

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos/Bio-Manguinhos

PAULINE MARTINS DA CUNHA

**DESENVOLVIMENTO DE UM ENSAIO MULTIPLEX
POR CITOMETRIA DE FLUXO PARA DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA
LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA.**

Rio de Janeiro
2022

Pauline Martins da Cunha

Desenvolvimento de um ensaio multiplex por citometria de fluxo para diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral canina

Texto de dissertação apresentado ao Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos para obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Imunobiológicos

Linha de Pesquisa: Desenvolvimento Tecnológico de Processos e Produtos.

ORIENTADORAS: Dra. Paula Mello De Luca

Dra. Denise Cristina de Souza Matos

Rio de Janeiro

2022

da Cunha, Pauline Martins.

Desenvolvimento de um ensaio multiplex por citometria de fluxo para diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral canina / Pauline Martins da Cunha. - Rio de Janeiro, 2022.

90f f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos - Bio-Manguinhos, Pós-Graduação em Tecnologia de Imunobiológicos, 2022.

Orientadora: Paula Mello de Luca.

Orientadora: Denise Cristina de Souza Matos.

Bibliografia: f. 70-78

1. Leishmaniose Visceral Canina. 2. Diagnóstico sorológico. 3. Ensaio Multiplex. 4. Citometria de Fluxo. I. Título.

Pauline Martins da Cunha

Desenvolvimento de um ensaio multiplex por citometria de fluxo para diagnóstico sorológico da Leishmaniose visceral canina.

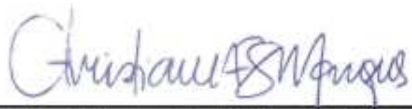
Dissertação apresentada ao Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos/FIOCRUZ, para a obtenção do título de Mestre em Ciências, Tecnologia de Imunobiológicos.

Aprovada em 27 de janeiro de 2022.

BANCA EXAMINADORA



Dr. Josué da Costa Lima Júnior
Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ



Dra. Christiane de Fátima Silva Marques
Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos/FIOCRUZ



Dra. Monique Paiva de Campos
Instituto Nacional de Infectologia /FIOCRUZ

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Dra. Paula Mello De Luca, pela enorme oportunidade, pela confiança e pelos ensinamentos técnicos e não técnicos que compartilha incessantemente;

À Dra Marta de Almeida Santiago, minha também orientadora, pelos ensinamentos, pelo fundamental apoio técnico, pela disponibilidade e pela paciência;

A Dra. Denise Cristina, minha orientadora junto ao MPTI, pela oportunidade e pela pronta disposição em me aceitar como aluna.

Aos amigos da turma MPTI-2019, as melhores pessoas com as quais eu poderia compartilhar um curso de mestrado e suas intercorrências, principalmente no meio de uma pandemia mundial;

À Cintia e Daniela, pelo apoio técnico inestimável e agradável companhia na plataforma de citometria, durante as aquisições das amostras;

À toda equipe do Laboratório de Imunoparasitologia do IOC, especialmente à Alinne e Patrick, pelo apoio, acolhimento e pela agradável convivência;

À equipe da Secretaria e da Coordenação do MPTI, pelo suporte e ajuda em todos os sentidos, desde antes do início do curso e sempre; e

À minha avó Ana, minha mãe Maria da Conceição, meu irmão Rafael e minha irmã Marcele, pelos quais absolutamente tudo vale a pena;

O meu infinito agradecimento.

"Os cães são o nosso elo com o paraíso. Eles não conhecem a maldade, a inveja ou o descontentamento. Sentar-se com um cão ao pé de uma colina numa linda tarde, é voltar ao Éden onde ficar sem fazer nada não era tédio, era paz."

Milan Kundera

RESUMO

A leishmaniose visceral canina (LVC) é uma enfermidade crônica que pode apresentar um amplo espectro de sinais clínicos, ou ainda ser assintomática. O aumento do número de casos de LVC costuma estar associado ao aumento da incidência da leishmaniose visceral em humanos, visto que os cães são a principal fonte de infecção em áreas urbanas. O Programa de Controle e Vigilância da Leishmaniose Visceral instituído pelo Ministério da Saúde no Brasil prevê, entre outras medidas, a eutanásia de cães positivos para a doença. Esta ação é bastante controversa pois, além das questões éticas relacionada à eutanásia de animais, ainda não se conseguiu evidenciar a redução dos casos em humanos em áreas onde se adotou o sacrifício sistemático de animais positivos. Neste contexto, o diagnóstico da enfermidade em cães é um desafio a ser superado, uma vez que os testes sorológicos de uso preconizados pelo MS apresentam diversas deficiências, demonstrando falhas na detecção da LVC em uma população de cães que inclui animais sãos, vacinados ou não, animais enfermos oligo ou assintomáticos, e ainda animais com outras enfermidades que implicam em reações cruzadas nos testes disponíveis. No presente estudo, com base numa plataforma de citometria multiplex em um ensaio do tipo CBA, foram utilizados três epitopos/peptídeos da proteína A2 (SV11, PP16 e VQ34), amplamente conhecida para imunização e diagnóstico da LVC, além do antígeno total de promastigotas de *Leishmania infantum*, para avaliar o perfil da resposta sorológica de cães a estes antígenos. Inicialmente foram avaliadas e estipuladas as mais adequadas concentrações de peptídeos/antígenos acoplados às beads, de diluição de soro e conjugado, para em seguida serem utilizadas no CBA em quatro grupos teste de animais: negativos (n=7), negativos vacinados (n=7), positivos sintomáticos (n=12) e positivo assintomáticos (n=7) para LVC. Embora não tenha sido possível estabelecer diferenças significativas entre os perfis sorológicos dos grupos de cães avaliados neste estudo, acredita-se que este ensaio pode ser aperfeiçoado em pesquisas futuras, vindo a se tornar uma opção ao aprimoramento do diagnóstico sorológico da LVC no país.

Palavras Chave: Leishmaniose Visceral Canina. Diagnóstico sorológico. Ensaio Multiplex. Citometria de Fluxo.

ABSTRACT

Canine Visceral Leishmaniasis (CVL) is a chronic disease that can present an extensive spectrum of clinical signs, or can also be asymptomatic. The increase in numbers of CVL cases tend to be associated with the increase of incidence of Visceral Leishmaniasis in humans, since dogs are the main source of infection in urban areas. The Visceral Leishmaniasis Control and Surveillance Program established by the Brazilian Ministry of Health suggests, among other measures, euthanasia of dogs tested positive for the disease. This action is quite controversial because, in addition to the ethical issues related to the euthanasia of animals, there has been no evidence of reduction of cases in humans in areas where systematic sacrifice of animals with CVL has been adopted. In this context, the diagnosis of disease in dogs is a challenge to be overcome, since serological tests recommended by the Ministry of Health present several deficiencies. They have failed in detecting CVL in a population of dogs that includes healthy animals, vaccinated or not, oligosymptomatic or asymptomatic, and also animals with other diseases resulting in cross reactions in the available tests. In the present study, based on a multiplex cytometry platform in a CBA assay, three epitopes/peptides (SV11, PP16 and VQ34) of protein A2, widely used for immunization and diagnosis of CVL, and *Leishmania infantum* total extract (LiAg), were used to evaluate the profile of the serologic response of dogs to these antigens. Initially, the most appropriate concentrations of peptides/antigens coupled to beads, serum titration and conjugate dilution were evaluated and chosen, and then were used at the CBA in four groups of animals: negatives (n=7), vaccinated (n=7), symptomatic positives (n=12) and asymptomatic positives (n=7) dogs for LVC. Although CBA was not capable to detect significant differences among the serologic profiles of the groups of dogs in this study, it is possible to build upon this assay in future researches, providing an option for improving the diagnosis of CVL in Brazil.

Keywords: Canine Visceral Leishmaniasis. Serological diagnostic. Multiplex assay. Flow cytometry.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Ciclo biológico de <i>Leishmania</i> sp em hospedeiros vertebrados e vetor (adaptado de Esch e Petersen, 2013).	19
Figura 2- Esquema de funcionamento de um citômetro de fluxo (Adaptado de Bourdin et al, 2016).	24
Figura 3- A - Diagrama de um ensaio CBA onde microesferas marcadas com diferentes intensidades de corante interno (beads A, B e C) podem ser acopladas com diversos antígenos (símbolos), permitindo a detecção de diferentes analitos simultaneamente (Chen 2016). B - Formatos de ensaios com microesferas: ensaio sanduíche de captura, ensaio competitivo e ensaio sorológico indireto (ANGELONI et al, 2018)	26
Figura 4- Etapas do ensaio de CBA proposto no estudo.....	33
Figura 5 - Definição das cinco populações de microesferas do kit QuantumPlex™ Carboxyl. Dot plot de SSC-A (side scatter- Area) vs. Starfire Red mostrando as populações de beads #1, #2, #3, #4 e #5 de acordo com a intensidade interna de fluorescência de Starfire Red.	34
Figura 6- Esquema das etapas realizadas no acoplamento dos antígenos (LIAg, SV11, PP16 e SV34), IgG e BSA as microesferas (beads) carboxiladas.....	37
Figura 7- Esquema das reações sorológicas realizadas com as beads acopladas a cada antígeno (LIAg, SV11, PP16 e SV34), IgG e BSA, individualmente, na presença de amostras de soro canino provenientes de cães positivos para LVC sintomáticos e positivos para LVC assintomáticos, animais sadios, negativos para LVC, e animais sadios vacinados contra LVC.....	39
Figura 8- Representação do protocolo citofluorimétrico simples. A: <i>Dot plot</i> para exclusão de <i>doublets</i> através dos parâmetros SSC-H (Side Scatter- Height) vs. SSC-A (Side Scatter- Area) com o <i>gate</i> “Singlets”. B: Definição da população de beads, a partir do <i>gate</i> “Singlets”, através do <i>dot plot</i> de FSC-A (Forward Scatter- Area) vs.	

SSC-A. C: Overlay dos histogramas de marcação para FITC nos tubos de IgG (azul), soro negativo (vermelho) e soro positivo (verde) 40

Figura 9 – Representação do protocolo citofluorimétrico multiplex. A: *Dot plot* para exclusão de *doublers* através dos parâmetros SSC-H (Side Scatter- Height) vs. SSC-A (Side Scatter- Area) com o *gate* “Singlets”. B: Definição da população de beads, a partir do *gate* “Singlets”, através do *dot plot* de FSC-A (Forward Scatter- Area) vs. SSC-A. C: *Dot plot* de FITC (eixo X) vs. Starfire Red (eixo Y), para as cinco populações de microesferas, em relação à marcação de IgG (azul), soro negativo (soro -, vermelho) e soro positivo (soro +, verde)..... 41

Figura 10- Fluxograma proposto para o desenvolvimento de um ensaio CBA multiplex para diagnóstico da LVC, com as etapas da realização dos ensaios..... 42

Figura 11- Histograma com intensidade de fluorescência dos controles internos do experimento. **A** - Histogramas demonstrativos das intensidades de fluorescência obtidas após a incubação das beads acopladas BSA (linha preta), IgG total de cão (linha azul escuro) e sem antígeno acoplado (linha azul clara) com soro positivo de obtido de 1 cão com LVC sintomática, e beads acopladas a BSA incubadas com soro negativo, obtido de 1 cão sadio (linha cinza). Soros utilizados na diluição final de 1:800 e conjugado anti-IgG de cão FITC na diluição de 1:400. **B** – resultados das intensidades médias de fluorescência integral (iMFI) das mesmas amostras representadas nos histogramas (A). 46

Figura 12- Histogramas demonstrativos intensidades médias de fluorescência obtidas após a incubação das beads acopladas ao antígeno total de promastigotas de *L. infantum* (LiAg) e aos peptídeos da proteínas A2 (SV11, PP16 e VQ34) em três diferentes concentrações: 5µg (A), 10µg (B) e 20µg (C), na presença de soro positivo obtido de cão com LVC sintomática (linha vermelha) ou com soro negativo, obtido cão sadio (linha azul). Soros utilizados na diluição final de 1:800 e conjugado anti-IgG de cão FITC na diluição de 1:400. 48

Figura 13- Resultados comparativos das intensidades médias de fluorescência integral após a incubação das beads acopladas ao antígeno total de promastigotas de *L. infantum* (LiAg – barra cinza) e aos peptídeos da proteínas A2 (SV11 – barra amarela, PP16 – barra rosa e VQ34 – barra azul) em três diferentes concentrações

(20µg, 10µg e 5µg de antígeno), na presença de soro positivo obtido de cães com LVC sintomática na diluição final de 1:800. O conjugado anti-IgG de cão FITC foi utilizado na diluição de 1:400. 49

Figura 14- Histogramas demonstrativos das intensidades de fluorescência obtidas após a incubação das beads sem acoplamento de antígenos (SP) e beads acopladas a IgG, usadas como controles dos ensaios, na presença de conjugado nas diluições de 1:400; 1:800 e 1:1600. 50

Figura 15- Resultados comparativos das intensidades médias de fluorescência (MFI) obtidas após a incubação das beads acopladas ao antígeno total de promastigotas de *L. infantum* (LiAg – barra cinza) e aos peptídeos da proteínas A2 (SV11 – barra amarela, PP16 – barra rosa e VQ34 – barra azul) na presença de soro positivo obtido de 3 cães com LVC sintomática nas diluições de 1:800 e 1:1.600 e conjugado anti-IgG de cão FITC nas diluições de 1:400, 1:800 e 1:1.600. As barras demonstram as médias das MFI ± Erro Padrão. 51

Figura 16- Histogramas demonstrativos das intensidades de fluorescência obtidas após a incubação das beads acopladas ao antígeno total de promastigotas de *L. infantum* (LiAg) e aos peptídeos da proteínas A2 (SV11, PP16 e VQ34) em três diferentes diluições de conjugado: 1:1600 (linha laranja); 1:800 (Linha azul) e 1:400 (linha vermelha), na presença de soro positivo obtido de cão com LVC sintomático na concentração de 1:800. Foram utilizadas as microesferas acopladas nas concentrações de 10µg para LiAg, 20 µg para SV11 e PP16, e 5µg para VQ34. 52

Figura 17- Histogramas demonstrativos das intensidades de fluorescência obtidas após a incubação das beads acopladas ao antígeno total de promastigotas de *L. infantum* (LiAg) e aos peptídeos da proteínas A2 (SV11, PP16 e VQ34), em reações utilizando soro de cão negativo para LVC em diluição 1:600 (linha azul), soro de cão positivo na diluição 1:1600 (linha verde) e na diluição 1:3200 (linha vermelha). O conjugado anti-IgG de cão FITC foi utilizado na diluição de 1:400..... 54

Figura 18- Resultados comparativos das intensidades médias de fluorescência (MFI) obtidas após a incubação das beads acopladas ao antígeno total de promastigotas de *L. infantum* (LiAg – barra cinza) e aos peptídeos da proteínas A2

(SV11 – barra amarela, PP16 – barra rosa e VQ34 – barra azul) na presença de soro positivo obtido de 3 cães com LVC sintomática nas diluições de 1:1.600 (barras lisas) 1:3.200 (barras hachuradas) e conjugado anti-IgG de cão FITC na diluição de 1:400. As barras demonstram as médias das MFI \pm Erro Padrão. 55

Figura 19- Comparação das intensidades médias de fluorescência obtidas no CBA para LiAg, SV11, PP16, VQ34 e BSA nos diferentes grupos de cães estudados. As barras demonstram as médias das MFI \pm Erro Padrão. Teste Mann Whitney..... 58

Figura 20- Dot plots representativos da marcação *multiplex* nos grupos de cães sadios, vacinados, assintomáticos e sintomáticos. O eixo X representa a intensidade de marcação do conjugado anti-IgG de cão conjugado a FITC. O eixo Y representa a intensidade de marcação de Starfire Red (marcação interna das beads). Os *gates* LiAg, SV11, PP16 e VQ34 representam as respectivas populações de beads acopladas ao antígeno total de promastigotas de *L. infantum* (LiAg) e aos peptídeos da proteínas A2 (SV11, PP16 e VQ34). O gate BSA representa a população de beads acopladas apenas com BSA. Dot plots A – Amostras com BSA apresentando baixa intensidade de marcação de anti-IgG-FITC. Dot plots B – Amostras com BSA apresentando alta intensidade de marcação de anti-IgG-FITC..... 60

Figura 21- Resultados comparativos das Intensidades médias de fluorescência (MFI) obtidas após a incubação das beads acopladas ao antígeno total de promastigotas de *L. infantum* (LiAg) e aos peptídeos da proteínas A2 (SV11, PP16 e VQ34) na presença de soro ou plasma obtidos de 2 cães sadios não vacinados (triângulos cheios), 4 cães sadios vacinados (quadrados vazios) e 2 portadores de LVC (1 sintomático - círculo cheio, e 1 assintomático - círculo vazio)..... 61

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1- Acoplamentos realizados para os testes de determinação da melhor concentração dos antígenos para a reação sorológica..... 35
- Tabela 2- Identificação de todos os cães cujas amostras foram analisadas no estudo, separadas pelos grupos teste: Cães Sadios, Cães Sadios Vacinados, Cães Positivos (para LVC) Sintomáticos e Cães Positivos (para LVC) Assintomáticos..... 44
- Tabela 3- Identificação dos componentes e respectivas concentrações e quantidades estipuladas para o ensaio multiplex por citometria de fluxo para diagnóstico de LVC..... 56
- Tabela 4- Identificação dos cães separados pelos grupos teste: Cães Sadios, Cães Sadios Vacinados, Cães Positivos (para LVC) Sintomáticos e Cães Positivos (para LVC) Assintomáticos, cujas amostras foram analisadas gerando os resultados descritos na seção 5.5..... 57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- BP- Passa banda (Band Pass)
- BBMA- Ensaio Multiplex com Beads (Bead Based Multiplexed Array)
- BSA - Albumina sérica Bovina (Bovine Soroalbumine)
- CBA - Ensaio de citometria com beads (Citometric Bead Array)
- CEUA - Comissão Ética no Uso de Animais
- DPP - Imunoensaio cromatográfico com duplo percurso (Dual Path Platform)
- EDAC - *N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N*-ethylcarbodiimide hydrochloride
- ELISA - Ensaio de Imuno absorção enzimática (Enzyme-linked immunosorbent assay)
- EIE - Ensaio Imunoenzimático
- FITC - Isoticianato de Fluresceina (Fluoresceine Isotiocianate)
- FSC - Dispersão frontal (Foward Scatter)
- IFAT - Teste de anticorpo fluorescente indireto (Indirect Fluorescent Antibody Test)
- MFI - intensidade média de fluorescência
- INI - Instituto Nacional de Infectologia
- IOC - Instituto Oswaldo Cruz
- LiAg - Antígeno total de *Leishmania infantum*
- LV/LVC - Leishmaniose Visceral/ Leishmaniose Visceral Canina
- MS - Ministério da Saúde
- WHO (OMS) - World Health Organization (Organização Mundial de Saúde)
- PAHO (OPAS) - Panamerican Health Organization (Organização Panamericana de Saúde)
- PBS - Tampão salino fosfato (Phosphate Buffered Saline)
- PCR - Reação da polimerase em cadeia (Polimerase Chain Reaction)
- qPCR - Reação da polimerase em cadeia quantitativa (Quantitative Polimerase Chain Reaction)
- PMT - Tubo fotomultiplicador (Photomultiplier Tubes)
- SSC - Dispersão lateral (Side Scatter)
- SSC-A - Dispersão lateral Area (Side Scatter Area)
- SSC-H - Dispersão lateral altura (Side Scatter Heights)

TA - Tampão de Acoplamento

TLE - Tampão de Lavagem e Estocagem

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1	AS LEISHMANIOSES.....	18
2.2	O CICLO BIOLÓGICO DA <i>LEISHMANIA</i> SP.....	18
2.3	LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA.....	20
2.4	DIAGNÓSTICO DA LVC.....	21
2.5	CITOMETRIA DE FLUXO.....	23
2.6	VACINAÇÃO CONTRA LVC.....	27
2.7	PROTEÍNA RECOMBINANTE A2.....	28
3	OBJETIVOS	30
3.1	OBJETIVO GERAL.....	30
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
4	MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1	OBTENÇÃO DE AMOSTRAS DE SORO E PLASMA.....	31
4.2	ANTÍGENO TOTAL DE <i>L. INFANTUM</i> , PROTEÍNAS E PEPTÍDEOS.....	32
4.2.1	Antígeno total de promastigotas de <i>L. infantum</i> (LiAg).....	32
4.2.2	Peptídeos sintéticos da proteína A2.....	32
4.3	CBA	33
4.3.1	Acoplamento dos antígenos às microesferas.....	34
4.3.2	Reação sorológica.....	37
4.3.3	Citometria de fluxo.....	39
4.4	ETAPAS DO ESTUDO.....	42
4.4.1	Avaliação do acoplamento e escolha da concentração de antígenos acoplados as beads.....	42
4.4.2	Definição da diluição do conjugado.....	43
4.4.3	Definição da diluição de soro e plasma	43
4.4.4	Ensaio CBA multiplex com os grupos de cães.....	43
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	45
5	RESULTADOS	46
5.1	AValiação DO ACOPLAMENTO.....	46
5.2	DEFINIÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE PROTEÍNAS ACOPLADAS ÀS MICROESFERAS.....	47
5.3	DILUIÇÃO DE CONJUGADO.....	50
5.4	DILUIÇÕES DE SORO.....	53
5.5	ENSAIOS CBA MULTIPLEX COM OS GRUPOS DE CÃES.....	56
5.6	COMPARAÇÃO DE RESULTADOS OBTIDOS COM SORO X PLASMA.....	61
6	DISCUSSÃO	62
7	CONCLUSÕES	69
	REFERÊNCIAS	70

ANEXO A - Licença CEUA L045/2015.....	79
ANEXO B - Carta do CEUA FIOCRUZ.....	81
ANEXO C - Planilha com Dados Clínicos dos Animais.....	83
ANEXO D - QuantumPlex™ Streptavidin - Product Data Sheet 215.....	88

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é uma infecção sistêmica e fatal em até 95% dos casos, e é considerada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como uma das doenças parasitárias mais importantes do mundo. Ela é endêmica em 62 países, com a estimativa de aparecimento em média de 500 mil casos novos por ano, numa população de cerca de 200 milhões de pessoas expostas ao risco da infecção (LEMOS et al, 2007).

No Brasil, a doença afeta cerca de 3.500 pessoas anualmente sendo que em 2019 foram confirmados 2.529 casos novos de LV no país, com uma taxa de incidência de 1,2 casos a cada 100 mil habitantes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021)

A LV é, portanto, endêmica no Brasil, sendo causada principalmente pelo protozoário *Leishmania Leishmania infantum* (MARCONDES; DAY, 2019). O flebótomo conhecido por mosquito palha (*Lutzomyia longipalpis*), é o principal vetor envolvido na transmissão da doença, e os cães domésticos são considerados os reservatórios mais importantes do protozoário (CAMPOS et al, 2017).

A LV figura na lista de doenças tropicais negligenciadas da OMS, sendo por isso altamente recomendado por esta organização o aumento no aporte de recursos e estudos para melhorias na prevenção, diagnóstico e tratamento desta grave enfermidade, visando assim salvar vidas, prevenir deficiências, acabar com o sofrimento e melhorar a produtividade das pessoas ao redor do mundo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 AS LEISHMANIOSES

São denominadas leishmanioses o conjunto de enfermidades antroponozoonóticas causadas por parasitos do gênero *Leishmania*, que acometem principalmente a população da região intertropical do planeta (SALOMON, 2020). Estes parasitos são transmitidos aos hospedeiros vertebrados pela picada de fêmeas de flebotomíneos, principalmente dos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia*. (STEVERDING, 2017). As leishmanioses se manifestam sob 3 formas principais: a leishmaniose cutânea (mais comum), a leishmaniose mucocutânea (com progressão crônica e menor incidência) e a leishmaniose visceral (LV), também conhecida como kala-azar, que é a forma mais severa da doença, sendo fatal caso não tratada adequadamente (PAHO, 2019).

2.2 CICLO BIOLÓGICO DA *LEISHMANIA* SP.

O ciclo biológico das leishmanias envolve ao menos um hospedeiro vertebrado e um vetor (Figura 1). A fêmea do flebotomíneo injeta as formas promastigotas infectantes no hospedeiro susceptível durante o repasto sanguíneo e estas são rapidamente capturadas pelos fagócitos, onde passam para a forma amastigota e se multiplicam por divisão binária, formando os vacúolos parasitóforos, que causarão a lise do macrófago. As amastigotas liberadas serão internalizadas por outros macrófagos e darão sequência ao processo de multiplicação levando a eventual parasitemia (MICHALICK, 2004).

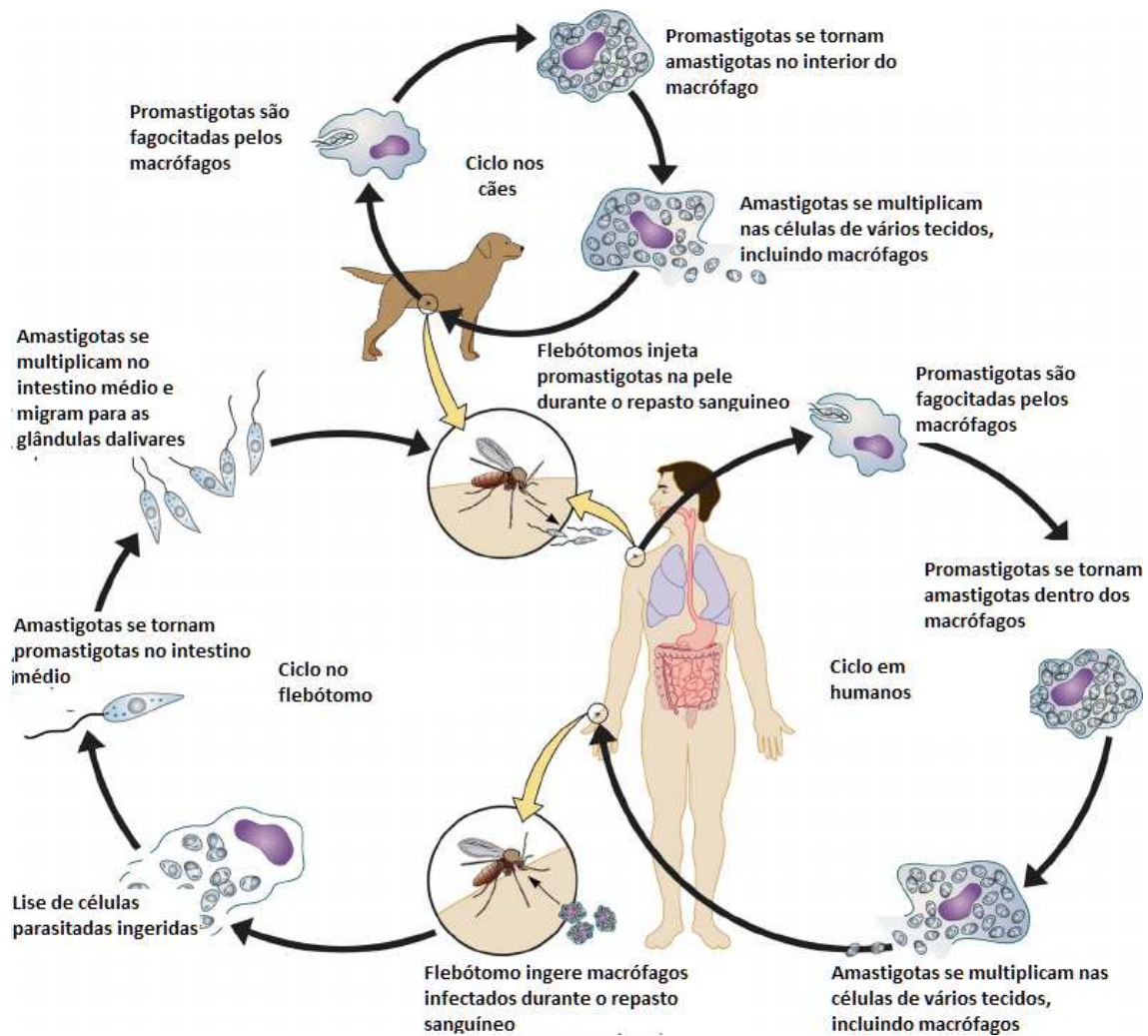


Figura 1. - Ciclo biológico de *Leishmania* sp em hospedeiros vertebrados e vetor (adaptado de Esch e Petersen, 2013).

Já os flebotomíneos se infectam ao se alimentarem do sangue de hospedeiros em parasitemia. Os parasitas se convertem a promastigotas no intestino médio do flebótomo, onde se reproduzem intensamente em até 14 dias. Estas formas promastigotas migram para as glândulas salivares, onde passam para a forma infectante de promastigota metacíclica, e ficam aguardando o início do repasto para nova infecção.

2.3 LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

Os cães desempenham um papel crucial no ciclo da enfermidade, por serem a principal fonte de infecção dos flebotomíneos em áreas urbanas. Sabe-se que o aumento do número de casos de Leishmaniose Visceral Canina (LVC) costuma estar associado ao aumento da incidência da LV em humanos. (MARCONDES; DAY, 2019).

Em cães, a doença se desenvolve lenta e cronicamente, apresentando um amplo espectro de sinais clínicos, ou mesmo por vezes, sendo assintomática (CAMPOS et al 2017). Por ser crônica e multissistêmica, a LVC tem o potencial de atingir qualquer órgão do cão (SOLANO-GALLEGO, 2011).

A progressão da LVC está relacionada ao tipo de resposta imunológica desencadeada no hospedeiro. Enquanto a resistência à doença indica estar associada à ativação da resposta Th1 mediada por células (CD4+) e produção de interferon gama, fator de necrose tumoral e IL-2 e IL-12, a susceptibilidade à enfermidade parece estar relacionada à ativação da resposta Th2 com a proliferação de células B e incremento de IL-4, IL-6 e IL-10 (LUVIZOTTO, 2006).

É bem estabelecido que a LV em cães se caracteriza por uma resposta celular limitada e pela presença de altas concentrações de anticorpos séricos, particularmente de IgG (PINELLI et al, 1994, MAIA et al, 2010, OLIAS-MOLERO et al, 2019). O aumento na concentração de anticorpos em cães com leishmaniose pode ser detectado dentro de um a quatro meses após a infecção (MAIA et al, 2010). Estudos já conseguiram demonstrar diferentes padrões de resposta sorológica de subclasses de IgG, sendo IgG1 e IgG2 associados a infecções sintomáticas e assintomáticas, respectivamente (DEPLAZES et al, 1995). Essa resposta humoral contribui para a formação de imunocomplexos cuja deposição em diferentes órgãos, especialmente nos rins, causa danos teciduais graves (LUVIZOTTO, 2006).

Os principais sinais clínicos no cão são representados pela caquexia, hipergamaglobulinemia, hepatoesplenomegalia, anemia e linfadenopatia (KRAUSPENHAR et al., 2007). Dentre as lesões cutâneas, incluem-se como as mais comuns na LVC a dermatite esfoliativa, nódulos e úlceras cutâneas, alopecia, dermatite papular ou pustular e onicogribose (MOREIRA et al, 2016). Os

animais sintomáticos podem ainda apresentar manifestações renais, hepatoesplênicas, locomotoras, oculares, neurológicas, pulmonares e cardíacas (PARABONI; FRANCO; MATTEI, 2008).

Percebe-se que o diagnóstico clínico da LVC é muito difícil de ser realizado, considerando a diversidade de sinais e sintomas possíveis, que também são comuns a outras enfermidades, bem como as alterações encontradas no hemograma, ou nos exames de função renal ou hepática, que são inespecíficos (IKEDA-GARCIA; MARCONDES, 2007). Além disso, os animais podem permanecer assintomáticos por toda a vida ou desenvolver sintomas após intervalos que variam de três meses a alguns anos após a infecção, funcionando como reservatório e fonte de infecção para os humanos por grandes períodos (WHO, 2020).

A crescente conscientização de que o controle da doença humana depende do controle efetivo da leishmaniose canina tem intensificado pesquisas sobre a leishmaniose em cães (ALVAR et al, 2004). Desta forma, os métodos de diagnóstico da LVC têm sido alvo de muitos estudos e avanços tecnológicos ao longo dos anos.

2.4 DIAGNÓSTICO DA LVC

Devido ao grande número de cães assintomáticos e à ausência de sinais clínicos patognomônicos, o diagnóstico da LVC é totalmente dependente do suporte laboratorial. Estão disponíveis atualmente técnicas parasitológicas, imunológicas, e moleculares para diagnóstico da LVC, cujas interpretações devem considerar seus benefícios e limitações (RIBEIRO et al, 2018).

O diagnóstico da LVC pode ser realizado por teste parasitológico direto, onde é feita a identificação das formas amastigotas do protozoário em esfregaços de medula óssea e/ou baço. Mesmo sendo bastante específico, o resultado negativo nesta prova não é necessariamente conclusivo, considerando a possível variabilidade na quantidade de parasitos no organismo do animal (PESSOA-E-SILVA et al 2019).

Já os testes moleculares como a PCR e qPCR, que estão cada vez mais presentes na rotina de diagnósticos em veterinária, e podem ser realizados a partir de vários tipos de amostras biológicas, têm se mostrado bastante sensíveis e específicos, porém requerem um aparato técnico e laboratorial que, além de torná-los muitos dispendiosos, inviabiliza sua ampla utilização a campo. (MAGALHÃES et al 2017).

Embora apresentem deficiências no diagnóstico das leishmanias, uma vez que o parasita normalmente induz soroconversão tardia e com baixos níveis de anticorpos no início da infecção (ANDRADE et al., 2009), os métodos sorológicos são os mais utilizados para detecção da LVC. O teste de imunofluorescência (IFAT) é o método mais difundido mundialmente para este fim, apesar de se mostrar pouco sensível para detectar cães assintomáticos (MANCIATI et al.1995; LIRA et al 2006).

No Brasil, os testes sorológicos são os métodos de eleição para o diagnóstico de LVC, de acordo com o protocolo estabelecido pelo MS, onde o TR-DPP (Dual Path Plataform) é o teste de triagem, seguido pelo ELISA, que é o teste confirmatório (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011). Embora este protocolo tenha vantagens em relação à sua praticidade e ao baixo custo na sua execução, diversos estudos apontam problemas no seu desempenho, relacionados à reações cruzadas com agentes infecciosos comuns em cães (*T. cruzi*, *L. braziliensis*, *Sporothrix sp.*, *Ehrlichia canis* e *Babesia canis*) e também diminuição de acurácia diagnóstica em animais assintomáticos ou oligossintomáticos em áreas onde a doença é endêmica (PESSOA-E-SILVA et al 2019). Há ainda a possibilidade do diagnóstico falso positivo em animais vacinados, uma vez que a resposta imune humoral induzida pela vacina pode interferir com o diagnóstico sorológico da LVC (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

Visto que os métodos sorológicos ainda são as ferramentas mais aplicáveis nos inquéritos epidemiológicos e no diagnóstico da LVC, percebe-se que o desenvolvimento e o aperfeiçoamento de novos testes baseados nesta metodologia são de enorme importância, no sentido de possibilitar, de forma acurada e prática, o diagnóstico diferencial da LVC em uma população que inclui animais sãos, vacinados ou não, animais enfermos oligo ou assintomáticos e

ainda animais com outras enfermidades que implicam em reações cruzadas nos testes atualmente utilizados.

Neste cenário, é possível destacar a citometria de fluxo, amplamente usada na prática clínica em um grande número de aplicações (JAROSZESKI & RADCLIFF, 1999 ; ANDRADE et al 2007), como uma técnica a ser explorada, no sentido de mitigar questões relacionadas aos outros testes sorológicos e aperfeiçoar o diagnóstico de LVC.

2.5 CITOMETRIA DE FLUXO

A citometria de fluxo é uma ferramenta com aplicações em diversas áreas da imunologia e biologia molecular e tem se mostrado bastante efetiva no monitoramento do sistema imune em respostas a doenças infecciosas. A técnica tem sofrido avanços significativos nos últimos anos, permitindo a obtenção detalhada de dados, principalmente em estudos relacionados ao sistema imunológico (MCKINNON, 2018). Na citometria de fluxo, partículas ou células em suspensão passam uma a uma por um feixe de luz (em geral um ou mais lasers). Estas partículas são marcadas com um anticorpo conjugado a um fluoróforo, e este, ao ser excitado pela luz, emite fótons que são captados por detectores e transformados em sinal eletrônico (Figura 2). Com auxílio de softwares específicos podem ser determinados tanto a positividade de um dado anticorpo de forma quantitativa em uma população celular (porcentagem) ou até em uma única célula ou partícula (intensidade de fluorescência) (GOMES, 2016).

A citometria de fluxo permite análises rápidas, acuradas e com ótima reprodutibilidade. Além de já ter apresentado resultados bastante promissores quando utilizada em estudos sorológicos da leishmaniose em humanos (ROCHA et al, 2002; LEMOS et al, 2007; GARCIA et al, 2009), a citometria de fluxo tem sido importante ferramenta no aprimoramento do diagnóstico sorológico da leishmaniose em cães. Em 2007, Andrade e colaboradores atestaram a utilização da técnica na detecção de IgG anti *L. (L.) chagasi* para diferenciar cães vacinados de não vacinados. Em 2013, Ker e colaboradores verificaram que a citometria teve ótimo desempenho em testes sorológicos para diagnosticar

cães positivos para LVC em variados estágios clínicos da enfermidade, e para diferenciar animais vacinados de não vacinados. Alguns pesquisadores também obtiveram êxito com a citometria de fluxo em pesquisa de imunoglobulinas anti *L. braziliensis* em cães, sinalizando a possibilidade do uso desta metodologia no diagnóstico diferencial entre da leishmaniose visceral e tegumentar em animais (ROCHA et al, 2002 e PISSINATE et al, 2008, SANTIAGO et al, 2008).

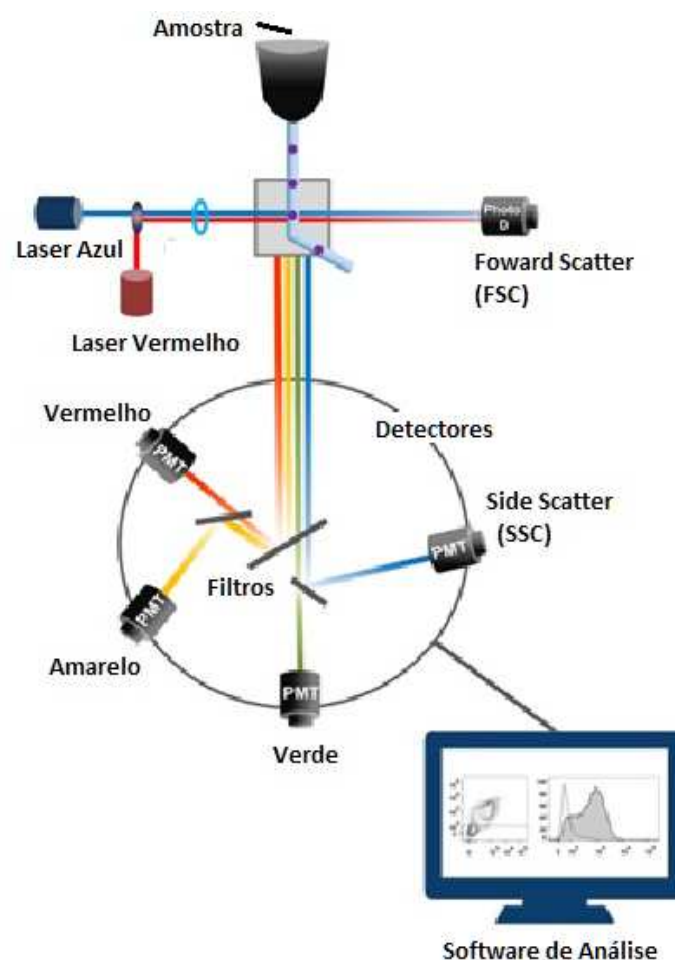


Figura 2 - Esquema de funcionamento de um citômetro de fluxo (Adaptado de Bourdin et al, 2016)

A citometria de fluxo permite ainda a realização de ensaios conhecidos como CBA ("Cytometric Bead Array") ou BBMA ("Bead Based Multiplex Array"), nos quais utilizam-se as microesferas ou "beads" para detecção e quantificação

de analitos em uma amostra (BRITO; ANAL; SANTANA, 2016). Esta técnica envolve a obtenção ou desenvolvimento de ligantes (que podem ser peptídeos, nucleotídeos, proteínas, anticorpos, receptores, polissacarídeos ou lipídios), que são acoplados a *beads* fluorescentes, e que irão se unir ao analito específico pesquisado na amostra. Um marcador secundário fluorescente é então utilizado para a detecção e quantificação deste analito no citômetro de fluxo (KELLAR; IANNONE, 2002; KELLAR et al 2006). A técnica permite o uso de mais de uma população de *beads*, que são diferenciadas entre si por quantidades/intensidades de corante fluorescente distintos, sendo possível a identificação de múltiplos analitos simultaneamente, o que caracteriza os ensaios denominados multiplex (MORGAN et al, 2004) (Figura 3A). Os ensaios podem ser desenvolvidos em três formatos diferentes: A) ensaios sanduíche de captura, onde são utilizados anticorpos para capturar e revelar o analito em estudo; B) ensaios competitivos onde se utiliza apenas um anticorpo e uma partícula alvo marcada; C) ensaios sorológicos indiretos que necessitam tanto de uma proteína alvo como de um anticorpo revelador (Figura 3B). Em todos os casos, as *beads* funcionam como o suporte para a ligação do anticorpo ou do antígeno onde o analito a ser pesquisado se ligará e essa ligação será revelada através de um antígeno ou anticorpo fluorescente (ANGELONI et al, 2018).

Comparado com outros ensaios quantitativos, como o ELISA e o Western blot, o CBA reduz significativamente as exigências relacionadas à quantidade de amostras e o tempo para obtenção de resultados. Esta técnica permite o delineamento e a criação de ensaios para mensurar ao mesmo tempo ampla variedade de componentes incluindo mediadores inflamatórios, citocinas, isotipos de imunoglobulinas, moléculas intracelulares, mediadores de apoptose, moléculas de adesão e anticorpos (MEDEIROS; GOMES, 2019).

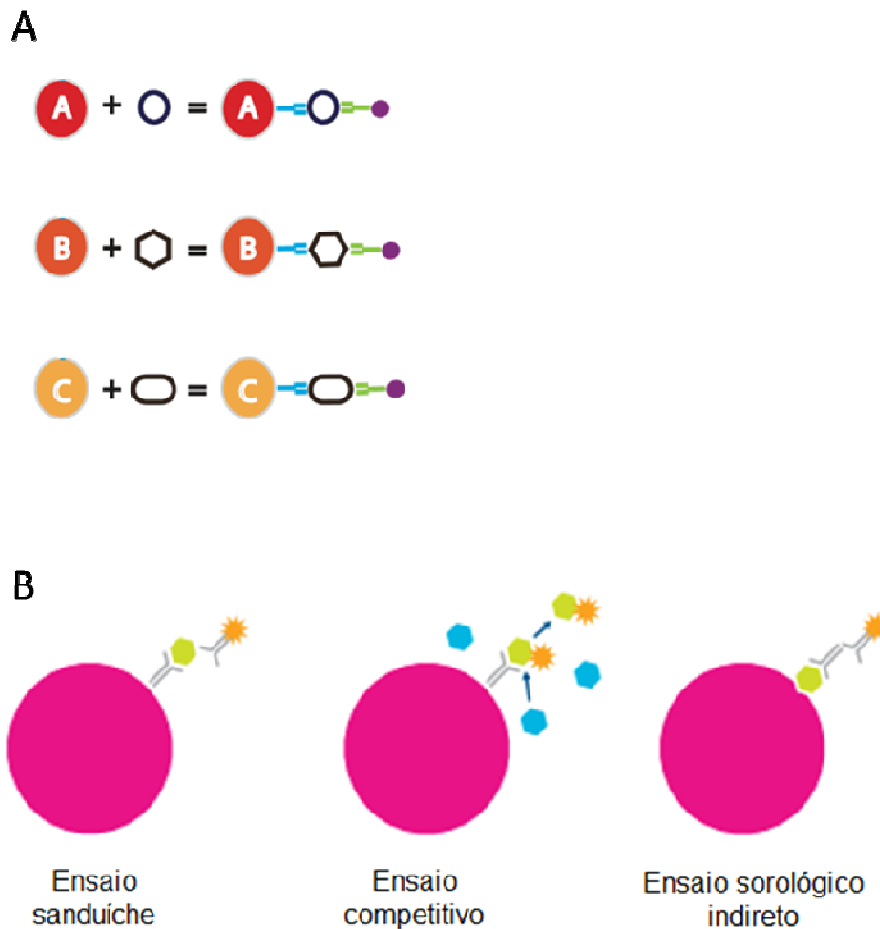


Figura 3 - A - Diagrama de um ensaio CBA onde microesferas marcadas com diferentes intensidades de corante interno (beads A, B e C) podem ser acopladas com diversos antígenos (símbolos), permitindo a detecção de diferentes analitos simultaneamente (Chen 2016). B - Formatos de ensaios com microesferas: ensaio sanduíche de captura, ensaio competitivo e ensaio sorológico indireto (ANGELONI et al, 2018).

Em animais, ensaios do tipo CBA vêm sendo utilizados para a detecção de patógenos, genotipagem, medição de níveis hormonais, na vigilância de doenças e avaliação de vacinas (CHRISTOPHER-HENNINGS et al., 2013). Ensaios do Tipo CBA também tem se mostrado eficientes para o uso no diagnóstico da leishmaniose em cães. Utilizando microesferas associadas à citometria de fluxo, Sousa e colaboradores (2013) evidenciaram um método sorológico com alta sensibilidade para o diagnóstico de formas clínicas e subclínicas da LVC. Ker e colaboradores (2019) demonstraram sensibilidade de 95,0% e especificidade de 91,2% num ensaio multiplex para LVC com base nos

sistemas antigênicos A4–rLci1A e E4–rLci2B. Evidencia-se assim o elevado potencial dos ensaios CBA para o aperfeiçoamento do diagnóstico sorológico da leishmaniose em cães.

2.6 VACINAÇÃO CONTRA LVC

O Programa de Controle e Vigilância da Leishmaniose Visceral instituído pelo Ministério da Saúde no Brasil, prevê, entre outras medidas, o tratamento dos indivíduos doentes, o controle do flebótomo vetor, e a eutanásia de cães diagnosticados positivos para a doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). Esta última ação é bastante polêmica, e também tida como controversa pois, além das questões éticas relacionada à eutanásia de animais, ainda não se conseguiu evidenciar claramente a redução dos casos em humanos em áreas onde se adotou o sacrifício sistemático de animais positivos para LVC (DANTAS-TORRES et al, 2019). Além disso, como foi discutido até aqui, o diagnóstico da enfermidade em cães é um desafio a ser superado, uma vez que os testes disponíveis apresentam diversas deficiências (KER et al, 2013).

Embora exista um imunobiológico disponível no Brasil (LeishTec® Ceva Saúde Animal Ltda.), a vacinação contra leishmaniose em cães ainda não foi adotada pelo MS como medida para controle da doença no país por questões relacionadas ao seu impacto na saúde pública, que ainda devem ser elucidadas (MINISTÉRIO DA SAÚDE; MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2009).

A Leish-Tec® é uma formulação constituída pela proteína recombinante A2 de *L. (L.) donovani*, produzida em *Escherichia coli*, sob a forma de proteína (ou antígeno) recombinante e saponina como adjuvante. A proteína A2 é expressa nas formas amastigotas de algumas espécies de *Leishmania*, como *L. (L.) donovani*, *L. (L.) infantum*, *L. (L.) chagasi*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) mexicana* (COELHO et al., 2003) e está envolvida na indução de resposta imune celular do tipo 1 no hospedeiro (RESENDE et al, 2008). A resposta imune IgG-mediada pela vacina pode ser indistinta daquela induzida pela infecção natural, quando utilizadas técnicas sorológicas tradicionais para o diagnóstico

(SCHIMING; PINTO SILVA, 2012). Utilizando o teste DPP, Campos e colaboradores (2017) detectaram soroconversão temporária 6 meses após a vacinação com Leish-Tec®, em 1 dos 12 animais avaliados em seu estudo.

Ainda em tramitação, o Projeto de Lei nº 1738/2011 prevê a vacinação obrigatória e gratuita contra LVC em todo país. Independente disso, por recomendação dos veterinários da iniciativa privada, atualmente muitos animais são vacinados e constituem uma parcela expressiva da população de cães no Brasil.

Urge portanto a necessidade de aprimoramento dos testes sorológicos para a detecção adequada da LVC, considerando também a crescente população de cães vacinados existentes.

2.7 PROTEÍNA RECOMBINANTE A2

O uso do antígeno recombinante A2 no diagnóstico de leishmaniose humana e canina já foi abordado satisfatoriamente em alguns trabalhos de pesquisa. Ghedin e colaboradores (1997) detectaram anticorpos anti-A2 em até 82% e 92% dos pacientes, utilizando as técnicas de ELISA e imunoprecipitação, respectivamente, em estudo realizado em pacientes com diagnóstico confirmado para leishmaniose visceral no Sudão e na Índia. Carvalho e colaboradores (2002) por sua vez, verificaram a presença de anticorpos específicos para a proteína A2 em 87% de soros de cães que apresentavam teste IFAT anti-*Leishmania* positivo ou teste parasitológico positivo, além de não terem detectado reações cruzadas significativas à proteína em cães com outras enfermidades. Quando comparada com outros antígenos utilizados no diagnóstico da LVC, a proteína A2 demonstrou maior especificidade, além de elevada sensibilidade em cães assintomáticos (PORROZZI et al, 2007).

Em estudo publicado em 2018, Campos e colaboradores verificaram, através da técnica de ELISA, a diferença entre os perfis sorológicos de cães vacinados, cães sintomáticos com LVC e cães assintomáticos com LVC, apontando diferenças na produção de IgG específica para três

peptídeos/epitopos da proteína A2 (VQ34, PP16 e SV11), confirmando que todos os epitopos preditos são epitopos lineares de células B, amplamente reconhecidos pelo soro de cães dos grupos avaliados. Além disso, o estudo demonstrou padrões distintos de resposta de IgG total dentre os peptídeos nos grupos imunizado e LVC.

Utilizando os mesmos 3 epitopos/peptídeos da proteína A2 preditos e avaliados por Campos e colaboradores(2018), o presente estudo se propôs a avaliar a resposta sorológica de um grupo semelhante de cães, porém utilizando uma plataforma de citometria multiplex, conforme metodologia descrita adiante. Nossa intenção foi identificar, a partir de um ensaio usando uma única amostra, o status clínico, vacinal e de saúde do animal, com base no seu perfil de resposta sorológica. A longo prazo, espera-se que os dados ora obtidos possam servir de base para desenvolvimento de outros testes que, ao detectar a presença de diferentes imunoglobulinas no soro, possam indicar de forma fidedigna o status de um indivíduo em relação à leishmaniose ou outra doença infecciosa.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um modelo de teste de diagnóstico sorológico, por meio de citometria de fluxo, com base na análise do padrão de resposta imune humoral de cães de diferentes status sanitários em relação à LVC, a três epitopos conhecidos da proteína recombinante A2 e ao antígeno total de *L. infantum*, de forma que se consiga diferenciar o status sanitário dos animais testados, com base no perfil sorológico encontrado.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar e avaliar o acoplamento dos antígenos às microesferas carboxiladas;
- Definir as melhores concentrações dos antígenos acoplados às microesferas a serem utilizadas no ensaio;
- Testar e eleger a melhor concentração do conjugado e diluição dos soros e plasma para serem aplicados no ensaio;
- Realizar os ensaios CBA multiplex com os soros obtidos de diferentes grupos de cães teste.
- Avaliar os padrões de respostas obtidos em relação a cada antígeno testado em relação aos diferentes grupos de cães teste.
- Verificar as possíveis diferenças de resultados entre a utilização de soro e plasma no CBA.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DE AMOSTRAS DE SORO E PLASMA

Foram utilizadas amostras de soro obtidas através de uma colaboração com o Laboratório de Pesquisa Clínica de Dermatozoonoses em Animais Domésticos do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas – INI, oriundas de um estudo relacionado à leishmaniose visceral canina, que já obteve anteriormente o aval do comitê de ética no uso de animais (CEUA IOC L-045/2015 cães vacinados e sadios ANEXO A). As amostras clínicas de cães diagnosticados com LV foram oriundas de necrópsias realizadas pelo Centro de Controle de Zoonoses e encaminhados para a eutanásia de acordo com as recomendações do Ministério da Saúde. Não houve experimentação animal, portanto, não houve necessidade de licença, segundo orientação do Comitê de Ética em Uso de Animais do Instituto Oswaldo Cruz e a lei brasileira 11794/08 (ANEXO B). O acesso ao patrimônio genético está cadastrado e certificado no SISGEN pelos números A14F041 (Cães sadios e vacinados) eAB9C7FE (Cães infectados).

Visto que o Laboratório de Pesquisa Clínica de Dermatozoonoses em Animais Domésticos do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas – INI é o laboratório de referência para diagnóstico da LVC e para eutanásia canina, todos os soros utilizados no presente estudo já foram submetidos ao padrão ouro de diagnóstico para LVC, com a realização dos testes preconizados pelo Ministério da Saúde (DPP® LVC e ELISA EIE-LC, ambos de BioManguinhos/Brasil), além de teste Parasitológico (PCR), de forma que seu status em relação à LVC já é conhecido. Os soros foram aliquotados e estocados a -70°C. Foram formados 4 grupos, no mínimo 7 (sete) amostras de soro cada um, a saber: animais positivos para LVC sintomáticos, animais positivos para LVC assintomáticos; animais negativos para LVC; e animais negativos vacinados contra LVC. Foram utilizados como soros positivos de cães sintomáticos e assintomáticos aqueles provenientes de animais que apresentaram resultado positivo para LVC nos testes sorológicos DPP® LVC e ELISA EIE-LC, e nos testes do padrão de referência (PCR quantitativo (qPCR) e

cultura parasitológica). De forma inversa, foram considerados animais saudáveis e com sorologia negativa animais que apresentaram negatividade em todos os testes. Os dados clínicos dos cães pertencentes a cada um dos 4 grupos avaliados estão disponibilizados no anexo C.

Foram utilizadas também algumas amostras de plasma dos grupos de cães supracitados, para avaliar possíveis diferenças do soro nos resultados do ensaio. Todas as amostras de plasma utilizadas atendem aos mesmos parâmetros de diagnóstico para LVC e seguiram as mesmas condições de armazenamento descritas para os soros.

4.2 ANTÍGENO TOTAL DE *L. infantum*, PROTEÍNAS E PEPTÍDEOS

4.2.1 Antígeno total de promastigotas de *L. infantum* (LiAg)

Foram utilizadas promastigotas de fase estacionária de cultura de *L. infantum* (MHOM/BR/1974/PP75), submetidas a 10 ciclos de congelamento e descongelamento (-196°C e 37°C, respectivamente) e aplicação de ultrassom (40 Watts/15 min). Posteriormente, foi realizada a dosagem de proteínas e a preparação ajustada para 1mg/ml e estocada a -80°C até o momento de uso.

4.2.2 Peptídeos sintéticos da Proteína A2

Três peptídeos sintéticos lineares foram obtidos por predição *in silico*, a partir da sequência da proteína A2 de *L. infantum* (GenBank: GQ290460), avaliados pela técnica de ELISA em estudo anterior do grupo (CAMPOS et al, 2018) e denominados SV11 (CSAEPHKAADV), PP16 (CPQSVGPLSVGPQSVGP) e VQ34 (CVGPLSVGPQSVGPLSVGPQAVGPLSVGPQ). Os peptídeos, cujas pequenas dimensões dificultam sua ligação de forma apropriada à superfície das *beads* carboxiladas, foram sintetizados acoplados à proteína Albumina Bovina Sérica (BSA) pela sua região N terminal (Go Genone, Brasil) para permitir seu adequado acoplamento com as *beads*.

4.3. CBA

O ensaio CBA proposto foi realizado em três etapas utilizando o formato de ensaio sorológico indireto. A primeira etapa consiste no acoplamento de proteínas e antígenos às microesferas carboxiladas. Na segunda etapa, é realizada a reação sorológica, em suspensão, onde as microesferas acopladas com os antígenos do estudo foram incubadas com os soros caninos, dos grupos acima descritos, para avaliar a presença de anticorpos específicos. Esta reação é revelada com a utilização de um anticorpo anti-IgG canino ligado a um fluorocromo. A terceira etapa trata-se da citometria de fluxo, onde as amostras são adquiridas no citômetro de fluxo (Figura 4).

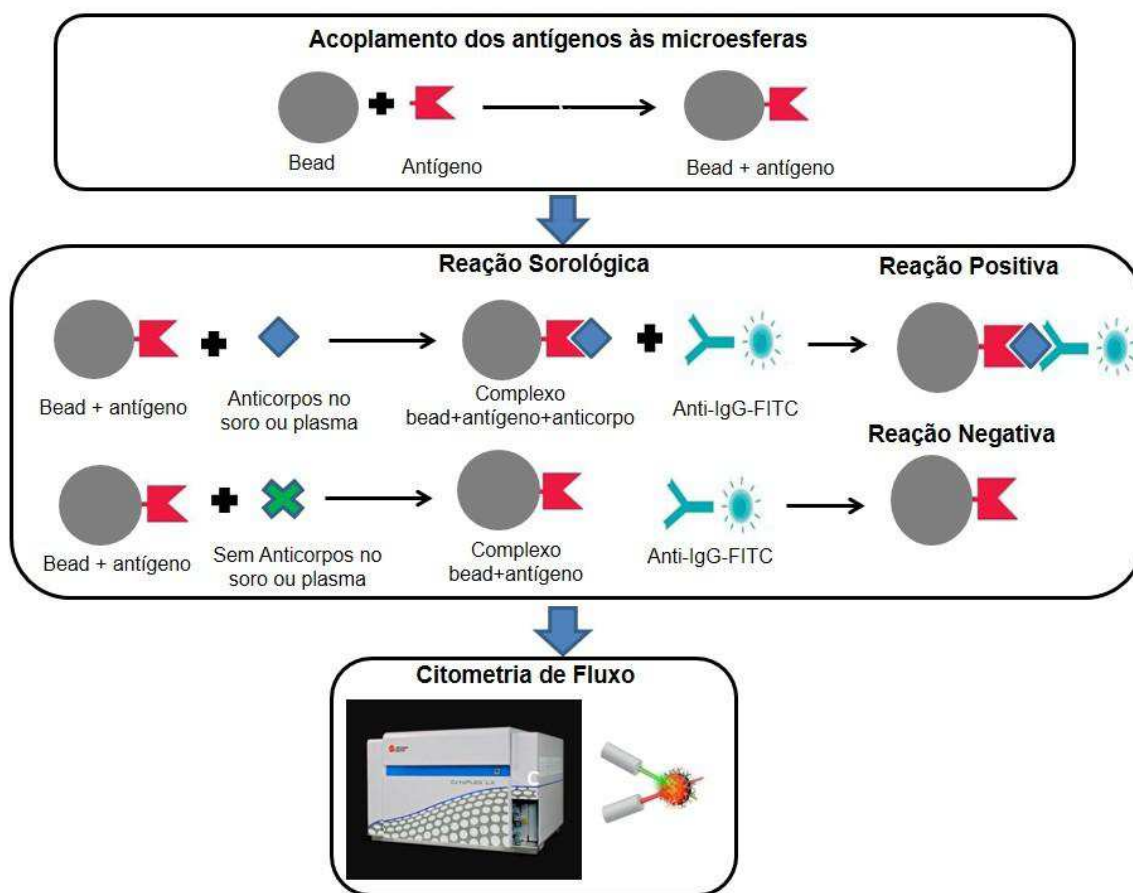


Figura 4- Etapas do ensaio de CBA proposto no estudo.

4.3.1 Acoplamento dos antígenos às microesferas

Para o acoplamento foi utilizado o kit QuantumPlex™ Carboxyl (Bangs Laboratories Inc, USA). Este kit consiste em cinco populações de microesferas carboxiladas, não magnéticas, de 5.5µm de diâmetro, cada população marcada internamente com intensidade variada do fluorocromo Starfire Red™. Desta forma, as populações bead#1, bead#2, bead#3, bead#4 e bead#5 podem ser identificadas de acordo com a intensidade de fluorescência do fluorocromo interno (Figura 5).

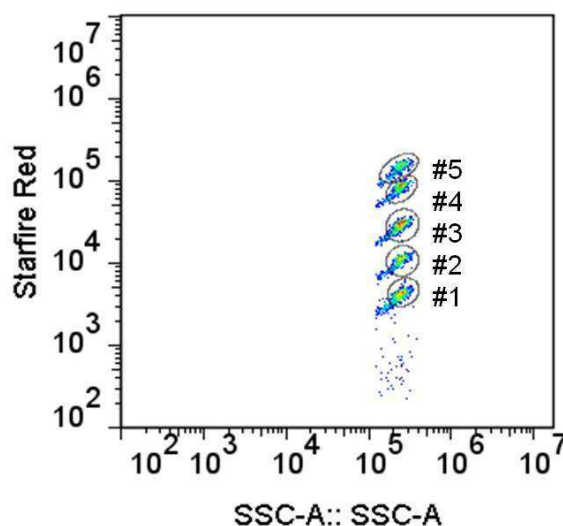


Figura 5 – Definição das cinco populações de microesferas do kit QuantumPlex™ Carboxyl. Dot plot de SSC-A (side scatter- Area) vs. Starfire Red mostrando as populações de beads #1, #2, #3, #4 e #5 de acordo com a intensidade interna de fluorescência de Starfire Red

As cinco populações de microesferas foram acopladas aos antígenos total de promastigotas de *L. infantum* (LiAg), aos peptídeos SV11 (P1), PP16 (P2) e VQ34 (P3) e a albumina sérica bovina (BSA). Cada antígeno foi acoplado a uma população de microesfera diferente. Como os peptídeos estão ligados à BSA, microesferas acopladas apenas com BSA foram utilizadas como controle da ligação específica aos peptídeos. Como controle positivo, microesferas foram acopladas à imunoglobulina G de cão purificada (IgG). Como controle negativo, foram utilizadas microesferas submetidas ao protocolo de acoplamento apenas na presença de PBS, sem adição de proteínas e peptídeos. Para se avaliar qual

a melhor concentração para o acoplamento, foram utilizadas, acopladas às beads, as concentrações de 5, 10 e 20 μ g de cada peptídeo, assim como do antígeno total de *L. infantum* (GOMES, 2016). Os controles internos BSA (Sigma- EUA) e IgG de cão purificada (BIO-RAD, EUA) foram utilizados na maior concentração (20 μ g), conforme demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1. Acoplamentos realizados para os testes de determinação da melhor concentração dos antígenos para a reação sorológica.

ACOPLAMENTO/BEAD	ANTÍGENO/CONTROLE
A1 bead#1	Sem proteína – Ctrl adsorção passiva
A2 bead#1	Albumina 20 μ g – Ctrl negativo peptídeos
A3 bead#1	IgG de cão 20 μ g – Ctrl positivo
A4 bead#2	Ag Total <i>L. infantum</i> (LiAg) 5 μ g
A5 bead#2	Ag Total <i>L. infantum</i> (LiAg) 10 μ g
A6 bead#2	Ag Total <i>L. infantum</i> (LiAg) 20 μ g
A7 bead#3	Peptídeo SV115 μ g
A8 bead#3	Peptídeo SV1110 μ g
A9 bead#3	Peptídeo SV1120 μ g
A10 bead#4	Peptídeo PP165 μ g
A11 bead#4	Peptídeo PP1610 μ g
A12 bead#4	Peptídeo PP1620 μ g
A13 bead#5	Peptídeo VQ345 μ g
A14 bead#5	Peptídeo VQ3410 μ g
A15 bead#5	Peptídeo VQ3420 μ g

Os acoplamentos dos antígenos às microesferas foram realizados utilizando-se o kit *Polylink protein Coupling Kit* (Bangs Laboratories Inc.) seguindo-se o protocolo fornecido pelo fabricante

As microesferas foram agitadas no vórtex por 15 segundos, sonicadas por 20 segundos e misturadas, novamente, no vórtex por 15 segundos, para a máxima dissolução de grumos. A seguir, foram transferidos 25 μ L da suspensão de microesferas para microtubos de 2 mL, adicionando-se 300 μ L de tampão de acoplamento (TA), seguido de homogeneização com pipeta e centrifugação a

1000G por 10 minutos. As microesferas foram então lavadas com 400 µL de TA, a 1000G por 10 minutos, o sobrenadante aspirado e as microesferas ativadas através da incubação por 15 minutos, em temperatura ambiente, com 170 µL de TA e 20 µL da solução de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDAC). Após este período, foram adicionados 100 µL das concentrações escolhidas de proteínas e peptídeos aos tubos contendo as populações de microesferas ativadas (beads#1, #2, #3, #4 e #5) conforme especificado na Tabela 1. Após 2 horas de incubação, em agitador gangorra, na temperatura ambiente, as microesferas foram centrifugadas a 1000 G por 10 minutos, o sobrenadante aspirado, seguindo-se uma nova lavagem com 400µL de tampão de lavagem e estocagem (TLE). Após homogeneização em vórtex, as microesferas foram centrifugadas a 1000 G por 10 minutos e, por fim, ressuspensas em 400 µL de TLE. A concentração foi ajustada para 2×10^6 beads/mL, através de contagem em contador de células automático (TC20™ BIO-RAD) e as microesferas aliqüotadas e armazenadas em tubos *low binding*, a temperatura de 4-8°C (Figura 6).

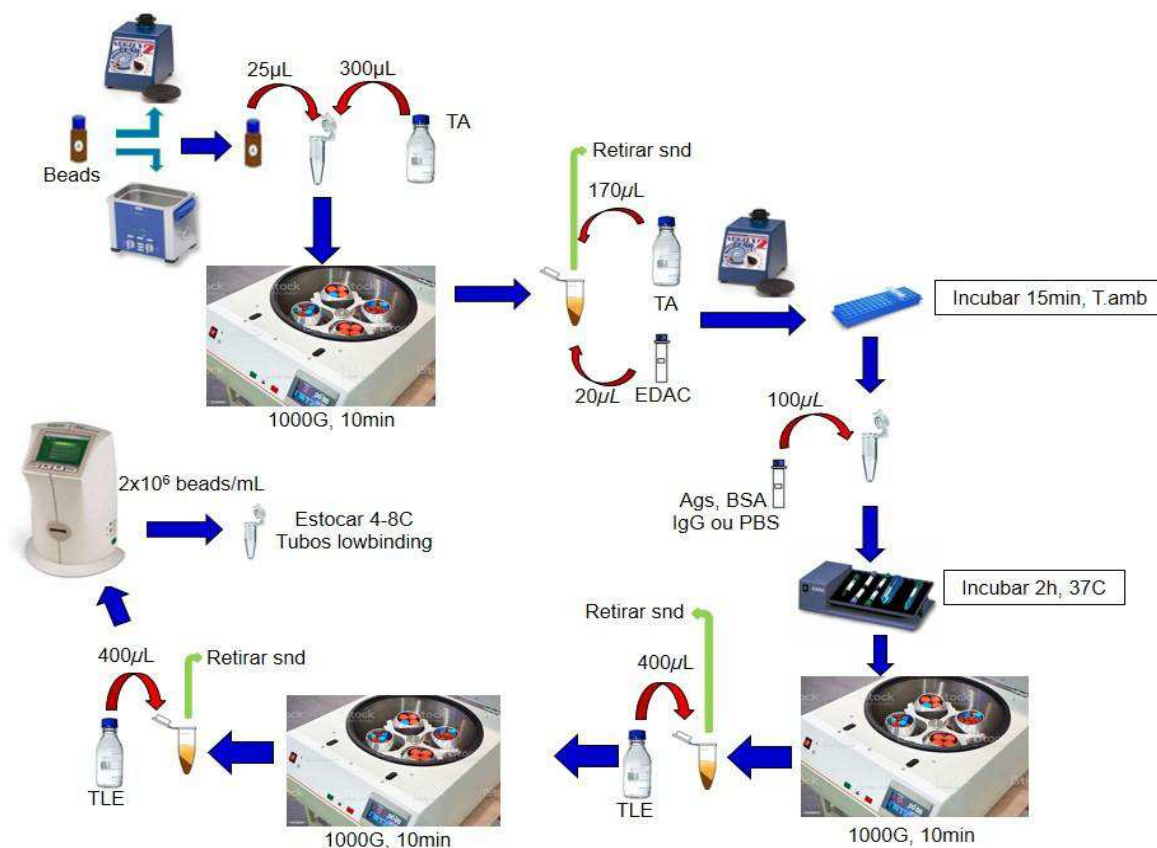


Figura 6- Esquema das etapas realizadas no acoplamento dos antígenos (LIAg, SV11, PP16 e SV34), IgG e BSA as microesferas (beads) carboxiladas. (Snd: sobrenadante. TA: Tampão de Acoplamento. TLE: Tampão de lavagem e estocagem)

4.3.2 Reação sorológica

A partir das soluções estoque, foram adicionados, em cada tubo, 5 µL da suspensão de microesferas acopladas (10.000 microesferas/ tubo) diluídas em 95 µL de tampão fosfato (PBS) com Tween 20 0,02%, BSA 1% e azida sódica 0,05% [PBS+Tween+BSA+NaAz (PBS*)]. Em seguida, foram adicionados 100 µL das amostras (soros caninos dos grupos S, A, N e V), na diluição especificada, ou PBS* (tubos controles). Após a incubação com os soros por 15 minutos, em agitador gangorra, a 37°C, foram adicionados 400 µL de PBS* em cada tubo, seguido de centrifugação a 1000G por 10'. Após a retirada do sobrenadante, foram adicionados 100 µL do conjugado anti-imunoglobulina G de cão ligada ao isotiocianato de fluoresceína (anti-IgG-FITC) (BIO-RAD, EUA), na diluição escolhida, ou PBS* (tubos controle sem conjugado), seguido de

incubação por 15 minutos, em agitador gangorra, a 37°C. Após a incubação, os tubos foram lavados com 400 µL de PBS a 1000G por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e as microesferas ressuspensas em 100 µL de PBS puro para avaliação imediata no citômetro de fluxo (Figura 7).

Em um primeiro momento, para a avaliação do acoplamento e definição da melhor concentração de antígenos acoplados às beads, foram utilizados soros em uma diluição final de 1:800, seguindo protocolo já testado anteriormente em outra dissertação do grupo (dados não publicados), e o conjugado na diluição final de 1:400. Posteriormente, avaliando-se os resultados iniciais verificados nos testes do acoplamento, foram realizados ensaios para verificação de melhor diluição de soro entre 1:800, 1:1.600 e 1:3.200, e também para a avaliação da melhor diluição do conjugado anti-IgG-FITC, testando-se as diluições 1:400, 1:800 e 1: 1600.

Após a padronização e a eleição das melhores concentrações/ diluições dos reagentes do ensaio, foi feita a avaliação do CBA nos soros dos animais de todos os grupos descritos no item 3.1.

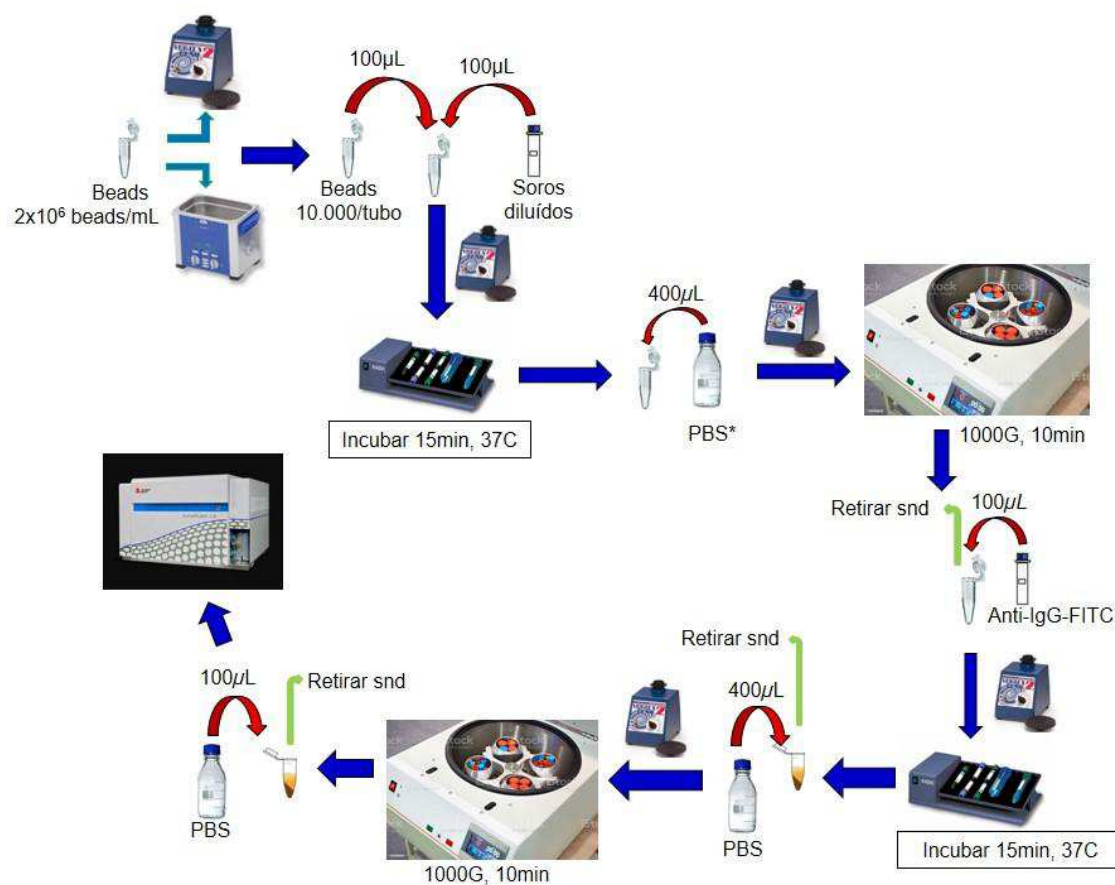


Figura 7- Esquema das reações sorológicas realizadas com as beads acopladas a cada antígeno (LIAg, SV11, PP16 e SV34), IgG e BSA, individualmente, na presença de amostras de soro canino provenientes de cães positivos para LVC sintomáticos e positivos para LVC assintomáticos, animais sadios, negativos para LVC, e animais sadios vacinados contra LVC. (Snd: sobrenadante. TA: Tampão de Acoplamento. TLE: Tampão de lavagem e estocagem)

4.3.3 Citometria de Fluxo

A citometria de fluxo foi realizada utilizando o citômetro de fluxo CytoFLEX de 12 cores equipado com 4 lasers de 405nm, 488nm, 565nm e 638nm (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) da plataforma multiusuário de Citometria de Fluxo do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ. O fluorocromo FITC foi avaliado no filtro 525/40BP e Starfire Red™ no filtro 690/50 BP, ambos no laser azul 488nm.

O protocolo de aquisição foi realizado utilizando o programa CytExpert (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). A aquisição foi baseada nos mesmos parâmetros da análise (protocolo detalhado a seguir). Foram adquiridos 2.000

eventos no *gate* de beads nas aquisições com apenas uma população de microesferas, e 5.000 eventos nos ensaios multiplex.

As análises foram realizadas através do software FlowJo 7.8.1 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA.). As avaliações se basearam no *dot plot* de SSC-H (Side Scatter- Height) vs. SSC-A (Side Scatter- Area) para exclusão de doublets. A partir do *gate* singlets, foi feito o *dot plot* de FSC-A vs. SSC-A, onde foi definido o *gate* beads. A partir deste ponto, dois tipos de análise foram realizados: quando apenas uma população de beads foi usada por tubo, procedemos à avaliação da marcação através dos histogramas de fluorescência de FITC, comparando as intensidades médias de fluorescência (MFI - dada pela mediana do deslocamento dos picos de intensidade de fluorescência de cada amostra) e o percentual de marcação entre os soros positivos e negativos assim como os controles (Figura 8).

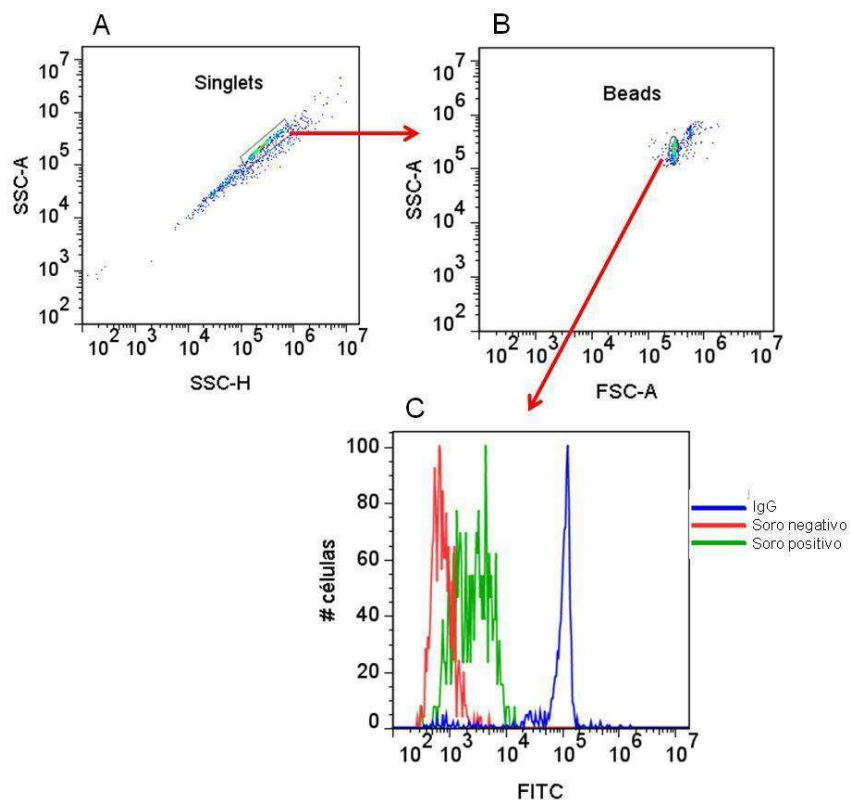


Figura 8 – Representação do protocolo citofluorimétrico simples. A: *Dot plot* para exclusão de *doublets* através dos parâmetros SSC-H (Side Scatter- Height) vs. SSC-A (Side Scatter- Area) com o *gate* “Singlets”. B: Definição da população de beads, a partir do *gate* “Singlets”, através do *dot plot* de FSC-A (Forward Scatter- Area) vs. SSC-A. C: Overlay dos histogramas de marcação para FITC nos tubos de IgG (azul), soro negativo (vermelho) e soro positivo (verde).

Quando foi feito o ensaio multiplex, a partir do *gate* de beads, avaliou-se o percentual e as intensidades médias de fluorescência dos soros e controles através de *dot plots* de FITC vs. Starfire Red, conforme a metodologia original de CBA (Figura 9).

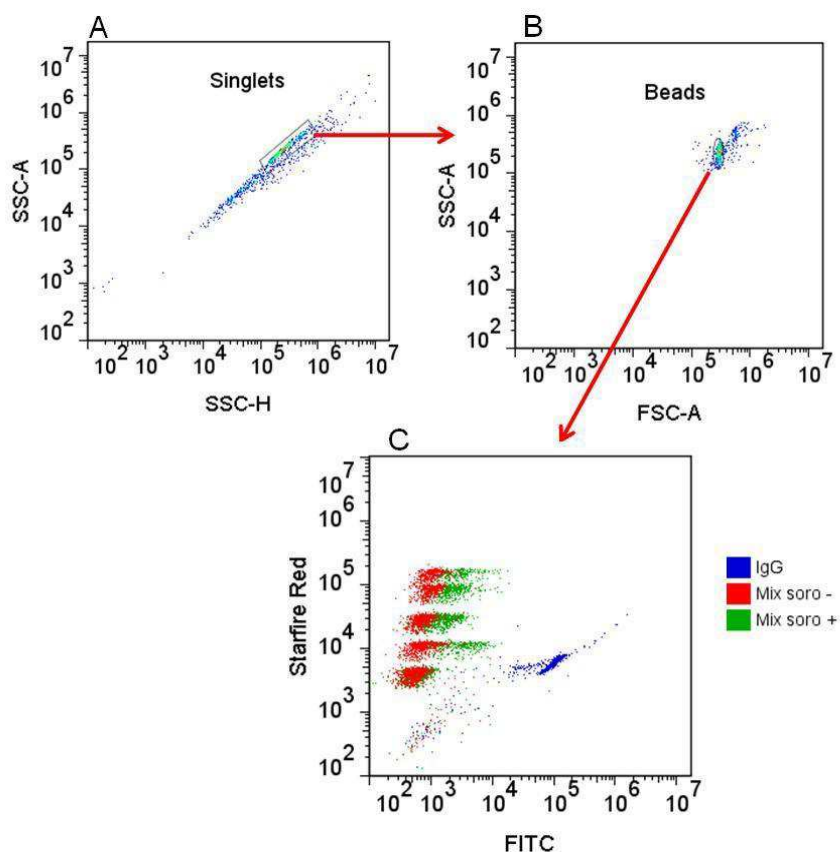


Figura 9 – Representação do protocolo citofluorimétrico multiplex. A: *Dot plot* para exclusão de *doublets* através dos parâmetros SSC-H (Side Scatter- Height) vs. SSC-A (Side Scatter- Area) com o *gate* “Singlets”. B: Definição da população de beads, a partir do *gate* “Singlets”, através do *dot plot* de FSC-A (Forward Scatter- Area) vs. SSC-A. C: *Dot plot* de FITC (eixo X) vs. Starfire Red (eixo Y), para as cinco populações de microesferas, em relação à marcação de IgG (azul), soro negativo (soro -, vermelho) e soro positivo (soro +, verde).

Em relação aos dados numéricos, foram avaliadas as medianas das intensidades médias de fluorescência obtidas na marcação do conjugado anti-IgG-FITC para cada grupo de bead avaliada.

4.4 ETAPAS DO ESTUDO

O desenvolvimento do ensaio multiplex proposto no presente estudo compreendeu quatro etapas de experimentos e foi realizado conforme exposto no fluxograma abaixo (Figura 10).



Figura 10 - Fluxograma proposto para o desenvolvimento de um ensaio CBA multiplex para diagnóstico da LVC, com as etapas da realização dos ensaios.

As etapas em lide foram assim realizadas:

4.4.1 Avaliação do acoplamento e escolha da concentração de antígenos acoplados às beads.

Para avaliar se o acoplamento foi realizado adequadamente, foram feitos três ensaios testando as 3 concentrações de cada antígeno acoplado às beads. Realizou-se a reação sorológica descrita no item 4.3.2 utilizando-se amostras de soro de cães portadores de LVC, com sorologia positiva nos testes diagnósticos padrão para LVC, e soros de cães saudáveis, não provenientes de área endêmica, com testes padrão para diagnóstico de LVC negativos, conforme especificado na Tabela 1. Ao fim desta etapa também foi possível escolher as concentrações de

antígenos acoplados a serem utilizadas no ensaio com todos os grupos de cães propostos.

4.4.2 Definição da diluição do conjugado

Para verificar e eleger as melhores diluições de conjugado a serem utilizados no CBA com os grupos teste de cães, foram realizados três ensaios aplicando-se a reação sorológica descrita no item 4.3.2, utilizando-se amostras de soro de cães portadores de LVC, com sorologia positiva nos testes diagnósticos padrão para LVC. Considerando os resultados obtidos na avaliação dos acoplamentos do experimento anterior, nesta etapa foram utilizadas as suspensão de beads acopladas nas seguintes concentrações: 10 µg para LiAg, 20 µg para SV11 e PP16; 5 µg para VQ34, além dos controles de acoplamento (beads sem proteínas acopladas e beads acopladas a IgG 20µg). Os soros foram avaliados nas diluições de 1:800 e 1:1.600 e o conjugado anti-IgG de cão FITC testados nas diluições de 1:400, 1:800 e 1:1.600.

4.4.3 Definição da diluição de soro e plasma

Em relação à avaliação das concentrações das amostras a serem testadas no CBA, foi realizado um total de cinco ensaios aplicando-se a reação sorológica descrita no item 4.3.2, utilizando-se amostras de soro de cães positivos e negativos para LVC, e as concentrações de 10µg de LiAg, 20 µg de SV11 e PP16; e 5µg de VQ34, além dos controles de acoplamento (beads sem proteínas acopladas e beads acopladas a IgG 20µg). Nesta etapa os soros/plasma negativos para LVC foram avaliados na diluição de 1:1.600 e os soros/plasma positivos nas diluições de 1:1.600 e 1:3.200.

4.4.4 Ensaios CBA multiplex com os grupos de cães.

Eleitas as concentrações mais adequadas de antígenos, e diluições de conjugado e soro do ensaio, a etapa seguinte foi a realização do CBA com as amostras dos quatro grupos teste de cães: sadios; sadios vacinados; positivos para LVC assintomáticos e positivos para LVC sintomáticos. Para avaliar o perfil sorológico destes animais, as amostras de soro de cada um dos quatro grupos (Tabela 2) do estudo foram testadas aplicando-se a reação sorológica descrita

no item 4.3.2, aplicando-se as concentrações dos reagentes descritas na Tabela 3.

Com a disponibilidade de amostras de plasma de alguns indivíduos dos grupos teste, e seguindo os mesmos protocolos de ensaio supracitados, foi possível comparar os resultados entre a utilização de soro e plasma no CBA.

Tabela 2. Identificação de todos os cães cujas amostras foram analisadas no estudo, separadas pelos grupos teste: Cães Sadios, Cães Sadios Vacinados, Cães Positivos (para LVC) Sintomáticos e Cães Positivos (para LVC) Assintomáticos.

Cães Sadios	Cães Sadios Vacinados	Cães Positivos Sintomáticos	Cães Positivos Assintomáticos
C1	C1	02/13	03/13
C2	C2	02/14	15/14
C3	C3	04/14	43/15
C4	C4	05/14	52/15
C5	C5	09/14	114/17
C6	C6	23/14	178
C7	C7	25/14	183
C8	C8	26/14	
C9	C9	197/21	
C22	C57	162	
C57	C58	182	
C60	C59	187	
	C60		

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas pelo programa Prism versão 7 (GraphPad Software®, Califórnia, EUA). A normalidade da distribuição das variáveis foi avaliada com os testes de Shapiro-Wilk. Como os dados foram considerados não-paramétricos utilizamos o teste U de Mann Whitney para comparações entre os grupos e, para comparação dos resultados obtidos com cada antígeno, dentro de um mesmo grupo (amostras pareadas) foi utilizado o teste de Wilcoxon. Diferenças com valores de p menores que 0,05 ($p < 0,05$) foram consideradas significativas, com intervalo de confiança de 95%.

5 RESULTADOS

5.1 AVALIAÇÃO DO ACOPLAMENTO

O sucesso do acoplamento e a avaliação da melhor concentração de proteínas acopladas às beads foram confirmados após as análises no citômetro de fluxo, seguindo protocolo descrito no item 4.3.3.

Nos experimentos realizados, foi possível verificar que o controle positivo interno, utilizando beads acopladas a IgG total de cão funcionou de maneira satisfatória, com um pico de marcação homogêneo e bem afastado do controle negativo (beads sem antígenos incubadas com soro + e conjugado) (Figura 11). Como, para possibilitar a ligação com as beads, os peptídeos foram sintetizados ligados pela sua porção N terminal a uma molécula de BSA, utilizou-se um outro controle interno com beads acopladas à BSA e incubadas com soro positivo para LVC e soro negativo. Conforme demonstrado na figura 11, nestes experimentos as beads acopladas à BSA e incubadas com soro negativo não demonstraram marcação com o conjugado, com um pico sobreposto ao observado com o controle negativo. Por outro lado, um pequeno deslocamento no pico de fluorescência foi observado quando foi utilizado um soro positivo para LVC.

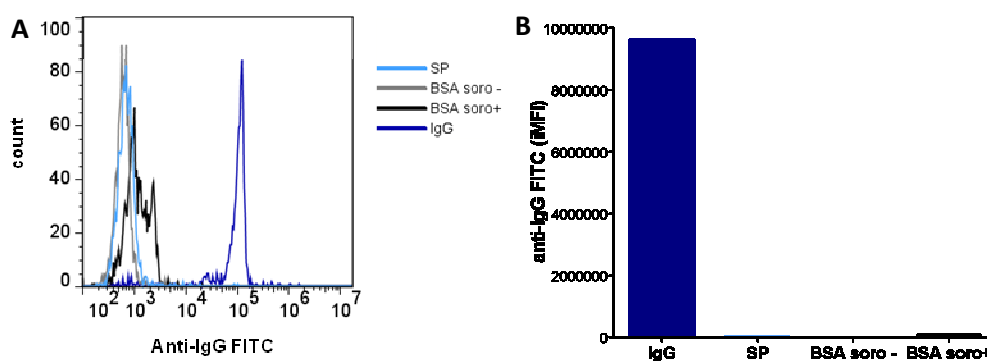


Figura 11 - Histograma com intensidade de fluorescência dos controles internos do experimento. **A** - Histogramas demonstrativos das intensidades de fluorescência obtidas após a incubação das beads acopladas BSA (linha preta), IgG total de cão (linha azul escuro) e sem antígeno acoplado (linha azul clara) com soro positivo de obtido de 1 cão com LVC sintomática, e beads acopladas a BSA incubadas com soro negativo, obtido de 1 cão sadio (linha cinza). Soros utilizados na diluição final de 1:800 e conjugado anti-IgG de cão FITC na diluição de 1:400. **B** – resultados das intensidades médias de fluorescência (MFI) das mesmas amostras representadas nos histogramas (A).

5.2 DEFINIÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE PROTEÍNAS ACOPLADAS ÀS MICROESFERAS

Em relação à utilização das beads acopladas ao antígeno total de *L. infantum*, e aos peptídeos SV11, PP16 e VQ34, também foi possível observar marcação positiva após a incubação com o soro positivo para LVC, nas beads acopladas a todos os quatro antígenos avaliados, em todas as concentrações testadas, porém com diferentes intensidades (Figura 12). Em relação ao antígeno total LiAg, foi observada uma semelhança na intensidade de marcação nas beads acopladas com 5, 10 e 20 μ g do antígeno, sendo menor a marcação utilizando-se as beads do acoplamento de 5 μ g. No que se refere aos antígenos, SV11 e PP16, foi possível observar uma marcação maior nas beads conjugadas com a concentração mais elevada de antígeno (20 μ g), sendo a menor intensidade de fluorescência observada na concentração de 5 μ g, com resultado semelhante ao obtido com o soro negativo para LVC com o antígeno SV11. Em LiAg, SV11 e PP16, houve portanto uma tendência a aumento da intensidade da marcação com o aumento da concentração de antígenos acoplados. Uma relação inversa foi observada com o peptídeo VQ34, que apresentou melhor marcação quando utilizamos beads acopladas à concentração menor desse peptídeo (5 μ g).

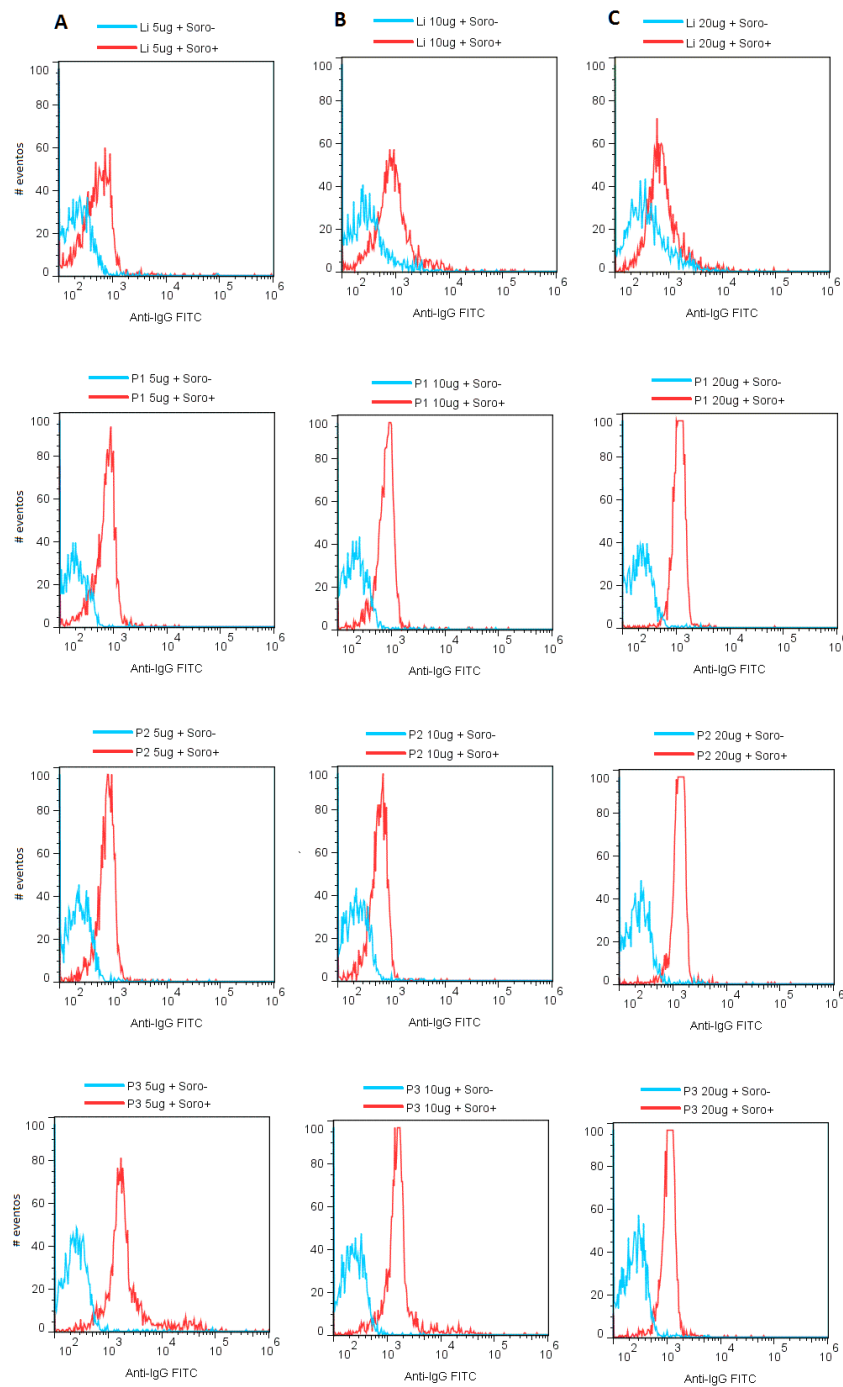


Figura 12 - Histogramas demonstrativos intensidades médias de fluorescência obtidas após a incubação das beads acopladas ao antígeno total de promastigotas de *L. infantum* (LiAg) e aos peptídeos da proteínas A2 (SV11, PP16 e VQ34) em três diferentes concentrações: 5 μ g (A), 10 μ g (B) e 20 μ g (C), na presença de soro positivo obtido de cão com LVC sintomática (linha vermelha) ou com soro negativo, obtido cão sadio (linha azul). Soros utilizados na diluição final de 1:800 e conjugado anti-IgG de cão FITC na diluição de 1:400.

Quando esses resultados são avaliados utilizando o cálculo da média das intensidades médias de fluorescência (MFI) dos soros testados, obtêm-se os resultados demonstrados na Figura 13. A marcação com LiAg foi semelhante entre as três concentrações avaliadas. Dentre os peptídeos, conforme já descrito, as maiores MFI foram observadas na concentração de 20 μ g, e a menor com a concentração de 5 μ g para SV11 e PP16. O antígeno SV11 apresentou as menores MFI de todos os 4 antígenos testados, nas 3 concentrações. A relação inversa entre a concentração de antígeno e a MFI fica bem clara para o peptídeo VQ34, que atinge a maior MFI na concentração de 5 μ g, sendo semelhante àquela observada com o peptídeo PP16 na concentração de 20 μ g (Figura 13).

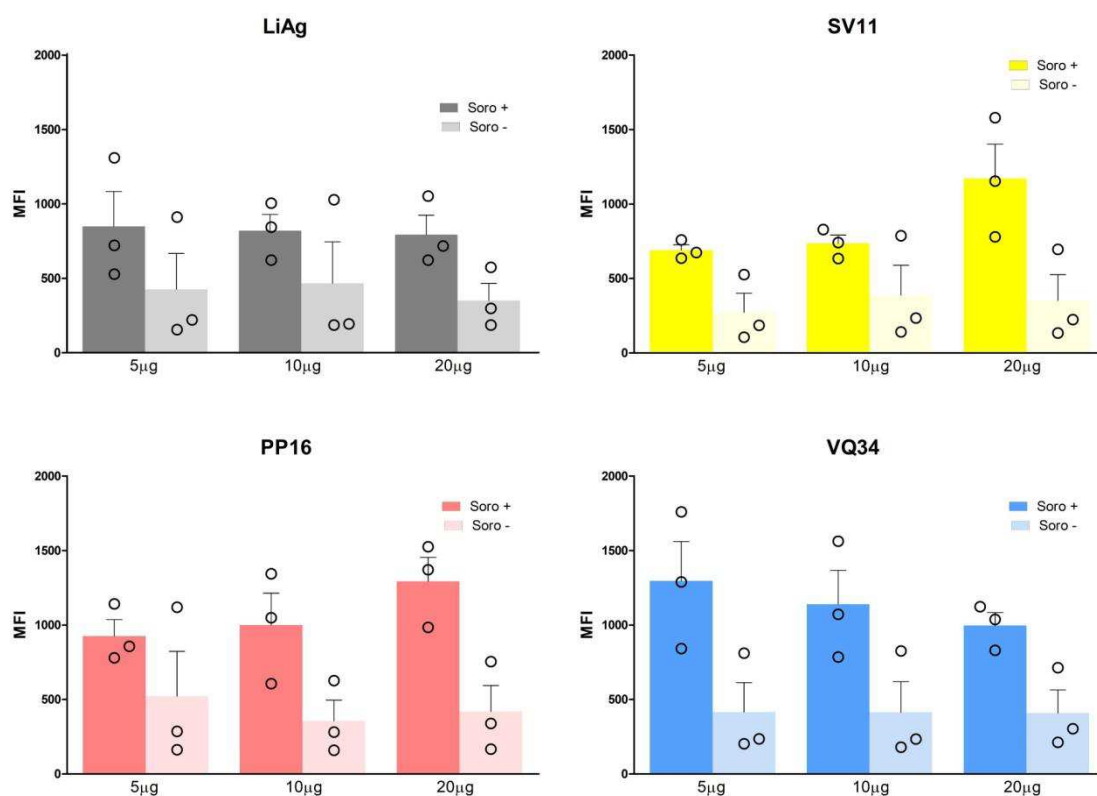


Figura 13 - Resultados comparativos das intensidades médias de fluorescência (MFI) obtidas após a incubação das beads acopladas ao antígeno total de promastigotas de *L. infantum* (LiAg – barra cinza) e aos peptídeos da proteínas A2 (SV11 – barra amarela, PP16 – barra rosa e VQ34 – barra azul) em três diferentes concentrações (20 μ g, 10 μ g e 5 μ g de antígeno), na presença de 3 soros positivos, obtidos de cães com LVC sintomática e de 3 soros negativos, obtidos de cães controle saudáveis, na diluição final de 1:800. O conjugado anti-IgG de cão FITC foi utilizado na diluição de 1:400. As barras demonstram as médias das MFI \pm Erro Padrão.

5.3 DILUIÇÃO DO CONJUGADO

Após a eleição das melhores concentrações de antígenos acoplados às beads, passou-se a avaliar as concentrações de conjugado do ensaio, tendo sido testadas as diluições de 1:400, 1:800 e 1:1.600. Observamos um maior deslocamento à direita no pico de intensidade de fluorescência conforme se aumentou a concentração de conjugado, nas reações com o controle positivo de beads acopladas a IgG. Ao mesmo tempo, conforme o esperado, não se percebeu alteração na intensidade de fluorescência nas beads sem acoplamento de proteínas, que permaneceu baixa e revelando picos de fluorescência sobrepostos nas três diluições de conjugado testadas (Figura 14).

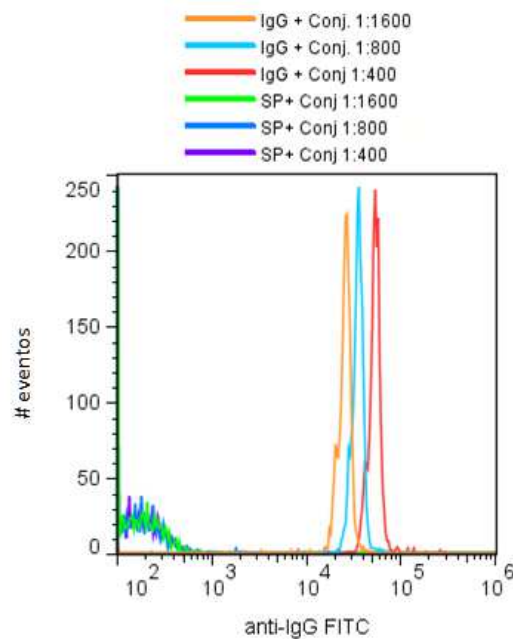


Figura 14 -Histogramas demonstrativos das intensidades de fluorescência obtidas após a incubação das beads sem acoplamento de antígenos (SP) e beads acopladas a IgG, usadas como controles dos ensaios, na presença de conjugado nas diluições de 1:400; 1:800 e 1:1600.

Em relação às reações com soros de cães positivos para LVC foi possível detectar satisfatoriamente a marcação com FITC nas beads acopladas a todos os antígenos com as três concentrações de conjugado testadas. Seguindo o mesmo perfil observado para a bead controle positivo IgG, foi evidenciada maior

intensidade média de fluorescência nos tubos onde o conjugado foi utilizado na diluição de 1:400 (Figura 15).

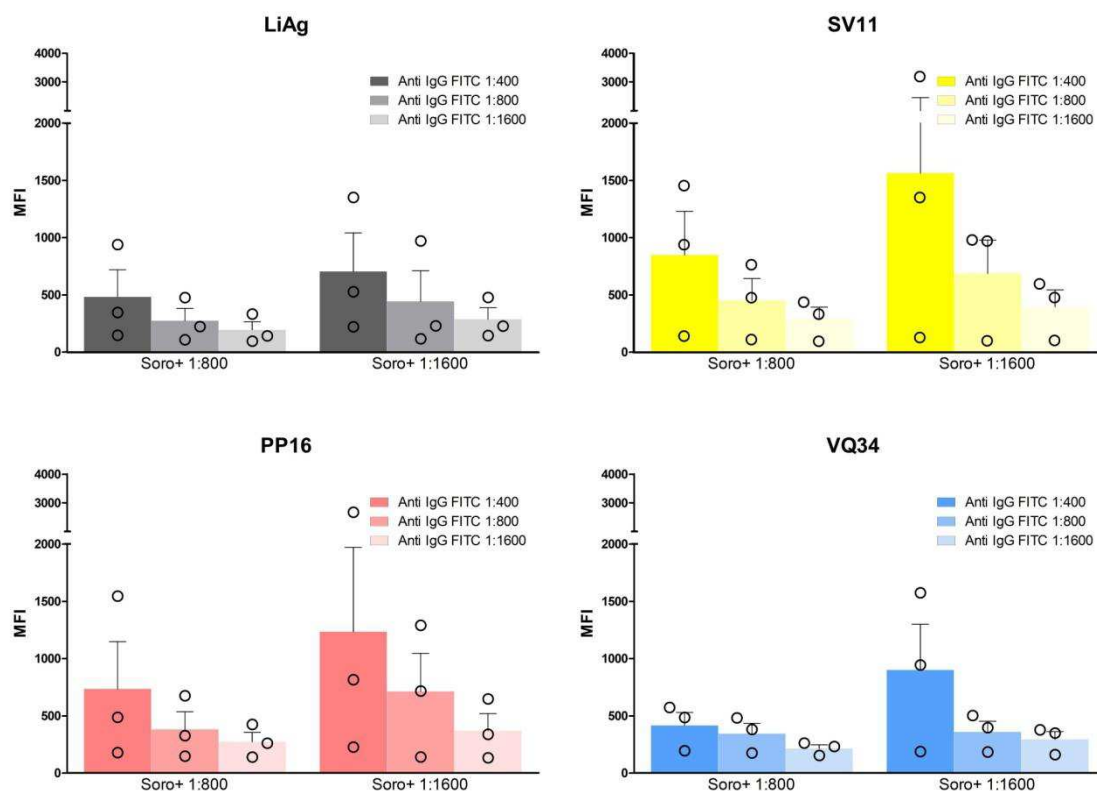


Figura 15 - Resultados comparativos das intensidades médias de fluorescência (MFI) obtidas após a incubação das beads acopladas ao antígeno total de promastigotas de *L. infantum* (LiAg – barra cinza) e aos peptídeos da proteínas A2 (SV11 – barra amarela, PP16 – barra rosa e VQ34 – barra azul) na presença de soro positivo obtido de 3 cães com LVC sintomática nas diluições de 1:800 e 1:1:600 e conjugado anti-IgG de cão FITC nas diluições de 1:400, 1:800 e 1:1.600. As barras demonstram as médias das MFI \pm Erro Padrão.

Ainda que com diferença mais discreta entre as diluições do que o percebido no histograma de IgG (Figura 14), a titulação de conjugado 1:400 apresentou maior deslocamento à direita dos picos de fluorescência em todos os antígenos na presença de soro positivo, sendo este deslocamento mais evidente no caso do SV11, conforme verificado nos histogramas abaixo (Figura 16). Considerando que um maior deslocamento à direita em tese permite a diferenciação mais evidente das amostras negativas, que por sua vez induzem

deslocamento mais à esquerda dos picos de fluorescência, a diluição de 1:400 foi eleita para ser utilizada nos ensaios com os grupos teste.

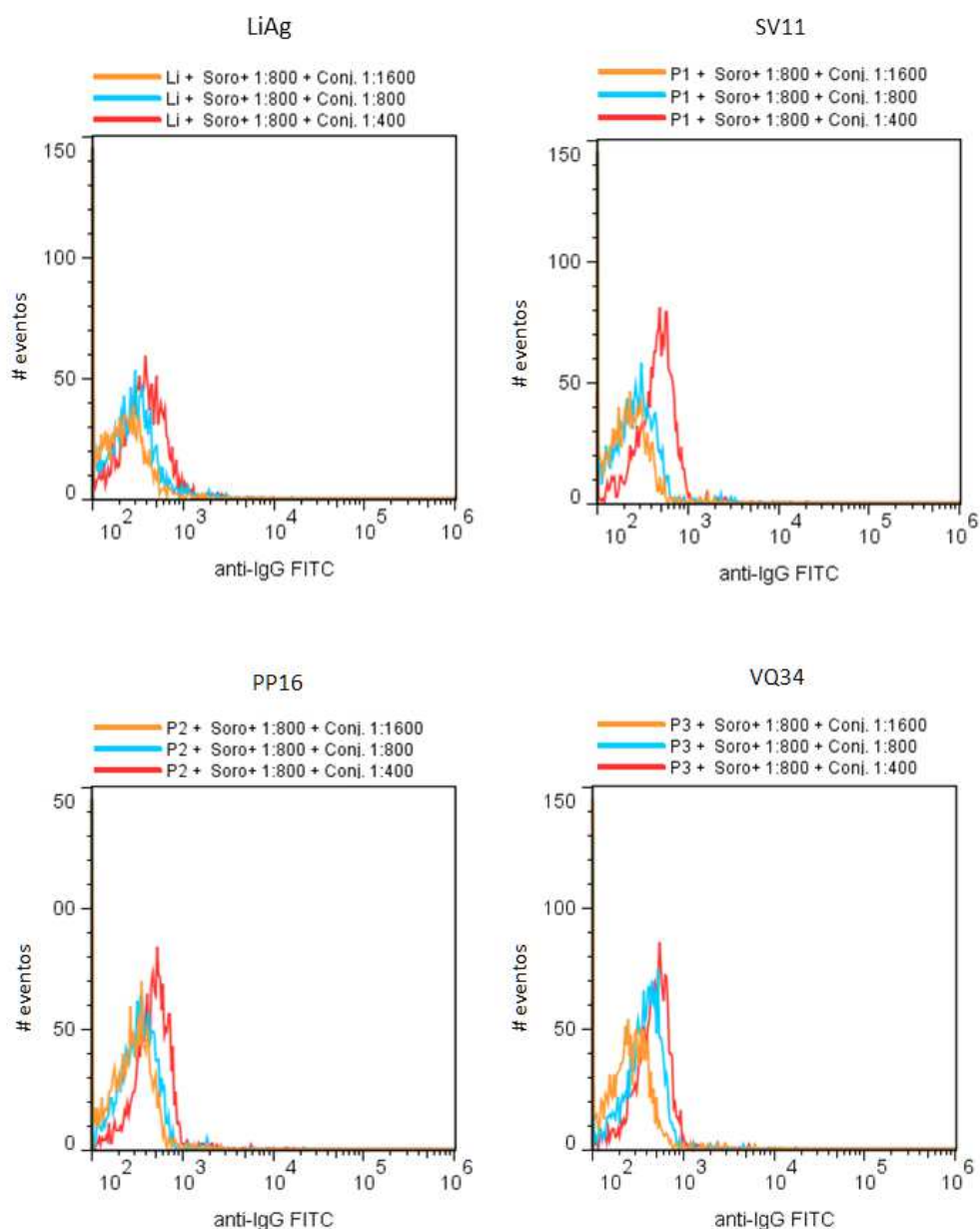


Figura 16 - Histogramas demonstrativos das intensidades de fluorescência obtidas após a incubação das beads acopladas ao antígeno total de promastigotas de *L. infantum* (LiAg) e aos peptídeos da proteína A2 (SV11, PP16 e VQ34) em três diferentes diluições de conjugado: 1:1600 (linha laranja); 1:800 (Linha azul) e 1:400 (linha vermelha), na presença de soro positivo obtido de cão com LVC sintomático na concentração de 1:800. Foram utilizadas as microesferas acopladas nas concentrações de 10 μ g para LiAg, 20 μ g para SV11 e PP16, e 5 μ g para VQ34.

5.4 DILUIÇÕES DE SORO

Ao comparar as diferentes concentrações de soro apresentadas na Figura 13, pode-se constatar que o uso da diluição de 1:1600 foi notadamente mais eficaz em relação a diluição de 1:800 para evidenciar a marcação de fluorescência em todos os quatro antígenos .

Considerando este resultado, para verificar se os soros ainda mais diluídos permitiriam melhor leitura dos resultados do CBA, foram feitos ensaios comparando as diluições de soro 1:1600 e 1:3200. Neste caso foi possível evidenciar a diferença de marcação entre soros negativos para LVC diluído em 1:1600 e soros positivos nas diluições de 1:1600 e 1:3200, com maior deslocamento à direita dos picos de fluorescência para todos os antígenos testados nestas duas diluições de soro positivo (Figura 17). Neste caso também foi possível verificar picos de fluorescência sobrepostos no caso de LiAg e SV11 nos soros positivos com diluições diferentes, mas ficou evidente a maior intensidade de marcação nos casos do peptídeo PP16 e VQ34, em se utilizando o soro mais diluído (1:3200).

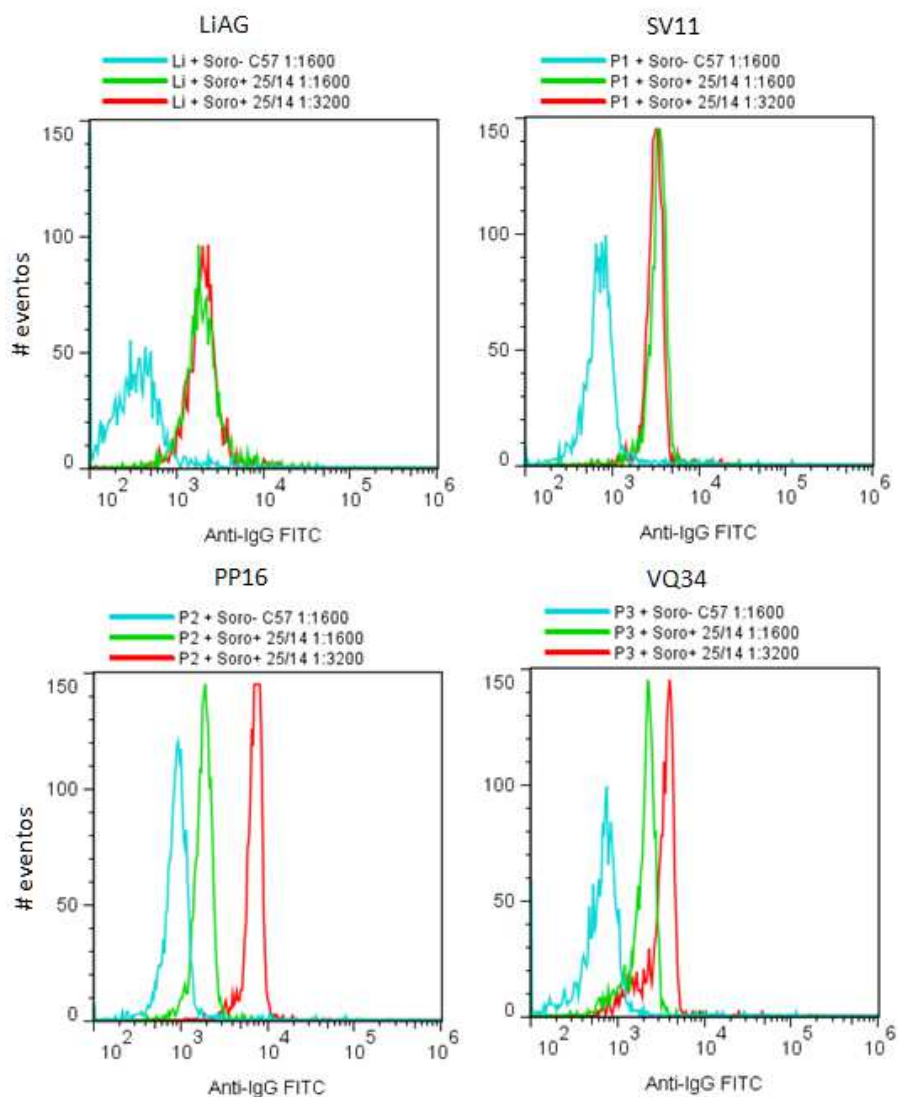


Figura 17 - Histogramas demonstrativos das intensidades de fluorescência obtidas após a incubação das beads acopladas ao antígeno total de promastigotas de *L. infantum* (LiAg) e aos peptídeos da proteínas A2 (SV11, PP16 e VQ34), em reações utilizando soro de cão negativo para LVC em diluição 1:600 (linha azul), soro de cão positivo na diluição 1:1600 (linha verde) e na diluição 1:3200 (linha vermelha). O conjugado anti-IgG de cão FITC foi utilizado na diluição de 1:400

Considerando que foi detectada pouca ou nenhuma diferença entre as concentrações de soro avaliadas nas reações com os peptídeos Li e SV11, mas que nos casos de PP16 e VQ34 (Figuras 17 e 18), ficou evidente a melhor marcação quando utilizada a diluição de 1:3200, esta foi titulação das amostras de soro eleita para a utilização no ensaio com os grupos teste de cães.

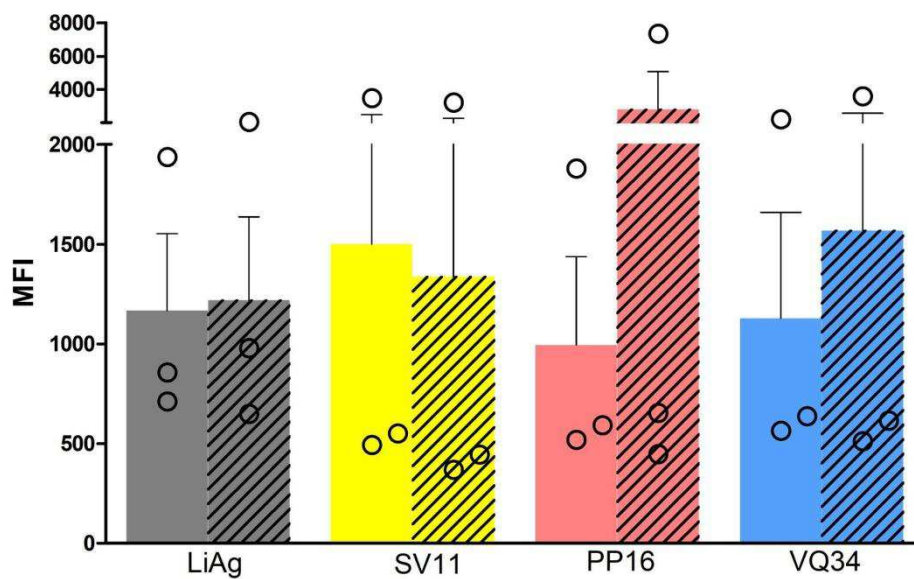


Figura 18 - Resultados comparativos das intensidades médias de fluorescência (MFI) obtidas após a incubação das beads acopladas ao antígeno total de promastigotas de *L. infantum* (LiAg – barra cinza) e aos peptídeos da proteínas A2 (SV11 – barra amarela, PP16 – barra rosa e VQ34 – barra azul) na presença de soro positivo obtido de 3 cães com LVC sintomática nas diluições de 1:1.600 (barras lisas) 1:3.200 (barras hachuradas) e conjugado anti-IgG de cão FITC na diluição de 1:400. As barras demonstram as médias das MFI \pm Erro Padrão.

Ao fim desta etapa, foram estipuladas portanto todas as concentrações/diluições dos componentes do CBA proposto neste estudo, a serem utilizadas nos ensaios com os grupos teste de animais, conforme descrito na Tabela 3.

Tabela 3. Identificação dos componentes e respectivas concentrações e quantidades estipuladas para o ensaio multiplex por citometria de fluxo para diagnóstico de LVC.

Componentes	Identificação	Concentração ou Diluição	Quantidade/reação
Controle	Bead s/ acoplamento	-	10.000 beads
Controle	Bead+BSA	20µg	10.000 beads
Controle	Beads +IgG de cão	20 µg	10.000 beads
Antígeno	LiAg	10 µg	10.000 beads
Antígeno	SV11	20µg	10.000 beads
Antígeno	PP16	20 µg	10.000 beads
Antígeno	VQ34	5 µg	10.000 beads
Conjugado	Anti IgG-FITC	1:400	100µL
Amostra	Soro canino	1:3200	100µL

5.5 ENSAIOS MULTIPLEX COM GRUPOS DE CÃES

Utilizando as concentrações/diluições e quantidades dos componentes descritos escolhidos nas etapas anteriores (Tabela 3), realizaram-se os ensaios CBA com os grupos teste de cães com diferentes situações em relação à LVC. Embora tenham sido testadas amostras de todos os cães enumerados na Tabela 2, os dados demonstrados a seguir foram obtidos a partir das amostras dos cães elencados na Tabela 4 (abaixo).

Alguns dados foram descartados em função de sinais de contaminação verificados em amostras, que foram em grande parte associados a resultados discrepantes em relação a outros de um mesmo grupo de animais. Uma vez que reações cruzadas com outros agentes biológicos são sabidamente uma das grandes fontes de erro no diagnóstico sorológico de LVC, presume-se que não há sentido em utilizar os dados obtidos das amostras com sinais de contaminação.

Tabela 4. Identificação dos cães separados pelos grupos teste: Cães Sadios, Cães Sadios Vacinados, Cães Positivos (para LVC) Sintomáticos e Cães Positivos (para LVC) Assintomáticos, cujas amostras foram analisadas gerando os resultados descritos na seção 5.5 deste trabalho.

Cães Sadios	Cães Sadios Vacinados	Cães Positivos Sintomáticos	Cães Positivos Assintomáticos
C1	C1	02/13	03/13
C3	C3	02/14	15/14
C4	C4	04/14	43/15
C6	C6	05/14	52/15
C22	C7	09/14	114/17
C57	C8	23/14	178
C60	C9	25/14	183
		26/14	
		197/21	
		162	
		182	
		187	

Após análise dos dados, foi constatado que não houve diferença significativa entre os grupos de animais comparando-se as intensidades médias de fluorescência obtidas em todos os antígenos testados. Verificou-se uma tendência das intensidades de fluorescência serem maiores no grupo de sintomáticos, seguido pelo grupo de assintomáticos e grupo de vacinados, principalmente para os peptídeos PP16 e VQ34, sendo o grupo de animais sadios o que demonstrou menor marcação para todos os antígenos testados. Foi possível verificar uma diferença estatisticamente significativa entre os animais sintomáticos e o grupo controle e entre os animais sintomáticos e os vacinados, para o peptídeo VQ34 (Figura 19). Com relação ao antígeno total, LiAg, observamos respostas de MFI muito heterogêneas em todos os grupos de animais analisados. De forma não esperada observamos um padrão semelhante

de resposta inclusive na avaliação dos resultados de BSA, com uma dispersão grande nas MFI observadas no grupo de cães sintomáticos, indicando uma possível reação de anticorpos anti BSA presentes no soro dos cães, que podem ter reagido com a BSA utilizada no acoplamento dos peptídeos SV11, PP16 e VQ34 às beads, interferindo na avaliação dos resultados obtidos.

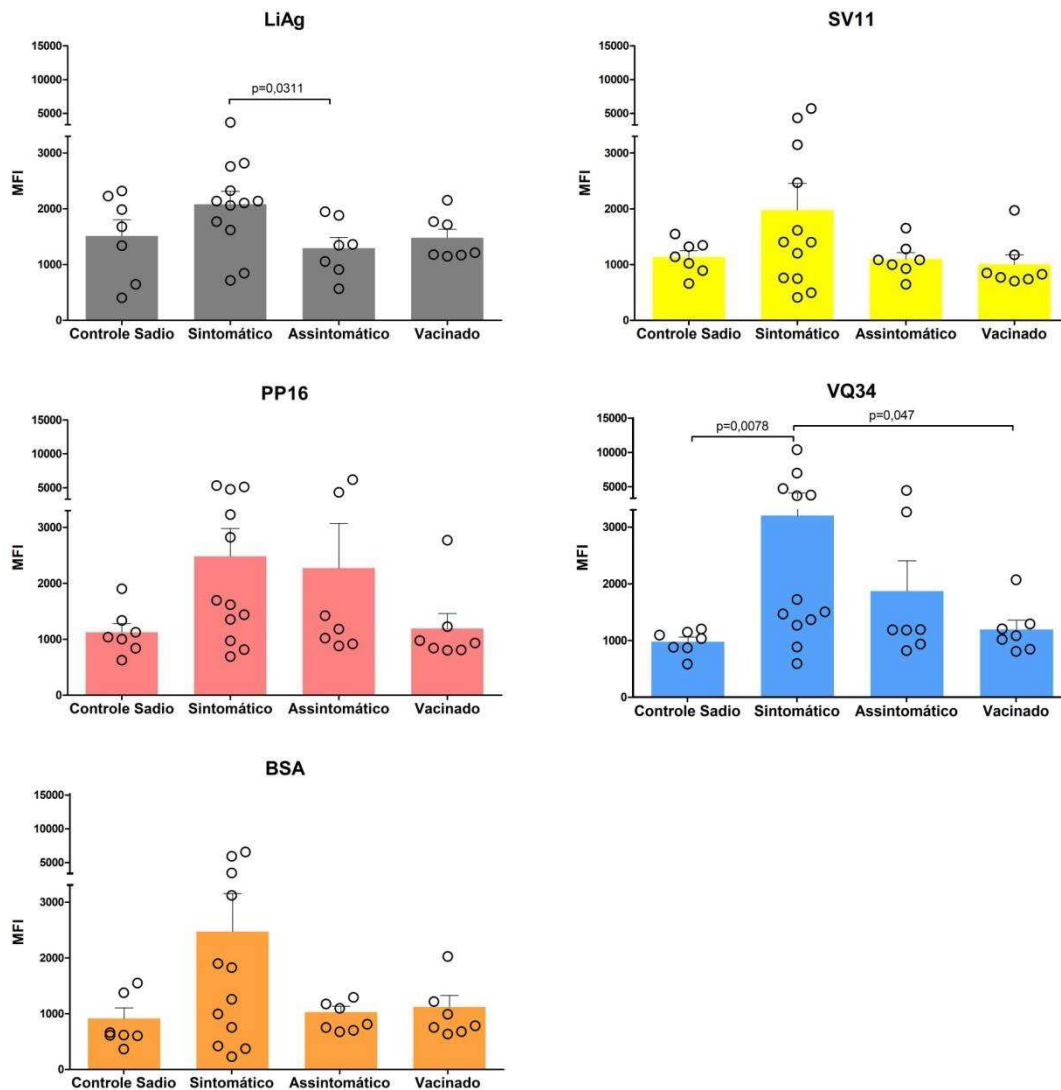


Figura 19 - Comparação das intensidades médias de fluorescência obtidas no CBA para LiAg, SV11, PP16, VQ34 e BSA nos diferentes grupos de cães estudados. As barras demonstram as médias das MFI \pm Erro Padrão. Teste Mann Whitney.

Avaliando-se individualmente animais de cada grupo que tiveram a intensidade de fluorescência detectada para BSA mais elevada ou mais

reduzida (Figura 20), verifica-se claramente que as marcações de todos os outros antígenos também se mostra elevada ou reduzida, acompanhando o que ocorre com BSA em todos os casos. Trata-se de mais uma evidência de que as reações de anticorpos do soro com BSA estão interferindo na reação e dificultando a interpretação dos resultados.

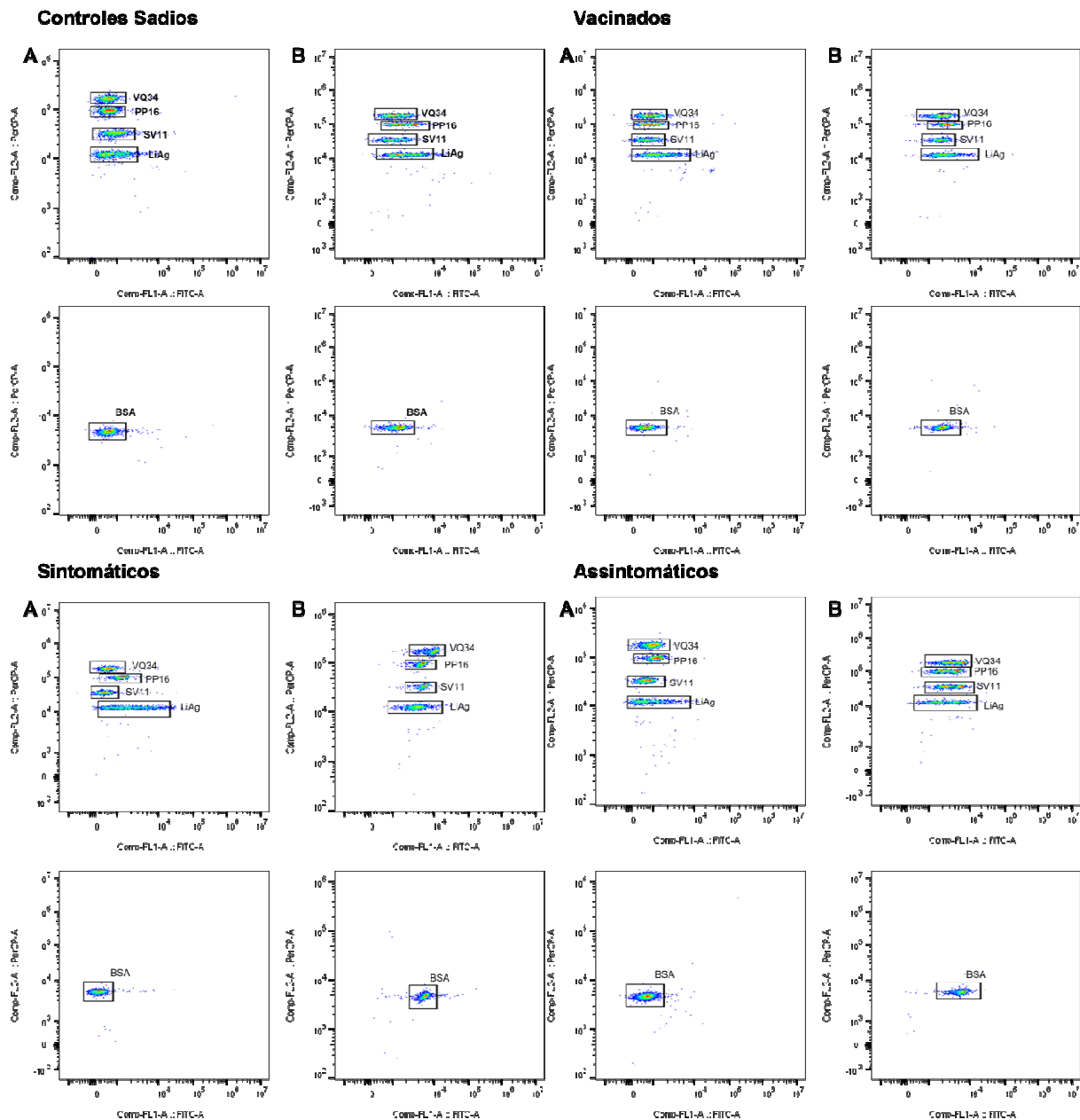


Figura 20 - Dot plots representativos da marcação multiplex nos grupos de cães saudáveis, vacinados, assintomáticos e sintomáticos. O eixo X representa a intensidade de marcação do conjugado anti-IgG de cão conjugado a FITC. O eixo Y representa a intensidade de marcação de Starfire Red (marcação interna das beads). Os *gates* LiAg, SV11, PP16 e VQ34 representam as respectivas populações de beads acopladas ao antígeno total de promastigotas de *L. infantum* (LiAg) e aos peptídeos da proteínas A2 (SV11, PP16 e VQ34). O gate BSA representa a população de beads acopladas apenas com BSA. Dot plots A – Amostras com BSA apresentando baixa intensidade de marcação de anti-IgG-FITC. Dot plots B – Amostras com BSA apresentando alta intensidade de marcação de anti-IgG-FITC.

5.6 COMPARAÇÃO DE RESULTADOS OBTIDOS COM SORO X PLASMA

Visto que foram disponibilizadas amostras de soro e plasma de alguns animais sadios e enfermos, estas foram submetidas ao teste de CBA para se obter dados preliminares sobre a diferença de respostas entre soro e plasma neste ensaio.

Foi possível detectar a presença de anticorpos IgG para todos os antígenos do CBA nas amostras de plasma analisadas, tendo sido detectadas diferenças significantes entre os resultados de soro e plasma para os 3 peptídeos testados (Wilcoxon $p \leq 0,05$), com maiores intensidades de fluorescência sendo observadas nas amostras de plasma se comparadas às de soro (Figura 21). Percebe-se uma tendência de paralelismo entre os resultados obtidos de soro e plasma, em se comparando as médias de intensidades de fluorescência dos antígenos do CBA entre si, sinalizando uma sensibilidade analítica mais elevada do ensaio no caso de amostras de plasma.

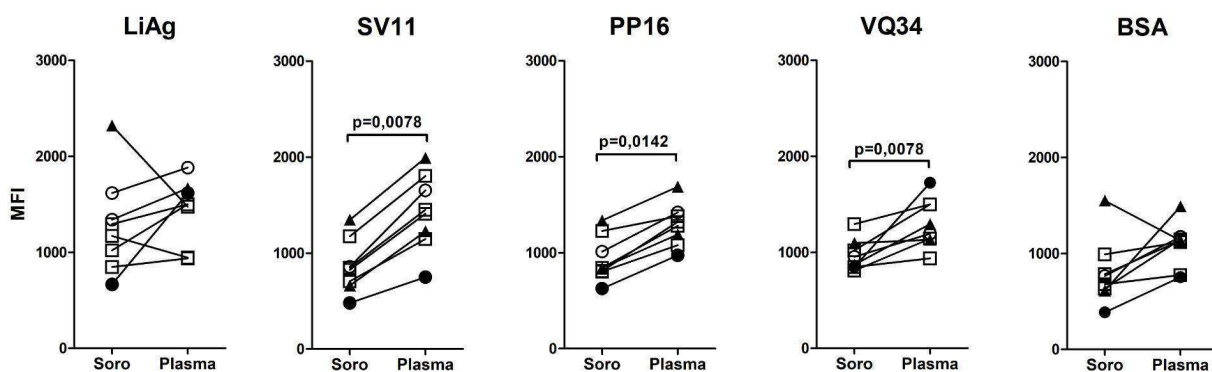


Figura 21 - Resultados comparativos das Intensidades médias de fluorescência (MFI) obtidas após a incubação das beads acopladas ao antígeno total de promastigotas de *L. infantum* (LiAg) e aos peptídeos da proteínas A2 (SV11, PP16 e VQ34) na presença de soro ou plasma obtidos de 2 cães sadios não vacinados (triângulos cheios), 4 cães sadios vacinados (quadrados vazios) e 2 portadores de LVC (1 sintomático - círculo cheio, e 1 assintomático - círculo vazio).

6 DISCUSSÃO

A LVC é reconhecida como um importante problema de saúde pública, em virtude de seu potencial zoonótico, e por isso é fundamental o desenvolvimento e aprimoramento de testes, para que seu diagnóstico seja realizado de uma forma cada vez mais eficaz e rápida.

Sabe-se que a LVC é caracterizada por uma marcante resposta imunológica humoral (OLIAS-MOLERO et al, 2020), com elevada produção de anticorpos, particularmente IgG, a partir de 1-4 meses após a infecção (MAIA et al, 2010). Embora esta hiperglobulinemia seja caracterizada como deletéria e não como protetiva, em função da deposição de imunocomplexos que induzem danos nos tecidos e órgãos acometidos pelo parasito(LUVIZOTTO, 2006), ela é bastante útil quando se trata do diagnóstico da enfermidade. Os testes mais utilizados no mundo atualmente para o diagnóstico da LVC são de natureza sorológica, embora estes, freqüentemente, apresentem falhas e resultados incongruentes entre si (SANTARÉM et al, 2020), principalmente no que se refere à detecção da doença em animais assintomáticos. Utilizando antígenos variados, muitos estudos têm sido realizados abordando inclusive a presença de diferentes clones ou subclasses de IgG, e sua correlação com o status clínicos de cães infectados ou não (CAMPOS et al., 2018; ELMAHALLAWY et al., 2021; FARIA et al., 2015; OLÍAS-MOLERO et al., 2020; TERRAZZANO et al., 2006), mas os resultados obtidos até então são variáveis e mantém o tema inconclusivo.

Neste contexto, a proteína recombinante A2, inicialmente isolada em *L. donovani* por Charest e Matlashewski (1994), e utilizada atualmente na elaboração da vacina Leish-Tec® (única disponível para cães no Brasil), se destaca como importante antígeno para o diagnóstico de LVC, por permitir sensibilidade variando de 60 a 87% e especificidade de 100% em testes sorológicos (CARVALHO et al, 2002). Epitopos de células B da proteína A2 já foram identificados e testados, com o objetivo de se alcançar melhorias no diagnóstico da leishmaniose em humanos e cães (MENDES et al 2017; VALE et

al, 2019). Em um estudo com cães utilizando a técnica de ELISA, Campos e colaboradores (2018) identificaram 3 epitopos lineares de células B da proteína A2 (SV11, PP16 e VQ34), que foram capazes de indicar diferenças entre as respostas sorológicas de cães saudáveis, saudáveis vacinados, infectados sintomáticos e infectados assintomáticos, sendo a IgG anti-SV11 apontada como um possível marcador de cães vacinados com Leish-Tec®.

Tomando como base os dados obtidos por Campos e colaboradores (2018), e utilizando os mesmos epitopos da proteína A2 por eles identificados, foi idealizado o presente estudo, utilizando como metodologia, entretanto, um ensaio de citometria de fluxo com microesferas - o CBA.

A citometria permitiu uma revolução na área de diagnósticos por permitir avaliações precisas de inúmeros processos biológicos (MENDES et al, 2019), sendo muitas destas análises realizadas com o auxílio das beads, nos ensaios do tipo CBA. Em se tratando de sorologia, os ensaios com beads permitem a detecção de até cem respostas de anticorpos a antígenos diversos, simultaneamente, possibilitando a diferenciação dos estágios de uma ou mais enfermidades em uma única análise de apenas uma amostra (WAKEMAN et al, 2021). As vantagens do CBA incluem ainda a necessidade de pequenos volumes amostrais, a boa reprodutibilidade de dados e resultados, e a possibilidade de comparação direta com outros ensaios existentes (MORGAN, 2004). Além disso, por se tratar de uma plataforma com múltiplas utilidades, é cada vez mais usual a presença de equipamentos de citometria de fluxo em laboratórios, clínicas e hospitais, o que permite a difusão do uso da técnica de CBA. Estudos realizados já apresentaram resultados promissores para o diagnóstico de Malária (AMBROSINO et al, 2010; FOUUDA et al, 2006) e leishmaniose cutânea (MENDES et al, 2019; PEDRAL-SAMPAIO et al, 2016) utilizando o CBA.

Para a investigação de anticorpos anti-SV11, anti-PP16 e anti-VQ34 através da técnica de CBA em cães, foi necessário inicialmente acoplar estes antígenos às microesferas carboxiladas ou *beads*. Este acoplamento é feito por meio de ligações covalentes aos terminais carboxílicos (COOH) das beads. Nesta reação, ativa-se o terminal COOH das microesferas com carbodiimida

solúvel em água, criando um éster ativo que por sua vez reage com o terminal amina da proteína de interesse, acoplando-a à microesfera (ARSHADY, 1993). Estudos evidenciaram que peptídeos muito pequenos não se acoplam adequadamente às beads carboxiladas (AMBROSINO et al, 2010), de forma que julgou-se necessário ligar os peptídeos à uma proteína, e em seguida acoplar o complexo peptídeo-proteína às beads. A Albumina Sérica Bovina - BSA, foi escolhida como proteína para permitir o acoplamento dos peptídeos às beads.

A BSA é mundialmente utilizada como agente bloqueador em imunoenaios, para prevenir reações inespecíficas de reagentes ou biomoléculas às superfícies de placas e tubos (XIAO; ISAACS, 2012). De fácil aquisição e armazenamento, ela é utilizada em concentrações de 1 a 3% na solução tampão dos ensaios (GIBBS, 1991), principalmente no caso do ELISA (AHIRWAR et al., 2015). A BSA foi escolhida, portanto, tendo por base sua ampla indicação de uso em imunoenaios, tomando-se o cuidado de utilizar as beads acopladas somente à BSA como um dos controles do CBA em desenvolvimento com a intenção de se obter dados a respeito de eventuais ligações inespecíficas de anticorpos do soro a esta proteína.

Assim sendo, utilizando microesferas sem acoplamento, e acopladas à IgG canina, BSA, LiAg (antígeno total de *L. Infantum*), e aos peptídeos SV11, PP16 e VQ34 (os três últimos por meio da BSA), foram feitos os experimentos de escolha de concentração de antígenos acoplados às beads, de diluição de conjugado anti-IgG-FITC e de diluição de amostras de soro para o CBA, chegando-se aos melhores resultados com as concentrações/diluições elencadas na Tabela 3.

Este estudo teve como objetivo principal verificar o padrão de resposta sorológica de cães ao antígeno total de *L. infantum* - LiAg, e aos epitopos SV11, PP 16 e VQ34 da proteína A2 num ensaio do tipo CBA, e foram verificados anticorpos para todos estes antígenos em todas as amostras testadas. Percebeu-se que nos histogramas de aquisição da citometria, os peptídeos apresentaram picos homogêneos e bem concentrados de intensidade de fluorescência, ao passo que nos gráficos relativos à LiAg, os picos apresentaram

um perfil mais difuso. Em ensaios do tipo CBA, os picos de intensidade de fluorescência costumam ser bem concentrados, em virtude da homogeneidade das beads (tanto em relação a FSC quanto a SSC). Uma explicação para esta diferença nos padrões de leitura entre beads acopladas a peptídeos e beads acopladas a LiAg, está na natureza das moléculas: enquanto os peptídeos são partículas semelhantes entre si e altamente purificadas, o antígeno total LiAg é composto pelo extrato bruto de promastigotas de *L. Infantum*, contendo diversas estruturas do protozoário, que possuem variados potenciais imunorreativos, e que se ligam aleatoriamente as beads, gerando provavelmente acoplamentos heterogêneos de antígenos e, por consequência eventos com diferentes intensidades de fluorescência, que geram um perfil mais disperso do pico de marcação durante a aquisição no citômetro.

Ainda sobre o padrão de intensidade de fluorescência, nas reações aos peptídeos, foi observado que em SV11 e PP16 houve um aumento da marcação nas beads conjugadas com o aumento da concentração de antígeno, sendo a melhor marcação verificada na concentração de 20µg, enquanto o inverso foi verificado no caso do VQ34, onde as marcações foram mais intensas com a diminuição da concentração do antígeno, sendo por isso escolhida a concentração de 5µg para a realização dos demais ensaios. Acredita-se que o motivo desta relação inversa concentração/intensidade de fluorescência esteja relacionada ao tamanho maior do peptídeo VQ34, que em maiores concentrações pode se sobrepor na superfície das beads, escondendo sítios de ligação aos anticorpos e assim inibindo a presença da IgG na reação, que seria revelada pelo conjugado na etapa seguinte do ensaio.

Já nos ensaios multiplex, o VQ34 foi, por sua vez, o único peptídeo para o qual detectou-se resposta diferente entre os grupos de cães estudados, sendo a concentração de anticorpos anti-VQ34 significativamente maior nos cães sintomáticos que nos outros cães. Esse dado levanta a possibilidade de uso deste peptídeo no diagnóstico diferencial da LVC com outras doenças de sintomatologia semelhante, inclusive em ensaios multiplex que contemplem enfermidades diferentes, porém mais estudos devem ser realizados para se verificar esta alegação.

Nos resultados obtidos na comparação das análises de soro e plasma do mesmo indivíduo, verificou-se diferença significativa entre os resultados destes dois tipos de amostra, evidenciando uma sensibilidade analítica mais elevada, no caso do plasma (Figura 21). Embora o soro seja a matriz mais amplamente utilizada ao longo dos anos em ensaios clínicos, o uso do plasma deve ser melhor considerado, no sentido de prevenir as modificações decorrentes do processo de coagulação que podem interferir em alguns analitos (PLEBANI et al, 2020), o que parece ter ocorrido no nosso caso. Julga-se muito importante verificar a possibilidade de uso de tipos de amostras diversas em testes diagnósticos em animais, pois na prática, nem sempre é possível obter a amostra considerada ideal para o ensaio. Os dados a respeito do melhor desempenho do plasma no CBA multiplex aqui obtidos são preliminares, e deverão ser melhor verificados em estudos futuros no desenvolvimento do ensaio.

Considerando os resultados aqui demonstrados, não foi possível reproduzir, através deste trabalho, os resultados observados por Campos e colaboradores (2018), onde através do ELISA, altas concentrações de IgG anti-VQ34 foram verificadas na maioria dos soros de animais dos grupos de vacinados e de sintomáticos e IgG anti-PP16 e anti-SV11 foram apontados como possíveis marcadores para cães vacinados com Leish-Tec®

Acredita-se que uma interpretação adequada dos resultados deste trabalho foi prejudicada pela presença de anticorpos anti-BSA nas amostras utilizadas. A presença destes anticorpos foi evidenciada ao analisar os dados de intensidade média de fluorescência das beads acopladas somente à BSA, que serviriam de controle para eventuais ligações inespecíficas a esta albumina no ensaio. Alguns cães entretanto apresentaram expressiva reação à BSA, independente do grupo de estudo em que estavam alocados, e além disso, verificou-se que a intensidade média de fluorescência nas reações a todos os peptídeos estudados, acompanhou em amplitude a intensidade média de fluorescência observada para BSA nestes animais.

A princípio, as desvantagens do uso da BSA em imunoenaios estariam relacionadas apenas à variabilidade entre lotes do produto; a dificuldade de exercer função bloqueadora em algumas superfícies e a reações cruzadas conhecida com alguns anticorpos (anti-fosfotirosina e anti-conjugado de BSA-haptenos) (GIBBS,1991). Alguns estudos já demonstraram problemas com o uso de BSA em ELISA em humanos, sugerindo o uso de outros agentes bloqueadores (CHART et al., 1998; KONISHI et al., 2010; XIAO; ISAACS, 2012).Em 1991, Carter e colaboradores apontaram a BSA como uma importante fonte de erro quando usada em imunoenensaio de cães.

O principal problema relacionado aos cães seria a usual presença de anticorpos séricos anti-BSA em indivíduos desta espécie. Embora não seja indicada para uso terapêutico em cães (MOSLEY; MATHEWS, 2008), a BSA é amplamente utilizada no cultivo de células para a produção de vacinas para animais, além de poder ser usada diretamente como estabilizante em imunógenos (HOGENESCH et al, 1999), e por este motivo seria possível encontrar anticorpos anti BSA em cães sadios (CARTER et al, 1991). Corroborando esta hipótese, HogenEsch e colaboradores (2002) verificaram a notável presença de anticorpos anti-BSA por até 50 semanas em cães após a vacinação contra raiva. É possível ainda que a formação de anticorpos anti-BSA também esteja associada a alterações de permeabilidade na mucosa intestinal em cães com enterite crônica (CASTRO, 2019). Os anticorpos anti-BSA também já foram relacionados a alergias alimentares (DAY, 2005) e artrite (OHASHI et al, 1996) em cães.

Diante destas informações, para viabilizar a continuidade do desenvolvimento do ensaio CBA aqui proposto, entende-se que um primeiro passo seria realizar um teste sorológico apropriado, como por exemplo o ELISA, com todas as amostras de cães disponíveis, para verificar seus títulos específicos de anticorpos anti-BSA. Uma vez confirmadas elevadas concentrações séricas desta imunoglobulina nas amostras, descartar-se-ia o uso da BSA nas reações, partindo para outras estratégias de acoplamento dos antígenos às beads e outras opções de bloqueadores no tampão, como por exemplo a caseína ou gelatinas (VOGT Jr. et al, 1987).

Embora existam dados sobre o insucesso no acoplamento de pequenas moléculas (AMBROSINO et al, 2010), considerando a pronta disponibilidade de beads e dos peptídeos sem BSA no Laboratório de Imunoparasitologia do IOC, é possível experimentar e avaliar o acoplamento direto dos antígenos às microesferas carboxiladas, como forma mais rápida e econômica de contornar as reações indesejáveis com a IgG anti-BSA no soro dos cães e continuar de forma assertiva os estudos deste ensaio multiplex para diagnóstico de LVC. Caso não se obtenha êxito no acoplamento direto dos antígenos, a opção seria a busca de outra proteína de acoplamento ou mesmo outra categoria de microesferas como as de streptavidina, onde o analitos ligados a biotina se acoplam às beads por meio da biotilação (QuantumPlex™ Streptavidin. ANEXO D), sendo desnecessário neste caso o uso de qualquer proteína adicional para a ligação dos peptídeos às beads.

Ante ao exposto, mesmo que não tenham sido obtidos os resultados finais esperados neste estudo, julga-se precipitado descartar o modelo de ensaio sorológico aqui proposto, uma vez que é possível, através das sugestões apontadas, contornar as inconformidades detectadas relacionadas a anticorpos anti-BSA nos soros dos cães.

Considerando a necessidade de incrementos no diagnóstico da LVC, acredita-se que a citometria de fluxo é uma tecnologia a ser melhor explorada neste contexto e que, ante às diversas alternativas sorológicas possíveis, o teste do tipo CBA multiplex se mostra promissor como técnica a ser aprimorada para o diagnóstico da enfermidade.

7 CONCLUSÕES

O protocolo de acoplamento de IgG, BSA, do antígeno total LiAg, e dos peptídeos SV11, PP16 e VQ34 às microesferas carboxiladas foi bem sucedido.

As concentrações 10µg de LiAg, de 20µg de SV11 e PP16, e de 5µg de VQ34 acopladas às microesferas foram consideradas as mais adequadas para a reação com soro dos cães positivos e negativos para LVC.

As diluições do conjugado de 1:400 e a de soro de 1:3200 foram verificadas como as melhores para avaliar a presença das imunoglobulinas anti-LiAg, anti-SV11, anti-PP16 e anti-VQ34 em soros de cães positivos e negativos para LVC.

Anticorpos anti-LiAg, anti-SV11, anti-PP16 e anti-VQ34 foram detectados em todas as amostras de cães examinadas, embora não tenha sido possível verificar diferença significativa entre os grupos de cães testados (controles sadios, vacinados, infectados assintomáticos e infectados sintomáticos) a respeito do perfil de resposta aos antígenos utilizados no CBA.

Foi verificada a presença de intensa reação sorológica à BSA no soro de vários indivíduos de todos os grupos testados, nos quais a reação aos antígenos LiAg, SV11, PP16 e VQ34 foi também visivelmente exacerbada se comparada aos indivíduos com menor resposta à BSA, onde conclui-se que o uso da BSA como meio de acoplamento dos peptídeos às beads prejudica a leitura correta do ensaio e a interpretação dos dados obtidos.

Foi possível detectar anticorpos anti-LiAg, anti-SV11, anti-PP16 e anti-VQ34 tanto em soro como em plasma de cães.

Para a continuidade dos estudos do modelo de CBA multiplex proposto, apresenta-se como solução à questão dos anticorpos anti-BSA dos cães, a tentativa de acoplamento dos peptídeos diretamente às beads carboxiladas ou a substituição destas por beads de streptavidina e peptídeos acoplados a biotina, além da alteração do agente bloqueador na solução tampão utilizada nos ensaios.

REFERÊNCIAS

AHIRWAR, R.; BARIAR, S.; BALAKRISHNAN, A.; NAHAR, P. BSA blocking in enzyme-linked immunosorbent assays is a non-mandatory step: A perspective study on mechanism of BSA blocking in common ELISA protocols. **RSC Advances**, v. 5, n. 121, p. 100077–100083, 2015.

AMBROSINO, E.; DUMOULIN, C.; ORLANDI-PRADINES, E.; REMOUE, F.; TOURE-BALDÉ, A.; TALL, A.; SARR, J.B.; POINSIGNON, A.; SOKHNA, C.; PUGET, K.; TRAPE, J. F.; PASCUAL, A.; DRUILHE, P.; FUSAI, T.; ROGIER, C. A multiplex assay for the simultaneous detection of antibodies against 15 *Plasmodium falciparum* and *Anopheles gambiae* saliva antigens. **Malaria Journal**, v. 9, n. 1, p. 1–12, 2010.

ALVAR, J.; CANAVATE, C.; MOLINA, R.; MORENO, J.; NIETO, J. Canine Leishmaniasis. **Advances in Parasitology**. v. 57. p.1-88. 2004.

ANDRADE, R. A.; ARAÚJO M. S. S.; REIS, B. A.; GONTIJO, C. M. F.; VIANNA, L. R.; MAYRINK, W.; MARTINS-FILHO, O. A. Advances in flow cytometric serology for canine visceral leishmaniasis: Diagnostic applications when distinct clinical forms, vaccination and other canine pathogens become a challenge. **Veterinary Immunology and Immunopathology** v. 128. p 79-86. 2009.

ANDRADE R. A.; REIS, A. B.; GONTIJO, C. M. F.; BRAGA, L. B.; ROCHA, R. D. R.; ARAÚJO, M. S. S.; VIANNA, L. R.; MARTINS-FILHO, O. A. Clinical value of anti-*Leishmania (Leishmania) chagasi* IgG titers detected by flow cytometry to distinguish infected from vaccinated dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. n.116, p. 85–97, 2007.

ANGELONI, S.; SHUBHAGATA, D.; DUNBAR, S.; STONE, V.; SWIFT, S. Assay Design. In: ANGELONI, S.; SHUBHAGATA, D.; DUNBAR, S.; STONE, V.; SWIFT, S. **xMAP® Cookbook - A collection of methods and protocols for developing multiplex assays with xMAP® Technology**. 4.ed. Luminex Corporation. 2018. E-book.150p. Disponível em: <http://info.luminexcorp.com/en-us/research/download-the-xmap-cookbook>. Acesso em 8 de janeiro de 2022.

ARSHADY, R. Microspheres for biomedical applications: preparation of reactive and labelled microspheres. **Biomaterials**, v. 14, n. 1, p. 5–15, 1993.

BOURDIN, B.; SEGURA, E., TÉTREAULT M.P.; LESSAGE, S.; PARENT, L. Determination of the Relative Cell Surface and Total Expression of Recombinant Ion Channels Using Flow Cytometry. **Journal of Visualized Experiments**. v. 115.e. 54732. 2016. <http://www.jove.com/video/54732>.

BRASIL. Câmara dos Deputados. Projeto de Lei 1738/2011. Dispõe sobre a Política Nacional de Vacinação contra a Leishmaniose animal. Brasília. 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. *Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral*. Brasília. 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Nota Técnica Conjunta Nº 01/2011 CGDT-CGLAB/DEVIT/SVS/MS. Esclarecimento sobre substituição de protocolo diagnóstico da leishmaniose visceral canina. Brasília. 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Nota Técnica VS/MS. Vacina Anti Leishmaniose Visceral Canina: Leishmune®. Brasília. 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde e Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Nota Técnica Interministerial Nº 01/2009. Nota sobre as Vacinas Antileishmaniose Visceral registradas no MAPA. Brasília 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. *Boletim epidemiológico - doenças tropicais negligenciadas*. Número Especial. Brasília. 2021.

BRITO, H. C. D.; ANAL L. A.; SANTANA A. E. O Uso do Ensaio Multiplex Baseado em Beads na Medicina Veterinária. **Investigação em Medicina Veterinária**, v.15 n.4 p.12-18, 2016.

CAMPOS, M. P.; DE LUCA, P. M.; RENZETTI, A. R. S.; SOUZA, S. M. M.; MENDES JUNIOR, A. A. V. Can vaccines against canine visceral leishmaniasis interfere with the serological diagnostics recommended by the Brazilian Ministry of Health? **Ciência Rural**. v.47, n4, e20160846, 2017.

CAMPOS, M. P.; FIGUEIREDO, F. B.; MORGADO, F. N.; RENZETTI, A. R. S.; SOUZA, S. M. M.; PEREIRA, S. A.; RODRIGUES-DA-SILVA, R. N.; LIMA-JUNIOR, J. C.; DE LUCA, P. M. *Leishmania infantum* Virulence Factor A2 Protein: Linear B-Cell Epitope Mapping and Identification of Three Main Linear B-Cell Epitopes in Vaccinated and Naturally Infected Dogs. **Frontiers in Immunology**. v.9, p 1-11, 2018.

CARTER, S. D.; BARNES, A.; MAY, C.; HALL, E. J.; BATT, R. M. Antibody responses to BSA in dogs: a source of error in diagnostic immunoassays. **Veterinary Record**, v. 129, n. 10, p. 220–221, 1991.

CARVALHO, F. A.; CHAREST, H.; TAVARES, C. A.; MATLASHEWSKI, G.; VALENTE, E. P.; RABELLO, A.; GAZZINELLI R. T.; FERNANDES, A. P. Diagnosis of american visceral leishmaniasis in humans and dogs using the recombinant *Leishmania donovani* A2 antigen. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. n. 43, p. 289–95, 2002.

CASTRO, A. C. S. **Measurement of anti-bovine serum albumin antibodies in dogs with chronic enteropathy**. Dissertação. (Mestrado Integrado em Medicina Veterinária). Universidade de Lisboa. Lisboa. 2019.

CHARREST, H.; MATLASHEWSKI, G. Developmental gene expression in *Leishmania donovani*: differential cloning and analysis of an amastigote-stage-specific gene. **Molecular and Cellular Biology**, v. 14, n.5, p. 2975-2984, 1994.

CHART, H.; EVANS, J.; CHALMERS, R. M.; SALMON, R. L. Escherichia coli O157 serology: False-positive ELISA results caused by human antibodies binding to bovine serum albumin. **Letters in Applied Microbiology**, v. 27, n. 2, p. 76–78, 1998.

CHEN, A. Multiplex Cytometric Bead Array: The ABCs of CBAs. BitesizeBio, 2016. Disponível em: <<https://bitesizebio.com/31909/multiplex-cytometric-bead-array>>. Acesso em 20 de outubro de 2020.

CHRISTOPHER-HENNING, J.; ARAÚJO, K. P. C.; SOUZA, C. J. H.; FANG, Y.; LAWSON, S.; NELSON, E. A.; CLEMENT, T.; DUNN, M.; LUNNEY, J.K. Opportunities for bead-based multiplex assays in veterinary diagnostic laboratories. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation** n. 25, v.6, p 671–691. 2013.

COELHO, E. A. F.; TAVARES, C. A. P.; CARVALHO, F. A. C.; CHAVES, K. F.; TEIXEIRA, K. N.; RODRIGUES, R. C.; CHAREST, H.; MATLASHEWSKY, G.; GAZINELLI, R. T.; FERNANDES, A. P. Immune responses induced by the *Leishmania (Leishmania) donovani* A2 antigen, but not by the LACK antigen, are protective against experimental *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. **Infection Immunology**. v. 71 n.7 p.3988-94. 2003.

DANTAS-TORRES, F.; MIRO, G.; BOWMAN, D. D.; GADRONI, L.; OTRANTO, D. Culling dogs for visceral canine leishmaniasis: The wind of change. **Trends in Parasitology**. v.35, n.2, p. 97-101, 2019.

DAY, M. J. The canine model of dietary hypersensitivity. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 64, n. 4, p. 458–464, 2005.

DEPLAZES, P.; SMITH, N. C.; LUTZ, H.; ECKERT, J. Specific IgG1 and IgG2 antibody responses of dogs to *Leishmania infantum* and other parasites. **Parasite Immunology**, v. 17, p. 451–458, 1995.

ELMAHALLAWY, E. K.; ZANET, S.; POGGI, M.; ALSHARIF, K. F.; LOKMAN, M. S.; TRISCIUOGLIO, A.; FERROGLIO, E. Prognostic Value of Immunoglobulin G (IgG) Patterns by Western Blotting Immunodetection in Treated Dogs Previously Infected with *Leishmania infantum*. **Veterinary Science** v. 9, n. 293, p. 1–10, 2021.

ESCH, K. J. e PETERSEN, C. A. Transmission and Epidemiology of Zoonotic Protozoal Diseases of Companion Animals. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 26 n.1 p. 58–85. 2013

FARIA, R.; VELOSO, L. C.; COURA-VITAL, W.; REIS, A. B. Novel Recombinant Multiepitope Proteins for the Diagnosis of Asymptomatic *Leishmania infantum*-Infected Dogs. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. v. 9, n. 1, p. 13–16, 2015.

FOUDA, G. G.; LEKE, R. F. G.; LONG, C.; DRUILHE, P.; ZHOU, A.; TAYLOR, D. W.; JOHNSON, A. H. Multiplex assay for simultaneous measurement of antibodies to multiple *Plasmodium falciparum* antigens. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 13, n. 12, p. 1307–1313, 2006.

GARCIA, L. M.; COELHOS DOS REIS, J. G. A.; PERUHYPE-MAGALHÃES, V.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; ROCHA, R. D. R.; ARAÚJO, M. S. S.; GOMES, I. T.; CARVALHO, S. F. G.; DIETZE, R.; LEMOS, E. L.; ANDRADE, M. C.; MARTINS-FILHO, O. A. Anti-fixed *Leishmania chagasi* promastigotes IgG antibodies detected by flow cytometry (FC-AFPA-IgG) as a tool for serodiagnosis and for post-therapeutic cure assessment in american visceral leishmaniasis. **Journal of Immunological Methods**. n. 350, p. 36–45, 2009.

GHEDIN, E.; ZHANG, W. W.; CHAREST, H.; SUNDAR, S.; KENNEY, R. T.; MATLASHEWSKI, G. Antibody response against a *Leishmania donovani* amastigote-stage-specific protein in patients with visceral leishmaniasis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**. n.4, p. 530-535, 1997.

GIBBS, J. **Effective Blocking Procedures ELISA Technical Bulletin Corning Incorporated Life Sciences Kennebunk, ME**. 1991. Disponível em: <http://https://www.labcluster.com/news4_3/Corning_elisa3_4.pdf>. Acessado em 29 de novembro de 2021

GOMES, G. M. T. **Avaliação da estabilidade de amostras positivas para leishmaniose visceral canina**. Dissertação. (Mestrado em Vigilância Sanitária). Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro. 2016.

HOGENESCH, H.; AZCONA-OLIVERA, J.; SCOTT-MONCRIEFF, C.; SNYDER, P. W.; GLICKMAN, L. Vaccine-induced autoimmunity in the dog. **Advances in Veterinary Medicine**, v. 41, n. C, p. 733–747, 1999.

HOGENESCH, H.; DUNHAM, A. D.; SCOTT-MONCRIEFF, C.; GLICKMAN, L. T.; DEBOER, D. J. Effect of vaccination on serum concentrations of total and antigen-specific immunoglobulin E in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 63, n. 4, p. 611–616, 2002.

IKEDA-GARCIA, F. A.; MARCONDES, M. Métodos de diagnóstico da leishmaniose visceral canina. **Clínica Veterinária**. n. 71, p.34-42, 2007.

INFORME DE LEISHMANIOSES Nº 7. Pan American Health Organisation, 2019. Disponível em: <<https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/50505/2019-cde-leish-informe-epi-das-americas.pdf?sequence=2&isAllowed=y>>. Acesso em 9 de setembro de 2020.

JAROSZESKI, M. J.; RADCLIFF, G. Fundamentals of flow cytometry. **Molecular Biotechnology**. n. 11. p. 37–53. 1999.

KELLAR, K. L.; IANNONE, M. A.: 2002, Multiplexed microspherebased flow cytometric assays. **Experimental Hematology** n. 74 v. 30 p. 1227–1237. 2002.

KELLAR K. L.; MAHMUTOVIC, A. J. E BANDYOPADHYAY, K. Multiplexed microsphere-based flow cytometric immunoassays. **Currents Protocols in Cytometry**. v.13 n.1 2006.

KER, D. T.; COURA-VITAL, W.; AGUIAR-SOARES, R. D. O.; ROATT, B. M.;

MOREIRA, N. D.; CARNEIRO, C. M.; MACHADO, E. M. M.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; MARTINS-FILHO, O. A.; GIUNCHETTI, R. C.; ARAÚJO, M. S. S.; COELHO, E. A. F.; SILVEIRA-LEMONS, D.; REISA, A. B. Evaluation of a prototype flow cytometry test for serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Clinical and Vaccine Immunology**. v.20, n.12, p.1792–1798, 2013.

KER, H. G.; COURA-VITAL W., VALADARES, D. G., SOARES, R. D. O. A.; BRITO, R. C. F.; VERAS, P. S. T.; FRAGA, D. B. M.; MARTINS-FILHO, O. A.; CARVALHO, A. T.; REIS, A. B. Multiplex flow cytometry serology to diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 103. p. 8179-8190. 2019.

KONISHI, E.; KITAI, Y.; NISHIMURA, K.; HARADA, S. Antibodies to Bovine Serum Albumine in human sera: problems and solutions with casein-based ELISA in the detection of natural Japanese encephalitis virus infection. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v. 63, p.296–298, 2010.

KRAUSPENHAR, C.; BECK, C.; SPEROTTO, V.; SILVA, A. A.; BASTOS, R.; RODRIGUES, L. Leishmaniose visceral em um canino de Cruz Alta, Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**. v.37 n.3 2007.

LEISHMANIASIS. World Health Organization, 2020. Disponível em <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>>. Acesso em: 20 de outubro de 2020.

LEMONS, E. M.; GOMES, I. T.; CARVALHO, S. F. G.; ROCHA, R.D.R.; PISSINATE, J. F.; MARTINS-FILHO, O. A.; DIETZE, R. Detection of Anti-*Leishmania (Leishmania) chagasi* immunoglobulin G by flow Cytometry for cure assessment following chemotherapeutic treatment of American visceral leishmaniasis. **Clinical and Vaccine Immunology**. v. 14, n. 5, p. 569–576, 2007.

LIRA, R.A.; CAVALCANTI, M.P.; NAKAZAWA, M.; FERREIRA, A. G. P.; SILVA, E. D.; ABATH, F. G. C.; ALVES, L. C.; SOUZA, W. V.; GOMES, Y. M. Canine visceral leishmaniasis: A comparative analysis of the EIE-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos and the IFI-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos kits. **Veterinary Parasitology** v.37 n.1-2. p.11-16. 2006.

LUVIZOTTO, M.C.R. Alterações patológicas em animais naturalmente infectados. **Anais do Fórum de Leishmaniose Visceral canina**. p.15-22. Jaboticabal.2006.

MAIA, C.; NUNES, M.; CRISTÓVÃO, J.; CAMPINO, L. Experimental canine leishmaniasis: Clinical, parasitological and serological follow-up. **Acta Tropica**, v. 116, n. 3, p. 193–199, 2010.

MAGALHÃES F. B., CASTRO NETO, A. L.; NASCIMENTO, M. B.; SANTOS W. J. T.; MEDEIROS, Z. M.; LIMA NETO A. S.; COSTA D. L.; COSTA, C. H. N.; DOS SANTOS W. I. C.; CARVALHO, L. C. P.; OLIVEIRA, G. G. S.; MALO NETO, O. P. Evaluations of a new set of recombinant antigens for the serological diagnosis of human and canine visceral leishmaniasis. **PLOS One**. v. 9, n. 12, p.

1-18, 2017.

MANCIATI F.; FALCONE, M. L.; GIANELLI C, E POLI A. Comparison between an enzyme-linked immunosorbent assay using a detergent-soluble *Leishmania infantum* antigen and indirect immunofluorescence for the diagnosis of canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology** v.59. n 1. p.13-21.1995.

MARCONDES, M.; DAY, M. J. Current status and management of canine leishmaniasis in Latin America. **Research in Veterinary Sciences**. n.123, p. 261-272, 2019.

MCKINNON, K. M. **Flow Cytometry: An Overview**. Current Protocols in immunology. v.120. n.1 p. 1.1-1.11. 2018.

MEDEIROS, N. I. E GOMES, J. A.S. Cytometric Bead Array (CBA) for measuring cytokine levels in chagas disease patients. **Methods in Molecular Biology**. v.1955. p.309-314. 2019.

MENDES, A. P. O.; OLIVEIRA, B. C.; PEREIRA, A. M. S.; CASTRO, M. C. A. B.; SOUZA, M. A.; BRITO, M. E. F.; ARAÚJO, F. F.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; MARTINS-FILHO, O. A.; PEREIRA, V. R. A. American tegumentary leishmaniasis diagnosis using *L. (V.) braziliensis* fixed promastigotes: A comparative performance of serological tests and spontaneous cure identification. **BMC Infectious Diseases**, v.19, n. 1, p.1–11, 2019.

MENDES, T. M.; ROMA, E. H.; COSTAL-OLIVEIRA, F.; DHOM-LEMOS, L. C.; TOLEDO-MACHADO, C. M.; BRUNA-ROMERO, O.; BARTHOLOMEU, D. C.; FUJIWARA, R. T.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. Epitope mapping of recombinant *Leishmania donovani* virulence factor A2 (recLdVFA2) and canine leishmaniasis diagnosis using a derived synthetic bi-epitope. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 5, p. 1–14, 2017.

MICHALICK, M.S.M. Gênero *Leishmania*. In: NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**, Ed Atheneu. 11a ed, pg. 41-46. 2004.

MOREIRA, N. B.; ALMEIDA, A. B. P. F. ; PINTO, A. Z. L.; MUTZENBERG, E. L.; GODOY, I.; SILVEIRA, M. M.; DUTRA, V.; SOUZA, V. R. F. Leishmaniose visceral canina: aspectos dermatológicos e dermatoses associadas. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 44 p.1-4. 2016.

MORGAN, E.; VARRO, R.; SEPULVEDA, H.; EMBER, J. A.; APGAR, J.; WILSON, J.; LOWE, L.; CHEN, R.; SHIVRAJ, L.; AGADIR, A.; CAMPOS, R.; ERST, D.; GAUR, A. Cytometric bead array: a multiplexed assay platform with applications in various areas of biology. **Clinical Immunology**. v. 110 n. 3 p. 252-66. 2004.

MOSLEY, C. A. E.; MATHEWS, K. The use of concentrated bovine serum albumin in canines. **Veterinary Anaesthesia and Analgesia**, v. 32, n. 4, p. 14–15, 2008.

OHASHI, F.; TERUMASA, S.; SAKURAI, M.; ISHIHARA, S.; KUWAMURA, M.; YAMATE, J.; OTA, M. The Production of arthritis in beagles by an immunological reaction to Bovine Serum Albumin. **Experimental Animals**, v.54, n.4, p.299–307,

1996.

OLÍAS-MOLERO, A. I.; CORRAL, M. J.; JIMENEZ-ANTON, M. D.; ALUNDA, J. M. Early antibody response and clinical outcome in experimental canine leishmaniasis. **Scientific Reports Nature Research**, v. 9, n. 18606, p. 1–9, 2019.

OLÍAS-MOLERO, A. I.; MORENO, I.; CORRAL, M. J.; JIMÉNEZ-ANTÓN, M. D.; DAY, M. J.; DOMÍNGUEZ, M.; ALUNDA, J. M. Infection of dogs by *Leishmania infantum* elicits a general response of IgG subclasses. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–10, 2020..

PARABONI, C.; FRANCO, P. A. e MATTEI, D. R. Poliartrite por leishmaniose visceral canina: relato de caso. **Anais do 35º Conbravet**. Gramado. 2008.

PEDRAL-SAMPAIO, G. ALVES, J. S.; SCHRIEFER, A.; MAGALHÃES, A.; MEYER, R.; GLESBY, M. J.; CARVALHO, E. M.; CARVALHO, L. P. Detection of IgG Anti-leishmania antigen by flow cytometry as a diagnostic test for cutaneous leishmaniasis. **PLoS ONE**, v. 11, n. 9, p. 1–9, 2016.

PESSOA-E-SILVA, R.; ANTÃO, V. V.; ANDRAEDE, T. A. S.; SILVA, A. C. O.; OLIVEIRA, G. A.; TRAJANO-SILVA, L. A. M.; NAKASONE, E. K. N.; PAIVA-CAVALCANTI, M. The diagnosis of canine leishmaniasis in Brazil: Confronting old problems. **Experimental Parasitology**. n.199, p.9-16, 2019.

PINELLI, E.; KILLICK-KENDRICK, R.; WAGENAAR, J.; BERNADINA, W.; REAL, D. E. L.; RUITENBERG, J. Cellular and Humoral Immune Responses in Dogs Experimentally and Naturally Infected with *Leishmania infantum*. **Infection and Immunity** v. 62, n. 1, p. 229–235, 1994.

PISSINATE, J. F.; GOMES, I. T.; PERUHYPE-MAGALHÃES, V.; DIETZE, R.; MARTINS-FILHO, O. A.; LEMOS, E. M. Upgrading the flow-cytometric analysis of anti-Leishmania immunoglobulins for the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. **Journal of Immunology Methods**. n.336, p.193–202, 2008.

PLEBANI, M.; BANFI, G.; BERNARDINI, S.; BONDANINI, F.; CONTI, L.; DORIZZI, R.; FERRARA, F. E.; MANCINI, R.; TRENTI, T. Serum or plasma? An old question looking for new answers. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 58, n. 2, p. 178–187, 2020.

PORROZI, R.; COSTA, M. V. S.; TEVA, A.; FALQUETO, A.; et al. Comparative Evaluation of Enzyme-Linked Immunosorbent Assays Based on Crude and Recombinant Leishmanial Antigens for Serodiagnosis of Symptomatic and Asymptomatic *Leishmania infantum* Visceral Infections in Dogs. **Clinical And Vaccine Immunology**, v.14. n. 5 p. 544–548. 2007.

RESENDE, D. M.; CAETANO, B. C.; DUTRA, M. S.; PENIDO, M. L.; ABRANTES, C. F.; VERLY, R. M.; RESENDE, J. M.; PILÓ-VELOSO, D.; REZENDE, S. A.; BRUNA-ROMERO, O.; FERNANDES, A. P.; GAZZINELLI R. T.; CAMPOS-NETO, A.;GRIMALDI JR, G. Epitope mapping and protective immunity elicited by adenovirus expressing the leishmaniaamastigote specific A2

antigen: correlation with IFN-gamma and cytolytic activity by CD8+ T cells. **Vaccine**. v. 26, p. 4585–93, 2008.

RIBEIRO, R. R.; MICHALICK, M. S. M.; SILVA, M.E.; DOS SANTOS, C. C. P.; FRÉZARD, F. J. G.; SILVA, S. M. Canine Leishmaniasis: An Overview of the Current Status and Strategies for Control. **Biomed Research International**. v. p.1-12. 2018.

ROCHA, R. D.; GONTIJO, C. M. F; ELOI-SANTOS, S. M.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; CORREIA-OLIVEIRA, R.; MARQUES, M. J.; GENARO, O.; MAYRINK, W.; MARTINS-FILHO, O. A. Anti-live *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigote antibodies, detected by flow cytometry, to identify active infection in american cutaneous leishmaniasis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. n. 35, p. 551–562, 2002.

SALOMON, O.D. Generalidades: Definición. *In*: MAIA-ELKHOURY, A.N.S. et al. (edit.) **Atlas Interactivo de Leishmaniasis en las Américas: aspectos clinicos y diagnosticos diferenciales**. Washington DC. Organización Panamericana de la Salud. p. 2-4. 2020.

SANTARÉM, N.; SOUSA, S.; AMORIM, C. G.; DE CARVALHO, N. L.; DE CARVALHO, H. L.; FELGUEIRAS, O.; BRITO, M.; DA SILVA, A. C. Challenges in the serological evaluation of dogs clinically suspect for canine leishmaniasis. **Scientific Reports**, v. 10, n.1, p.1–6, 2020.

SANTIAGO, M. A.; RIBEIRO, F. C.; MOUTA-CONFORT, E.; NASCIMENTO L. D.; SCHUBACH, A. O.; MADEIRA, M. F.; BERTHO, A. L. Differentiation between canine cutaneous and visceral leishmaniasis by the detection of immunoglobulin G specific for *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* antigens using flow cytometry. **Veterinary Parasitology**. n. 154, p. 341–346; 2008.

SCHIMING, B. C.; PINTO e SILVA, J. R. C. Leishmaniose visceral canina – revisão de literatura. **Revista científica eletrônica de medicina veterinária**. n. 19. p. 1-17. 2012.

SOLANO-GALLEGO, L.; MIRÓ, G.; KOUTINAS, A. F.; CARDOSO, L.; PENNISI, M. G.; FERRER, L.; BOURDEAU, P.; OLIVA, G. BANETH, G. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniasis. **Parasites & Vectors**. v. 4 n.86. 2011.

SOUSA, S.; CARDOSO, L.; REED S. G.; REIS, A. B.; MARTINS-FILHO, O. A.; SILVESTRE, R.; SILVA, A. C. Development of a Fluorescent Based Immunosensor for the Serodiagnosis of Canine Leishmaniasis Combining Immunomagnetic Separation and Flow Cytometry. **PLOS Neglected Tropical Diseases**. v. 7 . n. 8. p 1-7. 2013

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

TERRAZZANO, G.; CORTESE, L.; PIANTEDOSI, D.; ZAPPACOSTA, S.

Presence of anti-platelet IgM and IgG antibodies in dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **Veterinary Immunology and Immunopathology** v. 110, p. 331–337, 2006.

VALE, D. L.; DIAS, D. S.; MACHADO, A. S.; RIBEIRO, P. A. .F.; LAGE, D. P.; COSTA, L. E.; STEINER, B. T.; TAVARES, G. S.V.; RAMOS, F. F.; MARTÍNEZ-RODRIGO, A.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, M.; CALIGIORNE, R. B.; MAGALHÃES-SOARES, D. F.; SILVEIRA, J. A.G.; MACHADO-DE-ÁVILA, R. A.; TEIXEIRA, A. L.; COELHO, E. A. F. Diagnostic evaluation of the amastin protein from *Leishmania infantum* in canine and human visceral leishmaniasis and immunogenicity in human cells derived from patients and healthy controls. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 95, n. 2, p. 134–143, 2019.

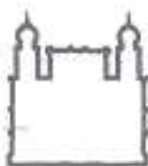
VOGT, R. V.; PHILLIPS, D. L.; OMAR, H. L.; WHITFIELD, W.; SPIERTO, F. W. Quantitative differences among various proteins as blocking agents for ELISA microtiter plates. **Journal of Immunological Methods**, v. 101, n. 1, p. 43–50, 1987.

WAKEMAN, B. S. SHAKAMURI, P.; MCDONALD, M. A.; WEINBERG, J.; SVOBODA, P.; MURPHY, M. K.; KARIUKI, S.; MACE, K.; ELDER, E.; RIVERA, H.; QVARNSTROM, Y.; POHL, J.; SHI, Y. P. Development of a new peptide-bead coupling method for an all peptide-based Luminex multiplexing assay for detection of *Plasmodium falciparum* antibody responses. **Journal of Immunological Methods**, v. 499, n. 113148, p. 1-12, 2021.

XIAO, Y.; ISAACS, S. N. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and blocking with bovine serum albumin (BSA)-not all BSAs are alike. **Journal of Immunological Methods**, v. 384, n. 1–2, p. 148–151, 2012.

ANEXO A

LICENÇA CEUA L045/2015



Instituto Oswaldo Cruz

Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/IOC

LICENÇA

L-045/2015

Certificamos que o protocolo (CEUA/IOC-044/2015), intitulado "Avaliação dos padrões celulares e imunológicos contra Leishmaniose Visceral e de cães naturalmente infectados com *L. infantum*", sob a responsabilidade de **PAULA MELLO DE LUCA** 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 01/10/2019 e inclui o uso total de:

Outro, cepa:

Cão - *Canis familiaris* – 80 animais – 40 animais machos - 40 animais fêmeas –
Acima de 4 meses - \geq 30kg

Observação: Esta licença não substitui outras licenças necessárias, como Certificado de Qualidade em Biossegurança para animais geneticamente modificados, certificado do IBAMA para captura de animais silvestres ou outros.

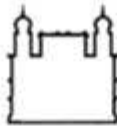
Rio de Janeiro, 21 de outubro de 2015.

Flávio Alves Lara

Coordenador Adjunto da CEUA/Instituto Oswaldo Cruz

ANEXO B

Carta do CEUA FIOCRUZ



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Vice-presidência de Pesquisa e
Laboratórios de Referência



**Comissão de Ética
no Uso de Animais**

Rio de Janeiro, October 24, 2014.

Dear Mrs.
Nazare Fernanda Morgado

The Ethics Committee on Animal Use (CEUA) of Oswaldo Cruz Foundation declares that research which uses tissues fragments after euthanasia, without animal manipulation does not need to be submitted for this Committee, according to Brazilian's Law 11794/08.



Octávio Augusto França Presgrave

Coordinator

Octavio A. F. Presgrave
Coordenador
CEUA/FIOCRUZ
SIAPE 04828550

Comissão de Ética no Uso de Animais
Vice-presidência de Pesquisa e Laboratórios de Referência - Fundação Oswaldo Cruz
Av. Brasil, 4036 – Prédio da Expansão – sala 200 – Manguinhos – Rio de Janeiro / RJ
Telefone: (21) 3882.9121 e-mail: ceua@fiocruz.br

ANEXO C

Planilha com dados clínicos dos animais

Planilha com Dados Clínicos dos Animais

Animal	Sinais Clínicos	Sexo	Ectoparasitos	Porte	Resultado Sorológico	Resultado Parasitológico	Idade (meses)	Grupo Experimental
002/2013	Alopecia Dermatite Hepatomegalia Linfadenopatia Esplenomegalia Condição corporal ruim	Macho	Não	Pequeno	DPP+/ELISA+	Positivo (234000 parasitas/10 ⁶ células)	ND	Infectado Sintomático
002/2014	Dermatite Onicogribose	Fêmea	Pulgas Carrapatos	Médio	DPP+/ELISA+	Positivo (9480 parasitas/10 ⁶ célula)	ND	Infectado Sintomático
004/2014	Dermatite Onicogribose Esplenomegalia Condição corporal ruim	Macho	Não	Médio	DPP+/ELISA+	Positivo (20300000 parasitas/10 ⁶ células)	ND	Infectado Sintomático
005/2014	Dermatite	Fêmea	Carrapato Pulga	Grande	DPP+/ELISA+	Positivo (71700 parasitas/10 ⁶ células)	ND	Infectado Sintomático
009/2014	Dermatite Ceratconjuntivite Onicogribose Esplenomegalia Condição corporal ruim	Fêmea	Pulgas Carrapatos	Médio	DPP+/ELISA+	Positivo (75600 parasitas/10 ⁶ células)	ND	Infectado Sintomático

023/2014	Dermatite Onicogribose Esplenomegalia	Fêmea	Pulgas	Médio	DPP+/ELISA+	Positivo (78100 parasitas/10 ⁶ células)	ND	Infectado Sintomático
025/2014	Alopecia Dermatite Ceratoconjuntivite Onicogribose Esplenomegalia	Fêmea	Não	Pequeno	DPP+/ELISA+	Positivo (52000 parasitas/10 ⁶ células)	ND	Infectado Sintomático
026/2014	Hepatomegalia Onicogribose Esplenomegalia	Fêmea	Carrapato	Grande	DPP+/ELISA+	Positivo (193 parasitas/10 ⁶ células)	ND	Infectado Sintomático
197/21	Onicogribose Alopecia Dermatite Condição Corporal Ruim	Macho	ND	Médio	DPP+/ELISA+	ND	ND	Infectado Sintomático
162	Caquexia Condição Corporal Ruim	Macho	Pulgas Carrapatos	Pequeno	DPP+/ELISA+	Positivo	72	Infectado Sintomático
182	Alopecia Linfadenopatia Anorexia Condição Corporal Ruim	Macho	Pulgas	Pequeno	DPP+/ELISA+	Positivo(Também qPCR+)	24	Infectado Sintomático
187	Linfadenopatia	Macho	Pulgas	Médio	DPP+/ELISA+	Positivo (Também qPCR+)	ND	Infectado Sintomático
003/2013	Linfadenopatia	Fêmea	Pulgas	Pequeno	DPP+/ELISA+	Positivo (4890 parasitas/10 ⁶ células)	48	Infectado Assintomático

15/2014	-	Fêmea	Flea	Médio	DPP+/ELISA+	Positivo (1440000 parasitas/10 ⁶ células)	ND	Infectado Assintomático
43/15	-	Macho	Não	Grande	DPP+/ELISA+	ND	36	Infectado Assintomático
52/15	-	Macho	Não	Médio	DPP+/ELISA+	ND	24	Infectado Assintomático
114/17	-	ND	ND	ND	DPP+/ELISA+	ND	ND	Infectado Assintomático
178	-	Macho	Não	Pequeno	DPP+/ELISA+	Positivo (Também qPCR+)	48	Infectado Assintomático
183	-	Fêmea	Pulgas Carrapatos	Pequeno	DPP+/ELISA+	Positivo (Também qPCR+)	48	Infectado Assintomático
C1	Linfadenopatia	Fêmea	ND	Grande	DPP-	Negativo(Também qPCR-)	66	Controle/Vacinado
C2	-	Macho	ND	Grande	DPP-	Negativo(Também qPCR-)	48	Controle/Vacinado
C3	-	Macho	ND	Grande	DPP-	Negativo(Também qPCR-)	60	Controle/Vacinado
C4	-	Macho	ND	Grande	DPP-	Negativo(Também qPCR-)	14	Controle/Vacinado
C5	-	Macho	ND	Grande	DPP-	Negativo(Também qPCR-)	31	Controle/Vacinado
C6	-	Fêmea	ND	Grande	DPP-	Negativo(Também qPCR-)	28	Controle/Vacinado
C7	-	Macho	ND	Grande	DPP-	Negativo(Também qPCR-)	31	Controle/Vacinado
C8	Linfadenopatia	Fêmea	ND	Grande	DPP-	Negativo(Também qPCR-)	72	Controle/Vacinado

C9	-	Macho	ND	Grande	DPP-	Negativo(Também qPCR-)	9	Controle/Vacinado
C22	Linfadenopatia	Fêmea	ND	Grande	DPP-	ND	60	Controle
C57	-	Fêmea	ND	Grande	DPP-	Negativo(Também qPCR-)	30	Controle/Vacinado
C58	Magreza	Macho	ND	Grande	DPP-	ND	12	Vacinado
C59	Linfadenopatia	Fêmea	ND	Grande	DPP-	Negativo(Também qPCR-)	11	Vacinado
C60	Magreza	Fêmea	ND	Grande	DPP-	Negativo(Também qPCR-)	11	Controle/Vacinado

ND: Dado não Disponível

PS1: Na coluna "Exames Parasitológicos" foram inseridas também as informações sobre a quantificação de parasitas e sobre o resultado de QPCR, quando disponíveis;

PS2: Os animais dos grupos "Controle" e "Vacinados" são os mesmos indivíduos, antes e 6 meses depois de receberem a terceira dose da vacina LeishTec®, respectivamente.

ANEXO D**QuantumPlex™ Streptavidin
(Product Data Sheet 215)**

Product Data Sheet 215

QuantumPlex™ Streptavidin

9025 Technology Dr. • Fishers, IN 46038-2006
 800.387.0672 • 317.570.7020 • Fax 317.570.7034
 info@bangslabs.com • www.bangslabs.com



BEADS ABOVE THE REST™

DESCRIPTION

The QuantumPlex™ kit is designed to be used as a multiplexing platform, allowing for the efficient, qualitative flow cytometric analysis of a sample for multiple analytes, or the high throughput screening of multiple samples.

QuantumPlex™ kits are available in five-bead sets of microspheres sized 4.4µm (Catalog Code 215), 5.5µm (Catalog Code 218), and in ten-bead sets comprised of the two (Catalog Code 219). Each five-bead set consists of five (5) bead populations internally dyed with varying intensities of Starfire Red™ fluorescent dye (fluorescent in FL3). Each bead is uniformly coated with streptavidin (SA). The SA surface allows for the easy conjugation of biotinylated antigen or antibody to the surface of each bead. The beads are then incubated with a sample and washed before a fluorescently-tagged reporter antibody is added. After a second wash and resuspension, the beads may be analyzed with a flow cytometer to determine the presence or absence of the assayed analyte.

CHARACTERISTICS

Mean Diameter: 4.4µm (Catalog Code 215) or 5.5µm (Catalog Code 218)

Particle Concentration: 1×10^7 microspheres/mL

MATERIAL

Material Supplied

- QuantumPlex™ microspheres: bottles individually in 1mL, 5mL, or 10mL aliquots

Material Required

- Biotinylated analyte or antibody specific to the analyte(s) of interest
- Buffered wash solution
- Fluorescently-labeled reporter antibody (fluorescent in FL1 or FL2)

PROCEDURE

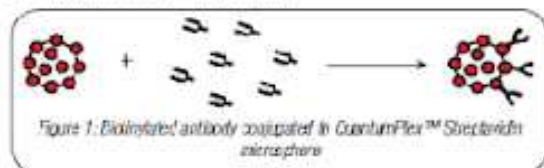
Researchers are advised to optimize the use of particles in any application.

The QuantumPlex™ kit allows for flexibility in designing individual experiments. The preparation procedure outlines the conjugation of a single biotinylated antibody to the QuantumPlex™ bead. Conjugating each of the beads to a single antibody specific to a different analyte yields a kit capable of testing a single sample for multiple analytes. The user may choose instead to conjugate antibodies of different specificities to each bead, producing a kit ideal for screening multiple samples at once. The user may further choose to conjugate antigen to the beads, yielding a kit capable of testing for the presence of a specific antibody. The specific application is to be determined by the user; it may be helpful to make a table to keep track of which antibodies have been conjugated to each bead population. The following

outline serves as a guide, and may be modified to reflect the user's specific application.

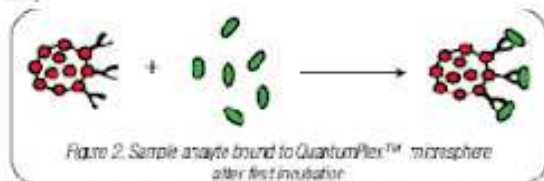
Preparation of Microspheres

- Vigorously shake or vortex the bottle prior to use to ensure uniform suspension of the beads.
- Immediately remove 10µL of solution to be labeled with biotinylated ligand. *Note:* The 10µL volume reflects the amount needed to conduct one test using the given bead population. For ease of use, the entire 1mL may be labeled all at once, and then stored for use with each test.
- Using an excess of biotinylated antigen or antibody, conjugate the antigen or antibody to the bead using established protocols. *Note:* One approach is to simply incubate the beads and the biotinylated antigen or antibody together for 30 minutes. See also *TechNote 101, ProActive® Microspheres*, for sample conjugation protocols.
- Wash the beads to remove any unbound antibody.
- Resuspend beads in ~100µL buffer.

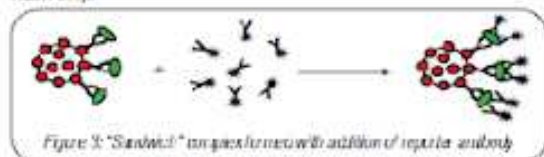


Testing Samples

- Incubate prepared beads with 100µL sample(s) for 30 minutes. (The volume of sample used may be adapted to the specific application.)
- Wash beads to remove nonspecifically bound analyte. Repeat the wash step.



- Incubate the beads with 20µL of the appropriate fluorescently-labeled antibody for 30 minutes.
- Wash beads to remove nonspecifically bound antibody. Repeat the wash step.

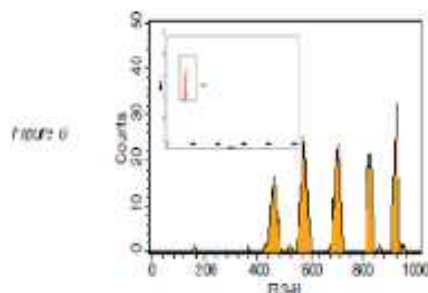
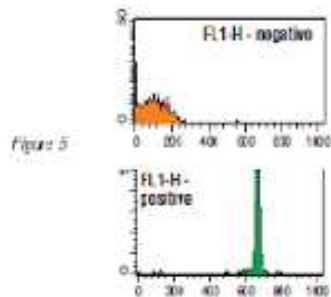
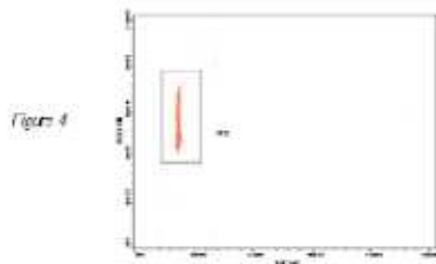


- Combine all beads in one tube and acquire data events using a flow cytometer.

PRODUCT DATA SHEET 215

Data Analysis

1. Gate on the single population(s) on a Forward Scatter vs. Side Scatter plot (Figure 4)
2. Using the FL1 and / or FL2 channels (depending on the reporter antibodies used), determine whether or not any bead populations tested "positive" for the analyte. (Figure 5) *Note:* A positive bead will produce a fluorescent peak in the FL1 or FL2 channel. The minimum fluorescence intensity needed to be considered "positive" is based on the Relative Channel Value (RCV) of the peak. It is up to the investigator to determine what threshold RCV value will constitute a "positive" result.
3. Using your flow cytometry analysis software, determine which beads produce positive results. The use of "back gating" may simplify this task. (Figure 5)
4. Based upon the beads that produced positive results, determine which samples contained the analyte, or which analytes the samples contained.

**TRADEMARKS AND REGISTERED TRADEMARKS**

1. QuantumFlex™, Starfire Red™, and ProActive® are trademarks or registered trademarks of Bangs Laboratories, Inc.
2. Tween® is a registered trademark of ICI Americas, Inc.

STORAGE AND STABILITY

Store at 2-8°C. Freezing may result in irreversible aggregation and loss of binding activity. QuantumFlex™ beads are stable for 12 months from date of purchase, provided the product is handled in accordance with the manufacturer's recommendations. The beads should be kept in the bottle in which they are shipped. Do not expose the beads to intense light sources for extended periods of time.

SAFETY

This particle suspension contains sodium azide. Sodium azide may react with lead and copper plumbing to form explosive metal azides. Upon disposal of material, flush with a large volume of water to prevent azide accumulation. Please consult the Material Safety Data Sheet for more information.

These products are for research use only and are not intended for use in humans or for *in vivo* diagnostic use.

ORDERING INFORMATION

Cat. Code	Description	Sizes
215	QuantumFlex™ Streptavidin 4.4µm (5 dye intensities)	1mL, 5mL, or 10mL
210	QuantumFlex™ Streptavidin 5.5µm (5 dye intensities)	1mL, 5mL, or 10mL
219	QuantumFlex™ Streptavidin 4.4µm and 5.5µm (2 x 5 dye intensities)	1mL, 5mL, or 10mL

Order online anytime at www.bangslabs.com.