Brazil	Microscopy and PCR	20	70 (HC=50/DC=20)	95.0	100.00	Menezes-Souza et al., 2014a
Iron-Superoxide dismutase ( <i>Lb</i> )	PP	Peru	Microscopy	45	32 (HC=12/DC=20)	93.3	32.4	Marin et al., 2009

HC - Healthy control; DC - Disease control; RP - Recombinant protein; PP - Purified protein; SP - synthetic peptide; <sup>#</sup> - antigenic target presenting sensitivity and specificity above 90%

**APÊNDICE 2**

**Título:** *Anti-mitochondrial trypanothione peroxidase (mTXNPx) monoclonal antibody-based immunohistochemistry for diagnosis of cutaneous leishmaniasis*

**Revista:** *Frontiers in Microbiology* (Fator de Impacto: 5.6)

**Status:** Artigo publicado



## OPEN ACCESS

# Anti-mitochondrial Tryparedoxin Peroxidase Monoclonal Antibody-Based Immunohistochemistry for Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis

**Edited by:**

Carlos Robello,  
Universidad de la República, Uruguay

**Reviewed by:**

Maria Echeverry,  
National University of Colombia,  
Colombia  
Kadir Gonzalez,  
Gorgas Memorial Institute for Health  
Studies, Panama  
Mohsen Kalantari,  
Shiraz University of Medical Sciences,  
Iran

**\*Correspondence:**

Edward Oliveira  
edward.oliveira@fiocruz.br

<sup>†</sup> These authors have contributed  
equally to this work and share last  
authorship

**Specialty section:**

This article was submitted to  
Infectious Agents and Disease,  
a section of the journal  
Frontiers in Microbiology

**Received:** 07 October 2021

**Accepted:** 27 December 2021

**Published:** 28 February 2022

**Citation:**

Freire ML, Rego FD, Lopes KF,  
Coutinho LA, Grenfell RFQ,  
Avelar DM, Cota G,  
Pascoal-Xavier MA and Oliveira E  
(2022) Anti-mitochondrial  
Tryparedoxin Peroxidase Monoclonal  
Antibody-Based  
Immunohistochemistry for Diagnosis  
of Cutaneous Leishmaniasis.  
Front. Microbiol. 12:790906.  
doi: 10.3389/fmicb.2021.790906

Mariana Lourenço Freire<sup>1</sup>, Felipe Dutra Rego<sup>1</sup>, Karine Ferreira Lopes<sup>1</sup>,  
Lucélia Antunes Coutinho<sup>1</sup>, Rafaella Fortini Queiroz Grenfell<sup>1</sup>, Daniel Moreira Avelar<sup>1</sup>,  
Gláucia Cota<sup>1</sup>, Marcelo Antônio Pascoal-Xavier<sup>1,2†</sup> and Edward Oliveira<sup>1\*\*</sup>

<sup>1</sup>Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, Brazil, <sup>2</sup>Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

Cutaneous leishmaniasis (CL) remains a globally spreading public health problem. Among Latin America countries, Brazil has the greatest number of recorded CL cases with several *Leishmania* species being associated with human cases. Laboratory diagnosis is one of the major challenges to disease control due to the low accuracy of parasitological techniques, the restricted use of molecular techniques, and the importance of differential diagnosis with regard to several dermatological and systemic diseases. In response, we have developed and validated an immunohistochemistry (IHC) technique for CL diagnosis using anti-mTXNPx monoclonal antibody (mAb). Recombinant *Leishmania*-mTXNPx was produced and used as an immunogen for mAb production through the somatic hybridization technique. The viability of mAb labeling of *Leishmania* amastigotes was tested by IHC performed with skin biopsies from hamsters experimentally infected with *Leishmania amazonensis*, *Leishmania braziliensis*, and *Leishmania guyanensis*. The enzymes horseradish peroxidase (IHC-HRP) and alkaline phosphatase (IHC-AP), both biotin-free polymer detection systems, were used in the standardization step. The IHC was further validated with skin biopsies from 49 CL patients diagnosed by clinical examination and quantitative real-time polymerase chain reaction and from 37 patients presenting other dermatological infectious diseases. Other parasitological techniques, such as direct examination and culture, were also performed for confirmed CL patients. Histopathology and IHC were performed for all included patients. Overall, the highest sensitivity was observed for IHC-AP (85.7%), followed by IHC-HRP (79.6%), direct examination (77.6%), histopathological examination (HE; 65.3%), and *in vitro* culture (49%). Only IHC and HE presented specificity over 90% and were able to detect CL patients regardless of parasite burden (odds ratio > 1.94; 95%CI: 0.34–11.23). A significant increase in positivity rates was observed when IHC-AP

was combined with direct examination (95.9%) and HE (93.9%). The IHC techniques evaluated in here detected the main *Leishmania* species causing CL in Brazil and can support diagnostic strategies for controlling this neglected disease, especially if used in combination with other approaches for an integrative laboratorial diagnosis.

**Keywords:** cutaneous leishmaniasis, immunohistochemistry, diagnosis, monoclonal antibody, mTXNPx

## INTRODUCTION

Cutaneous leishmaniasis (CL) is a neglected global disease that is often prevalent in the poorest and marginalized communities. It causes skin lesions, residual scars, and stigmatization, with serious psychosocial impacts on the lives of patients (Karimkhani et al., 2016; Galvão et al., 2019). The disease is endemic in at least 88 countries, and more than 210,000 cases have been reported in Brazil during the last decade, mainly caused by *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*, *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*, and *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis* (Brasil, 2017, 2021; WHO, 2020). Considering the clinical complexity of CL and the ineffective strategies available for vector control, disease prevention still relies on early diagnosis, followed by prompt and effective treatment of human cases (PAHO, 2019).

The clinical diagnosis of CL, although relevant, is insufficient for case definition, and differential diagnosis is required due to the broad clinical spectrum of the disease and the often reported presence of similar dermatological diseases in leishmaniasis endemic areas (Tirelli et al., 2017). Laboratory diagnosis is currently based on parasitological, molecular, histopathological, and immunopathological tests; however, gold-standard tests are not yet available (Faber et al., 2003; Goto and Lindoso, 2010). Direct examination of skin lesion scrapings or impression smears is conventionally used as a diagnostic test, even with its variable and generally low sensitivity. In New World countries, where CL chronic cases are frequent, the sensitivity of this test has ranged 30–80%, varying according to the onset of skin lesion, parasite burden, and professional expertise (Ramirez et al., 2000; Schubach et al., 2001; Faber et al., 2003; de Mello et al., 2011; Espir et al., 2016). Polymerase chain reaction (PCR) is usually more sensitive than parasitological tests and allows the identification and quantification of the parasite in tissue. However, despite several advances, the high cost and absence of a standardized protocol limit the use of PCR at reference centers (Moreira et al., 2018). The Montenegro Skin Test has long been used in Brazil as a screening method in endemic areas and in the laboratory routine for CL diagnosis, but the test is no longer used due to the suspension of antigen production (Braz, 2019). Although immunological methods are not currently used in clinical practice, different antigens have been evaluated to improve the restricted scenario for CL diagnosis (Freire et al., 2021), including peroxidoxin (Menezes-Souza et al., 2014), renamed as mitochondrial trypanedoxin peroxidase (mTXNPx) in trypanosomatids (Teixeira et al., 2015). This member of an antioxidant protein family from *Leishmania* is highly expressed in amastigote forms and has been detected in the immunochromatographic assay CL Detect™ Rapid Test (InBios International Inc., Seattle, WA, United States), with sensitivity of

around 65% in Old World countries (Bennis et al., 2018; Vink et al., 2018).

Histopathological examination (HE), a widely available technique, is usually more affordable than other assays and can help with CL diagnosis. However, recognizing the amastigote forms of *Leishmania* can occasionally be a limiting factor for CL case confirmation. From this perspective, immunohistochemistry (IHC) has proven to be a valuable tool at reducing this lacuna in CL diagnosis by labeling the amastigote forms of *Leishmania* spp., with sensitivity ranging 60–80% worldwide. Although several advances have been reported using IHC, hyperimmune sera and detection systems based on biotin are still used for CL diagnosis, which may be related to unspecific markings and limited specificity (Salinas et al., 1989; Schubach et al., 2001; Ramos-Vara et al., 2008; Amato et al., 2009; Quintella et al., 2009; Lunedo et al., 2012; Alves et al., 2013; Marques et al., 2017; Gonzalez et al., 2019). Due to the shortage of commercially available monoclonal antibody (mAb) for *Leishmania* detection, the use of IHC is indeed still limited, although promising (Beena et al., 2003; Salotra et al., 2003; Shirian et al., 2014). Thus, we produced an anti-mTXNPx mAb and applied it in the IHC using two biotin-free polymer detection systems for CL diagnosis. The availability of this diagnostic tool represents a potential advance toward increasing access to adequate laboratory diagnosis in Brazil.

## MATERIALS AND METHODS

### Ethics Statement

The study was approved by the Human Research Ethics Committee of the Instituto René Rachou, Oswaldo Cruz Foundation (IRR/Fiocruz, CAAE number 56188716.5.0000.5091) and of the Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG, CAAE number 14887414.0.0000.5149), respectively.

Furthermore, BALB/c mice (*Mus musculus*) and golden hamsters (*Mesocricetus auratus*) were obtained from the IRR/Fiocruz animal facility, and all protocols were licensed by the Ethics Committee of Animal Use of Fiocruz (licenses LW-15/15 and LW-4/18).

### Experimental Design

Since mTXNPx has been considered a promising target in different immunological tests for CL diagnosis (Freire et al., 2021), the recombinant protein *Leishmania* mTXNPx was produced and used to immunize BALB/c mice, stimulating the production of a specific antibody. After this stage, the anti-mTXNPx mAb was produced and used in IHC to label *Leishmania* spp. amastigotes. A pilot experimental study performed IHC with skin biopsies of hamsters experimentally

infected with the main species of *Leishmania* associated with CL in Brazil: *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, and *L. amazonensis*. Amastigote labeling was evaluated using two IHC protocols based on distinct polymer detection systems. Once the specific labeling was confirmed, these protocols were standardized and validated on skin biopsies from patients with CL-suggestive clinical diagnosis: the first using the enzyme horseradish peroxidase (HRP) and the other using alkaline phosphatase (AP).

### Production of Recombinant Antigen

The nucleotide sequences that code for *Leishmania infantum*-mTXNPx were obtained by back-translation of amino acid sequences (PDB ID: 6E0F). This sequence is highly similar to mTXNPx from other *Leishmania* species associated with CL worldwide, such as *L. braziliensis* (86.7%), *L. amazonensis* (98.7%), *L. guyanensis* (86.3%), and *L. major* (98.2%), such that some are still being named peroxidoxin (Supplementary Figure 1). The restriction sites for *Bam*HI and *Hind*III were inserted into the 5' and 3' ends of the minigene, respectively. Optimization, synthesis, and insertion of the minigene within the pET28a vector were performed by GenScript (Piscataway, NJ, United States). This synthetic gene was constructed containing the DNA sequence of 678 bp, corresponding to 226 amino acids (24.86 kDa). The pET28a with mTXNPx sequence construction (pET28a-mTXNPx) was used to transform *Escherichia coli* BL21 Star competent cells by thermal shock (15 min on ice, 1 min at 42°C, and 10 min on ice). Thereafter, the selected clones were tested by restriction analysis with *Bam*HI and *Hind*III, and those presenting the mTXNPx gene were cultured *in vitro* at 37°C in Luria-Bertani (LB) medium containing 30 µg/ml of kanamycin Sigma-Aldrich, (San Luis, MO, United States).

The started cultures were inoculated overnight in fresh LB medium (proportion of 1:25), maintained under the conditions previously described, until an optical density from 0.6 to 0.8 at 590 nm (OD<sub>590</sub>) for the expression of mTXNPx. At this time, the cultures were induced with 1 mmol/L isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) under constant agitation of 200 × g per min at 37°C overnight. Cells were harvested by centrifugation at 10,000 × g for 20 min, and the pellets were lysed for protein purification from inclusion bodies under denaturing conditions (Ntumngia and Adams, 2012). Briefly, the cells were resuspended in lysis buffer [50 mmol/L Tris buffer, pH 8.0, 500 mmol/L NaCl, 0.2 mmol/L EDTA, 3% sucrose, 1% Triton X-100, 200 µg/ml lysozyme, 1 mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), and 20 µg/ml DNase], and the lysates were sonicated in an ultrasonic processor (VC-750, SONICS VIBRA CELL, Newtown, OH, United States) by five cycles of 30-s pulse at 40% of intensity. Inclusion bodies were recovered by centrifugation at 13,000 × g for 40 min, washed twice [50 mmol/L Tris buffer (pH 8.0), 3 mol/L urea, 0.2 mmol/L EDTA, and 500 mmol/L NaCl], sonicated, and centrifuged as previously described. The inclusion bodies were solubilized (10 mmol/L phosphate buffer, pH 7.8, 200 mmol/L NaCl, 10 mmol/L Tris, 6 mol/L GuHCl, and 10 mmol/L BetOH), and the recombinant proteins were purified by affinity chromatography using Ni Sepharose High Performance resin

(GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Sweden) in Poly-Prep Chromatography columns (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, United States), according to the instructions of the manufacturer.

The expression and purification of mTXNPx were analyzed by 15% SDS-PAGE (Laemmli, 1970). The protein was blotted to a nitrocellulose membrane (Amersham Protran, 0.45 µm—GE Healthcare, Little Chalfont, United Kingdom), and Western blotting analysis (Towbin et al., 1979) was performed using monoclonal 6x-His-tag antibody (1:3,000) Thermo Fisher Scientific, (Waltham, MA, United States) and ECL<sup>TM</sup> Prime Western Blotting (GE Healthcare UK Ltd., Buckinghamshire, United Kingdom) as a detection agent. Blot images were obtained with ImageQuant LAS 4000 imaging system (GE Healthcare, Chicago, IL, United States).

### Production of Monoclonal Antibody

Two female 5-week-old BALB/c mice were subcutaneously immunized with the first dose containing 20 µg of mTXNPx and Freund's complete adjuvant. Four other immunizations containing 20 µg of mTXNPx and Freund's incomplete adjuvant were performed at intervals of 2 weeks. As a control, two female BALB/c mice were also immunized with saline and Freund's adjuvant, following the same conditions. Blood samples were obtained before each immunization, by submandibular vein puncture using a sterile single-use lancet, as well as after the fifth dose. The serum was titrated by indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), using mTXNPx as antigen and following the protocol described by Grenfell et al. (2014), with changes in absorbance being monitored at a wavelength of 450 nm. Once the production of specific antibodies was confirmed by ELISA, additional boosting immunization was performed intraperitoneally following the conditions described previously. Splenocytes were isolated for cell fusion 3 days after boosting, following the protocols described previously with modifications (Kennett et al., 1979; Harn et al., 1984). Briefly, 3.5 × 10<sup>7</sup> splenocytes and 7 × 10<sup>6</sup> Sp2/0-IL6 myeloma cells were mixed with 20 ml Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, United States) and centrifuged at 10,000 × g for 20 min, discarding the supernatant. After this step, a polyethylene glycol-dimethyl sulfoxide solution (Hybri-Max, Sigma, St. Louis, MO, United States) was preheated to 37°C, and 700 µl was added dropwise into the cell pellet while mixing slowly. The cellular suspension was incubated for 1.5 min, then 15 ml of DMEM was further added, and additional centrifugation at 300 × g for 3 min was performed. The cells were resuspended in 30 ml of DMEM, supplemented with 20% fetal bovine serum (FBS) and 1% PenStrep (Gibco Laboratories, Waltham, MA, United States). The fused cells were cultured at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> for 24 h. Selective 2% hypoxanthine-aminopterin-thymidine medium (HAT; Sigma-Aldrich) was added to the fused cell cultures, which were subsequently seeded into a 96-well plate containing previously collected mouse peritoneal macrophages. The wells were first screened by microscopy at 10–14 days later, and antibody production was confirmed by ELISA. The well containing the greatest number of cells and the higher value of absorbance

(at least 1.20) was expanded and subcloned by limiting the dilution until at the concentration of a single cell per well. The clone was expanded *in vitro* under the same conditions of the culture, and the supernatant containing anti-mTXNPx mAb was collected weekly. The cell culture supernatant, containing mAb, was concentrated using Amicon® Stirred Cells filtration system with Diaflo ultrafilters (EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, United States). The mAb was purified using HiTrap Blue HP and HiTrap rProtein A FF (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) according to the instructions of the manufacturer. The purification of anti-mTXNPx mAb was analyzed by 15% SDS-PAGE, and the antigen–antibody reaction was confirmed by Western blotting analysis using 1 µg of mTXNPx, 1:100 of anti-mTXNPx mAb, and 1:20.000 of anti-mouse antibody conjugated with HRP.

### Soluble *Leishmania* Antigen

Soluble *Leishmania* antigens (SLAs) were prepared with stationary-phase promastigotes of *L. amazonensis* (SLaA) (IFLA/BR/67/PH8), *L. braziliensis* (SLbA) (MHOM/BR/75/M2903), and *L. guyanensis* (SLgA) (MHOM/BR/75/M4147) maintained in the biphasic medium NNN (Novy, McNeal, and Nicolle)/LIT (liver infusion tryptose), supplemented with 20% inactivated FBS and 1% PenStrep. The parasites were washed twice with sterile phosphate-buffered saline (PBS) and centrifuged for 10 min at 2,000 × g and 4°C, and the supernatants were removed. Pellets containing the parasites were resuspended in lysis buffer (20 mmol/L HEPES, 10 mmol/L KCl, 1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 250 mmol/L sucrose, 1 mmol/L DTT, and 0.1 mmol/L PMSF) and submitted to 10 cycles of liquid nitrogen freezing and heating at 37°C. After this step, the partially lysed cells were centrifuged for 10 min at 2,000 × g and 4°C, the supernatant was removed, and the pellets were sonicated in five cycles of 30 s per pulse at 40% intensity, followed by a final centrifugation at 2,000 × g and 4°C for 15 min. The capacity of anti-mTXNPx mAb to detect this antigen in SLAs from each *Leishmania* species was performed by Western blotting analysis using 5 µg of each SLA, 1:100 of anti-mTXNPx mAb, and 1:20.000 of anti-mouse antibody conjugated with HRP.

### Pilot Experimental Study Using Golden Hamsters

Male golden hamsters (*Mesocricetus auratus*), 5 weeks old, were experimentally infected with *L. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8), *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), and *L. guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147). All inoculums were prepared in a total volume of 200 µl of sterile PBS with 1 × 10<sup>6</sup> stationary-phase parasites administered intradermally in the dorsal region of the right hind paw (Rêgo et al., 2018). Fragments from skin lesions were harvested at 30 days post-infection and fixed in 10% buffered formalin (pH 7.2). These samples were used in IHC with anti-mTXNPx mAb and two biotin-free polymeric detection systems to confirm *Leishmania* amastigote labeling.

### Validation in Human Samples

#### Study Population

The sample size was calculated considering 57.8% of *Leishmania* prevalence in the Leishmaniasis Reference Center of the Instituto René Rachou, Oswaldo Cruz Foundation (CRL-IRR/Fiocruz), with 0.75 confidence limit and 95% specificity. The minimum values of 34 non-cases and 47 CL cases were estimated (Flahault et al., 2005).

All biopsy samples were from patients with suspected CL and who reside in Minas Gerais, a Brazilian state endemic for this disease. Forty-nine patients who attended from 2017 to 2019 at the CRL-IRR/Fiocruz were included. The CL case definition criterion was based on the detection of the kDNA minicircle of *Leishmania* spp. by quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR). Moreover, direct examination and *in vitro* culture for *Leishmania* spp. isolation were performed by CRL-IRR/Fiocruz for all CL cases. Thirty-seven patients who were attended at the Clínica de Dermatologia Osvaldo Costa (Hospital das Clínicas/Universidade Federal de Minas Gerais), presenting other dermatological infectious diseases clinically similar to CL in the clinical practice, such as sporotrichosis (*n* = 7), paracoccidioidomycosis (*n* = 1), mycobacteriosis (*n* = 6), and dermatitis (*n* = 23), were included as a non-CL group. The definitive diagnosis of these diseases was established by clinical examination and laboratory tests, such as culture for sporotrichosis, paracoccidioidomycosis, and mycobacteriosis as well as search of acid–alcohol-resistant bacilli in dermal smears for mycobacteria cases. For all suggestive clinical examination and laboratory tests with proven negative results, the diagnosis of non-specific dermatitis was determined.

Histopathology and IHC were performed for all included patients. All samples were anonymized, and the researchers involved in the study were blinded to the nature of the samples.

#### Histopathology

Skin fragments from infected hamsters and CL patients were fixed in 10% buffered formalin (pH 7.2) for at least 24 h, followed by histological processing (dehydration, clarification, and embedding in paraffin) using the tissue processor PT05 TS Automatic Tissue Processor and the Inclusion Center CI 2014 (Lupetec, São Carlos, SP, Brazil). Four-micron-thick sections from the paraffin blocks containing the tissues were stained with hematoxylin–eosin and examined with a Zeiss microscope (Hallbergmoos, Germany) to detect the presence of amastigote forms (Pascoe and Gatehouse, 1986).

#### Immunohistochemistry

Since the detection systems can influence the sensitivity of the technique (Skaland et al., 2010), the IHC was standardized and validated with two biotin-free polymeric detection systems: (1) Novolink Polymer Detection System (Leica Microsystems, Newcastle, United Kingdom), a polymeric HRP-linker antibody conjugate system containing 3,3'-diaminobenzidine (DAB) solution as substrate chromogen, which labels the detected antigen with a brown color—IHC

using this detection system is hereon referred to as IHC-HRP and (2) Bond Polymer Refine Red Detection (Leica Microsystems, Newcastle, United Kingdom), a polymeric AP-linker antibody conjugate system containing Fast Red solution as substrate chromogen, which labels the antigen-detected in red color—IHC using this detection system is hereon referred to as IHC-AP.

For all IHC, 4- $\mu$ m-thick sections of the paraffin blocks containing the tissues were mounted on ImmunoSlides (EasyPath, São Paulo, SP - Brazil) and incubated overnight at 56°C. Initially, the IHC reactions (IHC-HRP and IHC-AP) were standardized using fragments of skin lesions from hamsters infected with *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, and *L. guyanensis* and from three CL patients previously confirmed by direct parasitological examination, *Leishmania* culture, and histopathology. Relevant parameters of the reactions, such as antigen retrieval, endogenous peroxidase blocking, antibody dilution, and incubation with the substrate chromogen, were evaluated to obtain a strong staining signal, with minimal or no background staining, using the higher antibody dilution in shorter reaction time (Lin and Chen, 2014). Details about the standardization are presented in **Supplementary Table 1**. The final protocols for IHC with each polymeric detection system are described below.

#### Immunohistochemistry-Horseradish Peroxidase

Microscope slides were dewaxed and hydrated with two xylene washes (10 min at room temperature), three 100% ethanol washes, and two distilled water washes (5 min for each step). The reaction proceeded with the following steps: (1) antigenic recovery with 10 mmol/L citrate buffer solution, pH 6.0, at a temperature of approximately 90°C for 30 min using a steamer, (2) inhibition of the endogenous peroxidase with peroxidase block for 20 min, (3) blocking of non-specific sites with protein block for 40 min, (4) incubation with anti-mTXNPx mAb (1:300 dilution) for 60 min, (5) post-primary antibody block for 30 min, (6) Novolink Polymer incubation for 30 min, (7) reaction revelation with DAB Chromogen (1:100 dilution in Novolink DAB substrate buffer) for 30 s, and (8) counterstaining with hematoxylin for 3 min.

#### Immunohistochemistry-Alkaline Phosphatase

Dewaxing, hydrating, and antigenic recovery were performed using 1:100 dilution of Trilogy® (Cell Marque, Rocklin, CA, United States) at a temperature of approximately 90°C for 30 min using a steamer. The reaction proceeded with the following steps: (1) blocking of non-specific sites with 5% powdered and skimmed milk (Molico®, Nestle) in PBS for 30 min, (2) incubation with anti-mTXNPx mAb (1:500 dilution) for 60 min, (3) post-primary AP antibody block for 30 min, (4) polymer AP incubation for 30 min, (5) reaction revelation with a solution containing Red Part A (1:10), Red Part B (1:50), and Red Part C (1:50), diluted in Red Part D for 3 min, and (6) counterstaining with hematoxylin for 3 min.

All steps of IHC-HRP and IHC-AP were performed at room temperature after the antigenic recovery, and Tris-buffer (Tris base 5 mmol/L; NaCl 140 mmol/L; pH 7.6) was used as washing

solution between each step. The slides were cover-slipped with Entellan® (Merck) and examined with a Zeiss microscope (Hallbergmoos, Germany) to detect the presence of amastigote forms (Pascoe and Gatehouse, 1986).

### Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction

Whole DNA was extracted from skin biopsies of patient and from *L. braziliensis* promastigote culture using Wizard® SV Genomic DNA Purification System according to the instructions of the manufacturer Promega, (Madison, WI, United States). A 120-bp fragment from a variable kDNA region of the *Leishmania* genus was amplified using the primers 150 (sense) 5' (C/G)(C/G)(G/C) CC(C/A) CTA T(T/A)T TAC ACC AAC CCC 3' and 152 (antisense) 5' GGG GAG GGG CGT TCT GCG AA 3' (Degraeve et al., 1994; Passos et al., 1996). Amplifications were performed in triplicate containing 12.5  $\mu$ l Universal SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, United States), 1 mmol/L of each primer (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, United States), and 10 ng of DNA template for a final volume of 25  $\mu$ l. Real-time PCR was performed with the Step One Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, United States), using optical grade 96-well plates. After an initial denaturation step of 10 min at 95°C, 30 cycles of 15 s at 95°C, 1 min at 60°C, and 30 s at 72°C, the melt curve was determined (Chagas et al., 2021). PCR mix without DNA and DNA extraction kit components were used in all qPCR assays as negative controls. Standard curves were obtained using serial dilutions (1:10 dilution factor) of *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), starting from the concentration equivalent to 1 ng until a concentration equivalent to  $1 \times 10^{-6}$  ng. The parasite burdens of skin biopsies were calculated considering 83.15 fg of *Leishmania* DNA equivalent to one parasite due to the size of the *L. braziliensis* haploid genome, following the calculation (parasite DNA equivalents per reaction/amount of tissue DNA per reaction)  $\times 10^3$ , expressed as *Leishmania* parasites per microgram of tissue DNA (Jara et al., 2013; Suárez et al., 2015; Sevilha-Santos et al., 2019).

### Data Analysis

Sensitivity, specificity, and diagnostic accuracy were calculated using a two-by-two contingency table with an exact 95% binomial confidence interval (CI) using Open-Epi Software (Dean et al., 2015). These parameters were compared using the chi-square ( $\chi^2$ ) test at the confidence level of 0.05, with MedCalc for Windows, version 15.0 (MedCalc Software, Ostend, Belgium).

Binary logistic regression analysis was performed to evaluate the influence model of the following predictors (variables) in the positivity of the tests: gender and age of the patients as well as the site, number, and onset time of skin lesions and parasite burden. Significant predictors were selected by the forward stepwise method, considering *P*-value  $< 0.25$ , from an initial modeling considering all these variables, and odds ratios (OR) with 95% confidence intervals were calculated. All analyses were performed in Minitab 17 (State College, PA, United States).

## RESULTS

### Characteristics of Participants

Forty-nine samples from CL patients with clinically compatible lesion and positive qPCR were included (Supplementary Table 2). The mean age was 44.8 years (SD  $\pm$  20.6), 75.5% (37/49) of the patients were male, and the mean number of lesions per patient was 2 (SD  $\pm$  2.18). The most predominant lesion sites were the lower extremities (61.9%), followed by the upper extremities (23.8%) and the face (9.5%). The average lesion onset time was 4 months (SD  $\pm$  3.04), in which patients who presented  $\leq$ 2 months were considered with recent infection ( $n$  = 16) and patients who presented  $>$ 2 months were defined with longer evolution ( $n$  = 33), according to the cytokine profile during the early phase of the disease (Ribeiro-de-Jesus et al., 1998; Baratta-Masini et al., 2007).

### Expression and Purification of mTXNPx

The fragment of 226aa corresponding to *L. infantum*-mTXNPx was used to obtain the DNA sequence by reverse translation, which was optimized for expression in prokaryotic systems (Supplementary Figure 2). The transformation of *E. coli* with the synthetic gene of approximately 678 bp was confirmed by enzymatic cleavage. Protein expression was confirmed through the difference between the bacterial lysate before and after IPTG induction in 15% SDS-PAGE, and mTXNPx purification was confirmed by reactivity with 6x-His-tag antibody (Supplementary Figure 3).

### Production of Monoclonal Antibody

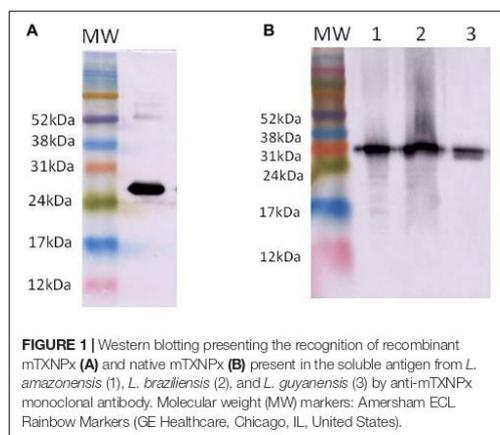
A significant production of anti-mTXNPx antibodies was observed in mice before the third immunization, and the absorbance remained greater than 1.0 after five immunizations. About 400 HAT-resistant hybridoma clones were recovered after cell fusion between BALB/c mice splenocytes and Sp2/0-IL6 myeloma cells. Of this total, 21 produced a high-binding mTXNPx antibody. The anti-mTXNPx mAb was purified and confirmed by 15% SDS-PAGE (Supplementary Figure 4). The specificity of the anti-mTXNPx mAb to recognize mTXNPx was analyzed (Figure 1A) as well as the presence of this native antigen in SLaA, SLbA, and SLgA (Figure 1B).

### Pilot Experimental Study

The presence of *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, and *L. guyanensis* amastigotes from skin lesion fragments of experimentally infected hamsters was confirmed by IHC using anti-mTXNPx mAb with both detection systems (Figures 2, 3). A histopathological examination of these fragments also confirmed the presence of amastigote forms.

### Performance of the Diagnostic Tests

The sensitivity, specificity, and accuracy of the diagnostic tests are shown in Table 1. The IHC-AP was the only test with sensitivity over 80%, while a significantly lower sensitivity was observed for HE ( $p$  = 0.02) and culture ( $p$  = 0.001). No difference was observed between HE and IHC (for both detection systems) for specificity.



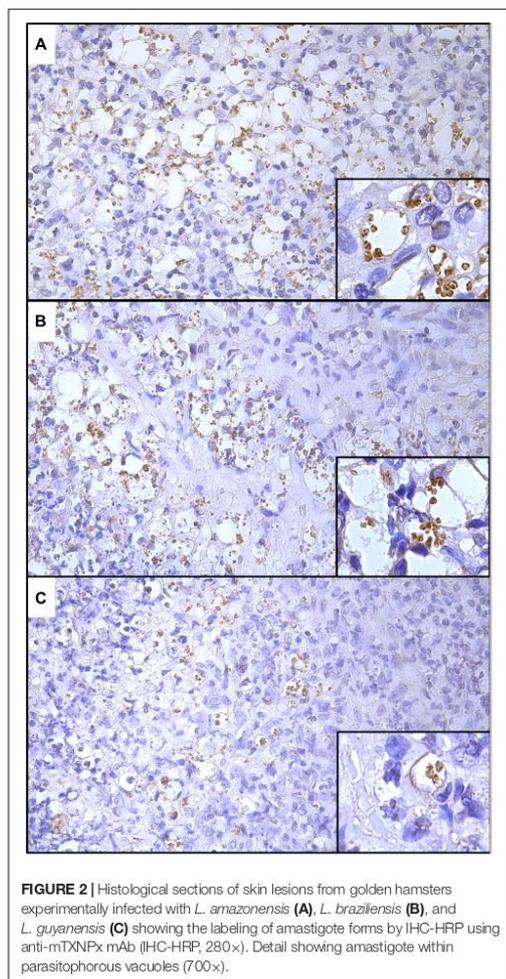
**FIGURE 1** | Western blotting presenting the recognition of recombinant mTXNPx (A) and native mTXNPx (B) present in the soluble antigen from *L. amazonensis* (1), *L. braziliensis* (2), and *L. guyanensis* (3) by anti-mTXNPx monoclonal antibody. Molecular weight (MW) markers: Amersham ECL Rainbow Markers (GE Healthcare, Chicago, IL, United States).

Overall, the IHC techniques exhibited the highest accuracies, but only IHC-AP had significantly superior results compared to HE ( $p$  = 0.02). There was no significant difference between IHC-HRP and IHC-AP for any of the evaluated parameters.

Skin lesion onset time ( $\leq$  or  $>$ 2 months) and parasite burden ( $\leq$  or  $>$ 10 parasites/ $\mu$ g tissue) were the only parameters correlated with diagnostic test assertiveness (Figure 4A). Although all tests were affected by the onset time of lesion, this parameter was not a determinant of assertiveness (Figure 4B). In contrast, high parasite burden ( $\geq$ 10 parasites/ $\mu$ g of tissue) was significantly associated with positivity rate only for direct examination (OR = 11.18; 95%CI = 2.00–62.51) and culture (OR = 4.46; 95%CI = 1.24–16.05). However, parasite burden was not observed to affect the assertiveness of the diagnosis for HE and IHC, suggesting that these tests were not affected by this parameter. Significant differences between parasite burden and the results of direct examination and culture are also shown in Figure 4C.

The great improvement of IHC techniques over traditional hematoxylin-eosin staining of sections is due to the ease by which amastigote forms can be visualized in the histological sections, especially for patients with low parasite burdens (Figures 5, 6). This was true regardless of the detection system (HRP or AP), although the chromatic contrast between labeled amastigotes and tissue is greater for IHC-AP. The absence of stained amastigotes in histological sections for non-CL patients can be checked in Figure 7.

Since diagnostic tests are frequently used in combination to enhance the confirmation of CL cases, the positivity rates for combining tests were calculated (Table 2). The use of IHC techniques in association with another diagnostic test increased the positivity rates regardless of the combination, clearly improving the assertiveness of CL diagnosis. An increase in positivity rate when using direct examination was observed only when it was combined with IHC-AP (95.9%;  $p$  = 0.0079). The combination between HE and IHC-HRP and between HE and



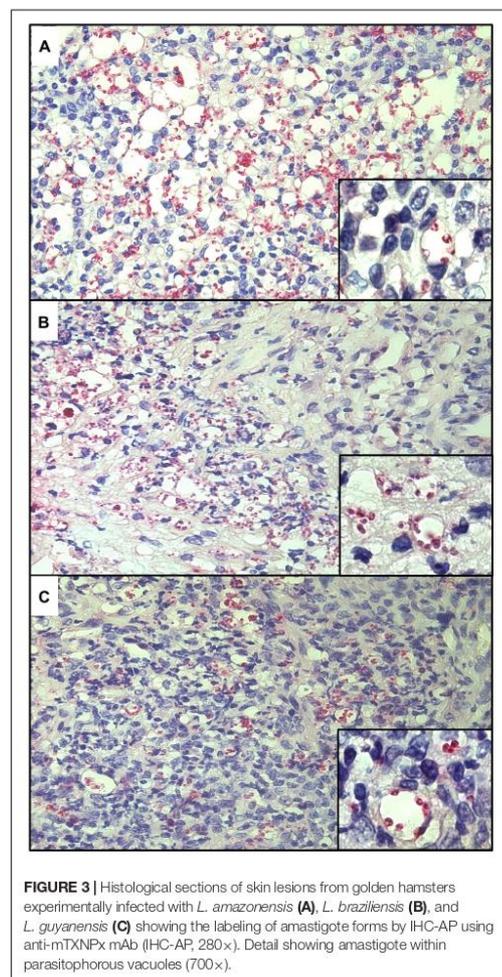
**FIGURE 2** | Histological sections of skin lesions from golden hamsters experimentally infected with *L. amazonensis* (A), *L. braziliensis* (B), and *L. guyanensis* (C) showing the labeling of amastigote forms by IHC-HRP using anti-mTXNPx mAb (IHC-HRP, 280 $\times$ ). Detail showing amastigote within parasitophorous vacuoles (700 $\times$ ).

IHC-AP resulted in 85.7% (42/49) and 93.9% (46/49) positivity, respectively ( $p < 0.02$ ). Although the inclusion of other tests in parallel, such as culture and/or direct examination, increased the number of CL patients correctly diagnosed, no statistical difference was observed in relation to the results for HE and IHC-HRP or HE and IHC-AP ( $p > 0.05$ ).

## DISCUSSION

Cutaneous leishmaniasis remains a relevant public health problem, leading to psychosocial problems, stigmatization, exclusion, and distress (WHO, 2020). One of the many challenges

that have been addressed to reduce the impact of this disease is early and accurate diagnosis, which is often impaired due to the broad range of clinical manifestations, the absence of a gold-standard test, and the scarce economic resources. Indeed further studies on CL diagnosis are essential to reach adequate laboratory testing for at least 80% of the cases, according to the World Health Organization action plan (PAHO, 2017). The present study developed and validated IHC using anti-mTXNPx mAb and two biotin-free polymeric detection systems for CL diagnosis. The results suggest that this technique may significantly improve the sensitivity of CL diagnosis even in patients presenting low parasite burden. Furthermore, IHC with anti-mTXNPx mAb was

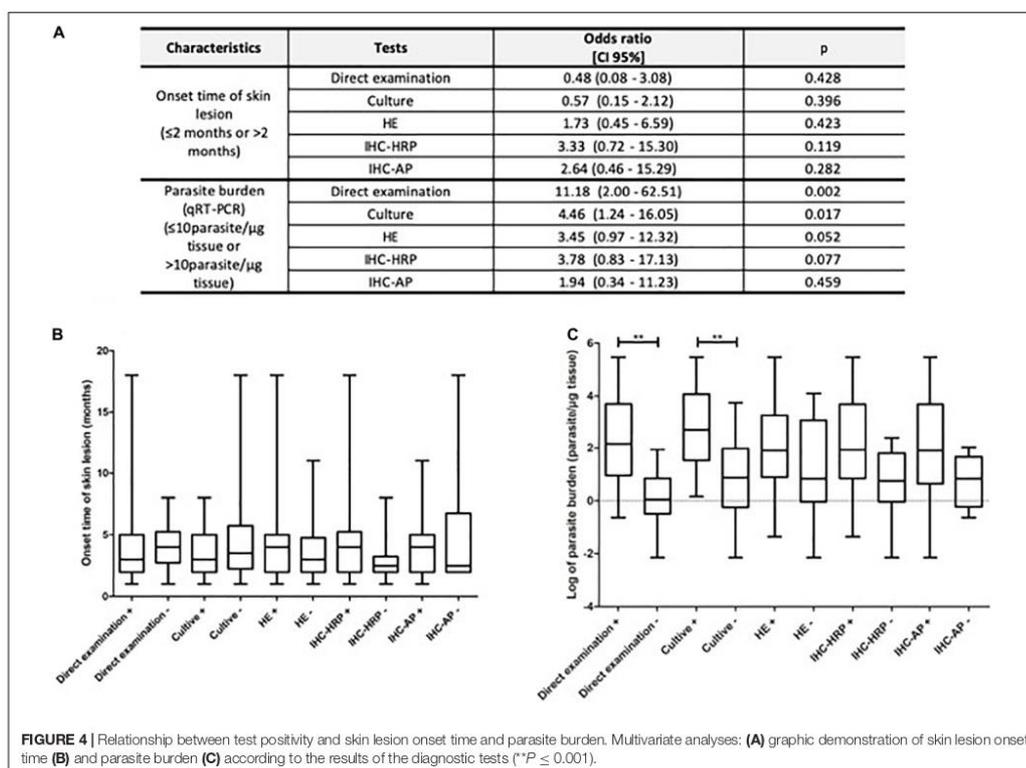


**FIGURE 3** | Histological sections of skin lesions from golden hamsters experimentally infected with *L. amazonensis* (A), *L. braziliensis* (B), and *L. guyanensis* (C) showing the labeling of amastigote forms by IHC-AP using anti-mTXNPx mAb (IHC-AP, 280 $\times$ ). Detail showing amastigote within parasitophorous vacuoles (700 $\times$ ).

**TABLE 1** | Sensitivity, specificity, and diagnostic accuracy of direct examination, culture, histopathology (HE), and immunohistochemistry (IHC) using two detection systems.

Tests	Sensitivity (%) [95% CI] (n = 49)	Specificity (%) [95% CI] (n = 37)	Accuracy (%) [95% CI] (n = 86)
Direct examination <sup>a</sup>	77.6 [64.1–87.0] (38/49)	–	–
Culture <sup>a</sup>	49.0 [35.6–62.5] (24/49)	–	–
HE	65.3 [51.3–77.1] (32/49)	94.6 [82.3–98.5] (35/37)	77.9 [68.1–85.4]
IHC-HRP	79.6 [66.4–88.5] (39/49)	94.6 [82.3–98.5] (35/37)	86.1 [77.2–91.8]
IHC-AP	85.7 [73.3–92.9] (42/49)	97.3 [86.2–99.6] (36/37)	90.7 [82.7–95.2]

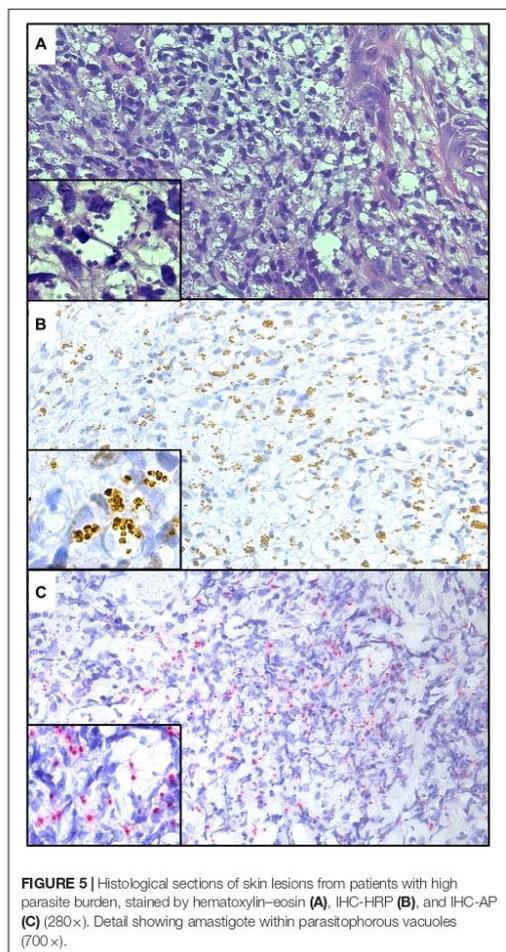
<sup>a</sup>Direct examination and culture were not performed for the non-CL group; therefore, the specificity and accuracy of those were not calculated.



found to be able to detect the main *Leishmania* species causing CL in Brazil, and so it can be used in routine diagnostic procedures.

*Leishmania* mTXNPx is a member of an antioxidant protein family and has been considered a promising target (McGonigle et al., 1998), especially due to the highly conserved degree and expression level of the protein (Harder et al., 2006; Jirata et al., 2006) with confirmed immunogenic (Webb et al., 1998; Campos-Neto et al., 2001; Coler et al., 2002) and antigenic properties (Santarém et al., 2005; Menezes-Souza et al., 2014). This protein plays a pivotal role in neutralizing reactive oxygen

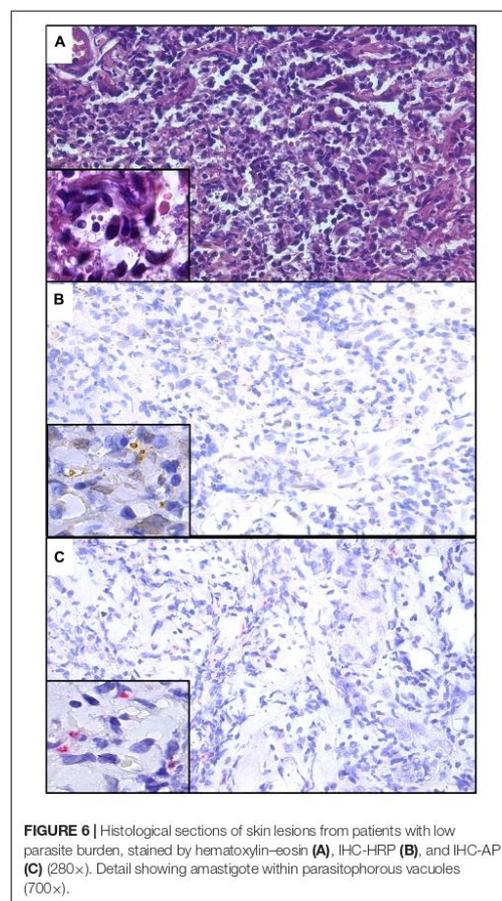
species produced by macrophages as a defense mechanism to eliminate *Leishmania* amastigote forms (Barr and Gedamu, 2003). Although mTXNPx is present in all stages of the development of the parasite, its expression is increased in the amastigote forms of several *Leishmania* species (Castro et al., 2002; Harder et al., 2006; Cuervo et al., 2009; Coelho et al., 2012). Therefore, mTXNPx has been used in immunodiagnostic studies and as vaccine candidate for leishmaniasis (Webb et al., 1998; Campos-Neto et al., 2001; Santarém et al., 2005; Menezes-Souza et al., 2014; Tabatabaie et al., 2014).

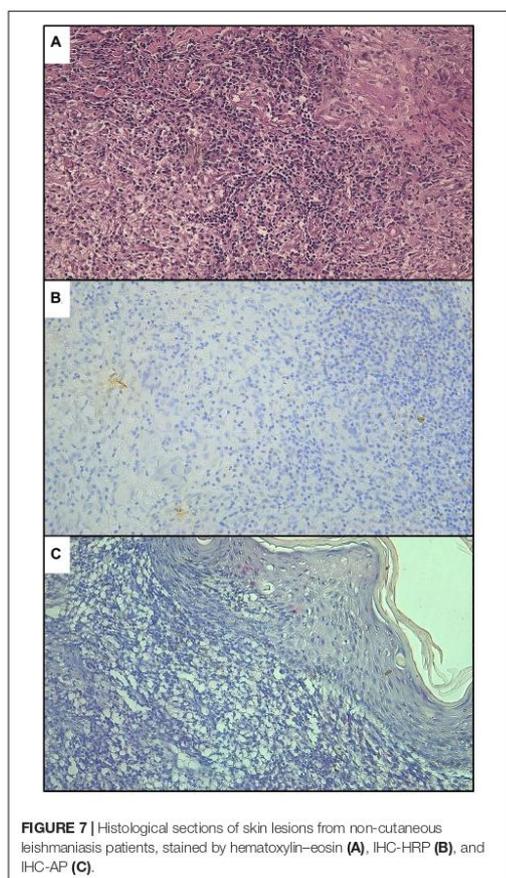


Previous studies have shown controversial results of using recombinant mTXNPx for CL diagnosis. In Brazil, high sensitivity (98.5%) has been reported when mTXNPx was used in ELISA (Menezes-Souza et al., 2014). On the other hand, in Suriname, the immunochromatographic assay CL Detect™ Rapid Test (InBios International Inc., Seattle, WA, United States), based on the *L. major* mTXNPx detection, presented low sensitivity (<37%), below that reported in Asia and Africa (De Silva et al., 2017; Vink et al., 2018; Schallig et al., 2019). In this specific context, the low sensitivity was associated with a lower expression of mTXNPx antigen or even due to a variant of this antigen in *L. guyanensis*, the main species associated with CL in Suriname (Schallig et al., 2019). Here, considering the endemic region, the CL patients evaluated were

probably infected with *L. braziliensis*; however, the expression of mTXNPx in promastigote and amastigote forms of other prevalent species in Brazil, such as *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, and *L. guyanensis*, was also demonstrated by Western blotting and IHC, respectively. The results suggest that IHC may also be used as a diagnostic test in all CL endemic regions in Brazil or wherever these species occur. It is noteworthy that the mTXNPx sequence used in the present study was obtained from *L. infantum*, and it is possible that the anti-mTXNPx mAb also recognizes amastigotes in patients infected with this parasite or even of other species whose protein sequences are similar, such as *Leishmania donovani*. Although uncommon, these species could also be associated with CL cases (Siriwardana et al., 2013; Lyra et al., 2015).

Several authors have considered IHC as one of the most relevant techniques in CL diagnosis (Salotra et al., 2003;





**FIGURE 7 |** Histological sections of skin lesions from non-cutaneous leishmaniasis patients, stained by hematoxylin–eosin (A), IHC-HRP (B), and IHC-AP (C).

Shirian et al., 2014). However, despite advances, most of the studies to date generally used anti-*Leishmania* serum obtained from immunizing animals with SLA and adopted a detection system using avidin–biotin complex (ABC) or labeled streptavidin–biotin (LSAB) (Salinas et al., 1989; Schubach et al., 2001; Amato et al., 2009; Quintella et al., 2009; Marques et al., 2017; Gonzalez et al., 2019). Notably, polyclonal sera contain different anti-*Leishmania* antibodies, and therefore cross-reactions are commonly reported, reducing the specificity of the reaction, especially in endemic regions. Furthermore, background color is frequently observed due to the presence of endogenous biotin when ABC or LSAB is used (Mighell et al., 2008; Ramos-Vara et al., 2008). For this reason, we propose the use of anti-mTXNPx mAb and polymer detection systems since polymer-based technology is often easier to carry out and presents higher sensitivity and less background staining color compared to biotin detection systems (Ramos-Vara, 2005). We

also propose to evaluate distinct polymer detection systems: horseradish peroxidase enzyme, the most widely used, and alkaline phosphatase enzyme, recommended for the diagnosis of infectious diseases (Liang et al., 2007; Ramos-Vara et al., 2008). Although these enzymes presented satisfactory results for CL diagnosis (Table 1) without a significant difference, IHC-AP was found to present better chromatic contrast and, thus, enhance the visualization of amastigote forms. Moreover, it was shown that, in some cases, brown pigments (hemosiderin) within macrophages may cause confusion and confound assertiveness in IHC-HRP as previously reported (Ramos-Vara, 2005).

Quantitative real-time polymerase chain reaction was used as a reference standard test due to its higher sensitivity, and the IHCs presented 79.6% (IHC-HRP) and 85.7% (IHC-AP) sensitivity. However, other studies have reported varying sensitivity, from 58.5 to 80%, for CL diagnosis, considering parasitological tests as a reference standard test and IHC with polyclonal sera and biotin systems (Salinas et al., 1989; Schubach et al., 2001; Amato et al., 2009; Quintella et al., 2009; Marques et al., 2017; Gonzalez et al., 2019). Using histopathological or *in vitro* culture as reference tests, Kenner et al. (1999) reported a sensitivity of 51% for IHC using mAb anti-*Leishmania gerbilli* (G2D10) and ABC system (Kenner et al., 1999). Sensitivity over 90% was reported for IHC using mAb against the specific protein of *L. major* and *Leishmania tropica* in Iran, considering clinical diagnosis as the reference test (Shirian et al., 2014). Regarding the specificity, we evaluated the anti-mTXNPx mAb in samples from patients presenting clinical signs similar to CL, which may represent a confounding factor in the clinical practice. Cross-reactions with other pathogens phylogenetically close to *Leishmania*, causing diseases such as Chagas' disease, was not evaluated here and may be performed in further studies. Overall, these results suggest that IHC may be a sensitive and effective test for CL diagnosis, especially using specific mAb and signal amplification polymeric systems as proposed here. However, it should be noted that the reference standard test is a crucial parameter in the accuracy of studies as it directly influences the performance of the index test.

The inverse correlation between skin lesion onset time and the sensitivity of parasitological techniques for CL diagnosis has been widely described, and reduction in sensitivity is mainly observed after 6 months of onset time (Weigle et al., 1987; Gutierrez et al., 1991; Ramirez et al., 2000). Multivariate regression analysis showed that the four tests evaluated here were influenced by this parameter; however, this predictor variable was not strictly determinant for the sensitivity of these tests (de Mello et al., 2011). On the other hand, parasite burden, measured by qPCR, was determinant for the positivity of direct examination and *in vitro* culture, highlighting a clear dependence of these tests on parasite burden. Since this parameter was not correlated with the assertiveness of HE and IHCs, their use may be strongly recommended regardless of parasite burden in CL patients.

Here we verify a clear improvement in CL case confirmation when HE was used in combination with IHC as previously reported (Quintella et al., 2009; Gonzalez et al., 2019). Indeed the use of IHC in laboratories with adequate equipment and infrastructure for routine

**TABLE 2 |** Positivity rates obtained by combining diagnostic test results.

Combined tests			% positivity rates (n = 49)	P
Two tests	Direct examination 77.6%	Culture	83.7 (41)	0.4470
		HE	87.8 (43)	0.1842
		IHC-HRP	91.8 (45)	0.0521
		IHC-AP	95.9 (47)	0.0079*
		HE	85.7 (42)	0.0001*
	Culture 49%	IHC-HRP	91.8 (45)	<0.0001*
		IHC-AP	87.8 (43)	<0.0001*
		IHC-HRP	85.7 (42)	0.0195*
		IHC-AP	93.9 (46)	0.0005*
		HE	85.7 (42)	0.0195*
Three tests	Direct examination + culture 83.7%	HE	93.9 (46)	0.1112
		IHC-HRP	98.0 (48)	0.0146*
		IHC-AP	98.0 (48)	0.0146*
		IHC-HRP	91.8 (45)	0.5151
		IHC-AP	95.9 (47)	0.1449
	Direct examination + HE 87.8%	IHC-HRP	95.9 (47)	0.0822
		IHC-AP	95.9 (47)	0.0822
		IHC-HRP	98.0 (48)	0.3057
		IHC-AP	98.0 (48)	0.3057
		IHC-AP	98.0 (48)	0.3057
Four tests	Direct examination + culture + HE 93.9%	IHC-AP	98.0 (48)	0.3057
		IHC-AP	98.0 (48)	0.3057

\* $p < 0.05$ .

histopathological diagnosis can make parasite identification more feasible. Regarding the histopathological patterns, only 8 (16.32%) samples from CL patients presented a well-organized granulomatous reaction in HE. This low number was not enough for any statistical inferences between the IHC positivity and the organization of the inflammatory response. We also verified in this study that IHC-AP significantly increased the positivity rate of direct examination (from 77.6 to 95.9%); thus, if pathology service is available, the use of direct examination and IHC can provide greater autonomy to the diagnosis procedure (Gonzalez et al., 2019).

In this study, we developed, applied, and evaluated the performance of anti-mTXNPx mAb in IHC for CL diagnosis. High sensitivity and specificity were observed for IHC using HRP and AP polymer detection systems; however, from the perspective of our expertise, we suggest the implementation of IHC-AP as a CL diagnosis tool, especially due to the chromatic contrast for amastigote visualization. Although a significantly substantial performance was presented here, several aspects of IHC using mAb should be considered, such as national production and accessibility. In locations with pathology service, the use of IHC could provide greater autonomy to CL diagnosis.

Thus, we encourage further studies on this topic, especially in endemic areas where other species of *Leishmania* are prevalent,

like *L. guyanensis* and *L. amazonensis*. Furthermore, multicenter studies of IHC-HRP and IHC-AP as well as of their performance with mucosal leishmaniasis are recommended. Further analysis considering aspects such as cost-effectiveness is also required as a crucial step to incorporate this technique in health services. Lastly, we believe that this study represents a crucial step toward the broader evaluation required to achieve greater autonomy in CL diagnosis outside of reference centers and decentralizing its diagnosis especially in Brazil.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

All relevant data are within the article/**Supplementary Material**.

## ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by Human Research Ethics Committee of the Instituto René Rachou, Oswaldo Cruz Foundation (IRR/Fiocruz, CAAE number 56188716.5.0000.5091). Written informed consent for participation was not required for this study in accordance with the national legislation and the institutional requirements. The animal study was reviewed and approved by Ethics Commission of Animal Use of Fiocruz (licenses LW-15/15 and LW-4/18).

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

MF produced recombinant mTXNPx and monoclonal antibody, performed the qPCR assay, analyzed the results, and wrote manuscript. FR assisted with *Leishmania* cultivation and experimental infection. KL assisted with the recombinant mTXNPx production. LC aided with the monoclonal antibody production. RG supported with the monoclonal antibody production. DA assisted with the qPCR assay and critically reviewed the manuscript for intellectual content. GC aided with the enrollment of the participants and caption of the participant data. MP-X aided validation of immunochemistry technique, supported with the study design, and critically reviewed the manuscript for intellectual content. EO assisted with the study design, data analysis, and critically reviewed the manuscript for intellectual content. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

## FUNDING

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001 and Instituto René Rachou-Oswaldo Cruz Foundation (IRR/FIOCRUZ). EO was supported by CNPq-Brazil (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico; Proc. 313471/2019-3).

## ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Fernanda Cesari (Laboratório de Anatomia Patológica, Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil)

## REFERENCES

- Alves, C. F., Alves, C. F., Figueiredo, M. M., Souza, C. C., Machado-Coelho, G. L. L., Melo, M. N., et al. (2013). American tegumentary leishmaniasis: effectiveness of an immunohistochemical protocol for the detection of leishmania in skin. *PLoS One* 8:e63343. doi: 10.1371/journal.pone.0063343
- Amato, V. S., Tuon, F. F., de Andrade, H. F. Jr., Bacha, H., Pagliari, C., Fernandes, E. R., et al. (2009). Immunohistochemistry and polymerase chain reaction on paraffin-embedded material improve the diagnosis of cutaneous leishmaniasis in the Amazon region. *Int. J. Dermatol.* 48, 1091–1095. doi: 10.1111/j.1365-4632.2009.04099.x
- Baratta-Masini, A., Teixeira-Carvalho, A., Cosme, L., Malaquias, C., Mayrink, W., Assis Martins-Filho, O., et al. (2007). Mixed cytokine profile during active cutaneous leishmaniasis and in natural resistance. *Front. Biosci.* 12:839. doi: 10.2741/2106
- Barr, S. D., and Gedamu, L. (2003). Role of peroxidoxins in *Leishmania chagasi* survival. Evidence of an enzymatic defense against nitrosative stress. *J. Biol. Chem.* 278, 10816–10823. doi: 10.1074/jbc.M212990200
- Beena, K. R., Ramesh, V., and Mukherjee, A. (2003). Identification of parasite antigen, correlation of parasite density and inflammation in skin lesions of post kala-azar dermal leishmaniasis. *J. Cutan. Pathol.* 30, 616–620. doi: 10.1034/j.1600-0560.2003.00125.x
- Bennis, I., Verdonck, K., El Khalifaoui, N., Riyad, M., Fellah, H., Dujardin, J.-C., et al. (2018). Accuracy of a rapid diagnostic test based on antigen detection for the

and Larissa Finamore Lopes (Imunologia de Doenças Virais, Instituto René Rachou, Brazil) for their assistance with the histological sections. We thank all the support received from the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES).

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2021.790906/full#supplementary-material>

**Supplementary Figure 1 |** Sequence of *Leishmania infantum*-mTXNPx used to produce the recombinant antigen, aligned with mTXNPx from *Leishmania braziliensis* (A), *Leishmania amazonensis* (B), *Leishmania guyanensis* (C), and *Leishmania major* (D).

**Supplementary Figure 2 |** Sequences of mTXNPx: (A) amino acid sequence of *L. infantum* mTXNPx (PDB ID: 6E0F) containing 226aa. (B) Synthetic gene construction containing the DNA sequence (678 bp), restriction enzyme sites *Bam*HI and *Hin*dIII at the 5' and 3' ends, respectively, and the stop codon.

**Supplementary Figure 3 |** Production of recombinant mTXNPx. (A) Polyacrylamide gel with DNA fragment of synthetic gene stained with silver, (B) 15% SDS-PAGE with lysate of culture before (1) and after (2) induction with IPTG and purified recombinant mTXNPx (3). (C) Western blotting using monoclonal 6x-His-tag antibody against recombinant mTXNPx. Molecular marker: 100 bp DNA Ladder (Promega, United States); molecular weight markers: Amersham ECL Rainbow Markers (GE Healthcare, Chicago, IL, United States).

**Supplementary Figure 4 |** Production of anti-mTXNPx monoclonal antibody. (A) Kinetics of antibody production (pools of sera) measured by ELISA before each immunization from mice immunized with recombinant mTXNPx or saline plus Freund's adjuvant. (B) 15% SDS-PAGE showing purified monoclonal anti-mTXNPx antibody under denaturing conditions (fragments of ~50 and ~25 kDa corresponding to heavy and light chains, respectively).

- diagnosis of cutaneous leishmaniasis in patients with suggestive skin lesions in Morocco. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 99, 716–722. doi: 10.4269/ajtmh.18-0066
- Brasil (2017). *Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Tegumentar. 1a. Brasília: Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde.* Available online at: [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual\\_vigilancia\\_leishmaniose\\_](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_) (accessed September 6, 2019).
- Brasil (2021). *Sistema de Informação Sobre Mortalidade.* Available online at: <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0203r.def> (accessed May 13, 2021).
- Braz, L. M. A. (2019). Tegumentary leishmaniasis diagnosis: what happened with MST (Montenegro skin test) in Brazil? *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 61, 1–3. doi: 10.1590/s1678-9946201961017
- Campos-Neto, A., Porrozz, R., Greeson, K., Coler, R. N., Webb, J. R., Seiky, Y. A., et al. (2001). Protection against cutaneous leishmaniasis induced by recombinant antigens in murine and nonhuman primate models of the human disease. *Infect. Immun.* 69, 4103–4108. doi: 10.1128/IAI.69.6.4103-4108.2001
- Castro, H., Budde, H., Flohé, L., Hofmann, B., Lünsdorf, H., Wissing, J., et al. (2002). Specificity and kinetics of a mitochondrial peroxidoxin of *Leishmania infantum*. *Free Radic. Biol. Med.* 33, 1563–1574. doi: 10.1016/S0891-5849(02)01088-2
- Chagas, ÚM. R., de Avelar, D. M., Marcelino, A. P., Paz, G. F., and Gontijo, C. M. F. (2021). Correlations between tissue parasite load and common clinical signs in dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Vet. Parasitol* 291:109368. doi: 10.1016/j.vetpar.2021.109368
- Coelho, V. T. S., Oliveira, J. S., Valadares, D. G., Chávez-Fumagalli, M. A., Duarte, M. C., Lage, P. S., et al. (2012). Identification of proteins in promastigote and

- amastigote-like Leishmania using an immunoproteomic approach. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6:1430. doi: 10.1371/journal.pntd.0001430
- Coler, R. N., Skeiky, Y. A. W., Bernards, K., Greeson, K., Carter, D., Cornellison, C. D., et al. (2002). Immunization with a polyprotein vaccine consisting of the T-cell antigens thiol-specific antioxidant, Leishmania major stress-inducible protein 1, and Leishmania elongation initiation factor protects against leishmaniasis. *Infect. Immun.* 70, 4215–4225. doi: 10.1128/IAI.70.8.4215-4225.2002
- Cuervo, P., De Jesus, J. B., Saboia-Vahia, L., Mendonça-Lima, L., Domont, G. B., and Cupolillo, E. (2009). Proteomic characterization of the released/secreted proteins of Leishmania (Viannia) braziliensis promastigotes. *J. Proteomics* 73, 79–92. doi: 10.1016/j.jprot.2009.08.006
- de Mello, C. X., de Oliveira Schubach, A., de Oliveira, R. V. C., Conceição-Silva, F., Pimentel, M. I. F., Lyra, M. R., et al. (2011). Comparison of the sensitivity of imprint and scraping techniques in the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis in a referral centre in Rio de Janeiro. *Brazil. Parasitol. Res.* 109, 927–933. doi: 10.1007/s00436-011-2335-2
- De Silva, G., Somaratne, V., Senaratne, S., Vipuladasa, M., Wickremasinghe, R., Wickremasinghe, R., et al. (2017). Efficacy of a new rapid diagnostic test kit to diagnose Sri Lankan cutaneous leishmaniasis caused by Leishmania donovani. *PLoS One* 12:e0187024. doi: 10.1371/journal.pone.0187024
- Dean, A. G., Sullivan, K. M., and Soe, M. M. (2015). *OpenEpi: Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health Version 2.3.1*. Recuper.
- Degrave, W., Fernandes, O., Thiemann, O., Wincker, P., Britto, C., Cardoso, A., et al. (1994). Detection of Trypanosoma cruzi and Leishmania using the polymerase chain reaction. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 89, 367–368. doi: 10.1590/s0074-02761994000300013
- Espir, T., Guerreiro, T., Naif, M., Figueira, L., Soares, F. V., da Silva, S. S., et al. (2016). Evaluation of different diagnostic methods of American Cutaneous Leishmaniasis in the Brazilian Amazon. *Exp. Parasitol.* 167, 1–6. doi: 10.1016/j.exppara.2016.04.010
- Faber, W. R., Oskam, L., van Gool, T., Kroon, N. C. M. M., Knegt-Junk, K. J., Hofwegen, H., et al. (2003). Value of diagnostic techniques for cutaneous leishmaniasis. *J. Am. Acad. Dermatol.* 49, 70–74. doi: 10.1067/mjd.2003.492
- Flahault, A., Cadilhac, M., and Thomas, G. (2005). Sample size calculation should be performed for design accuracy in diagnostic test studies. *J. Clin. Epidemiol.* 58, 859–862. doi: 10.1016/j.jclinepi.2004.12.009
- Freire, M. L., Rêgo, F. D., Cota, G., Pascoal-Xavier, M. A., and Oliveira, E. (2021). Potential antigenic targets used in immunological tests for diagnosis of tegumentary leishmaniasis: a systematic review. *PLoS One* 16:e0251956. doi: 10.1371/journal.pone.0251956
- Galvão, E. L., Pedras, M. J., Cota, G. F., Rabello, A., and Simões, T. C. (2019). How cutaneous leishmaniasis and treatment impacts in the patients' lives: a cross-sectional study. *PLoS One* 14:e0211374. doi: 10.1371/journal.pone.0211374
- Gonzalez, K., Calzada, J. E. E., Diaz, R., Paz, H., García, V., Miranda, A., et al. (2019). Performance of immunohistochemistry as a useful tool for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis in Panama, Central America. *Parasitol. Int.* 71, 46–52. doi: 10.1016/j.parint.2019.03.007
- Goto, H., and Lindoso, J. A. (2010). Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* 8, 419–433. doi: 10.1586/eri.10.19
- Grenfell, R. F. Q., Marcos, P., Coelho, Z., Taboada, D., Alves De Mattos, A. C., Davis, R., et al. (2014). Newly established monoclonal antibody diagnostic assays for Schistosoma mansoni direct detection in areas of low endemicity. *PLoS One* 9:e87777. doi: 10.1371/journal.pone.0087777
- Gutierrez, Y., Salinas, G. H., Palma, G., Valderrama, L. B., Santrich, C. V., and Saravia, N. G. (1991). Correlation between histopathology, immune response, clinical presentation, and evolution in Leishmania braziliensis infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 45, 281–289. doi: 10.4269/ajtmh.1991.45.281
- Harder, S., Bente, M., Isermann, K., and Bruchhaus, I. (2006). Expression of a mitochondrial peroxiredoxin prevents programmed cell death in Leishmania donovani. *Eukaryot. Cell* 5, 861–870. doi: 10.1128/EC.5.5.861-870.2006
- Harn, D. A., Mitsuyama, M., and David, J. R. (1984). Anti-egg monoclonal antibodies protect against cercarial challenge in vivo. *J. Exp. Med.* 154, 1371–1387. doi: 10.1084/jem.159.5.1371
- Jara, M., Adau, V., Valencia, B. M., Martinez, D., Alba, M., Castrillon, C., et al. (2013). Real-time PCR assay for detection and quantification of Leishmania (Viannia) organisms in skin and mucosal lesions: exploratory study of parasite load and clinical parameters. *J. Clin. Microbiol.* 51, 1826–1833. doi: 10.1128/JCM.00208-13
- Jirata, D., Kuru, T., Genetu, A., Barr, S., Hailu, A., Aseffa, A., et al. (2006). Identification, sequencing and expression of peroxidoxin genes from Leishmania aethiopia. *Acta Trop.* 99, 88–96. doi: 10.1016/j.actatropica.2006.08.001
- Karimkhani, C., Wanga, V., Coffeng, L. E., Naghavi, P., Dellavalle, R. P., and Naghavi, M. (2016). Global burden of cutaneous leishmaniasis: a cross-sectional analysis from the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet Infect. Dis.* 16, 584–591. doi: 10.1016/S1473-3099(16)00003-7
- Kenner, J. R., Aronson, N. E., Bratthauer, G. L., Turnicky, R. P., Jackson, J. E., Tang, D. B., et al. (1999). Immunohistochemistry to identify Leishmania parasites in fixed tissues. *J. Cutan. Pathol.* 26, 130–136. doi: 10.1111/j.1600-0560.1999.tb01817.x
- Kennett, R. H., Denis, K. A., Tung, A. S., and Klinman, N. R. (1979). Hybrid plasmacytoma production: fusions with adult spleen cells, monoclonal spleen fragments, neonatal spleen cells and human spleen cells. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 81, 77–91. doi: 10.1007/978-3-642-67448-8\_13
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685. doi: 10.1038/227680a0
- Liang, C. T., Chueh, L. L., Pang, V. F., Zhuo, Y. X., Liang, S. C., Yu, C. K., et al. (2007). A non-biotin polymerized horseradish-peroxidase method for the immunohistochemical diagnosis of canine distemper. *J. Comp. Pathol.* 136, 57–64. doi: 10.1016/j.jcpa.2006.11.002
- Lin, F., and Chen, Z. (2014). Standardization of diagnostic immunohistochemistry: literature review and geisinger experience. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 138, 1564–1577. doi: 10.5858/arpa.2014-0074-RA
- Lunedo, S. N., Thomaz-Soccol, V., de Castro, E. A., and Telles, J. E. Q. (2012). Immunocytochemical and immunohistochemical methods as auxiliary techniques for histopathological diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Acta Histochem.* 114, 252–258. doi: 10.1016/j.acthis.2011.06.002
- Lyra, M. R., Pimentel, M. I. F., Madeira, M., de F., Antonio, L., de F., et al. (2015). First report of cutaneous leishmaniasis caused by Leishmania (Leishmania) infantum chagasi in an urban area of Rio de Janeiro, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 57, 451–454. doi: 10.1590/S0036-46652015000500016
- Marques, F. A., Soares, R. P., Almeida, G. G., Souza, C. C., Melo, M. N., Pinto, S. A., et al. (2017). Effectiveness of an immunohistochemical protocol for Leishmania detection in different clinical forms of American tegumentary leishmaniasis. *Parasitol. Int.* 66, 884–888. doi: 10.1016/j.parint.2016.10.003
- McGonigle, S., Dalton, J. P., and James, E. R. (1998). Peroxidoxins: a new antioxidant family. *Parasitol. Today* 14, 139–145. doi: 10.1016/s0169-4758(97)01211-8
- Menezes-Souza, D., De Oliveira Mendes, T. A., Pinto Nagem, R. A., De Oliveira Santos, T. T., Teixeira Silva, A. L., Santoro, M. M., et al. (2014). Mapping B-cell epitopes for the peroxidoxin of Leishmania (Viannia) braziliensis and its potential for the clinical diagnosis of tegumentary and visceral leishmaniasis. *PLoS One* 9:e0099216. doi: 10.1371/journal.pone.0099216
- Mighell, A., Hume, W., and Robinson, P. (2008). An overview of the complexities and subtleties of immunohistochemistry. *Oral Dis.* 4, 217–223. doi: 10.1111/j.1601-0825.1998.tb00282.x
- Moreira, O. C., Yadon, Z. E., and Cupolillo, E. (2018). The applicability of real-time PCR in the diagnostic of cutaneous leishmaniasis and parasite quantification for clinical management: current status and perspectives. *Acta Trop.* 184, 29–37. doi: 10.1016/j.actatropica.2017.09.020
- Ntumngia, F. B., and Adams, J. H. (2012). Design and immunogenicity of a novel synthetic antigen based on the ligand domain of the Plasmodium vivax Duffy binding protein. *Clin. Vaccine Immunol.* 19, 30–36. doi: 10.1128/CVI.05466-11
- PAHO (2017). *Plan of Action to Strengthen the Surveillance and Control of Leishmaniasis in the Americas 2017–2022*. Available online at: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/34144> (accessed March 9, 2021).
- PAHO (2019). *Neglected Infectious Diseases (n.d.)*. Available online at: <https://www.paho.org/salud-en-las-americas-2017/?p=1244> (accessed December 10, 2021).
- Pascoe, S., and Gatehouse, D. (1986). The use of a simple haematoxylin and eosin staining procedure to demonstrate micronuclei within rodent bone marrow. *Mutat. Res. Mutagen. Relat. Subj.* 164, 237–243. doi: 10.1016/0165-1161(86)90057-9

- Passos, V. M., Lasmar, E. B., Gontijo, C. M., Fernandes, O., and Degraive, W. (1996). Natural infection of a domestic cat (*Felis domesticus*) with *Leishmania* (Viannia) in the metropolitan region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 91, 19–20. doi: 10.1590/S0074-02761996000100003
- Quintella, L. P., Cuzzi, T., Madeira, M., de, F., Okamoto, T., Schubach, A., et al. (2009). Immunoperoxidase technique using an anti-*Leishmania* (L.) chagasi hyperimmune serum in the diagnosis of culture-confirmed American tegumentary leishmaniasis. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 51, 83–86. doi: 10.1590/S0036-46652009000200005
- Ramirez, J. R., Agudelo, S., Muskus, C., Alzate, J. F., Berberich, C., Barker, D., et al. (2000). Diagnosis of cutaneous leishmaniasis in Colombia: the sampling site within lesions influences the sensitivity of parasitologic diagnosis. *J. Clin. Microbiol.* 38, 3768–3773.
- Ramos-Vara, J. A. (2005). Technical aspects of immunohistochemistry. *Vet. Pathol.* 42, 405–426. doi: 10.1354/vp.42-4-405
- Ramos-Vara, J. A., Kiupel, M., Baszler, T., Bliven, L., Brodersen, B., Chelack, B., et al. (2008). Suggested guidelines for immunohistochemical techniques in veterinary diagnostic laboratories. *J. Vet. Diagnostic Investig.* 20, 393–413. doi: 10.1177/104063870802000401
- Rêgo, F. D., da Rocha Lima, A. C. V. M., Pereira, A. A. S., Quaresma, P. F., Pascoal-Xavier, M. A., Shaw, J. J., et al. (2018). Genetic variant strains of *Leishmania* (Viannia) braziliensis exhibit distinct biological behaviors. *Parasitol. Res.* 117, 3157–3168. doi: 10.1007/s00436-018-6014-4
- Ribeiro-de-Jesus, A., Almeida, R. P., Lessa, H., Bacellar, O., and Carvalho, E. M. (1998). Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 31, 143–148. doi: 10.1590/S0100-879X1998000100020
- Salinas, G., Valderrama, L., Palma, G., Montes, G., and Saravia, N. G. (1989). Detection of amastigotes in cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis using the immunoperoxidase method, using polyclonal antibody: sensibility and specificity compared with conventional methods of diagnosis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 84, 53–60. doi: 10.1590/s0074-02761989000100010
- Salotra, P., Sreenivas, G., Beena, K. R., Mukherjee, A., and Ramesh, V. (2003). Parasite detection in patients with post kala-azar dermal leishmaniasis in India: a comparison between molecular and immunological methods. *J. Clin. Pathol.* 56, 840–843. doi: 10.1136/jcp.56.11.840
- Santarém, N., Tomás, A., Ouassii, A., Tavares, J., Ferreira, N., Manso, A., et al. (2005). Antibodies against a *Leishmania infantum* peroxiredoxin as a possible marker for diagnosis of visceral leishmaniasis and for monitoring the efficacy of treatment. *Immunol. Lett.* 101, 18–23. doi: 10.1016/j.imlet.2005.04.006
- Schallig, H., Hu, R. V. P. F., Kent, A. D., van Loenen, M., Menting, S., Picado, A., et al. (2019). Evaluation of point of care tests for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis in Suriname. *BMC Infect. Dis.* 19:25. doi: 10.1186/s12879-018-3634-3
- Schubach, A., Cuzzi-Maya, T., Oliveira, A. V., Sartori, A., de Oliveira-Neto, M. P., Mattos, M. S., et al. (2001). Leishmanial antigens in the diagnosis of active lesions and ancient scars of American tegumentary leishmaniasis patients. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 96, 987–996. doi: 10.1590/s0074-02762001000700018
- Sevilha-Santos, L., Dos Santos Júnior, A. C. M., Medeiros-Silva, V., Bergmann, J. O., da Silva, E. F., Segato, L. F., et al. (2019). Accuracy of qPCR for quantifying *Leishmania* kDNA in different skin layers of patients with American tegumentary leishmaniasis. *Clin. Microbiol. Infect.* 25, 242–247. doi: 10.1016/j.cmi.2018.04.025
- Shirian, S., Oryan, A., Hatam, G.-R., Panahi, S., and Daneshbod, Y. (2014). Comparison of conventional, molecular, and immunohistochemical methods in diagnosis of typical and atypical cutaneous leishmaniasis. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 138, 235–240. doi: 10.5858/arpa.2013-0098-OA
- Siriwardana, H. V. Y. D., Thalagala, N., and Karunaweera, N. D. (2013). Clinical and epidemiological studies on the cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania* (*Leishmania*) *donovani* in Sri Lanka. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 104, 213–223. doi: 10.1179/136485910X12647085215615
- Skaland, I., Nordhus, M., Gudlaugsson, E., Klos, J., Kjellevoid, K. H., Janssen, E. A. M., et al. (2010). Evaluation of 5 different labeled polymer immunohistochemical detection systems. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* 18, 90–96. doi: 10.1097/PAI.0b013e3181b0eaad
- Suárez, M., Valencia, B. M., Jara, M., Alba, M., Boggild, A. K., Dujardin, J.-C., et al. (2015). Quantification of *Leishmania* (Viannia) Kinetoplast DNA in ulcers of cutaneous leishmaniasis reveals inter-site and inter-sampling variability in parasite load. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9:e0003936. doi: 10.1371/journal.pntd.0003936
- Tabatabaie, F., Mahdavi, M., Faezi, S., Dalimi, A., Sharifi, Z., Akhlaghi, L., et al. (2014). Th1 platform immune responses against leishmania major induced by thiol-specific antioxidant-Based DNA vaccines. *Jundishapur J. Microbiol.* 7:e8974. doi: 10.5812/jjm.8974
- Teixeira, F., Castro, H., Cruz, T., Tse, E., Koldewey, P., Southworth, D. R., et al. (2015). Mitochondrial peroxiredoxin functions as crucial chaperone reservoir in *Leishmania infantum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112, E616–E624. doi: 10.1073/pnas.1419682112
- Tirelli, F., Vernal, S., Roselino, A. M., Tirelli, F., Vernal, S., and Roselino, A. M. (2017). Final diagnosis of 86 cases included in differential diagnosis of American tegumentary leishmaniasis in a Brazilian sample: a retrospective cross-sectional study. *An. Bras. Dermatol.* 92, 642–648. doi: 10.1590/abd1806-4841.2017.5794
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76, 4350–4354. doi: 10.1073/pnas.76.9.4350
- Vink, M. M. T., Nahzat, S. M., Rahimi, H., Buhler, C., Ahmadi, B. A., Nader, M., et al. (2018). Evaluation of point-of-care tests for cutaneous leishmaniasis diagnosis in Kabul, Afghanistan. *EBioMedicine* 37, 453–460. doi: 10.1016/j.ebiom.2018.10.063
- Webb, J. R., Campos-Neto, A., Owendale, P. J., Martin, T. I., Stromberg, E. J., Badaro, R., et al. (1998). Human and murine immune responses to a novel *Leishmania* major recombinant protein encoded by members of a multicopy gene family. *Infect. Immun.* 66, 3279–3289.
- Weigle, K. A., de Davalos, M., Heredia, P., Molineros, R., Saravia, N. G., and D'Alessandro, A. (1987). Diagnosis of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Colombia: a comparison of seven methods. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 36, 489–496. doi: 10.4269/ajtmh.1987.36.489
- WHO (2020). Global leishmaniasis surveillance, 2017–2018, and first report on 5 additional indicators. *Wkly. Epidemiol. Rec.* 95, 265–280.

**Conflict of Interest:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

**Publisher's Note:** All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2022 Freire, Rego, Lopes, Coutinho, Grenfell, Avelar, Cota, Pascoal-Xavier and Oliveira. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

## Supplementary Figure 1

**A) XP\_001562236.1 peroxidoxin [Leishmania braziliensis MHOM/BR/75/M2904]**Sequence ID: **Query\_28064** Length: **226** Number of Matches: **1**Range 1: 1 to 226 [Graphics](#)[Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
418 bits(1075)	4e-155	Compositional matrix adjust.	196/226(87%)	210/226(92%)	0/226(0%)
Query 1	MLRRLPTSCFLKRSQFRGFAATSPLLNLQYMYRTATVREAAQFSGQAVVNGAIKDINM				60
Sbjct 1	MLRRL T CF + Q RGF AATS P+LN+DYQMYRTATVR+ APQFSG+AVV+GAIK+IN				60
Query 61	NDYKGYIVLFFYPMDFTFVCPTEIIAFSDRHADFEKLNQVAVSCDSVYSHLAWVNTP				120
Sbjct 61	NDYKGYIVLFFYPMDFTFVCPTEIIAFSDR+ +FEKLNQV+AVSCDS YSHLAWVNTP				120
Query 121	RKKGGLGEMHIPVLADKSMEIARDYGVLIEESGIALRGLF IIDKKGILRHSTINDLPVGR				180
Sbjct 121	RKKGGLGEM IPVLADKSMEIARDYGVLIE +GIALRGLF+IDKKG LRHSTINDLPVGR				180
Query 181	NVDEALRVLEAFQYADENGDAIPCGWKPGQPTLDTTKAGEFFEKNM			226	
Sbjct 181	NVDE LRV+EAFQYADENGDAIPCGW PG+PTLDT KAGEFFEKNM			226	

**B) AAX47429.1 mitochondrial tryparedoxin peroxidase [Leishmania amazonensis]**Sequence ID: **Query\_28065** Length: **226** Number of Matches: **1**Range 1: 1 to 226 [Graphics](#)[Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
469 bits(1208)	2e-175	Compositional matrix adjust.	223/226(99%)	225/226(99%)	0/226(0%)
Query 1	MLRRLPTSCFLKRSQFRGFAATSPLLNLQYMYRTATVREAAQFSGQAVVNGAIKDINM				60
Sbjct 1	MLRRL TSCFLKR+QFRGFAATSPLLNLQYMYRTATVREAAQFSG+AVVNGAIKDINM				60
Query 61	NDYKGYIVLFFYPMDFTFVCPTEIIAFSDRHADFEKLNQVAVSCDSVYSHLAWVNTP				120
Sbjct 61	NDYKGYIVLFFYPMDFTFVCPTEIIAFSDRHADFEKLNQVAVSCDSVYSHLAWVNTP				120
Query 121	RKKGGLGEMHIPVLADKSMEIARDYGVLIEESGIALRGLF IIDKKGILRHSTINDLPVGR				180
Sbjct 121	RKKGGLGEMHIPVLADKSMEIARDYGVLIEESGIALRGLF IIDKKGILRHSTINDLPVGR				180
Query 181	NVDEALRVLEAFQYADENGDAIPCGWKPGQPTLDTTKAGEFFEKNM			226	
Sbjct 181	NVDEALRVLEAFQYADENGDAIPCGWKPGQPTLDTTKAGEFFEKNM			226	

**C) CCM15703.1 Putative peroxidoxin [Leishmania guyanensis]**Sequence ID: **Query\_28066** Length: **226** Number of Matches: **1**Range 1: 1 to 226 [Graphics](#)[Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
416 bits(1070)	2e-154	Compositional matrix adjust.	195/226(86%)	209/226(92%)	0/226(0%)
Query 1	MLRRLPTSCFLKRSQFRGFAATSPLLNLQYMYRTATVREAAQFSGQAVVNGAIKDINM				60
Sbjct 1	MLRRL T CF + Q RGF AATS P+LN+DYQMYRTATVR+ APQFSG+AVV GAIK+IN				60
Query 61	NDYKGYIVLFFYPMDFTFVCPTEIIAFSDRHADFEKLNQVAVSCDSVYSHLAWVNTP				120
Sbjct 61	NDYKGYIVLFFYPMDFTFVCPTEIIAFSDR+ +FEKLNQV+AVSCDS YSHLAWVNTP				120
Query 121	RKKGGLGEMHIPVLADKSMEIARDYGVLIEESGIALRGLF IIDKKGILRHSTINDLPVGR				180
Sbjct 121	RKKGGLGEM IPVLADKSMEIARDYGVLIE +GIALRGLF+IDK GILRHSTINDLPVGR				180
Query 181	NVDEALRVLEAFQYADENGDAIPCGWKPGQPTLDTTKAGEFFEKNM			226	
Sbjct 181	NVDE LRV+EAFQYAD+NGDAIPCGW PG+PTLDT KAGEFFEKNM			226	

**D) XP\_001683326.1 peroxidoxin [Leishmania major strain Friedlin]**Sequence ID: **Query\_28067** Length: **226** Number of Matches: **1**Range 1: 1 to 226 [Graphics](#)[Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
466 bits(1198)	6e-174	Compositional matrix adjust.	222/226(98%)	223/226(98%)	0/226(0%)
Query 1	MLRRLPTSCFLKRSQFRGFAATSPLLNLQYMYRTATVREAAQFSGQAVVNGAIKDINM				60
Sbjct 1	MLRRL TS FLKR+QFRGFAATSPLLNLQYMYRTATVREAAQFSGQAVVNGAIKDINM				60
Query 61	NDYKGYIVLFFYPMDFTFVCPTEIIAFSDRHADFEKLNQVAVSCDSVYSHLAWVNTP				120
Sbjct 61	NDYKGYIVLFFYPMDFTFVCPTEIIAFSDRHADFEKLNQVAVSCDSVYSHLAWVNTP				120
Query 121	RKKGGLGEMHIPVLADKSMEIARDYGVLIEESGIALRGLF IIDKKGILRHSTINDLPVGR				180
Sbjct 121	RKKGGLGEMHIPVLADKSMEIARDYGVLIEESGIALRGLF IIDKKGILRHSTINDLPVGR				180
Query 181	NVDEALRVLEAFQYADENGDAIPCGWKPGQPTLDTTKAGEFFEKNM			226	
Sbjct 181	NVDEALRVLEAFQYADENGDAIPCGWKPGQPTLDTTKA EFFEKNM			226	

## Supplementary Figure 2

a. Amino acid sequence of *Leishmania infantum* mTXNPx (PDB ID: 6E0F), containing 226 aa

```

1  MLRRLPTSCF LKRSQFRGFA ATSPLLNLDY QMYRTATVRE AAPQFSGQAV VNGAIKDINM
61  NDYKGYIVL FFYPMDFTFV CPEIIAFSD RHADFEKLNT QVAVSCDSV YSHLAWVNTF
121 RKKGGLGEMH IPVLADKSME IARDYGVLE ESGIALRGLF IIDKKGILRH STINDLPVGR
181 NVDEALRVLE AFQYADENGD AIPCGWKPGQ PTLDTTKAGE FFEKNM

```

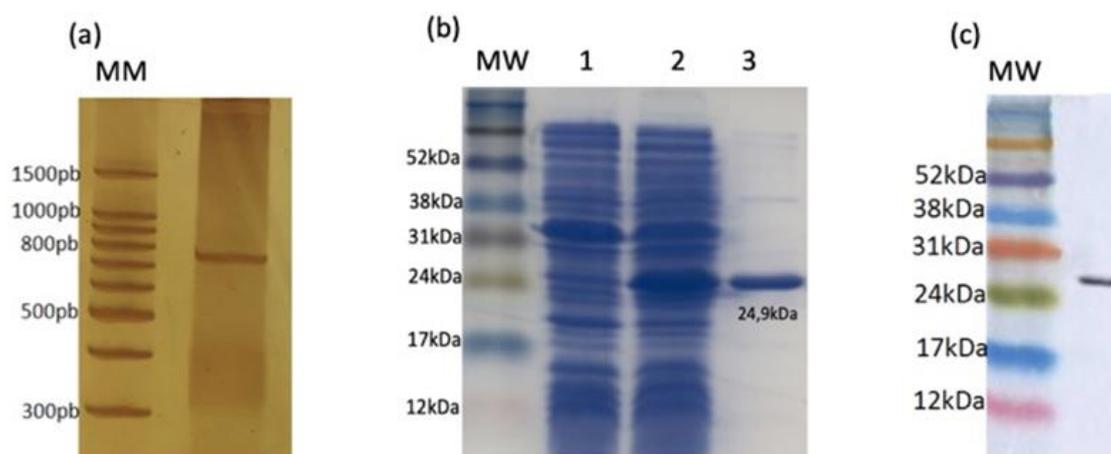
b. Synthetic gene construction containing the DNA sequence (678bp), restriction enzyme sites *Bam*HI and *Hind*III at the 5' and 3' ends, respectively, and the stop codon.

```

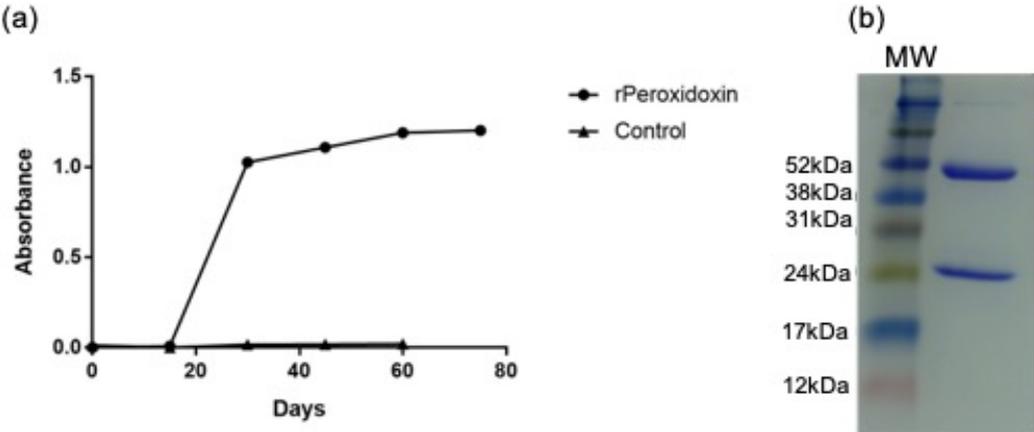
1  GGATCCATGCTGCGTCGTTTGCCGACCAGCTGCTTCCTGAAGCGTAGCCAATTCGGTG
59  GTTTTGCTGCGACCAGCCCGCTGTTGAACTTGGATTACCAGATGTATCGTACCGCTAC
117 CGTTCGTAAGCTGCGCCGAATTCAGCGGTCAGGCTGTTGTTAATGGTGCATTAAA
175 GATATCAACATGAACGACTACAAGGGTAAATACATCGTTCTGTTCTTTTACCCGATGG
233 ATTCACCTTTGTTTGCCCGACCGAAATTATCGCTTTCAGCGATCGTCACGCGGACTT
291 TGAGAAGCTGAACACCCAAGTTGTTGCTGTTAGCTGTGACAGCGTTTACAGCCACTTG
349 GCGTGGGTTAATACCCCGCGTAAGAAAGGTGGTCTGGGTGAAATGCATATTCGGTTT
407 TGGCTGATAAAAGCATGGAGATCGCGCGTGACTATGGTGTCTGATTGAAGAGAGCGG
465 TATCGCTCTGCGTGTTTGTTCATTATCGATAAGAAAGGTATTCTGCGTCATAGCACC
523 ATCAACGATTTGCCGTTGGTCGTAATGTTGACGAAGCTCTGCGTGTTTTGGAGGCTT
581 TTCAATATGCGGATGAGAACGGTGACGCGATCCCGTGTGGTTGGAAGCCGGGTCAGCC
639 GACCTTGGACACCACCAAGGCGGGTGAATTCTTTGAGAAAAATATGtAAGCTT

```

## Supplementary Figure 3



Supplementary Figure 4



**Supplementary Table 1.** Standardization and details on Immunohistochemistry protocols

IHC steps		1 Test	2 Test	3 Test	4 Test	Final protocol
IHC-HRP <sup>1</sup>	<b>Fixation</b>	56°C overnight	56°C overnight	56°C overnight	56°C overnight	<b>56°C overnight</b>
	<b>Deparaffinization</b>	Xylene: 2x 20'	Xylene: 2x 20'	Xylene: 2x 20'	Xylene: 2x 20'	<b>Xylene: 2x 20'</b>
	<b>Rehydration</b>	Ethanol: 3x 5' / Running water 3'	Ethanol: 3x 5' / Running water 3'	Ethanol: 3x 5' / Running water 3'	Ethanol: 3x 5' / Running water 3'	<b>Ethanol: 3x 5' / Running water 3'</b>
	<b>Antigen retrieval</b>	10mmol/L Sodium citrate pH 6 (30' in steamer)	Tris/EDTA pH 9 buffer (30' in steamer)	10mmol/L Sodium citrate pH 6 (30' in steamer)	10mmol/L Sodium citrate pH 6 (30' in steamer)	<b>10mmol/L Sodium citrate pH 6 (30' in steamer)</b>
	<b>Peroxidase Block</b>	10'	10'	20' / 40'	20'	<b>20'</b>
	<b>Protein Block</b>	10'	10'	40' / 60'	40'	<b>40'</b>
	<b>Antibody dilution</b>	1:100; 1:300; 1:500; 1:1000	1:100; 1:300; 1:500; 1:1000	1:300	1:300	<b>1:300</b>
	<b>Post Primary</b>	30'	30'	30'	30'	<b>30'</b>
	<b>Polymer</b>	30'	30'	30'	30'	<b>30'</b>
	<b>Substrate - chromogen</b>	50''	50''	50''	15''; 30''; 50''	<b>30''</b>
IHC-AP <sup>2</sup>	<b>Fixation</b>	56°C overnight	56°C overnight	56°C overnight	56°C overnight	<b>56°C overnight</b>
	<b>Deparaffinization</b>	Trilogy solution <sup>3</sup> (20' in steamer)	Xylene: 2x 20'	Trilogy solution <sup>3</sup> (20' in steamer)	Trilogy solution <sup>3</sup> (20' in steamer)	<b>Trilogy solution<sup>3</sup> (20' in steamer)</b>
	<b>Rehydration</b>		Ethanol: 3x 5' / Running water 3'			
	<b>Antigen retrieval</b>		10mmol/L Sodium citrate pH 6 (30' in steamer)			
	<b>Protein block</b>	30'	30'	30'	30'	<b>30'</b>
	<b>Antibody dilution</b>	1:100; 1:300; 1:500; 1:1000	1:100; 1:300; 1:500; 1:1000	1:500	1:500	<b>1:500</b>
	<b>Post Primary</b>	30'	30'	30'	30'	<b>30'</b>
	<b>Polymer</b>	30'	30'	30'	30'	<b>30'</b>
	<b>Substrate-chromogen dilution</b>	A(1:5); B(1:25); C (1:25) dilution in D for 3'	A(1:5); B(1:25); C (1:25) dilution in D for 3'	A(1:5); B(1:25); C (1:25) dilution in D for 3' / A(1:10); B(1:50); C (1:50) dilution in D for 3'	A(1:10); B(1:50); C (1:50) dilution in D for 3' / A(1:20); B(1:100); C (1:100) dilution in D for 3'	<b>A(1:10); B(1:50); C (1:50) dilution in D for 3'</b>

<sup>1</sup>Novolink Polymer Detection System (Leica Microsystems, Newcastle, UK); <sup>2</sup>Bond Polymer Refine Red Detection (Leica Microsystems, Newcastle, UK); <sup>3</sup>Trilogy (Cell Marque, Rocklin, CA, USA); After antigen retrieval step the reactions were wash three times in Tris solution (5mmol/L Tris; 140mM NaCl; pH 7.6) between each of the steps described.

Supplementary Table 2.

Cod	Age (years)	Gender	Municipality (Minas Gerais, Brazil)	Time of onset skin lesion	Type of lesion	Number of lesion	DE	Culture	HE	IHC-HRP	IHC-AP	PCR	Parasity load*
CL 001	3	M	Raposos	1	ulcer	1	1	1	1	1	1	1	243,45
CL 002	40	F	Água boa	1	ulcer	1	9	0	0	0	1	1	0,01
CL 003	8	M	Belo Horizonte	1	ulcer	1	1	1	1	1	1	1	30,13
CL 004	13	M	Jequitibá	1	ulcer	1	1	1	1	1	1	1	9633,19
CL 005	14	M	Santa Luzia	2	ulcer	1	1	0	1	0	0	1	3,06
CL 006	52	F	Rio Acima	2	ulcer	1	1	1	0	0	1	1	4,54
CL 007	40	M	Mariana	2	plate	1	0	1	0	0	0	1	6,87
CL 008	16	M	Santo Antônio do Rio Abaixo	2	ulcer	2	1	1	0	1	1	1	4948,81
CL 009	19	M	Santana do Riacho	2	ulcer	4	1	0	0	1	1	1	9,33
CL 010	5	F	Governador Valadares	2	ulcer	2	1	0	1	1	1	1	85,64
CL 011	70	F	Santa Luzia	2	ulcer	3	1	0	1	1	0	1	105,84
CL 012	21	M	Belo Horizonte	2	ulcer	2	1	1	0	0	1	1	239,13
CL 013	27	M	Juatuba	2	ulcer	2	1	1	1	1	1	1	64,77
CL 014	30	M	Rio Acima	2	ulcer	1	1	1	1	1	1	1	24894,54
CL 015	31	M	Belo Horizonte	2	ulcer	1	1	0	1	1	1	1	192,23
CL 016	61	F	Belo Horizonte	2	ulcer	1	0	0	0	1	0	1	0,59
CL 017	32	M	Caeté	3	ulcer	1	1	1	0	1	1	1	12675,89
CL 018	67	F	Rio Acima	3	ulcer	2	0	0	1	1	1	1	1,10
CL 019	33	M	Santa Luzia	3	ulcer	1	1	0	1	1	1	1	272,67
CL 020	36	M	Malacacheta	3	ulcer	2	9	1	0	0	1	1	1,43
CL 021	67	F	Belo Horizonte	3	ulcer and	1	1	0	1	1	1	1	206,56
CL 022	38	M	Cipotanea	3	ulcer	1	1	0	1	0	0	1	37,16
CL 023	42	M	Pedro Leopoldo	3	ulcer	2	1	1	0	1	1	1	5267,59
CL 024	42	M	Água boa	3	ulcer e plate	2	1	0	1	1	1	1	227,55
CL 025	42	M	Betim	3	ulcer and	3	1	0	0	0	0	1	0,23
CL 026	43	M	Presidente Juscelino	3	ulcer	1	1	1	1	1	1	1	41498,43
CL 027	45	M	Bebedouro	4	ulcer	2	0	0	1	1	1	1	0,04
CL 028	46	M	Ladainha	4	ulcer	15	0	0	0	1	1	1	0,55
CL 029	47	M	Sabará	4	ulcer	1	1	1	1	1	1	1	294239,53
CL 030	53	F	Sabará	4	ulcer	2	1	0	1	1	1	1	7,60

CL 031	47	M	Belo Horizonte	4	ulcer	s	1	1	1	1	1	1	218419,56
CL 032	50	M	Graminha	4	ulcer	1	1	0	1	1	1	1	0,79
CL 033	45	F	Contagem	4	ulcer	1	1	1	0	1	1	1	45,30
CL 034	50	M	Belo Horizonte	4	ulcer	1	1	1	1	0	1	1	55,63
CL 035	50	M	Sabará	4	ulcer	3	9	0	1	1	1	1	0,32
CL 036	52	M	Contagem	5	ulcer	1	1	1	0	1	1	1	4,05
CL 037	58	M	Contagem	5	ulcer	1	0	0	1	1	1	1	75,22
CL 038	62	M	Alto Caaras	5	ulcer e nodule	2	1	1	1	1	1	1	2245,52
CL 039	63	M	gua Boa	5	ulcer (2)	3	1	1	1	1	1	1	4908,57
CL 040	63	M	Novo Cruzeiro	6	ulcer	1	9	0	1	1	1	1	7,12
CL 041	63	M	Novo Cruzeiro	6	ulcer	1	1	1	1	1	1	1	8,75
CL 042	67	M	Tapirai	6	ulcer	5	1	1	1	1	1	1	15880,47
CL 043	56	F	Barão de cocais	7	plate	1	1	0	1	1	1	1	74,95
CL 044	69	M	Raposos	7	ulcer	3	1	1	1	1	1	1	924,51
CL 045	70	M	Ladainha	8	ulcer	2	9	1	0	0	1	1	87,55
CL 046	10	F	Belo Horizonte	8	ulcer	1	1	9	1	1	1	1	0,44
CL 047	73	M	Raposos	10	ulcer	1	1	0	0	1	1	1	2,90
CL 048	78	M	São Domingos das Dores	11	papule	3	1	0	0	1	1	1	5601,12
CL 049	84	M	São Gonçalo do Rio Preto	18	ulcer	1	1	0	1	1	0	1	45,49

Legend: (DE)Direct examination; (HE)Histopathological examination; (IHC-HRP)Immunohistochemistry with enzymes horseradish peroxidase; (IHC-

FA)Immunohistochemistry with alkaline phosphatase; (qPCR)Quantitative real-time polymerase chain reaction; \*expressed as the number of Leishmania parasites per  $\mu\text{g}$  of tissue DNA.

### APÊNDICE 3

#### a) Triparedoxina Mitocondrial Peroxidase (mTXNPx)

Também conhecida como Mitochondrial peroxiredoxin, peroxidoxina, peroxiredoxina ou ainda anti-oxidante tiol específico (TSA, do inglês *Thiol Specific Antioxidant*), faz parte de uma família de enzimas antioxidantes, presente em grande variedade de organismos vivos, atuando na redução de peróxidos através de um resíduo conservado de cisteína. No gênero *Leishmania* já foi identificada e caracterizada em várias espécies, sendo altamente conservada (BARR; GEDAMU, 2001; CASTRO et al., 2002; FLOHÉ et al., 2002; JIRATA et al., 2006; LEVICK et al., 1998; WEBB et al., 1998). Esta proteína parece estar envolvida na proteção contra espécies reativas de oxigênio e espécies reativas de nitrogênio, que são utilizadas por macrófagos como mecanismo de defesa para eliminar as formas amastigotas (BARR; GEDAMU, 2003). HARDER et al. (2006) verificaram experimentalmente que em promastigotas de *L. donovani*, a mTXNPx está restrita à área do cinetoplasto, já em amastigotas encontra-se superexpressa e presente em toda a mitocôndria.

A aplicabilidade deste antígeno como candidato vacinal, já foi avaliada em diferentes estudos (CAMPOS-NETO et al., 2001; TABATABAIE et al., 2014; WEBB et al., 1998). Através de ELISA com rPeroxidoxina de *L. braziliensis*, MENEZES-SOUZA et al. (2014), reportaram elevada sensibilidade para o diagnóstico de pacientes com LC (100%) e LM (95%), com uma sensibilidade total de 98,5%, para o diagnóstico de pacientes com LT. Este antígeno é o alvo detectado no teste rápido *CL Detect*<sup>TM</sup> (InBios International Inc.) para o diagnóstico da LC. De acordo com o fabricante, este teste pode ser realizado para o diagnóstico de lesões cutâneas causada por *L. tropica*, *L. major*, *L. donovani*, *L. panamensis*, *L. mexicana* e *L. braziliensis*, apresentando 100% de sensibilidade e 84,2% de especificidade quando testado em população de áreas endêmicas.

#### b) Proteína homóloga do receptor para cinase C ativada de *Leishmania* (LACK)

A LACK é um antígeno extremamente conservado no gênero *Leishmania*, presente tanto em formas amastigotas quanto promastigotas do parasito e faz parte da família de proteínas com repetição de triptofano-ácido aspártico (MOUGNEAU et al., 1995). Estudos experimentais verificaram sua presença no citoplasma, próximo ao cinetoplasto, sendo também encontrada no lado externo da superfície do parasito, provavelmente, devido à reassociação de LACK secretada (CUERVO et al., 2009; GOMEZ-ARREAZA et al., 2011; GONZALEZ-

ASEGUINOLAZA et al., 1999). A LACK foi encontrada no secretoma e no lisado celular de *L. braziliensis* e *L. donovani* (BENTEL et al., 2003; CUERVO et al., 2009).

Este antígeno tem sido muito avaliado como imunógeno em vacinas, devido a seu papel na imunopatogênese da infecção experimental por *Leishmania*. De acordo com KELLY, STETSON & LOCKSLEY, (2003) a LACK é essencial para a infecção efetiva do parasito nos macrófagos de camundongos BALB/c, visto que a atenuação deste gene em *L. major* causou diminuição da infecção *in vivo*. A antigenicidade desta proteína já foi avaliada para o diagnóstico da LV, tanto em infecções em humanos como em cães (MAALEJ et al., 2003; TODOLÍ et al., 2009). No entanto, não foram encontrados estudos avaliando o desempenho deste antígeno para o diagnóstico de pacientes com a forma cutânea da doença. Além da localização celular descrita na literatura e do fato de ser amplamente secretada, a seleção desta proteína baseou-se também no trabalho de HOFMAN *et al.* (2003) que utilizaram um AcMo anti-LACK para identificar, por meio da técnica de IHQ, amastigotas de *L. infantum* em amostras de diferentes tipos de tecidos, como medula óssea e fígado de pacientes com LV. Esses autores empregaram a técnica de IHQ em 117 amostras e reportaram 100% de sensibilidade e de especificidade. Diante desses resultados, a LACK foi considerada um marcador acurado para a confirmação de LV em cortes histológicos.

### c) Fosfatase ácida secretada (sAcP)

As fosfatases ácidas apresentam sítios catalíticos compostos quase exclusivamente de resíduos de histidina e compreendem tanto as fosfatases ácidas secretadas quanto as associadas à membrana (SHAKARIAN et al., 1997, 2003). SOULAT & BOGDAN (2017), verificaram que o genoma de diferentes espécies de *Leishmania* patogênicas para humanos contém seis ou sete genes da família das fosfatases ácidas, sendo quatro ou cinco genes codificantes para a fosfatase ácida de membrana e dois ou três genes que codificam as sAcPs. Embora tenham sido observadas diferenças marcantes entre as sAcPs de diferentes espécies de *Leishmania*, estas proteínas compartilham epítomos semelhantes (DOYLE; DWYER, 1993). Estudos mostraram que sAcPs estão entre as proteínas mais abundantes presentes no secretoma de *Leishmania*, sendo liberadas através de um mecanismo não convencional que envolve vesículas do tipo exossomo (SILVERMAN et al., 2010; FERNANDES et al., 2013). Devido à conservação das sequências deste gene entre as espécies de *Leishmania*, foi sugerido que esta enzima exerça papel crucial na sobrevivência do parasito, atuando provavelmente, inibindo a produção de ânions superóxido por neutrófilos e macrófagos (BATES & DWYER, 1987; ELLIS, SHAKARIAN & DWYER, 1998; KATAKURA & KOBAYASHI, 1988)

#### **d) Proteína de Membrana dos Kinetoplastídeos-11 (KMP-11)**

A KMP-11 é uma glicoproteína de 11 kDa, presente na membrana da superfície celular de todos os protozoários da classe Kinetoplastea, sendo altamente conservada e expressa nas formas amastigota e promastigota (JARDIM et al., 1995; RAMÍREZ et al., 1998; STEBECK et al., 1995; TOLSON et al., 1994). A função dessa proteína está relacionada com a estabilização da membrana, devido ao grau de similaridade com os domínios anfipáticos das apolipoproteínas, que transportam o colesterol de alta densidade nos humanos (STEBECK et al., 1995). Em *L. amazonensis*, a KMP-11 foi encontrada em associação com estruturas de membrana na superfície celular, bolsa flagelar e vesículas intracelulares, sendo superexpressa em formas amastigotas (MATOS et al., 2010).

Diferentes estudos têm demonstrado que a KMP-11, atua como um potente estimulador de células B durante o curso natural da infecção (RAMÍREZ et al., 1998). Desta forma, esta proteína tem sido frequentemente avaliada como potencial candidato para o desenvolvimento de vacinas e testes diagnósticos (BHAUMIK et al., 2009; DE MENDONÇA, CYSNE-FINKELSTEIN & MATOS, 2015; JENSEN et al., 1998; PASSOS et al., 2005; RODRÍGUEZ-CORTÉS et al., 2007; SANTOS et al., 2012; SOUZA et al., 2013). Em estudo, usando a técnica de immunoblot, rKMP-11 foi reconhecida por 80% e 77% dos soros de pacientes com LC e LM, respectivamente (RAMÍREZ et al., 1998). SOUZA et al. (2013) avaliaram o desempenho da rKMP-11 de *L. braziliensis* e obteve sensibilidade e especificidade de 55,7% e 53,4% respectivamente, para o diagnóstico de LC e 74% e 71,5% para LM, respectivamente.

#### **e) Proteína Hipotética (LbPH):**

As proteínas hipotéticas são aquelas que apresentam uma sequência polipeptídica estabelecida, porém sem função biológica definida. Através de análises de imunoproteômica, DUARTE *et al.* (2015) identificaram diversas proteínas antigênicas de *L. braziliensis* utilizando soro de pacientes com LT, dentre outras, a proteína hipotética (acesso NCBI n° XP\_001566959.1), aqui denominada LbPH. Esta proteína foi avaliada para o diagnóstico sorológico da LT, e demonstrou sensibilidade variando de 95,4% a 100% e especificidade de 85 a 98% (DUARTE et al., 2015; LIMA et al., 2017, 2018). As propriedades funcionais, da LbPH foram preditas através de ferramentas de bioinformática por LIMA et al. (2017). Esses autores sugeriram uma localização citoplasmática ou no meio extracelular, podendo ser secretada através de uma via não clássica, fazendo parte da família das cinesinas. Posteriormente, esta proteína hipotética foi utilizada para estimular células mononucleares do

sangue periférico (PBMCs) de pacientes com LM e indivíduos saudáveis. Nesse estudo, foi observado um perfil de resposta imune Th1 polarizado, baseado nos altos níveis de interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) e baixos níveis de interleucina (IL)-4 ou IL-10, encontrados no sobrenadante do cultivo celular. Os autores sugeriram que esta proteína também pode ser avaliada, em estudos futuros, como uma candidata vacinal para a LT (LIMA et al., 2018).

#### **f) Proteína quinase ativada por mitógeno 4 (MAPK4)**

A MAPK4 faz parte da família das proteínas quinases ativadas por mitógenos, presentes em quase todos os organismos eucariontes regulando processos celulares importantes, como diferenciação, proliferação, resposta ao estresse e apoptose (KARIN & CHANG, 2001; WIESE, 1998). WANG *et al.* (2005) além de confirmarem a divergência de aminoácidos desta proteína em *Leishmania* quando comparada com MAP-quinases de mamíferos, demonstraram que a MAPK4 é um potencial alvo de fármacos leishmanicidas. A MAPK4 em *Leishmania* está relacionada à transformação de formas promastigotas em formas amastigotas, sendo superexpressa durante a etapa de diferenciação e proliferação das amastigotas (MENEZES-SOUZA et al., 2015a; WANG et al., 2005). MENEZES-SOUZA et al. (2015), avaliaram a proteína recombinante rMAPK4 de *L. braziliensis* para o diagnóstico sorológico da LT e relataram acurácia de 92,4%, com sensibilidade de 75,4% e especificidade de 96,7%.

## APÊNDICE 4

### 1. Triparedoxina Mitocondrial Peroxidase (mTXNPx) de *L. infantum*

#### a. Sequências de aminoácidos (Q95U89\_LEIIN)

MLRRLPTSCFLKRSQFRGFAATSPLLNLDYQMYRTATVREAAPOFSGQAVVNGAIKDINMNDYK  
GKYIVLFFYPMDFTFVCPTEIIAFSDRHADEFKLNTOVVAVSCDSVYSHLAWVNTPRKKGGLGEM  
HIPVLADKSMEIARDYGVLIIESGIALRGLFIIDKKGILRHSTINDLPVGRNVDEALRVLEAFQYAD  
ENGDAIPCGWKPGOPTLDTTKAGEFFEKMN

#### b. Sequência de nucleotídeos do gene sintetizado, contendo destacado na extremidade 5' sítio de restrição para *Bam*HI e na extremidade 3' código de parada e sítio de restrição para *Hind*III

GGATCCATGCTGCGTCGTTTGCCGACCAGCTGCTTCCTGAAGCGTAGCCAATTCCGTGGTTTTGCT  
 GCGACCAGCCCGCTGTTGAACTTGGATTACCAGATGTATCGTACCGCTACCGTTCGTGAAGCTGCG  
 CCGCAATTCAGCGGTCAGGCTGTTGTTAATGGTGCGATTAAGATATCAACATGAACGACTACAAG  
 GGTAATAACATCGTTCTGTTCTTTTACCCGATGGATTTACCTTTGTTTGCCCGACCGAAATTATCG  
 CTTTCAGCGATCGTCACGCGGACTTTGAGAAGCTGAACACCCAAGTTGTTGCTGTTAGCTGTGACA  
 CGTTTTACAGCCACTTGCCGTGGGTTAATACCCCGCTAAGAAAGGTGGTCTGGGTGAAATGCATA  
 TTCCGGTTTTGGCTGATAAAAGCATGGAGATCGCGCGTACTATGGTGTCTGATTGAAGAGAGCG  
 GTATCGCTCTGCGTGGTTTGTTCATTATCGATAAGAAAGGTATTCTGCGTCATAGCACCATCAACGA  
 TTTGCCGGTTGGTTCGTAATGTTGACGAAGCTCTGCGTGTTTTGGAGGCTTTTCAATATGCGGATGAG  
 AACGGTGACGCGATCCCGTGTGGTTGGAAGCCGGGTCAGCCGACCTTGGACACCACCAAGCGGG  
 TGAATTCTTTGAGAAAAATATGtAAGCTT

### 2. Homólogo do receptor de proteína quinase C ativada (LACK) de *L. braziliensis*

#### a. Sequências de aminoácidos (A4HGX7\_LEIBR) com destaque para as regiões que foram retrotraduzidas para construção do minigene.

MNYEGHLKGRGWVTSLACPOQAGSYIKVVSTSRDGTAIWKSNDPDRHSVDSYGLPNHRLEGHT  
GFVSCVSLAHATDYALTASWDRSIRMWDLRNGSQQRKFLKHTKDVLAVAFSPDDRLIVSAGRDN  
VIRVWNVAGECMHEFLRDGHEDWVSSICFSPSLEHPIVVSGSWDNTIKVWNVNEGKCERTLKHSNY  
VSTVTVSPDGSLSASGGKDGAALLWDLSTGEQLFRINVESAINQIAFSPNRFWMCVAAEKSLSVYDL  
ESKAVIAELTPDGTKPSECISIAWSADGNTLYSGHKDNLIRVWSISDAE

#### b. Sequência de nucleotídeos do minigene sintetizado, contendo destacado na extremidade 5' sítio de restrição para *Bam*HI e na extremidade 3' código de parada e sítio de restrição para *Hind*III

GGATCCCCCGCAGCAAGCGGGCAGCTACATCAAAGTGGTTAGCACCAGCCGTGACGGTACCGCGAT  
 TAGCTGGAAGAGCAACCCGGATCGTCACAGCGTGGACAGCGATTACGGCCTGCCGAACCACCGTC  
 TGGAGGGTCACACCGGCTTCGTGAGCTGCGTTAGCCTGGCGCATGCGACCGACTATGCGCTGACCG  
 CGAGCTGGGACCGTAGCATCCGTATGTGGGATCTGCGTAACGGCCAGAGCCAGCGTAAGTTCCTGA  
 AACACACCAAGGACGTGCTGGCGGTTGCGTTTACCCCGGACGATCGTCTGATTGTGAGCGCGGGTC  
 GTGATAACGTGTGGAACGTTAACGAGGGTAAATGCGAACGTACCCTGAAGGGCCACAGCAACTAT  
 GTTAGCACCGTGACCGTTAGCCCGGATGGTAGCCTGTGCGGAGCGGTGGCAAAGATGGTGCGGC  
 GCTGCTGTGGGATCTGAGCACCGGCGAGCAGAAAAGCCTGAGCGTGTACGACCTGGAGAGCAAGG  
 CGGTTATCGCGGAAGTACCCCGGATGGTACCAAACCGAGCGAATGCATCAGCATTGCGTGGAGC  
 CGGACGGTAACACCCTGTATAGCGGCCACAAGGATAACCTGATTTCGTAAGCTT

### 3. Fosfatase ácida secretora (sAcP) de *L. braziliensis*

a. Sequências de aminoácidos (A4HQG9\_LEIBR) com destaque para as regiões que foram retrotraduzidas para construção do minigene.

MASKLLRVLATALLVAAAVSVDARLVVRMVQVAHRHGARSALVDDNATQICGTVYPCGELTDEGVE  
MVRAIGKFARSRYNPSLVESPLFPSTRYNSSVYTRSTDTQRTIQSATAFLHGLFEDDYFFPVVYSHNM  
TTDTLLSTDTVPSVMGRSWLSPALSATLNPVVD AHLTWDAIQAAAKDAWIEGL**CADPNARADCVLN**  
**NLYDVAAAFEASGRLDSTSDLKAAYPGLVEVNAA**WYKYVFGWNDTDKLDRTQGTPSQNLAQTMLD  
 NMNAHRLSPSYKLF EYSAHDTTIAPLAVTFGDQGNTTMRPPYAVTIFVELLQDTE DANGWYVRLIRGN  
 PVKAAANGIYVFQQSGIEVHCMD SAGNMEVASTGICPLDNFRRMVDYSRPTVEDGNCAMTTTQYSNMG  
 CPRTIADNEPVPLRCEVYRRVCTNKACPPAHILSAADYQCHPTAETQGPSSSTNSSSS**SGITTPPD TSAFL**  
**RPMNLRPRVLSPEKRRRIAADILYGV TNGVAVGA AVQ EYNHOG**

b. Sequência de nucleotídeos do minigene sintetizado, contendo destacado na extremidade 5' sítio de restrição para *Bam*HI e na extremidade 3' código de parada e sítio de restrição para *Hind*III

**GGATCCT**GC GCGGACCCGAACGCGCGTGC GGATTGCGTGCTGAACAACCTGTACGATGTTGCGGC  
 GGCGTTTGAGGCGAGCGCCGTCTGGACAGCACCAGCGATCTGAAGGCGGCGTATCCGGGCCTGG  
 TGGAAGTTAACGCGGCGAGCGGTATCACCACCCGCGGACACCAGCGCGTTTCTGCGTCCGATGA  
 ACCTGCGTCCGCGTGTGCTGAGCCCGGAGAAGCGTCTGCTGATTGCGGCGGATATTCTGTACGGTG  
 TTACCAACGGTGTGGCGGTTGGTGC GCGGTT CAGGAATATAACCACCAAGGT**tAAGCTT**

#### 4. *Kinetoplastid membrane protein11 (KMP-11) de L. braziliensis*

a. Sequências de aminoácidos (A4HMP3\_LEIBR)

**MATTYEEFAAKLDRLDEEFNKMQEQNAKFFADKPDESTLSPEMKEHYEKFERMIKEHTEKFNK**  
**KMHEHSEHFHKHFAELLEQQKAAQYPGK**

b. Sequência de nucleotídeos do gene sintetizado, contendo destacado na extremidade 5' sítio de restrição para *Bam*HI e na extremidade 3' código de parada e sítio de restrição para *Hind*III

**GGATCC**ATGGCTACCACCTACGAAGAGTTCGCTGCGAAGCTGGATCGTTTTGACGAAGAGTTAA  
 CAAGAAAATGCAAGAACAGAATGCTAAGTTCTTTGCGGATAAACCGGACGAGAGCACCCTGAGCC  
 CGGAAATGAAGGAGCACTACGAAAAATTCGAGCGTATGATTAAGGAACATACCGAGAAGTTCAAC  
 AAGAAGATGCACGAACATAGCGAGCACTTCAAGCATAAATTTGCGGAAGTGTGGAGCAACAGAA  
 GGCTGCGCAATATCCGGGTA**AAAtAAGCTT**

#### 5. *Proteína hipotética de L. braziliensis*

a. Sequências de aminoácidos (A4HIR9\_LEIBR)

**MMYTGEIENGQMHGRGCLVYPNKEKEYEGDWVYGKRHGHGVYTYADGSKYDGEWVEDKVHG**  
**KGTCYYASGNRYTGDWTFGRINGRGVLEYADGDRYDGEWKDGRMHGKGLYYYYSNGDRYEGE**  
**WKDDKRHGGKGTVYAGPDGSYSEKFDGDWMEGRMQGWKYYYADGGVYEGEWQDGKMHG**  
**KGTYIFPNGNKYEGEWFDVVKQGYGLTYVNGERYEGYWLDDKAHGTGTLTYLQGDRTGEW**  
**YQKKKHGHGTLAYSNKDTYEGEWRNDSATGRGVLEYANGCRYEGDWLDDRRHGEQQLLPDG**  
**SSYEGGWVNGKKDGRARIILKCGAIFVGTWKDNHIVGQGEFRLSEHCDSLNSDY**

b. Sequência de nucleotídeos do gene sintetizado, contendo destacado na extremidade 5' sítio de restrição para *Bam*HI e na extremidade 3' código de parada e sítio de restrição para *Hind*III

**GGATCC**ATGATGTACACCGGCGAGATCGAAAACGGCCAGATGCACGGTCTGGCTGCCTGGTGT  
 CCCGAACAAGGAGAAATATGAGGGTACTGGGTGTACGGCAAGCGTACGGTACGGCGTTTACA  
 CCTATGCGGACGGTAGCAAATATGATGGCGAGTGGGTGGAAGACAAGGTTACGGTAAAGGCACC  
 TGCTACTATGCGAGCGGTAACCGTTACACCGGCGATTGGACCTTCGGTCTGATTAACGGTCTGGC  
 GTTCTGGAGTATGCGGACGGCGATCGTTACGACGGTGAATGGAAGGATGGCCGTATGCACGGTAA  
 AGGCCTGACTATTACAGCAACGGTGACCGTTATGAGGGCGAATGGAAGGACGATAAACGTCACG

GTAAAGGTACCGTGACCTATGCGGGTCCGGATGGCAGCGTTAGCGAGAAATTTGACGGTGATTGG  
 ATGGAAGGCCGTATGCAGGGTTGGGGCAAGTATTACTATGCGGACGGTGGCGTGTACGAGGGTGA  
 ATGGCAAGATGGCAAGATGCACGGTAAAGGCACCTATATCTTCCCGAACGGTAACAAGTACGAGG  
 GCGAATGGTTTGACGATGTTAAACAAGGTTACGGCGTGCTGACCTATGTTAACGGCGAGCGTTACG  
 AAGGCTATTGGCTGGACGATAAAGCGCACGGTACCGGCACCCTGACCTACCTGCAGGGTGACCGTT  
 ACACCGGCGAGTGGTATCAAGGTAAGAAACACGGTCACGGCACCCCTGGCGTATAGCAACAAGGAC  
 ACCTACGAGGGTGAATGGCGTAACGATAGCGGACCGGTCTGTTGGCGTGTGGAGTATGCGAACGG  
 CTGCCGTTACGAGGGTACTGGCTGGACGATCGTCGTCATGGTGAAGGCCAGCTGCTGCTGCCGGA  
 TGGTAGCAGCTATGAAGGTGGCTGGGTTAACGGTAAGAAAGATGGCCGTGCGCGTATCATTCTGA  
 AGTGGCGTGCGATCTTCGTGGGTACCTGGAAAGATAACCCACATTGTTGGTCAAGGGCAGTTTCGT  
 TGAGCGAACACTGCGACCTGAGCAACAGCGATTACtAAGCTT

## 6. Proteína quinase ativada por mitógeno 4 (MAPK4) de *L. braziliensis*

### a. Sequências de aminoácidos (A4HA94\_LEIBR)

MTQLVPLAELPSGKKIYSVRGQGFVDREYDLVKIIFGAYGTVCSAVANRSGERVAIKRLSRVF  
GDLREGKRILREMEIMTSLKHSNLRHLHHFLRPHSKETFEDIYFVMDLYDSDLNRIIRSROKLTDE  
HLQYFMIOAFRGLHYLHSAKVMHRDLKPSNLLVNADCALAICDFGLARDDQVMSSDLTQYVVT  
RWYRPPEVLGMGFNOYTSADVWVSLGLIFAELMVGRTLLPGTDYIEQLVMIVNLLGSPSIDDMEF  
LSSEARAFILSQPHRALPFRDLFPMATEEATDLLSKLLVFHPPARRLTAKQVMEHPYFSKYRDPAE  
EADAPNPFVWNHSHIETKAQLREDLWRVVEAYSHSNE

### b. Sequência de nucleotídeos do gene sintetizado, contendo destacado na extremidade 5' sítio de restrição para *Bam*HI e na extremidade 3' código de parada e sítio de restrição para *Hind*III

GGATCCATGACCCAACTGGTTCGGCTGGCGGAGCTGCCGAGCGGTAAGAAAATCTACAGCGTGCG  
 TGGTCAAGGCTTCGAGGTTGACCGTGAATACGATCTGGTGAATAATCATTGGTTTTGGCGCGTATGG  
 TACCGTGTGCAGCGCGGTTGCGAACCGTAGCGGTGAACGTGTTGCGATTAAGCGTCTGAGCCGTGT  
 GTTCGGTGACCTGCGTGAAGGCAAACGTATCCTGCGTGAGATGGAAATTATGACCAGCCTGAAGC  
 ACAGCAACCTGATCCGTCTGCACCACTTTCTGCGTCCGCACAGCAAAGAGACCTTCGAAGACATTT  
 ACTTTGTGATGGATCTGTATGACACCGATCTGAACCGTATCATTTCGTAGCCGTCAGAAGCTGACCG  
 ACGAGCACCTGCAGTACTTCATGATCCAAGCGTTTCGTGGTCTGCACTATCTGCACAGCGCGAAGG  
 TTATGCACCGTATCTGAAACCGAGCAACCTGCTGGTGAACGCGGACTGCGCGCTGGCGATTGCG  
 ATTCGGCCTGGCGCGTGACGATCAGGTTATGAGCAGCAGCGATCTGACCCAATACGTGGTTACCC  
 GTTGGTATCGTCCGCCGGAAGTGCTGGGTATGGGCTTCAACCAATACACCAGCGCGGTGGACGTTT  
 GGAGCCTGGGTCTGATCTTTGCGGAGCTGATGGTTGGTCGTACCCTGCTGCCGGGCACCGATTATA  
 TCGAACAGCTGGTGATGATTGTTAACCTGCTGGGCAGCCCGAGCATCGACGATATGGAGTTCCTGA  
 GCAGCGAAGCGCGTGCCTTTATTCTGAGCCAACCGCACCGTCCGGCGCTGCCGTTCCGTGACCTGT  
 TTCCGATGGCGACCGAGGAAGCGACCGATCTGCTGAGCAAACCTGCTGGTTTTTTCATCCGGCGCGTC  
 GTCTGACCGCGAAGCAGGTGATGGAACACCCGTACTTCAGCAAATATCGTGACCCGGCGGAGGAA  
 GCGGATGCGCCGAACCCGTTTGTGTGGAACACAGCCACATCGAGACCAAGGCGCAACTGCGTGA  
 AGACCTGTGGCGTGTGGTTGAGGCGTATAGCCACAGCAACGAATtAAGCTT

## ANEXO 1



Ministério da Saúde

FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo CruzVice-presidência de Pesquisa e  
Laboratórios de ReferênciaComissão de Ética  
no Uso de Animais

## LICENÇA

LW-15/15

Certificamos que o protocolo (P-76/14-3), intitulado "Produção de anticorpos policlonais e monoclonais pelos critérios da Plataforma Tecnológica de Anticorpos Monoclonais (RPT14A)", sob a responsabilidade de Paulo Marcos Zech Coelho, atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exime a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

Esta licença tem validade até 02/03/2019 e inclui o uso total de :

*Mus musculus*

- 192 Fêmeas de BALB/c, Idade: 5 Semana(s), Peso: 30,0000 Grama(s).

Rio de Janeiro, 2 de março de

Octavio Augusto França Presgrave  
Coordenador da CEUA

## ANEXO 2



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Vice- Presidência de Pesquisa e  
Coleções BiológicasComissão de Ética  
no Uso de Animais

## LICENÇA

LW-4/18

Certificamos que o protocolo (P-12/17-5), intitulado "Desenvolvimento e validação de técnica imuno-histoquímica para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar", sob a responsabilidade de EDWARD JOSE DE OLIVEIRA, atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exige a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

Esta licença tem validade até 11/06/2022 e inclui o uso total de :

*Mesocricetus auratus*

- 42 Machos de Golden, Idade: 5 Semana(s), Peso: 100,000 Grama(s).

Rio de Janeiro, 11 de junho de 2018

Octavio Augusto França Presgrave  
Coordenador da CEUA