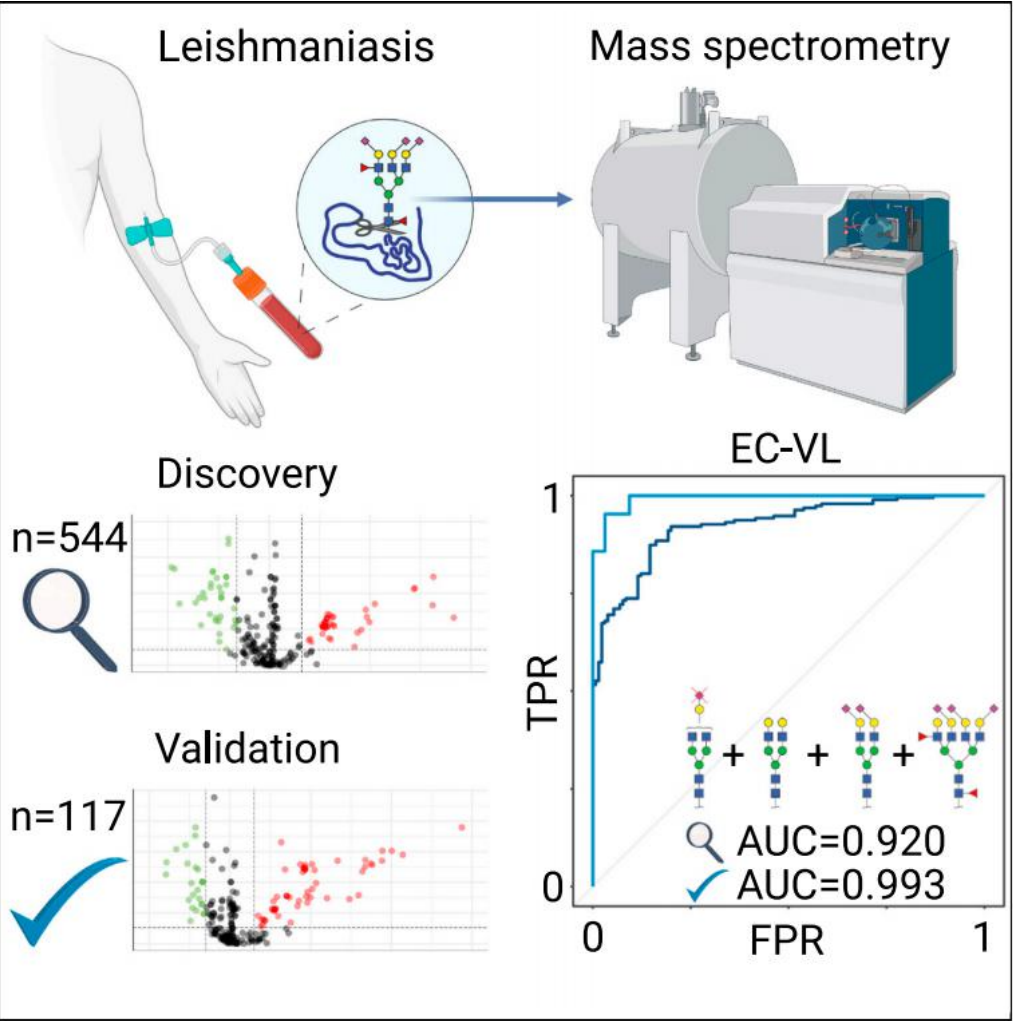


文章

总血清n-聚糖标记婴儿利什曼婴儿感染的内脏利什曼病



加布里安
鼻咽鼓管
波奇诺, 马尔科雷
内的刀轮车, 维多
利亚多兹, 罗克帕
切科德阿尔梅达,
伊莎贝尔肯尼费雷
拉德米兰达桑托斯
, 曼弗雷德·乌勒
...

m.r.bladergroen@lumc.nl
(M.R.B.)
imsantos@fmrp.usp.br
(I.K.F.d.M.S.)

亮点
内脏利什曼病 (VL) 具有明
显的N-糖体谱

VL的n-糖体谱反映了治疗反
应

无症状感染的n-糖含量与健
康对照组没有区别

n-糖聚体分析有可能作为一
种替代侵入性诊断技术的替
代方法

波奇诺等人, 《科学》
26, 107021
2023年7月21日, *2023年
作者(s)。
[https://doi.org/10.1016/
j.isci.2023.107021](https://doi.org/10.1016/j.isci.2023.107021)

文章

总血清n-聚糖标记婴儿利什曼婴儿感染的内脏利什曼病

加布里安·纳西门托·波西诺,¹马可·雷恩的品牌,^{2,*}维多利亚Dotz^{2,6}西蒙妮卡拉迪,²埃勒姆回忆,²路易斯古斯塔沃加迪纳西,³卡洛斯恩里克尼里科斯塔,⁴阿尔梅达公园,⁵伊莎贝尔·金尼·费雷拉·德·米兰达·桑托斯,^{1,7,*}和曼弗雷德·乌勒²

总结

内脏利什曼病 (VL) 是一种临床形式的利什曼病, 死亡率很高不治疗时的比率。诊断中患有侵入性技术和亚技术最佳敏感性。目前 (负担得起的) 治疗与五价抗世界卫生组织建议的费用可能对患者有害。有需要为了改进诊断, 防止可能不必要的治疗。N-聚糖分析可能有助于诊断。我们评估了活性的n-聚糖谱VL、无症状感染 (ASYMP) 和非地方性 (NC) 和流行地区 (EC)。活性VL有一个独特的n-糖基谱, 关联与疾病的严重程度。我们的研究表明, 观察到的多聚糖特征可能是一个有价值的添加剂, 以诊断和帮助确定可能的疾病的标志物和了解VL的发病机制。进一步的研究有必要评估血糖分析在主动VL诊断中的未来作用, 并应以疾病特异性为目标。

介绍

利什曼病是一种被忽视的主要热带病, 也是一种全球公共卫生问题, 因为它存在于世界98个国家, 每年有70万至100万新病例, 估计有3.5亿人面临感染风险^(1, 2 和<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>, 已于2022年12月2日访问)。在美洲, 该疾病存在于19个国家, 其中巴西是受影响最严重的19个国家。三种主要的临床形式是皮肤 (CL)、粘膜 (ML) 和内脏利什曼病 (VL)。在未接受治疗的病例中, 95% 的患者死亡率很高³这也是本研究所关注的临床形式。

婴儿利什曼原是巴西VL的病原体。⁴该疾病于1932年首次在该国被发现⁵可能是被感染了这种寄生虫的南欧或北非的人或狗带到巴西东北部地区的。⁶L的有效向量。在拉丁美洲大多数国家发现的婴儿是白蛉和主要宿主。婴儿是狗。^{7, 8}此外, 无症状感染的人类作为L。有人提出了婴儿潮。^{9, 10}

VL可以被归类为一种机会性感染, 因为它是许多HIV患者的一种合并感染¹¹众所周知, HIV感染会大量增加VL的易感性和严重程度。¹²VL的易感因素包括年龄, 其中1岁以下儿童和50岁以上成人受影响最大¹³-以及宿主的遗传背景,¹⁴营养状况¹⁵性别¹⁶和免疫抑制。¹⁷

对于无症状的感染者来说, 很难预测该疾病是否以及何时会变得活跃, 而环境、寄生虫和宿主相关因素都发挥了作用。¹⁸VL的无症状潜伏期持续时间不同, 间歇性发热、不适和颤抖是早期症状。脾肿大, 伴或不伴肝肿大, 是明显疾病的症状。^{19, 20}

诊断VL的金标准是寄生虫学检查, 显示无鞭毛体, 一种运动的, 圆形和专性形式的L。婴儿, 在活检材料中, 最好是

¹ 巴西保罗大学里贝罗普雷托医学院Imica免疫学院14049-900

² 蛋白质组学和代谢组学中心, 莱顿大学医学中心, 莱顿2333 ZA, 荷兰

³ 巴西戈尼亚联邦大学热带专利研究所74605-050

⁴ 巴西特雷西纳, 64002-510

⁵ 医学部, 波学院-PPGCS学院, 大学c
阿拉卡朱的塞尔吉普联邦49060-100, 巴西

⁶ 目前的地址: 生物治疗学分析开发, Janssen生物制剂B.V., 莱顿, 2333 CB, 荷兰

⁷ 引线接触

*Correspondence:

m.r.bladergroen@lumc.nl

(M. R. B.),

imsantos@fmrp.usp.br

(I. K. F. d. M. S.)

<https://doi.org/10.1016/j.isci.2023.107021>



从骨髓、淋巴结或脾脏的吸出物或活检中获得的。手术必须在手术条件下的医院环境中进行，然后样本可以用于涂片，Giemsa染色后检查或通过分子生物学测试进行分析。^{21, 22}在欧洲、巴西和美国使用的骨髓穿刺的缺点是难以进行手术、造成的疼痛和致命出血的风险，尽管这种方法比主要在东非和印度次大陆进行的脾脏抽吸术的风险更低。这可能会影响一些国家对骨髓抽吸的选择，尽管敏感性较低（60–85%）。^{23, 24}考虑到VL诊断的侵袭性以及相关的发病率甚至死亡率风险，需要替代或补充的，最好是是非侵入性诊断方法。

当分析以非侵入性方式获得的样本（外周血、棕黄色外套和外周血单个核细胞（PBMCs））时，显微镜的敏感性低于培养，而培养的完整诊断结果可能需要几天到几周的时间。²⁵低侵入性rK39快速条带免疫层析检测在不同的地理区域表现出不同的敏感性和特异性，影响了其对诊断的有效性。²⁴

目前还没有检测无症状感染的标准诊断。需要一种或多种不同的、可能是互补的技术来检测感染，²⁶但这些指标的敏感度仍然适中。需要更多的研究来确定有症状和无症状VL的理想生物标志物，以在高灵敏度和最低侵袭的早期检测疾病。其中一个标记物可能是血清蛋白上的n-聚糖图谱，包括免疫球蛋白G（IgG）和其他抗体。

n-聚糖是与蛋白质上的天冬酰胺残基共价连接的糖链。²⁷ n-聚糖谱深刻影响蛋白质分泌、转运、受体相互作用和调节免疫反应的生物学功能²⁸并可作为早期诊断和患者分层的生物标志物。²⁹这些聚糖的几个共同特征，被称为糖基化特征，被证明与特定的生物学功能有关。例如，我们想提到的是，低的聚焦化，低的半乳糖化和高的唾液化，以及大聚糖的增加和杂交和高甘露糖结构的减少与炎症性肠病（IBD）相关。³⁰

多年来，糖聚糖分析技术得到了改进
为研究和临床生物标志物的开发提供有价值的工具。³¹

尽管糖聚糖特征在一个反映其生理阶段的个体中是高度稳定的，³²许多疾病，如癌症和自身免疫性疾病，都会影响糖基化。^{33, 34}同样，随着年龄的增长，激素的变化和妊娠糖基化也在发生变化。^{35 - 37}

先前的一项研究表明，VL患者产生具有Fc糖基化模式的IgG，这与在其他炎症条件中发现的模式类似。因此，IgGFcn-糖基化与血清细胞因子水平、c反应蛋白以及疾病的严重程度相关。³⁸然而，其他血清蛋白的糖基化作用还没有被研究。

在这里，我们使用高通量技术分析了内脏利什曼病的总血清n-糖基化尼克。^{39 - 41}我们探讨了血清总n-糖基化和VL与存在或无症状，疾病的严重程度和治疗后的恢复，以获得潜在的潜力诊断和治疗监测的新标志物。

结果

分析途径

图1描述了所遵循的分析路径的图形表示。采用质谱法对VL患者的血清和/或血浆n-糖糖与对照组的样本进行分析。在最初收集的756份样本中，经过光谱和分析物处理，共661份以73个聚糖为特征的血清样本被纳入研究。排除是基于STAR方法部分中描述的参数。如同节所述，这些样本的一个大子集（n = 544）在2012年至2013年期间被收集，并用作发现集。其余样本于2018年采集，作为验证集。此外，来自等离子体的76个光谱

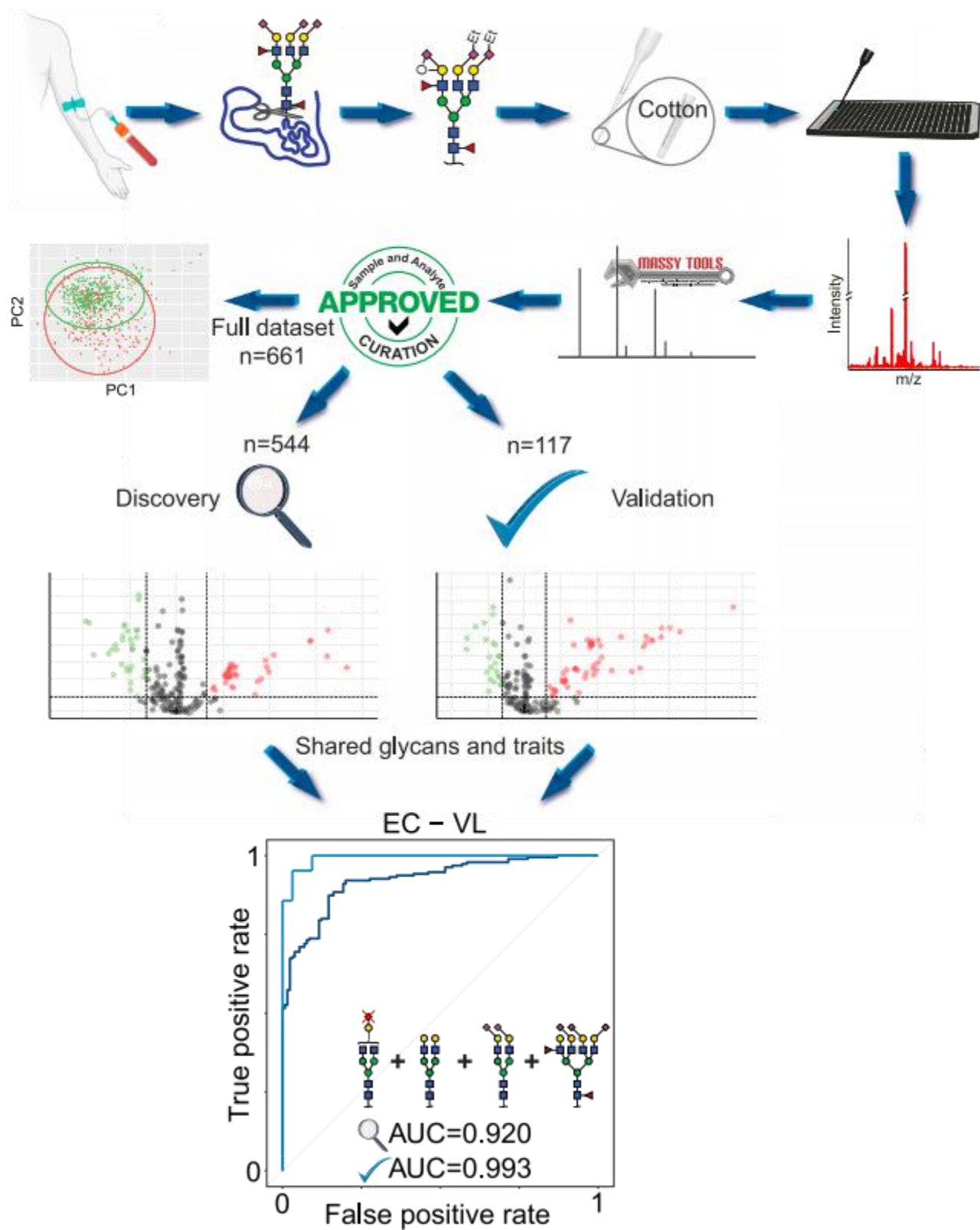


图1. 本研究中使用的分析方法的图形流程图

在收集本研究参与者的血清（或血浆）后，从蛋白质中释放聚糖，在唾液酸上衍生以适应聚糖异构体分化，用棉花HILIC纯化，并用质谱仪测量。数据使用MassyTools软件进行处理，并进行数据管理，以消除低质量的数据。对完整的数据集进行PCA分析，之后将数据分为发现集和验证集，如STAR方法部分所述。在使用Wilcoxon秩和检验进行分析物选择后，建立了一个能够区分内胜利什曼病（VL）患者和健康流行对照个体（EC）的模型。

治疗后的不同时间点被纳入了一项纵向研究。表1总结了参与者队列的特征。

为了进行重复性测试，27个合并血清样本和67个VisuCon血浆样本分布在10个样本-对25个最丰富的聚糖进行了分析，显示平均总CV为17.1%（图S1A）。

为了支持数据的有效性，并且因为我们的样本的性别分布在两组之间是不平衡的，已知的聚糖的趋势受到性别的影响^{39, 42} 经过评估，并证明与预期一致（图S1B）。

血清总n-糖糖可以区分VL和无症状的个体

采用主成分分析（PCA）检测无症状组、VL组和对照组血清总糖含量（TSNG）。拟合的总结如图S2A所示，显示了前五个主成分已经描述了数据中很大一部分的方差。PCA结果显示，TSNG可以将VL与其他三组相关患者区分开来。无症状患者与健康个体基本重叠。轻微失衡的性别分布被发现不是疾病特征的主要混杂因素。还有年龄，这是另一个已知的影响某些聚糖表达的因素，⁴³ 没有显示出任何可能表明混淆的趋势（图S2），因为年龄均匀地分布在各个生物组中。

双触角结构的唾液酸化决定了PCA的第一个维度（图S2B），但其对疾病的影响尚不清楚，因为PCA评分图中的大部分鉴别在第二个维度中可见。三和四触角结构驱动第二维度的分离，聚焦聚糖表明VL患者，而聚焦聚糖标记非表现个体（NC、EC和ASYMP）。为了更详细地调查VL患者和其他组之间的差异，我们分别使用Kruskal-Wallis检验（图2、S3和表S3A），显示了男性和女性的一致特征。

在症状发作时很少观察到聚糖差异

通过单变量分析，更详细地探讨四组感兴趣者的差异
样本队列被分为一个发现集和一个验证集（见STAR方法）。

为了更深入地了解可能出现的症状，我们首先使用Wilcoxon秩和检验来关注两个健康对照组。在流行健康和非流行健康对照组之间没有发现一致的、重复的差异。

在发现和验证集方面，三种聚糖在非流行对照和无症状对照之间存在差异。它们都属于二义的，二分的聚糖。有趣的是，当比较地方性对照与无症状患者时，没有观察到重复的糖基化差异。观察到的聚糖差异反映在杂交、单链和二链聚糖的糖基化性状上（表S3C和S3D）。

活动性内胜利什曼病中明显的n-糖体特征变化

该数据集的大部分差异是在v1患者和其他组之间观察到的（没有临床表现）（图3；表S3E和S3F）。由于非地方性和地方性控制之间的差异与疾病无关，而非地方性控制相比，地方性控制与无症状病例和活动VL更密切，因此在后续分析中忽略了后者。Wilcoxon测试显示，在发现和验证中，44个ASYMP和VL的复制聚糖和糖基化性状在ASYMP和VL之间存在显著且充分的差异

表1。 队列信息

发现（2012-2013） ^b						
组 ^a	合计	不	平均年龄，yr.（SD）	不（%）：		nr ^f
				女性	男人	
v1	190		25.7（17.8）	68（36）	111（58）	11（6）
渐近 ^e	177		36.5（17.8）	104（59）	58（33）	15（8）
执行 ^h 130 29（22）		21（16）	36.0（18.3）		80（62）	
不合格品 ⁱ 47 16（34）		12（26）	30.6（10.9）		19（40）	
验证（2018） ^b						
	合计	不	平均年龄 yr.（SD）	不（%）：		nr ^f
				雌性	男人	
VL 21 42.7（15.7）	2（10）	19（90）	0（0）			
渐近 ^e	52		39.3（14.0）	39（75）	13（25）	0（0）
执行 ^h 32 12（37）		0（0）	34.6（10.6）		20（63）	
不合格品 ⁱ 12 6（50）		0（0）	32.3（10.5）		6（50）	
已治疗的VL患者血浆 ^c						
一天 ^d	总数没有。	平均年龄，yr.（SD）		不（%）：		nr ^f
				女性	男人	
0	23		33.7（12.6）			
10（44）	9（39）		4（17）			
5	22	33.7（13.0）	9（41）	9（41）	4（18）	
90	19	35.3（13.5）	7（37）	8（42）	4（21）	
180	12	33.5（11.0）	6（50）	4（33）	2（17）	
临床严重程度 ^e						
	合计	不	平均年龄 yr.（SD）	不（%）：		nr ^f
				雌性	男人	
U-VL 49 25.8（17.9）	68（36）	110（58）	11（6）			
C-VL 82 29.1（9.1） 12（27）			17（38）		16（35）	

^a血清样本组：来自巴西东南部里贝罗普雷托保罗的非流行地区（NC）的健康个体，来自流行地区（EC）的健康个体，无症状（ASYMP）个体，以及居住在巴西东北部皮亚纳-或aracaju-塞吉佩地区的活跃内脏利什曼病患者（VL）。

^b该发现队列收集于2012-2013年。该队列的VL样本均来自上述两个地区。验证队列收集于2018年，仅使用来自特雷西纳的VL样本。

^c一项来自生活在巴西东北部特雷西纳-皮奥 ‘i或阿拉卡朱-塞尔吉佩地区的内脏利什曼病（VL）患者的纵向研究的血浆样本，与发现队列在同一时期收集。

^d表格中显示了治疗开始后的天数（0、5、90、180天）。

^e内脏利什曼病的临床严重程度分为以下类别： U-VL无并发症；根据实验室数据，C-VL有并发症，需要使用额外治疗治疗患者，包括抗生素或血液制品，有出血和死亡风险增加。

^fNR是指其性别或年龄未经登记的个人。

^g无症状个体经文献检测阳性检测。^{26,38}采用相同的方法来识别对照组。

^h来自一个流行地区的健康个体。

ⁱ来自非流行地区的健康个体通过阴性结果。

数据集（表2）。在来自VL患者的样本中（以e.g.，图2A与S3性状CF）相比，主要由核心聚焦驱动，虽然天线聚焦-

三四触角聚糖的糖基化程度也略有增加(图S3性状A3F、A3Fa、A4F和A4Fa)。对结果的详细检查表明，二触角结构的二分是减少(图2B和S3性状CB)，即使存在聚焦化。整体唾液酸化降低

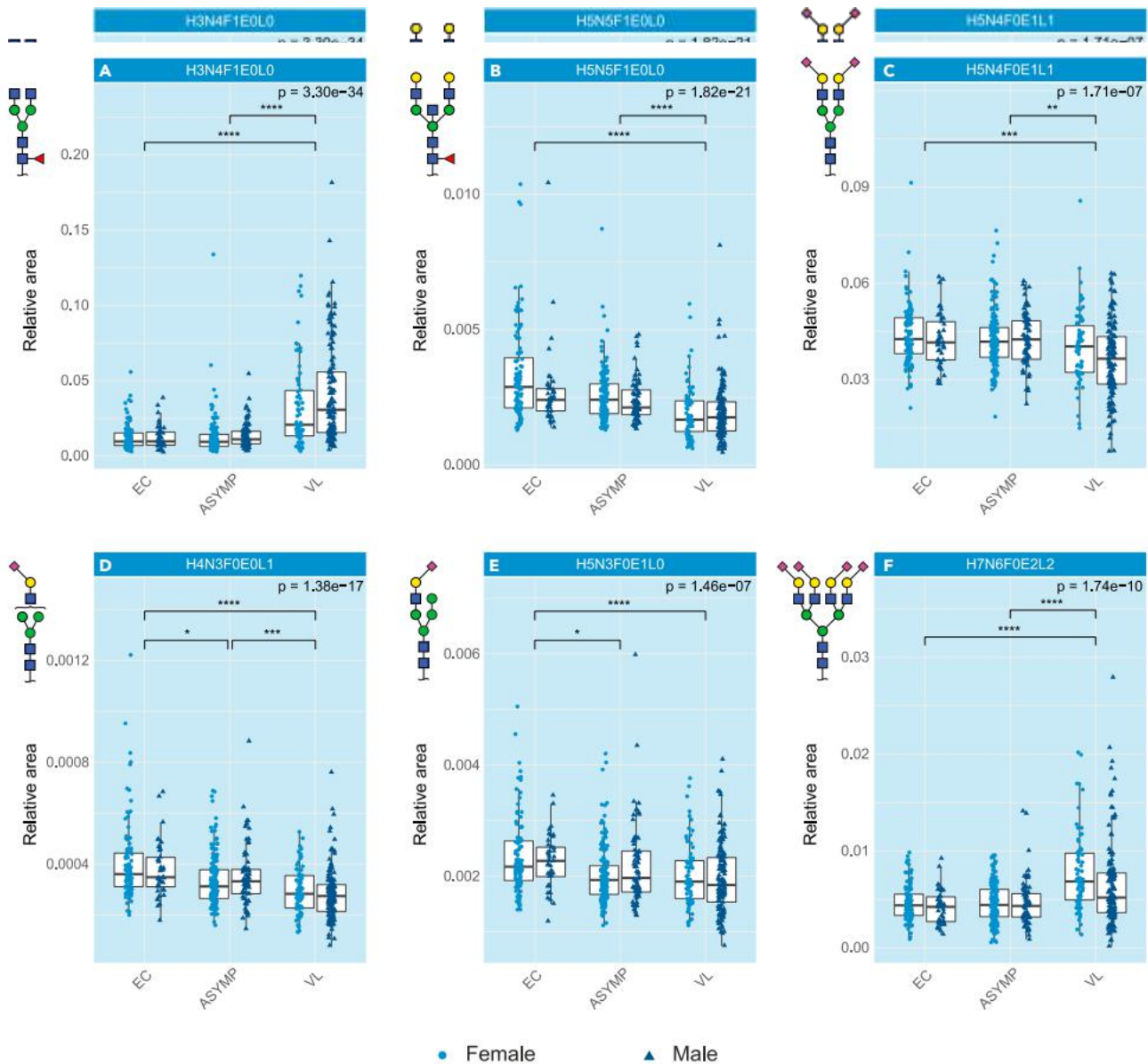


图2. n-糖基化模式在VL中发生了改变

活动性内脏利什曼病的n-聚糖特征中一组具有代表性的改变的聚糖（相对丰度）的箱线图，按性别分开。误差条表示在整个数据集的中位数（粗体中线）周围的第一和第三个分位数之外的可变性。图中的个体样本用男性的深蓝色三角形表示，女性的浅蓝色圆圈表示。

VL患者的(A)聚糖化增加；VL患者的(B)二分减少；(C)唾液酸化，(D)2,3连接和(E)2,6连接，在VL患者中减少，然而，在四触角聚糖上没有；(F)高度唾液酸化的四触角聚糖正在增加。该分析采用克鲁斯卡尔-沃利斯检验和事后Dunn检验，其显著性阈值为 $p = 5.0 \times 10^{-5}$ 。用 $p < 5.0 \times 10^{-5}$ 、 $***p < 1.0 \times 10^{-5}$ 、 $***p < 1.0 \times 10^{-6}$ 、 $****p < 1.0 \times 10^{-7}$ 表示有显著性差异。EC = 地方性控制，ASYMP = 无症状和VL = 内脏利什曼病。H=己糖，N=N-乙酰己糖胺，F=脱氧己糖（聚焦），L=内酯化N-乙酰神经氨酸（a2,3连接），E=酯化N-乙酰神经氨酸（a2,6连接）。参见图S3。数据用方框图表示，方框图显示了第0和第100个百分位数、样本中位数、第一和第三个四分位数，并用点表示个体的值。

在VL（图2C和S3性状CS）中，有一个2,6-连接的唾液酸化是这种下降的主要原因（图—虽然2,3链的唾液酸化也减少了，特别是在单链和双链上聚糖（图2D、2E和S3性状TA2E、TA1L和TA2L）。与这一趋势相反，四联体上的唾液酸化VL患者的产前聚糖含量增加（图2F和S3性状A4S），同时，触角聚糖含量增加一般的四触角聚糖（图S3性状TA4）。

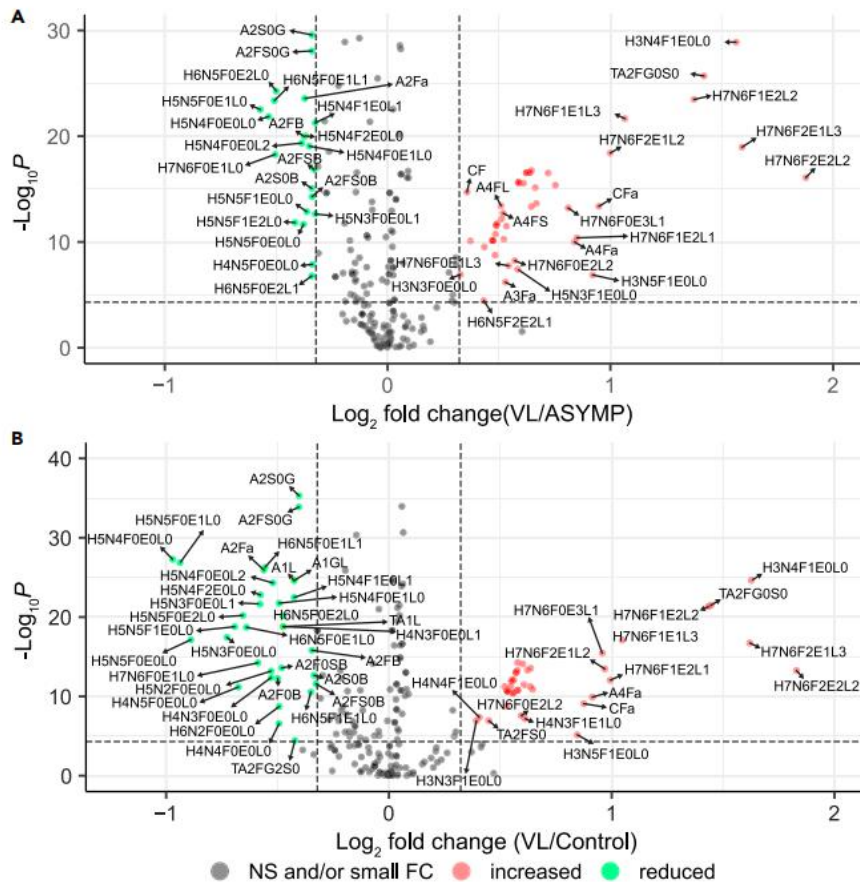


图3. VL中差异表达的糖基化特征

(A和B) (A)无症状 (ASYMP) 和内脏利什曼病 (VL) 和 (B) 之间的聚糖表达差异在总数据集上的地方性控制和 VL。x 轴和 y 轴上的值显示日志₂ (折叠变化) vs. -日志₁₀ (p 值) 分别采用 Wilcoxon 秩和检验。绿点表示显著下降 ($=5.0 \times 10^{-5}$), 至少有绝对记录₂ (倍数变化) 为 0.3, 红点表示有足够的倍数变化后显著增加。灰点表示没有重大的或充分的变化。共对 226 个变量 (聚糖和糖基化性状) 进行了分析。Wilcoxon 试验的可测试性见表 S3。H=己糖, N=N-乙酰己糖胺, F=脱氧己糖 (聚糖), L=内酯化的 N-乙酰神经氨酸 (a2,3 连接), E=E 基酯化的 N-乙酰神经氨酸 (a2,6 连接), G=半乳糖, S=唾液酸, A=天线, C=复合物, T=总。参见图 S4。

为了获得VL相对于其他样本的独特能力，使用自动特征选择进行ROC分析从发现集上共享的显著聚糖和糖基化特征中得到了一个四个参数模型（A2S0G + H5N4F0E0L0 + H5N4F0E0L2 + H7N6F2E1L2）对健康对照组和a无症状组的四参数模型（A2S0G + H6N5F0E2L0 + H7N6F0E3L1 + H7N6F2E1L2）。这些交叉验证模型的预测能力非常好，其auc分别为0.92和0.88，敏感性分别为0.854和0.859，特异性分别为0.874和0.758。将这些模型应用于验证集甚至优于发现集，auc分别为0.99和0.97（图4a和4b）。

n-糖基体不受VL的严重程度的影响

为了更好地了解活动性VL的潜在过程和疾病进展的过程，我们将VL划分组合的发现和验证集分为两个子组：不复杂（U-VL）和copy i 并伴有临床表现（C-VL）。我们这样做，因为验证集只包含两个复杂-确定的案例，这使得该集不适合进行验证。后一组包括患有额外的治疗，出血或死亡风险的增加。火山图中描述的数据（图S4C）表明，两者之间的聚糖和糖基化性状没有显著差异（表S3G）。即使是在实验级的多重测试校正的情况下（ $\alpha = 0.05 / 226 = 2.2124 \times 10^{-4}$ ），而不是研究范围内的多重测试校正，只有一个糖聚糖（H5N5F0E1L0）可以

表2。对44个共享的聚糖和糖基化性状的Wilcoxon检测结果

地方性控制 (n=162) 与内脏利什曼病 (n=211)

无症状 (n=229) 与内脏利什曼病 (n=211)

95%置信区间										95%置信区间									
特征统计计数p值					折叠变化 VL/EC					特征统计计数p值					折叠变化 VL/ASMP				
					Abs (日志2 (fc))										Abs (日志2 (fc))				
H7NF2E2L2	—	0.00033959	9332	5 61268E14	—	0.0234E-	—	2.028E-04	3 554172646	1 829513763	—	0.000324287	13062	0.02523E17	—	4 276E-	2 957398989	1	3
H3NF1E0L0	—	0.015903486	6351	2 2 090E 02	1 178E 02	3 087935911	0	0.015679955	9098	1	2 045E 02	1 193E 02	2 957398989	1	3	2 957398989	1	3	
H7NF2E1L3	—	0.000427238	8316	1.87697E17	0.04, 0.031E-02,	—	3.851E-04	3.073914738	1.620077149	—	0.000469817	12060	0.04, 0.09077E19	—	5.862E-	—	3.449E-04	0	0
3.012191827	—	0.01070709	3589522	—	2.297E-4	1 278E-02	0.0234E-04	0.01070709	0.01070709	—	0.01070709	0.01070709	0.01070709	—	0.01070709	—	0.01070709	0	0
H7NF1E1L3	—	0.001426651	8714	7 9744E18	—	1.774E-03	0.04, 0.052E-03	2.066125802	1.046928099	—	0.001450009	11100	—	2.19409E-22	—	10.47E-03	—	1.105E-03	2.091898575
1.000121245	—	0.000172145	9255	3 9 14226E14	2 341E 04	0.04, 0.142E 04	—	1.957051561	990612673	0	0.000158469	12249	—	0.000358186	15363	2 233E 04	1 323E 04	1.99725162	0
H7NF1E1L4	—	0.000421899	9718	0.849820307	0.04,	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1.802276581	—	0.000421899	9718	0.849820307	0.04,	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
H7NF0E3L1	—	0.000673024	8675	3.53983E16	—	8.466E-04	—	5.143E-04	0.941695611	0.957317055	—	0.000584096	14155	—	6.03412E14	—	7.331E-	1.929596553	0
0.010000000	—	0.000673024	8675	3.53983E16	—	8.466E-04	—	5.143E-04	0.941695611	0.957317055	—	0.000584096	14155	—	6.03412E14	—	7.331E-	1.929596553	0
A4Fa	—	0.018205959	10453	1.26988E10	—	2.464E-	—	1.245E-02	1.883238859	0.913216761	—	0.01737756	15542	—	1.00370E10	—	2.327E-	—	1.211E-02
0.018205959	—	0.018205959	10453	1.26988E10	—	2.464E-	—	1.245E-02	1.883238859	0.913216761	—	0.01737756	15542	—	1.00370E10	—	2.327E-	—	1.211E-02
H7NF1E1L3	—	0.000421899	9718	0.849820307	0.04,	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0.000421899	—	0.000421899	9718	0.849820307	0.04,	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
A4Fa	—	0.018205959	10453	1.26988E10	—	2.464E-	—	1.245E-02	1.883238859	0.913216761	—	0.01737756	15542	—	1.00370E10	—	2.327E-	—	1.211E-02
0.018205959	—	0.018205959	1045	1.26988E10	—	2.464E-	—	1.245E-02	1.883238859	0.913216761	—	0.01737756	15542	—	1.00370E10	—	2.327E-	—	1.211E-02
H7NF1E1L3	—	0.000421899	9718	0.849820307	0.04,	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0.000421899	—	0.000421899	9718	0.849820307	0.04,	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
A4Fa	—	0.018205959	10453	1.26988E10	—	2.464E-	—	1.245E-02	1.883238859	0.913216761	—	0.01737756	15542	—	1.00370E10	—	2.327E-	—	1.211E-02
0.018205959	—	0.018205959	1045	1.26988E10	—	2.464E-	—	1.245E-02	1.883238859	0.913216761	—	0.01737756	15542	—	1.00370E10	—	2.327E-	—	1.211E-02
H7NF1E1L3	—	0.000421899	9718	0.849820307	0.04,	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0.000421899	—	0.000421899	9718	0.849820307	0.04,	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
A4Fa	—	0.018205959	10453	1.26988E10	—	2.464E-	—	1.245E-02	1.883238859	0.913216761	—	0.01737756	15542	—	1.00370E10	—	2.327E-	—	1.211E-02
0.018205959	—	0.018205959	1045	1.26988E10	—	2.464E-	—	1.245E-02	1.883238859	0.913216761	—	0.01737756	15542	—	1.00370E10	—	2.327E-	—	1.211E-02
H7NF1E1L3	—	0.000421899	9718	0.849820307	0.04,	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0.000421899	—	0.000421899	9718	0.849820307	0.04,	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
A4Fa	—	0.018205959	10453	1.26988E10	—	2.464E-	—	1.245E-02	1.883238859	0.913216761	—	0.01737756	15542	—	1.00370E10	—	2.327E-	—	1.211E-02
0.018205959	—	0.018205959	1045	1.26988E10	—	2.464E-	—	1.245E-02	1.883238859	0.913216761	—	0.01737756	15542	—	1.00370E10	—	2.327E-	—	1.211E-02
H7NF1E1L3	—	0.000421899	9718	0.849820307	0.04,	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0.000421899	—	0.000421899	9718	0.849820307	0.04,	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
A4Fa	—	0.018205959	10453	1.26988E10	—	2.464E-	—	1.245E-02	1.883238859	0.913216761	—	0.01737756	15542	—	1.00370E10	—	2.327E-	—	1.211E-02
0.018205959	—	0.018205959	1045	1.26988E10	—	2.464E-	—	1.245E-02	1.883238859	0.913216761	—	0.01737756	15542	—	1.00370E10	—	2.327E-	—	1.211E-02
H7NF1E1L3	—	0.000421899	9718	0.849820307	0.04,	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0.000421899	—	0.000421899	9718	0.849820307	0.04,	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
A4Fa	—	0.018205959	10453	1.26988E10	—	2.464E-	—	1.245E-02	1.883238859	0.913216761	—	0.01737756	15542	—	1.00370E10	—	2.327E-	—	1.211E-02
0.018205959	—	0.018205959	1045	1.26988E10	—	2.464E-	—	1.245E-02	1.883238859	0.913216761	—	0.01737756	15542	—	1.00370E10	—	2.327E-	—	1.211E-02
H7NF1E1L3	—	0.000421899	9718	0.849820307	0.04,	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0.000421899	—	0.000421899	9718	0.849820307	0.04,	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
A4Fa	—	0.018205959	10453	1.26988E10	—	2.464E-	—	1.245E-02	1.883238859	0.913216761	—	0.01737756	15542	—	1.00370E10	—	2.327E-	—	1.211E-02
0.018205959	—	0.018205959	1045	1.26988E10	—	2.464E-	—	1.245E-02	1.883238859	0.913216761	—	0.01737756	15542	—	1.00370E10	—	2.327E-	—	1.211E-02
H7NF1E1L3	—	0.000421899	9718	0.849820307	0.04,	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0.000421899	—	0.000421899	9718	0.849820307	0.04,	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
A4Fa	—	0.018205959	10453	1.26988E10	—	2.464E-	—	1.245E-02	1.883238859	0.913216761	—	0.01737756	15542	—	1.00370E10	—	2.327E-	—	1.211E-02
0.018205959	—	0.018205959	1045	1.26988E10	—	2.464E-	—	1.245E-02	1.883238859	0.913216761	—	0.01737756	15542	—	1.00370E10	—	2.327E-	—	1.211E-02
H7NF1E1L3	—	0.000421899	9718	0.849820307	0.04,	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0.000421899	—	0.000421899	9718	0.849820307	0.04,	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
A4Fa	—	0.018205959	10453	1.26988E10	—	2.464E-	—	1.245E-02	1.883238859	0.913216761	—	0.01737756	15542	—	1.00370E10	—	2.327E-	—	1.211E-02
0.018205959	—	0.018205959	1045	1.26988E10	—	2.464E-	—	1.245E-02	1.883238859	0.913216761	—	0.01737756	15542	—	1.00370E10	—	2.327E-	—	1.211E-02
H7NF1E1L3	—	0.000421899	9718	0.849820307	0.04,	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0.000421899	—	0.000421899	9718	0.849820307	0.04,	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
A4Fa	—	0.018205959	10453	1.26988E10	—	2.464E-	—	1.245E-02	1.883238859	0.913216761	—	0.01737756	15542	—	1.00370E10	—	2.327E-	—	1.211E-02
0.018205959	—	0.018205959	1045	1.26988E10	—	2.464E-	—	1.245E-02	1.883238859	0.913216761	—	0.01737756	15542	—	1.00370E10	—	2.327E-	—	1.211E-02
H7NF1E1L3	—	0.000421899	9718	0.849820307	0.04,	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0.000421899	—	0.000421899	9718	0.849820307	0.04,	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
A4Fa	—	0.018205959	10453	1.26988E10	—	2.464E-	—	1.245E-02	1.883238859	0.913216761	—	0.01737756	15542	—	1.00370E10	—	2.327E-	—	1.211E-02
0.018205959	—	0.018205959	1045	1.26988E10	—	2.464E-	—	1.245E-02	1.883238859	0.913216761	—	0.01737756	15542	—	1.00370E10	—	2.327E-	—	1.211E-02
H7NF1E1L3	—	0.000421899	9718	0.849820307	0.04,	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0.000421899	—	0.000421899	9718	0.849820307	0.04,	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
A4Fa	—	0.018205959	10453	1.26988E10	—	2.464E-	—	1.245E-02	1.883238859	0.913216761	—	0.01737756	15542	—	1.00370E10	—	2.327E-	—	1.211E-02
0.018205959	—	0.018205959	1045	1.26988E10	—	2.464E-	—	1.245E-02	1.883238859	0.913216761	—	0.01737756	15542	—	1.00370E10	—	2.327E-	—	1.211E-02
H7NF1E1L3	—	0.000421899	9718	0.849820307	0.04,	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0.000421899	—	0.000421899	9718	0.849820307	0.04,	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
A4Fa	—	0.018205959	10453	1.26988E10	—	2.464E-	—	1.245E-02	1.883238859	0.913216761	—	0.01737756	15542	—	1.00370E10	—	2.327E-	—	1.211E-02
0.018205959	—																		

WONPOEIL0	0	..7924.980.757.710562245.49296706.018094108.68547.494.091.783538872023719036	27158	1 E-22	1 E-02, 2 E-02	0	0	0	36292	8 E-20	1 E-02, 2 E-02
0	0.351923245										
HSK470EOL2	0	000602187	27757	4 98381E-25	5 061E-04, 6 894E-04	0 697065025	0 520634851	0 000433998	36382	4 6518E-20	3 595E-04, 5 386E-04
0	0.765562088	0.385408708									

(在下一页继续)

表2. 继续														
地方性控制 (n=162) 与内脏利什曼病 (n=211)										无症状 (n=229) 与内脏利什曼病 (n=211)				
95%置信信变化95%置信信变化														
特点	估计	统计数字	p 价值	间隔	VL/EC	Abs (日志2 (fc)	估计	统计数字	p 价值	间隔	VL/ASYMP	Abs (日志2 (fc)		
W6XSF0E111 0 703024141	0 003485357 0.508353864	28194		5 51408E-27	2 939E-03, 3 985E-03	0 679944779	0 55651051	0 003030007		37651	4 31926E-24	2 484E-03, 3 540E-03		
A2Fa 0 000244241	28121 1 18469E 26 1 841E 04, 2 385E 04 0 677663015 0 561360059 0 00019451 37712 2 70246E 24 1 355E 04, 2 072E 04 0 772706325 0.372007887													
. 00. 63237.563, 758.670475145, 576744244, 000134029, 64265.058, 564, 774074214H5NAF2E0L0 04 0	0 001038368 0.369456204	28415		5 28256E-28	8 589E-04, 1 185E-03	27406	1 E-23	1 E-04, 1 E-04	0 04	0	36606	9 E-21	1 E-04, 1 E-04	
H5NAF0E0L0 0 690880212	0 001038368	28415		5 28256E-28	8 589E-04, 1 185E-03	0 510165943	0 970961502	0 000723915		37191	1 38707E-22	6 036E-04, 8 483E-04		

另见表S3。



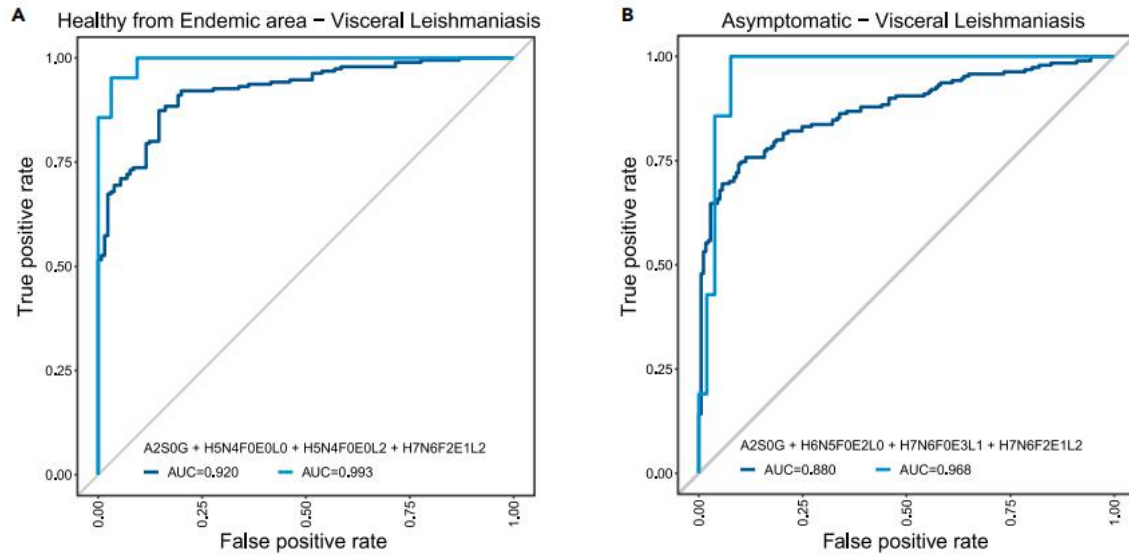


图4. VL可以通过四种糖基化性状来检测

(A和B) ROC分析显示模型建立在由使用MXM r包的SES算法确定的自动特征选择所确定的性状上。采用10倍交叉验证程序来评估预测模型的强度。然后使用一个独立的数据集对这些模型进行验证。相关的分析值见表S4。

(A) 地方性对照组vs. 内脏利什曼病和(B) 无症状与. 内脏利什曼病。深蓝色线: 由SES算法确定的交叉验证模型。浅蓝色线: 应用于验证集的相同模型。

在这些组之间有显著的绝对对数差异 2^2 (折叠变化) 至少为0.3 (在这种情况下会减少; -0.515), 可能还有另一个具有绝对对数的变化 2^2 (折叠变化), 略低于0.3 (H6N5F1E1L0; -0.298)。ROC分析证实了这一结果 (图S5C)。所得到的单参数模型 (H6N5F1E1L0) 的预测性较差, AUC为0.60。有趣的是, 在本ROC分析中没有选择H5N5F0E1L0作为鉴别器。

在VL处理后, n-糖体恢复到基础水平

为了评估治疗和疾病恢复时的糖基化变化, 我们评估了治疗开始后第0、5、90和180天患者血浆样本中糖聚糖水平的差异。随着时间的推移, 样本数量的减少是由于不幸的是, 患者没有在指定的时间点返回医院。因此, 样本数量太少, 无法进行统计分析。然而, 我们观察到了一些趋势。在治疗中, 大多数糖基化模式恢复到在健康对照组中观察到的情况。总的来说, 四触角聚糖上的唾液化 (图5A、5B、5C和5F) 和唾液化 (图5G) 随着时间的推移而减少, 而二触角聚糖上的2、3和2、6连接的唾液化则增加 (图5D和5E)。聚焦双触角结构的二分显示VL患者的减少, 随着时间的恢复而增加。

讨论

TSNG分析提供了一个强大的特征, 可以将VL与无症状和地方性对照区分具有非常高的敏感性和特异性 (ASYMP和EC的auc分别为0.88和0.92)。鉴于目前VL诊断方法的侵袭性, 血糖分析可能为进一步评估和可能实施VL诊断提供一种有前途的方法。血糖分析可以从干燥的血点中进行, 并提供与血清或血浆血糖学分析获得的血糖特征非常相似。

⁴⁴ 因此, 有必要对活性VL临床队列和类似临床表现条件下的干血点血糖分析进行进一步研究, 以评估其补充或替代当前侵入性诊断程序的潜力。此外, 为了临床实施, 血糖分析必须从高端质谱转移到e. g., 微量滴度板测定法。

31, 41, 45

在我们的研究中, 我们包括了来自流行地区和非流行地区的健康对照组。分析表明, 这两组之间的差异指向了参与

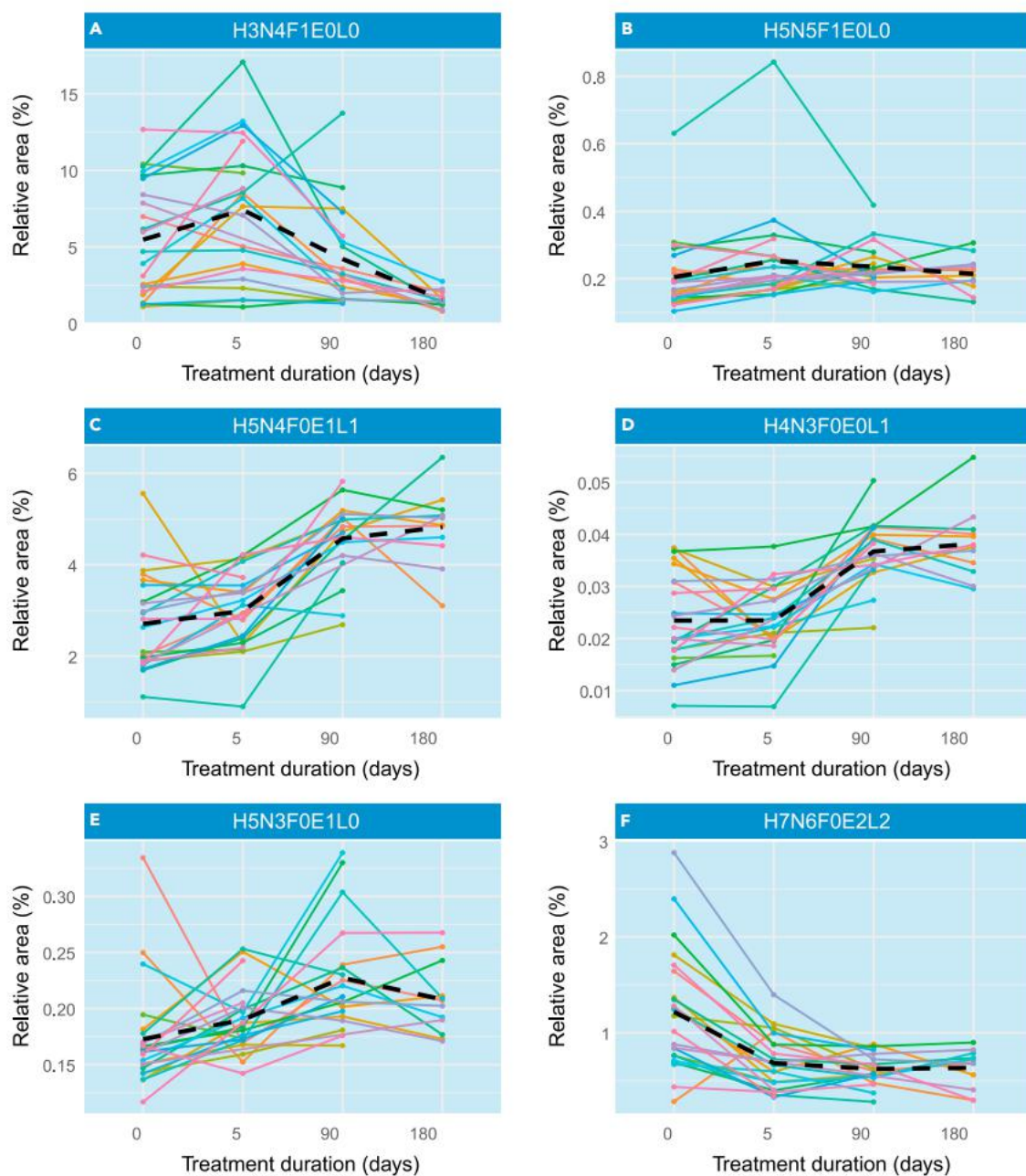


图5. VL患者的n-糖基体的变化在治疗后得到恢复

内脏利什曼病患者血浆样本中n-糖体特征的变化。意大利面图显示了如图2所示的相同的代表性聚糖集，每一行代表了一个个体在治疗开始后不同时间点的n-聚糖特征。黑色虚线表示个体之间的平均值。

(A - F) H3N4F1E0L0, B) H5N5F1E0L0, C) H5N4F0E1L1, D) H4N3F0E0L1, E) H5N3F0E1L0, F) H7N6F0E2L2 .H=己糖, N=N-乙酰己糖胺, F=脱氧己糖(聚糖), L=内酯化N-乙酰神经氨酸(a2,3连接), E=乙酯化N-乙酰神经氨酸(a2,6连接)。

免疫球蛋白类然而，大多数这些差异都无法得到验证。因为这些差异显然不是v1引起的，它们可能是由生活方式和/或环境的不同引起的，就像以前一样举行示威游行⁴⁶生活在世界流行地区的人可能会经历更高的病原体暴露率一般会导致更高水平的蛋白质参与保护来对抗它们。因为流行的对照组与无症状和活动性VL病例更密切相关，并排除了引入的偏倚通过人口统计学差异，我们决定在进一步的比较中排除非流行病控制。

根据这一推理，我们想强调的是，下面描述的讨论应该被认为是针对正在研究的种群和寄生虫物种的。

内脏利什曼病在其慢性病程中表现为系统性红斑狼疮的临床体征，⁴⁷ 如肝、脾肿大，以及全血细胞减少⁴⁸ 而该疾病的临床状态与全身性炎症反应直接相关。^{49, 50} 众所周知，肝病的进展与血清蛋白的特异性糖基化改变有关。例如，在肝细胞癌中，一种具有肝损伤和炎症高风险的疾病，核心聚焦水平会增加。⁵¹ 铜绿假单胞菌是一种机会性革兰氏阴性病原菌，其核心聚焦水平升高患者的血清n-糖（与影响肺和肝的囊性纤维化密切相关）。⁵² 核心聚焦水平在晚期胰腺癌中也会增加，然而，该研究的作者表明，其生物学功能似乎与疾病本身有关，而与炎症无关。⁵³ 类似的聚糖谱已经被描述为（自身）炎症性疾病，如类风湿性关节炎⁵⁴ 和克罗恩病，^{30, 55} 其中三触角结构的聚焦，作为炎症标志，升高。在这种程度上，我们在核心和天线上的聚焦增加的结果，证实了所有这些观察结果，表明炎症通路参与了很大程度。如前所述，L. 婴儿导致VL患者循环免疫球蛋白升高。^{56, 57} 有趣的是，患有登革热病毒的患者⁵⁸ 和COVID19⁵⁹ 降低了疾病特异性igg的核心聚焦水平。这种减少与包膜病毒特别相关。核心聚焦减少的生物学功能与FcγRIIIa的过度激活有关，这导致免疫细胞的过度反应，增加抗体依赖的细胞毒性（ADCC）和细胞因子风暴。⁶⁰ 由于我们在TSNG中观察到相反的聚焦反应，并且在VL患者的总IgG中也观察到类似的聚焦增加，³⁸ 研究利什曼原虫特异性IgG的聚糖谱将是有趣的，特别是严重病例，因为这些促炎反应也在严重VL的患者中观察到⁴⁹ 它们可能与特定igg的聚焦作用降低有关，从而解释了这一现象。值得注意的是，与未感染的控制或无症状的个人，在患者呈现活动VL基因的转录谱表达在外周血白细胞注释成白细胞趋化过程，中性粒细胞激活和B细胞受体激活下调，然而，另一方面，上调基因主要丰富到NK细胞毒性的网络过程，⁶¹ 这表明了FcγRIIIa的参与。

除了增加聚焦化外，炎症糖基化模式的其他变化还包括二分化、半乳糖化和唾液酰化的变化。首先，二分，我们的结果与一项关于血小板减少的研究一致，该疾病的治疗导致二分增加，表明症状发展时二分减少。⁶² 另一方面，在临床结果最严重的脑膜炎患者中，二分率明显更高。⁶³ 二分法还可以区分引起菌血症的病原体，⁵² 这可能反映了它们的微生物相关分子模式和各自激活先天免疫信号通路的优势的差异。

关于半乳糖化和唾液酰化，我们的研究结果与之前在其他炎症性疾病中的发现一致。在抗中性粒细胞胞浆抗体水平较高的复发性血管炎患者中，也观察到总IgG唾液化、半乳糖化和二分化减少，聚焦化增加。⁶⁴ 先前的工作的免疫球蛋白分子的糖基化模式VL患者也显示减少二分，唾液化和半乳糖化，特别是Fc部分的免疫球蛋白亚类在VL患者和无症状的个体，虽然减少最后一组不那么明显，TSNG与我们的发现一致。有趣的是，在我们的数据中观察到的半乳糖化的减少主要是由于对二触角聚糖的影响和由于a2,6-连接唾液酸的减少而导致的唾液酰化的减少。这些结果与免疫球蛋白在人体中包含大量的蛋白质和IgGs的Fc部分携带双链聚糖这一事实相一致。³⁸ 当存在时，IgG上的唾液化几乎完全是2,6连接的。两种观察结果都表明与IgG糖基化有很强的关系。⁶⁵ 此外，还提出了半乳糖化作用减少与年龄和炎症性疾病之间的联系。³⁶ 由于复杂病例组的平均年龄相对较低（23岁），且IgG的促炎作用与无乳糖基化结构的增加有关，⁶⁶ 我们假设所观察到的半乳糖基化的变化是VL的炎症谱的结果。

上述结果都表明免疫球蛋白及其糖基-的巨大贡献
血液糖基化特征。关于高丙种球蛋白血症，人们可以推测
特异性抗体糖型可能有助于炎症和调节免疫(以几乎相同的方式
血清细胞因子的总体水平决定了免疫谱和临床结果)。此外
在研究结果中也有一些疾病特异性变化的迹象。触角的增加
已被观察到，特别是四触角结构。这与普遍的下降是相矛盾的
在半乳糖化和唾液酸化过程中，这些糖基化性状显示出四触角聚糖的增加
同样，这对于唾液酸化也不是连锁特异性的。问题仍然是是否有数量的变化
触角表明了一种疾病特异性的现象，因为这种过程也已被确定在
表现出不同来源的炎症的患者。例如，在炎症介导的处理过程之后，
各种炎症糖蛋白的碳水化合物结构从甘露糖型转变为二、三型
和四产前聚糖。⁶⁷此外，有报道称，-1酸糖基上的聚糖
蛋白质(AGP)是人类主要的急性期蛋白之一，在急性期反应中被修饰，
从双三和四触角分支增加聚焦和唾液化。类似的修改
在一些炎症疾病中，AGP的增加和聚糖结构的分支的增加也有报道
如哮喘和类风湿性关节炎等疾病。⁶⁸有趣的是，肝硬化患者AGP聚焦
化更高。据报道，a2,3和a2,6-唾液化水平普遍增加
许多疾病所共有的炎症标志物。⁶⁹例如，在自身免疫性疾病中，是炎症性疾病
肠道疾病和急性炎症的高分支与唾液化增加已经
描述³⁰

唾液酸的存在已被报道在前鞭毛虫和在无鞭毛虫的形式
利什曼原虫。然而，在寄生虫中检测这些糖分子仍然值得问题，因为
寄生虫获得唾液酸的生物合成机制还不清楚，而且大多数的
研究是在多诺瓦尼的利什曼原虫中进行的，而没有考虑到利什曼原虫的种类是
在分子和毒性方面的异质性。尽管如此，人们已经证明了L.多诺瓦
能否在环境中的各种刺激下吸附唾液聚糖来弥补不足
唾液酸的⁷⁰卡瓦尔坎特等人也回顾过。和科利，以逃避宿主的免疫力。^{71,72}这样的机械
因此，nisms可以解释患者蛋白质中含唾液酸聚糖的减少
与VL。对于感染P.假单胞菌⁷³在这里，
细菌表达一种唾液酸酶，可以从宿主的糖蛋白中切割唾液酸残基
从而促进了与宿主细胞的粘附，而这被宿主细胞上的唾液化聚糖所抑制
表面Khatua等。也报道了P.铜绿假单胞菌能够吸收宿主a2,3和a2,6-唾液多糖-
蛋白质，从而降低中性粒细胞活性，增加P.假单胞菌⁷⁴

我们的结果也可能最终提供一种机制来解释早期的发现，即VL
患者含有的因素可提高L的3-5倍。多诺瓦尼
与正常人血清相比，补体的有效途径。⁷⁵另一个观察结果
在利什曼病发病时，涉及到结束溶解途径。⁷⁶寄生虫特异性IgG抗体诱导
利什曼原虫(和其他锥虫)的溶解。⁷⁷唾液酸对保护寄生虫至关重要
抵御主机补体系统的攻击，⁷⁸类似于，例如，奈瑟菌
淋球菌，保护激活甘露糖结合凝集素(MBL)补体和sia死亡
在寄生虫的外鞭毛虫和锥虫形式中的裂解化，阻止裂解性的结合
抗半乳糖抗体。⁷⁹有趣的是，如果利什曼原虫感染在细胞中的成功
依赖于唾液酸，寄生虫吸附它的能力越强，寄生虫的增殖能力就越大
而且，可能会对宿主造成更大的伤害。不幸的是，到目前为止，对糖基化的更深入的分析
与感染的严重程度关系并没有阐明这种密切的关系，在这种背景下，抗原-
必须检测特异性抗体。进一步可能的机制，可能是套索的基础
TSNG谱与L。在本研究中看到的婴儿就是结果
L的相互作用。婴儿特异性抗体与吞噬细胞上的几个受体介导这一点
过程(审查在⁸⁰)，以及可能是由
IgG Fcs受体存在于许多病原体上，包括锥虫病原体。⁸¹

虽然不显著，但两个最有前途的聚糖与疾病严重程度是在无症状病例中已经略有减少，而在VL患者中总体上显著减少。如果我们在无症状组和对照组旁边分别绘制两个严重程度组(图S5A和S5B)可见，H5N5F0E1L0呈明显的下降趋势，随着严重程度的增加而下降

H6N5F1E1L0的减少几乎完全导致严重疾病。无症状组和无聚糖的平均值在无症状组之间相似，与健康对照组相比已经略有降低，在复杂VL组中最低。因此，我们假设这些聚糖受到疾病的严重程度的影响。不幸的是，正如ROC分析所示，这种变化并不足以明显地作为预测标记。这一点的生物学意义仍不清楚。此外，值得注意的是，上述所有变化似乎在治疗后会恢复。

我们的研究是由两个主要问题驱动的。其中一个问题涉及到VL感染和严重性的可预测性和早期诊断。使用本文描述的方法，由于（单变量）分析没有产生足够的一致和重复的差异，因此对无症状病例的早期检测似乎是不可能的。尽管如此，在一个流行地区进行一项纵向研究，跟踪无症状感染L。婴儿。

我们的第二个问题是聚糖分析是否有潜力替代现有侵入性技术的可能性。ROC分析表明，可以建立良好的模型来区分健康对照和无症状病例。在这两种情况下，这都产生了一个四参数模型。有趣的是，两个模型之间共享了两个参数。因为比较VL与健康对照组的模型作为诊断工具具有最合理的医学意义，我们认为四个参数EC-VL模型（A2SOG + H5N4F0E0L0 + H5N4F0E0L2 + H7N6F2E1L2）是最后一个，尽管ASYMP-VL模型在验证集中表现稍好。这可能是由于不同的样本分布或不同的诊断标准造成的。将需要使用新的样本进行持续的调查来强制执行我们的模型。聚糖分析可能是一种很好的替代现有的方法，因为它对患者的侵入性较小。然而，问题仍然是，该模型是针对疾病的，还是鉴于上面讨论的研究结果，是一般疾病现象的表现。因此，其诊断潜力应通过更多的VL患者样本和相关临床对照的交叉验证（e.g., 影响肝脏的全身性炎症性疾病，如狼疮，⁴⁷以及涉及骨髓的肿瘤，如多发性骨髓瘤，⁸²等）目前值得一提的是，VL可能与狼疮和淋巴瘤相混淆，如果由于这种混淆而不及及时治疗，这对VL患者可能是致命的。这些适当的控制还应包括无VL但患有VL并发疾病的患者，如艾滋病毒、麻风病和恰加斯病，以排除交叉反应性；需要进行更多的研究，在可预测性方面，将涉及相似表型的多种疾病相互比较。

同样值得强调的是，即使在治疗成功和免疫抑制的情况下，如果有活的寄生虫，VL也可能发生复发。⁸³除此之外，有VL病例存在抗体治愈，有一些病人不能产生足够的抗体，从而限制复发的诊断或预测治疗抗体测试如rK39快速带免疫层析测试和ELISA。²⁴从这个意义上说，我们的结果表明，糖组特征反映了治疗反应，总血浆n-糖组特征（TPNG）分析（或TSNG分析）可用于监测治疗成功，并最终检测复发。最后，由L。婴儿是一种人畜共患疾病，狗是水库。然而，尽管没有科学证据支持扑杀血清阳性的犬以减少VL的发病率，无症状的犬表现为低寄生性，而有症状的犬与皮肤、骨髓和脾脏等各种组织中的高寄生虫负荷相关。^{84, 85}狗的诊断面临着与人类相同的问题，它可能也值得研究这个宿主中的tsng，以更好地确定这个物种中人类事实上的动物宿主。

综上所述，TSNG可以成为一种具有高灵敏度和特异性的VL检测工具，因为活性VL与健康对照或无症状病例的区分是明确的，而复杂和非复杂VL之间的TSNG特征似乎基本相同。对于无症状感染的L。婴儿，尽管与对照组（EC）相比，这一组（ASYMP）的一些结构似乎略有下降，但它们的变化没有足够的统计能力作为感染的生物学标志，也不存在一个亚组进化为VL的风险。n-糖基特征的变化与核和天线聚焦的增加和二触角聚糖的半乳糖化和唾液化的减少有关，这已经被描述为其他具有炎症特征的疾病，主要是那些

与肝损伤有关。此外，天线的增加以及半乳糖基化作用的增加这些更大的聚糖的唾液酸化可能与活性VL的炎症有关。因此，VL的整体糖聚糖谱具有炎症特征，这有助于了解其发病机制如果更好的探索，表明治疗和复发检测的潜在靶点。直到现在，无法确定疾病的特定特征，这需要进一步的研究。

研究的局限性

值得注意的是，2013年和2018年的发现表明，感染具有不同的策略验证集是由于监管标准的变化：黑山皮肤试验试剂用于引起寄生虫特异性的迟发性皮肤超敏反应，是诊断感染的方法之一与L。婴儿，在2013年后停用。这就需要开发一种新的分析方法，基于血液白细胞释放选定的细胞因子。²⁶ 在分配策略上的差异可能会有影响导致了分配准确性的差异，这可能部分解释了验证优于验证的原因发现。对这种优异表现的第二个贡献可能是由于样本中的差异EC与VL在发现集（2：3）和验证集（3：2）中的分布。然而，这反映了公共卫生监测中VL发病率的预期波动。⁸⁶

此外，尽管观察到的VL与健康或无症状对照组之间的差异是令人惊讶的是，它们并没有阐明疾病的特异性。为此目的，进一步与不相关的差异进行比较需要缓解类似的表型或定期观察到的合并感染。

星+方法

具体方法见本文在线版，包括：

d KEY资源表

d资源可用性

B铅接触

B材料可用性

B数据和代码的可用性

d实验模型和研究参与者的细节

d方法详细信息

B患者招募和样本收集

B化学品和试剂

BN-聚糖释放

B质谱分析的衍生化、纯化和制备

B有害质谱和质谱数据的预处理

B数据处理

d量化和统计学分析

补充信息

补充信息可以在<https://doi.org/10.1016/j.j.2023.isci.107021>上找到。

确认

这项研究得到了来自美国高等学校的资助ão Paulo Research Foundation (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, 编号2015/07820-9和19/19789-0. K. F. M. S.), 一个学者从FAPESP (编号2016/18527-3, 到G. N. P.), 一个海外研究实习奖学金BEPE/FAPESP (编号2019/15738, 至G. N. P.) 和国家科学委员会和技术发展 (CNPq) (编号302571/2015-9, 至C. H. N. C. 309776/2018-0至R. P. A.). 资助者没有参与研究设计、数据收集和解释，也没有决定提交研究出版工作。

我们要感谢所有的志愿者和研究参与者提供的身体材料。此外，我们感谢博士。Oleg A. 梅博罗达和博士。感谢Rico Derks在统计分析方面的帮助和建议。

作者贡献

概念化，我。K.F.M.S.和G.N.P.；方法，G.N.P.，E.M.和V.D.；调查，G.N.P.，M.B.，和S.N.；资源，L.G.G.，C.H.N.C.，R.P.A.，和我。K.F.M.S.；验证，G.N.P.和M.B.；正式分析，G.N.P.和M.B.；写作-初稿，G.N.P.和M.B.；写作-评论和编辑，G.N.P.，M.B.，I.K.F.M.S.和M.W.；资金收购，我。K.F.M.S.，G.N.P.，C.H.北卡罗来纳州和R.P.A.；监督，V.D.，I.K.F.M.S.和M.W.所有作者都阅读并批准了该手稿的最终版本。

利益声明

作者声明没有任何相互竞争的利益。

包容与多样性

我们支持包容性、多样化和公平的研究行为。

收稿日期：2023年2月8日

修订日期：2023年4月7日

接受：2023年5月30日

出版：2023年6月5日

参考文献

1. S. Burza, 克罗夫特. L. 和 Boelaert. (2018). 利什曼病。柳叶刀 392, 951–970. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31204-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31204-2).
2. Pisarski, K. (2019). 人畜共患寄生虫病的全球疾病负担：需要优先考虑的前5大竞争者。Trav. 医学感染。分离4, 44. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed4010044>.
3. 埃雷拉, 巴拉格, N. 卢娜, Mart 'inez, D., 马蒂诺, 麦地那, 倪, 爸爸, L. Ram 'irez, A., 维加, L., 等人. (2020). 一个关于美洲利什曼原虫物种分布的交互式数据库。科学。数据 7, 110. <https://doi.org/10.1038/s41597-020-0451-5>.
4. 威尔逊, M. E., 杰罗尼莫, S. M. B., 皮尔逊, R. D. (2005). 内脏性利什曼原虫感染的免疫发病机制。麦克罗布。Pathog. 38, 147–160. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2004.11.002>.
5. 查加斯, E. (1936). 在巴西的内脏利什曼病。科学 84, 397–398. <https://doi.org/10.1126/science.84.2183.397>.
6. Maur 'icio, 我. L., 斯托塔德, J. R. 和 Miles. A. (2000). 一种奇怪的利什曼原虫病。寄生虫。今天 188–189年. [https://doi.org/10.1016/S0169-4758\(00\)01637-9](https://doi.org/10.1016/S0169-4758(00)01637-9).
7. 巴达罗, R., 琼斯, T. C., 洛雷诺, R., Cerf, B. J. 博士, 桑帕约, 卡瓦略, M., Rocha, 特谢拉, 和约翰逊. D., 小. (1986). 对巴西一个流行地区的内脏利什曼病的前瞻性研究。J. 感染。分离 154, 639–649. <https://doi.org/10.1093/infdis/154.4.639>.
8. 埃文斯, T. G., 特谢拉, M. J., 麦考利夫, 我. T. I., 瓦斯康塞洛斯, A. W., 苏萨. 德阿, 利马, J. W. 和皮尔森, R. D. (1992). 巴西东北部内脏利什曼病的流行病学。J. 感染。分离 166, 1124–1132. <https://doi.org/10.1093/infdis/166.5.1124>.
9. 科斯塔, C. H. N., 斯图尔特, J. M., 戈麦斯, R. B. B., Garcez L. M., 拉莫斯, P. K. S. Bozza, M., 美国, 桑托斯, R. S., 席尔瓦, M. R. B., 以及其他 (2002). 无症状的人类利什曼原虫携带者。是 J. 太医学 Hyg. 66, 334–337. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2002.66.334>.
10. 莫利纳, M., la-Mart 'inez, 圣马特, in, 卡里洛, E., 萨恩切兹, C., 莫雷诺, in., 阿尔维斯, F., 和阿尔瓦, J. (2020). 无症状和有症状的人类作为地中海地区内脏利什曼病的宿主的作用。PLoS 忽略了 Trop. 分离 14, e0008253. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008253>.
11. 阿尔瓦, 阿帕里西奥, 阿塞法, A., 登布尔, 加州, C., Dedet, JP. 格拉多尼, 特雷斯特, 罗, 和莫雷诺, J. A. (2008). 利什曼病和艾滋病之间的关系：第二个十年。Clin. 微生物。发动机的旋转 21, 334–359. <https://doi.org/10.1128/CMR.00061-07>.
12. Roatt, B. M., Aguiar-Soares, R. D. d. O., Coura Vital, W., Ker, H. G., 莫雷拉, N. d. D., 维托里亚诺-苏萨, 吉安凯蒂, R. C., 卡尔内鲁 C. M., Reis, A. B., 和 Reis A. B. (2014). 内脏利什曼病的免疫治疗和免疫化疗：对这种被忽视的疾病的有前途的治疗方法。前面免疫学. 5, 272. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00272>.
13. de Araujo V. E. M., 莫莱, M. H. F., 里斯, 我. A., A., 和卡内罗, M. (2012). 与内脏利什曼病死亡相关的早期临床表现。PLoS 忽略了 Trop. 分离 6, e1511. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001511>.
14. 布莱克威尔, J. M. (1996). 对利什曼氏菌感染的遗传易感性：对小鼠和人类的研究。寄生虫学 112, S67–S74.

15. Malafaia, G. (2009). 蛋白质-能量营养不良作为内脏利什曼病的一个危险因素：一篇综述。寄生虫免疫。31, 587 - 596. <https://doi.org/10.1111/j3024.2009.01117.x>.
16. 科塔, G., 厄伯, A. C., 谢恩哈默, 西米斯, T. 等. (2021). 巴西内脏利什曼病病死率的不平等：一个考虑空间、时间、个人和背景因素的多层次模型。PLoS忽略了Trop. 分离15, e0009567. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009567>
17. 查普伊斯, 桑达尔, 海, 加, 加, 里哈尔, 皮林, 等. W., Alvar, J., 和博拉尔特, M. (2007). 内脏利什曼病：诊断、治疗和控制需要什么？Nat. 发动机的旋转微生物。5, 873 - 882. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1748>.
18. 辛格, P., Hasker, E., 萨克斯, D., 博拉尔特, M., 和桑达尔, S. (2014). 无症状利什曼原虫感染：利什曼原虫控制的一个新挑战。Clin. 感染。分离58, 1424 - 1429. <https://doi.org/10.1093/cid/ciu102>.
19. 默里, H. W., 伯曼, J. D., 戴维斯取自父名 C. R. 和萨拉维亚, N. G. (2005). 利什曼病的研究进展。柳叶刀366, 1561-1577. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67629-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67629-5).
20. 罗德里格斯, 科代罗-达-席尔瓦, 拉福格, 西尔维斯特和埃斯塔奎尔. (2016). 内脏利什曼原虫感染期间的免疫调节。寄生虫向量9118. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1412-x>.
21. Aronson, N., Herwaldt, B. L., Libman, M., 皮尔逊, R. 韦雷兹, 维纳, P., 卡瓦略, E. M., Ephros, M., 杰罗尼莫, S., 和马吉尔, A. (2016). 利什曼病的诊断和治疗：美国传染病学会 (IDSA) 和美国热带医学和卫生学会 (ASTMH) 的临床实践指南。Clin. 感染。分离63, e202 - e264. <https://doi.org/10.1093/cid/ciw670>.
22. Reimo, J. Q., 科瑟, E. M., 李, M. R. 和 Coelho, C. (2020). 皮肤和内脏利什曼病的实验室诊断：目前和未来的方法。

- 微生物8、1632。
<https://doi.org/10.3390/microorganisms8111632>.
23. 范格里斯文和迪罗。(2019). 内脏利什曼病: 诊断和治疗方案的最新进展。感染。分离Clin. 33, 79 - 99. <https://doi.org/10.1016/j.2018.idc.10.005>.
24. 杰特利, S., 拉纳, 可汗, S., 泽巴, J., 哈桑, M. 和卡普尔, P. (2013). 一名青少年男性的骨髓阴性内脏利什曼病。伊朗J. 寄生虫学. 8, 182 - 185.
25. Diro, E., Yansouni, C. P., Takele, Y., 孟格莎, B., 丽莲, 李., 海陆, A., 范格里斯文, 博拉特, 和P. (2017). 在埃塞俄比亚, 使用外周血显微镜诊断内脏利什曼病: 一项前瞻性的iii期研究, 研究了不同浓度技术与组织抽取相比的诊断性能。是J. 太医学Hyg. 96, 190 - 196. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0362>.
26. 波西诺, G. N., 卡瓦略, K. S. S., Braz, D. C., 科斯塔-席尔瓦, 科斯塔, C. H. N., 和德·米兰达·桑托斯, 我。K. F. (2019). 巴西Piau '州无症状感染婴儿利什曼原虫的个体检测方法的评价。PLoS忽略了Trop. 分离13, e0007493. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007493>
27. 哈尔蒂万格, R. S., 巴斯比, S., 格罗夫, K., 李, 梅森, D., 麦地那, 莫洛尼, D., 菲利士堡和斯卡尔兹。(1997). 核蛋白和细胞质蛋白的o-糖基化: 类似于磷酸化的调控? 生物化学。生物生理学。物品通勤。231, 237 - 242. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.6110>
28. 瓦尔基, A. (2017). 聚糖的生物学作用。糖生物学27日3-49。
<https://doi.org/10.1093/glycob/cww086>.
29. 哈达克, J. E., 和伯托兹, C. R. (2014). 糖疗法: 新的进展激发了聚糖在医学上的重新出现。化学比奥尔。21, 16 - 37. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2013.09.010>
30. 克莱克, F., 诺沃克梅特, M., 多茨, V., 雷丁, K. R., de Haan, N., 坎米耶, G. S. M., Dalebout, H., Bladergroen, M. R., Vukovic, F., 拉普, E. 以及其他 (2018). 血浆n-聚糖特征与炎症性肠病的特征相关。胃肠病学155, 829 - 843. <https://doi.org/10.1053/j.胃.2018.05.030>
31. 德哈恩, N., 伍尔和鲁哈克, L. R. (2020). 临床糖组学中的质谱分析: 从生物标志物鉴定到临床实施的路径。Clin. 质谱。18, 1 - 12. <https://doi.org/10.1016/j.clinms.2020.08.001>.
32. 戈尔尼克, O., 瓦格纳, J., 普奇, M., 克内泽维, A. 和Redzic, 我, 和劳克, G. (2009). 人血浆中n-聚糖谱的稳定性。糖生物学19, 1547 - 1553. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwp134>.
33. 亚当奇克, 塔马林甘, 和拉克德, P. M. (2012). 聚糖作为癌症生物标志物。生物芯片。生物生理学。1820年, 1347-1353年。
<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.12.001>.
34. 劳克, g., 佩泽尔, 鲁丹, i., 和坎贝尔, H. (2016). 疾病的机制: 人类的n-糖体。生物芯片。生物生理学。1860年, 1574-1582年。
<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2015.10.016>.
35. 詹森, B. C., “绑定”, A., 编织物, K. R., Lonardi, E., 德容, C. J., Falck, D., 卡米杰, G. S. M. Dolhain, R. J. E. M., 罗布茨, Y., 和乌勒, M. (2016). 高通量疟疾质谱研究妊娠相关血清n糖的变化。科学。棱纹平布6, 23296. <https://doi.org/10.1038/srep23296>.
36. 古德尔吉, I., 劳克, G., 和佩泽尔, M. (2018). 免疫球蛋白G糖基化在衰老和疾病中的作用。单元免疫。333, 65 - 79. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2018.07.009>
37. 米贾科瓦克, 朱里, J., 科尔特, W. 和Kriti, J., Kifer, D., 加文, K. M., Mikec, K., 弗尔卡托维, A., 武库科维, F., Pezer, M., 等。 (2021). 雌二醇对免疫球蛋白G糖基化的影响: 下游信号传导机制的定位。前面免疫。12, 680227. <https://doi.org/10.3389/fimmu.680227.2021>.
38. Gardinassi, L. G., 多茨, 美国, 德阿尔梅达, R. P., Nery Costa, H., 科斯塔, D. L., 德耶稣, A. R., 梅博罗达, O. A., 加西亚, G. R., Wuhler, M., 和德·米兰达·桑托斯, 我。K. F. (2014). 内脏利什曼病的临床严重程度与免疫球蛋白G Fe的变化有关糖基化mBio 5, e01844. <https://doi.org/10.1128/mBio.01844-14>
39. 驻留, K. R., Ruhaak, L. -R., 嗯, HW., 美国, 范登阿克, E. B., 普朗普, 麦克唐奈, L. A., Houwing-Duistermaat, J. J., Slagboom, P. E., 比克曼和乌赫尔。(2017). 人血浆通过基质辅助激光解吸/电离-傅里叶变换离子回旋共振质谱分析, n-糖基化与炎症和代谢健康的标志物相关。摩尔单元蛋白质组学16, 228-242. <https://doi.org/10.1074/mcp.M116.065250>.
40. Vreeker, G. C. M., Nicolardi, S., Bladergroen, M. R., 范, C. J., 梅斯克, W. E., Tollenaar, R. A. E. M., 范德堡, Y. E. M. 和Wuhler, M. (2018). 具有连接特异性唾液酸酯化的自动血浆糖组学。肛门。化学90, 11955 - 11961. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem02391.8>
41. 雷贝洛, 哦。D., 加德纳, R. A., 乌尔巴诺维奇 P. A., Bolam, D. N., 克劳奇, L. I., Falck, D., 和斯宾塞, D. I. R. (2020). 一种新的基于糖苷酶平板的人IgG半乳糖基化和唾液酸化的定量分析方法。糖conj. J. 37, 691 - 702. <https://doi.org/10.1007/s10719-020-09953-9>.
42. 丁、N、聂、H、孙、X、孙、W、曲、Y、刘、X、姚、Y、梁、X、陈、C。C., 和李, Y. (2011). 人血清n-聚糖谱依赖于年龄和性别。年龄40岁, 568-575岁. <https://doi.org/10.1093/ageing/afr084>.

43. 阿克迈, I., 维拉杰, M., 和劳克, G. (2016). 高通量分析免疫球蛋白G糖基化。专家牧师。蛋白质组学13、523-534。 <https://doi.org/10.1080/14789450.2016.1174584>.
44. Vreeker, G. C. M., Bladergroen, M. R., 尼科拉迪, S., 梅斯克, W. E., Tollenaar, R. A. E. M., 范德堡, Y. E. M. 和Wuhrer M. (2019). 干血斑N-甘油采用MALDI质谱法进行分析。 *Talanta* 205, 120104. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.06.104>
45. 德穆斯, 德, 厄巴诺维茨, P. A., 加德纳, R. A., 吴, 吴, 吴, 吴, 吴, Medvidovi, E. P., 欧文, K. R., 戈尔尼克, 朱吉和斯宾塞. I. R. (2022). 外糖苷酶板的发展基于检测1-3,4聚焦的分析方法HNF1A-MODY个体的生物标志物。 *糖生物学*32、230-238。 <https://doi.org/10.1093/glycob/cwab107>.
46. 德容, S. E., 塞尔曼, M. H. J., Adegnika, A. A., 阿摩亚, A. S., van Riet, E., Kruize, Y. C. M., 雷恩斯, J. G., 罗德里格斯 A., 船, D., von Mutius, E. 以及其他 (2016). IgG1FcN-聚糖半乳糖化作为免疫的生物标志物活性值科学。 *棱纹平布*6, 28207. <https://doi.org/10.1038/srep28207>.
47. 王, Y., 林, S., 吴, J., 江, M., 林, J., 张, Y, 丁, H., 周, H., 沈, 吴, 吴. (2023). 通过IgG唾液化的参与来控制妊娠期狼疮的活动: IgG唾液化和pDC功能之间的新型串扰。 *前面医学* <https://doi.org/10.1007/s11684-022-0965-7>.
48. 普拉卡什, A., 辛格, N. P., 斯里德拉拉, G., 马尔霍特拉, V., 马克吉亚, A., 车库, D., Pathania, A., 和阿加瓦尔, S. K. (2006). 伪装为慢性肝病的内脏利什曼病. *J. 使发生联系物理学*. 印度54893-894.
49. 科斯塔, D. L. Rocha, R. L., 卡瓦略R. M. A., 利马-内托, A. S., Harhay, M. O., 科斯塔, C. H. N., Barral-Neto, M., 和Barral, A. P. (2013). 血清细胞因子与黑热病的严重程度和并发症。 *Pathog. 一滴健康*107、78-87。 <https://doi.org/10.1179/2047773213Y..0000000078>
50. O. O. A., 普, A., 席尔瓦, L. 德 A., Rabello, A., TeixeiraCarvalho, A., 菲格雷多, R. M., 吉马雷斯-卡瓦略, S. F., 法拉利. C. A., 和科雷亚-奥利维拉, R. (2005). 人类内脏利什曼病的免疫反应: 先天免疫细胞因子谱与疾病结局之间的相关性分析。 *斯坎德. J. 免疫醇*. 62, 487 - 495. <https://doi.org/10.1111/j365-3083.2005.01686.x>.
51. 朱、J、林、Z、吴、尹、H、戴、J、冯、Z、马雷罗、J. 和卢布曼, D. M. (2014). 不同病因的肝细胞癌和肝硬化中的血清触珠蛋白聚焦分析。 *J. 蛋白质组Res*. 13, 2986 - 2997. <https://doi.org/10.1021/pr500128t>.
52. 陈特吉, 川原, 特宗德罗. C., 杂木林 D. R., Nenke, M. A., 扭矩, D. J. 和泰森安徒生, M. (2021). 血清n-糖组学对细菌血症患者进行分层感染了不同的病原体。 *J. Clin.*

- 医学10,
516. <https://doi.org/10.3390/jcm10030516>.
53. Sarrats, A., 萨尔多瓦, 解放军, 福特, 哈维, D. J., 斯特鲁, W. B., 德洛伦斯, 陆克文, P. M. 和Peracaula. (2010). 胰腺癌和慢性胰腺炎中肝脏急性期蛋白的糖基化作用. 蛋白质经济学Clin. 应用程序. 4, 432 - 448. <https://doi.org/10.1002/prca.200900150>
 54. Clerc, F., 里德, K. R., 詹森, B. C., Kammeijer, G. S. M., Bondt, A., 和Wuhrer, M. (2016). 人血浆蛋白糖基化糖conj. J. 33, 309 - 343. <https://doi.org/10.1007/s10719-015-9626-2>.
 55. Klari, L., 塞皮洛夫, Y. A., 斯坦顿 C. M., Mangino, M., Sikka, T. T., Esko, T., 帕克霍莫夫, E., 萨洛, P., 迪伦, J., 麦格纳汉, S. J. 以及其他 (2020). 免疫球蛋白G的糖基化是由炎症性疾病的大量多效性基因网络调控的. 科学. Adv. 6, eaax0301. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aax0301>.
 56. 加尔沃-卡斯特罗, B., 萨, 费雷拉, J. A., Marzochi, K. F., Marzochi, M. C., 库蒂尼奥, G., 和兰伯特. H. (1984). 美国人内利什曼病中的多克隆B细胞激活、循环免疫复合物和自身免疫. Clin. 经验. 免疫. 56, 58 - 66.
 57. 席尔瓦-巴里奥斯, S., 斯曼斯, M., Duerr, C. U., Qureshi S. T., 弗里茨, J. H., 德斯科托, A., 和斯特格, S. (2016). 多诺瓦尼利什曼原虫激活先天免疫B细胞可加剧疾病并介导高丙种球蛋白血症. 细胞代表. 15, 2427 - 2437. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.05.028>.
 58. 王, T. T., Sewatanon, J., Memoli, M. J., 沃拉默特, 波纳佐斯, 巴米克, S. K., Pinsky, B. A., , K., 等, 等, 等, 等. (2017). 与FcγRIIIIA结合增强的登革热IgG抗体决定了疾病的严重程度. 科学355、395-398. <https://doi.org/10.1126/科学.aai8128>.
 59. 拉森, M. D., 德格拉夫, E. L., 桑尼维尔德, M. E., Plomp, H. -R., Nouta, J., 霍佩尔, W., 陈, HJ., 林蒂, F., 维瑟, R., 布林克豪斯, M., 等. (2021). 荧光化IgG是包膜病毒反应的特征, 并与COVID-19的严重程度相关. 科学371, eabc8378. <https://doi.org/10.1126/science.abc8378>.
 60. 李, T., 迪利洛, D. J., 布尔纳索斯, S., 吉登斯, J. P., Ravetch, J. V. 和Wang, LX. (2017). 通过Fc多聚糖工程调节IgG效应蛋白的功能. 过程Nat'l. 阿卡德. 科学. 美国114 - 3485-3490. <https://doi.org/10.1073/pnas.1702173114>.
 61. Gardinassi, L. G., 加西亚, G. R., 科斯塔, C. H. N., 科斯塔·席尔瓦, v. 和德·米兰达·桑托斯, 我. K. F. (2016). 血液转录谱揭示了人类利什曼原虫感染的不同状态的免疫学特征
 - 婴儿. PLoS忽略了Trop. 分离10, e0005123 - e0005124. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005123>
 62. 施密特, D. E., 德哈恩, 北, 索纳维尔德, M. E., C, C. C. E., 德哈斯, M. - , 兹瓦金加, JJ. 吴勒先生, 维达森, G. (2020). IgG -Fc糖基化
 - 利妥昔单抗治疗免疫性血小板减少症前后. 科学. 棱纹平布10, 3051. <https://doi.org/10.1038/s41598-02059651-7>.
 63. 德汉, N., 博伊达, N. P., Ekinci, E., 雷丁, K. R., Emonts, M., Hazeltet, J. A., 伍勒和德里森. J. (2018). IgG Fc糖基化的差异与儿童脑膜炎球菌脑毒症的预后相关. mBio 9, e00546-18. <https://doi.org/10.1128/mBio.00546-18>.
 64. 科林, M. (2017). 抗体糖基化可预测自身免疫性血管炎的复发. EBioMedicine 17, 15. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2017.02.008>
 65. 安东尼, R. M., 尼默尔扬, F., 阿什林, D. J., 莱因霍尔德, V. N., 保尔森, J. C., 和拉维奇, J. V. (2008). 用重组IgG Fc再现IVIG的抗炎活性. 科学320、373-376. <https://doi.org/10.1126/science.1154315>
 66. 卡尔斯滕, C. M., 潘迪, M. K., Figge, J., 基尔琴斯坦, R., 泰勒, P. R., Rosas, M., 麦当劳, J. U., Orr, S. J., 伯杰, M., 佩佐德, D. 以及其他 (2012). Fc半乳糖化介导的IgG1的抗炎活性与FcγRIIB与dectin-1的关联. Nat. 医学18, 1401 - 1406. <https://doi.org/10.1038/nm.2862>.
 67. 拉多瓦尼和古德吉. (2022). N-糖基化和炎症: 不甜的关系. 前面免疫. 13, 893365. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.893365>
 68. 塞西利亚尼, F., 和波卡夸亚, V. (2007). 急性期蛋白-1酸糖蛋白: 一种疾病期间糖基化改变的模型. 柯尔. 蛋白质部分. 科学. 8, 91 - 108. <https://doi.org/10.2174/138920307779941497>.
 69. 多茨, V., 和乌勒, M. (2019). 人血浆中的n-糖聚体特征: 与生理学和主要疾病的关系. FEBS Lett. 593, 2966 - 2976. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13598>.
 70. 穆科霍帕德海耶, S., 和曼达尔, C. (2006). 多诺瓦尼利什曼原虫的糖生物学. 印度的 J. 医学物品123, 203 - 220.
 71. 卡瓦尔坎特, 特, 梅代罗斯, M. M., 骡子, S. N., 帕尔米萨诺, G., 和Stolf, B. S. (2021). 唾液酸在病原体感染的建立中的作用, 特别关注利什曼原虫. 前面单元感染. 微生物. 11, 671913. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.671913>.
 72. Colli, W. (1993). 反式唾液酸酶: 在克氏锥虫中发现的一种独特的酶活性. 法西布. J. 7, 1257 - 1264. <https://doi.org/10.1096/fasebj.7.13.8405811>.
 73. 加莱戈和胡伦. (2006). 唾液酸和细菌唾液酸酶对铜绿假单胞菌与上皮细胞粘附差异的

- 影响。胶体冲浪。B Biointerfaces 52, 154 - 156. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2006.04.013>
74. Khatua, B., 巴塔查里亚和曼达尔, C. (2012). 被铜绿假单胞菌吸附的唾液糖蛋白促进其生长通过siglec-9阻碍中性粒细胞细胞外陷阱而存活。J. 白细胞。比奥尔。91, 641 - 655. <https://doi.org/10.1189/jlb.0511260>.
75. 胡佛, D. L., 伯杰, M., 奥本海姆, M. H., Hockmeyer, W. T. 和梅尔泽, M. S. (1985). 人血清对无鞭毛虫利什曼原虫的细胞毒性: 替代补体途径介导的抗体促进杀伤。感染。Immun。47, 247 - 252. <https://doi.org/10.1128/iai.47.1.247-252.1985>
76. 多姆Iniguez, 莫雷诺, 我, 特拉斯卡萨, 我和托拉。ñ (2002). 正常人血清中锥虫前乳毛虫的补体相互作用。J. 经验。医学195, 451 - 459. <https://doi.org/10.1084/jem.20011319>
77. 导航, T. R., 克鲁格。C., 皮尔逊, R. D. (1989). 正常人血清免疫球蛋白M对多诺瓦尼利什曼原虫凝集、补体介导的杀伤和人单核细胞吞噬作用。感染。Immun。57, 1343 - 1346. <https://doi.org/10.1128/IAI1343-1346.1989>.
78. 瓦尔基, A., 和科恩菲尔德, S. (1980). 一个常染色体显性基因调节小鼠红细胞唾液酸的9- α -乙酰化的程度。这可能是激活人类替代补体途径能力变异的解释。J. 经验。医学152, 532 - 544. <https://doi.org/10.1084/jem.152.3.532>
79. 古拉蒂, 萨斯特里, 詹塞尼尤斯, J. C., 大米, P. A., 和Ram, S. (2002). c1抑制剂和2-巨球蛋白对淋病奈瑟菌补体甘露聚糖结合凝集素途径的调控。J. 免疫醇。168, 4078 - 4086. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.8.4078>
80. 上野和威尔逊。E. (2012). 受体介导的利什曼原虫的吞噬作用: 对细胞内存活的影响。趋势寄生虫醇。28, 335 - 344. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2012.05.002>.
81. 德米兰达-桑托斯, 我。K. 和坎波斯-内托 A. (1981). 免疫球蛋白Fc受体对致病性锥虫科而非致病性原生动物没有影响。J. 经验。医学154, 1732 - 1742. <https://doi.org/10.1084/jem.154.6.1732>
82. Hadjiaggelidou, C., Vadikolia, C., 维鲁, 陈等, 陈等, 陈等, 陈等, 陈等, 陈等, A., Markala, D., 以及其他 (2021). 2例使用来那度胺和地塞米松治疗的患者的内脏利什曼病: 可能与免疫反应迟钝相关。Hemasphere 5, E506. <https://doi.org/10.1097/HS9.0000000000000506>.
83. 迪罗, 范, 格里斯文, J, 穆罕默德, 碰撞, 阿尔法, 阿尔法, 海陆, 和莱恩, L. (2015). 埃塞俄比亚北部艾滋病患者中内脏利什曼病的非典型表现: 在资源贫乏的环境中, 在机会性感染的管理指南方面存在差距。《柳叶刀》。分离15, 122 - 129. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(14\)70833-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(14)70833-3).

84. Reis, A. B., 马丁-菲尔霍, O. A., 卡瓦略, A., Giunchetti, R. C., 卡尔内鲁 C. M., 梅林克, W., 塔夫里, W. L., 和科拉-奥利维拉, R. (2009). 犬内脏利什曼病的全身性和区域性免疫反应。兽医。免疫。免疫原蛋白。128, 87 - 95. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.10.307>
85. Solc, M. M. S., 阿鲁达, M. R., 利特, B. M. M., Mota, T. F., Rebouas, M. F., Rebouas, M. F., Amorim, L. D. A. F., 博尔赫斯, 五。M., Valenzuela, J., 卡马哈维, S., 等人。(2021). 免疫反应动力学和长触诊佐米菌暴露是犬类队列中内脏利什曼病易感性的生物特征。PLoS忽略了Trop. 分离15, e0009137. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009137>
86. De Araujo Bastos, F. M. DeSousa, R. A., 阿吉亚尔 B. G. A., Ibiapina, A. B., 德阿尔伯斯基, L. P., Mendona, V. J. 和C. Costa. H. N. (2021). 负责利什曼病的流行内脏: piau 'i, 巴西, 2008 a 2018. 卑鄙的男人Sau' de Pu'blica
37. <https://doi.org/10.1590/0102-311X00340320>.
87. 渡边, Y., 青木-木下, K. F., 石滨和奥田。(2021). GlycoPOST实现了糖组学质谱数据的公平原理。核酸。49, D1523 - D1528. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAA1012>.
88. 驻留, K. R., 空白, D., 柯伊伯公司, D. M., Deelder, M. M. 和Wuhrer, M. (2014). 蛋白质的高通量分析利用连接特异性唾液酸酯化反应的MALDI-TOF-MS进行n-糖基化。肛门。化学86, 5784 - 5793. <https://doi.org/10.1021/ac500335t>.
89. 雷贝洛, D., Nicolardi, S., Lageveen-Kammeijer, G. S. M., Nouta, J., 加德纳, R. A., 梅斯克, W. E., Tollenaar, R. A. E. M., 斯宾塞, D. I. R., Wuhrer, 和Falck. (2020). 基质辅助激光解吸/电离质谱分析触角聚焦的定量人血浆中的n-聚糖。前面化学8, 138. <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.00138>.
90. 詹森, B. C., 驻留, K. R., 邦, A., 爱德文, A. L., 帕尔姆布莱德, M., 法尔克, D. 和Wuhrer, M. (2015). 合成工具: 一种高通量靶向数据处理工具, 用于相对定量和质量控制, 用于糖组和糖蛋白质组MALDI-MS. J. 蛋白质组Res. 14, 5088 - 5098. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.5b00658>.
91. RStudio团队 (2020). 针对R. 的集成开发环境。
92. 拉加尼, 五世, 阿西尼乌, 法尔科梅尼, A. 察格里斯, 和萨马迪诺斯. (2017). 使用R包MXM选择特征: 发现统计上等价的特征子集。J. 斯达软件80. <https://doi.org/10.18637/jss.v080.i07>.

星+方法

关键资源表

试剂或资源	源	标识符
生物样品		
来自表现为活跃的个体的血清 内脏利什曼病被确诊 在骨髓抽吸物中形成的无鞭毛体 用Giemsa染色，并经分离证实 骨髓培养中的寄生虫 在NNN培养基中抽吸。	2012–2013年在皮奥伊联邦大学内森·波特拉 热带医学研究所或塞尔吉佩联邦大学大学医院 住院的患者；加尔迪纳西等人。 ³⁸	N/A
活动性内脏利什曼病个体的血清通过Giemsa染色的骨髓 吸出物中存在无鞭毛体，并通过在NNN培养基中骨髓抽吸 出物培养中分离寄生虫证实。	2018年，在皮奥伊联邦大学内森·波特 拉热带医学研究所住院的患者；猪猪等 。 ²⁶	N/A
无症状感染或无感染个体的血清（未感染的流行对照）	2012年，VL患者的联系人（邻居和家庭 成员），2012–2013年；加迪纳西 等。 ³⁸	N/A
无症状感染或无感染个体的血清（未感染的流行对照）	联系人（邻居和家庭成员 VL患者的成员），2018年； Porcino等。 ²⁶	N/A
化学品，多肽，和重组器官蛋白质		
L的可溶性抗原。婴儿（SLA） 血清学诊断 和细胞因子释放试验	加迪纳西等人。 ³⁸ ；Porcino等。 ²⁶	N/A
PNaseF	默克，达姆施塔特，德国	猫#11365177001
关键商业分析		
卡拉查快速检测	InBIOS国际公司，西雅图，华盛顿州，美国	猫#INS025
现场利什曼原虫IgG/IgM组合试验	CTK生物技术，圣地亚哥，美国	Cat#R0122S
BD细胞仪珠阵列人Flex 设置IP10人	贝克顿·狄金森生物科学公司，美国	猫#558280
BD细胞仪珠阵列人Flex 设置Anti-MIG人E8	贝克顿·狄金森生物科学公司，美国	猫#558286
人可溶性蛋白缓冲试剂盒CBA Flex套装	贝克顿·狄金森生物科学公司，美国	卡特#558264
存放数据		
原始数据，分析和在...之后或超出数据	https://glycopost.glycosmos.org/	GPST000313
软件和算法		
瑞斯托姆	Rstimer团队 ⁹¹	https://posit.co/
MM平台	拉加尼等人 ⁹²	https://cran.r-project.org/ package=MXM
Massy工具	Jansen等。 ⁹⁰	https://github.com/Tarskin/ MassvTIL
其他		
汉密尔顿之星和斯塔普加斯机器人系统	汉密尔顿	https://www.hamiltoncompany.com/自动液体处理
布鲁克索拉里斯15T FT-ICR-MS	布鲁克	https://www.布鲁克.com/en/products- 和-溶液/质谱/mrms/solarix.html

202023年7月21日

资源可用性

引线接触

关于资源和试剂的进一步信息和要求应直接指向并将由首席联系人，伊莎贝尔·金尼·费雷拉·德·米兰达·桑托斯。usp.br).

材料可用性

这项研究没有产生新的独特的试剂。

数据和代码可用性

d原始质谱数据的形式为。xy文件已存入糖邮报⁸⁷并公开自出版之日起提供。登录号列在关键资源表中。这个重新存储库还包含相关的元数据以及本文中使用的最终管理数据（表S5）手稿

d本文不报告原始代码。

d重新分析本工作文件中报告的数据所需的任何其他信息均可从以下获得
[应要求提供的领导联系人。](#)

实验模型和研究参与者的细节

这项工作仅限于人类的实验对象。总共661名参与者被分为338：264人女性；男性的比例（59名参与者的性别没有登记）。在全文中，当提到性时，出生时性别的。年龄在2岁到86岁之间。所有的参与者都来自于巴西的特雷西纳地区或阿拉卡朱尔地区。其他种族或民族信息没有登记。更多细节是如表1所示。表S5中还包含了每个患者的所有可用元数据。这项研究已经由里贝尔奥普雷托医学院诊所医院研究伦理委员会批准³圣保罗大学的科学家，由协议2347所描述的负责研究人员签名/2012年，或道德陈述证书编号67213017.0.0000.5440和意见编号2.101.755.此外，在纳坦热带病研究所授权进行研究的证书编号.901.波特拉是AA 1.009518/17-65。在本研究中所采用的方法是根据经批准的指南，并在所有情况下获得知情同意。

方法详细信息

患者招募和样本收集

在这项研究中，样本收集在两个不同的时间点，发现集在2012-2013年和验证设置在2018年。血清样本来自活动性内脏利什曼病患者（VL：n=211），住院在热带疾病研究所的纳坦波特拉（特雷西纳，Piau ‘I，巴西，发现和验证），或在大学医院，Aracaju ‘-SE（仅发现）。阳性诊断为通过使用Gi-在骨髓抽吸物中存在婴儿利什曼原虫的无鞭毛体形式得到证实emsa染色，并在NNN培养基中培养细胞培养。此外，还采集了印度人的血清样本无症状感染的人（ASYMP： n=229），生活在特雷西纳流行地区的健康个体巴西市或阿拉卡朱市（EC；n=162），以及居住在非流行地区的健康个体（NC： n=59）巴西的里贝尔·奥·普雷托市。³为了分类无症状，阳性（至少在所描述的一种测试中和健康个体的VL（所有检测均为阴性），所有样本均进行检测用ELISA检测抗利什曼原虫抗体的存在，卡拉扎检测免疫染色质-通过qPCR检测和血液中寄生虫的存在，²⁶和黑山人的皮肤呈阳性测试（MST⁺），³⁸或在刺激外周血白细胞后产生细胞因子谱用抗原提取物。婴儿。²⁶由于监管方面的变化2013年后，巴西卫生部不再允许进行黑山皮肤试验因此只适用于发现集。

在本研究中，我们评估了131例患者的临床严重程度类别，这些患者在uncom-重复（U-VL： n=49），并合并需要额外的治疗或出血和增加

死亡风险（C-VL： n=82）。

《科学》26107021202321年7月21日

在治疗开始后第0天（第=23）、第5天（第=22）、第90天（第=20）和第180天（第180=12）收集VL患者（第=24）的血浆样本。

化学品和试剂

分析级乙醇、十二烷基硫酸钠（SDS）和三氟乙酸（TFA）购自默克公司（德国达姆施塔特公司）。磷酸二钠、磷酸二氢钠、85%磷酸、50%氢氧化钠、非P-40替代品（NP-40）、1-羟基苯并三唑97%（HOBt）和super-DHB（9: 5-二羟基苯甲酸和2-羟基-5-甲氧基苯甲酸、sDHB）（德国）。1-乙基-3-（3-（二甲基氨基）丙基）碳二亚胺（EDC）盐酸盐购自氟化学公司（哈德菲尔德，英国），而重组肽-糖苷酶F（PNGase F）购自默克公司（达姆施塔特，德国）。HPLC级乙腈（ACN）来自生物溶剂（瓦尔肯斯瓦德，荷兰），超纯水（Milli-Q或MQ，抗性R18 MU）来自Q-Gard 2系统（密尔克，阿姆斯特丹，荷兰）。用于HILIC纯化的棉花来自Pipoos（乌得勒支，荷兰）。

N-聚糖释放

所有临床样本以随机方式分布在96孔板上，以及商业上可行的混合血浆标准（VisuconF：亲和生物制剂（Ancaster，ON，加拿大）和随机选择的临床样本的混合血清的技术复制，以监测糖基样品制备和测量的质量。多个实例的磷酸盐缓冲盐水（PBS）也被包括作为空白。如前所述，从蛋白质中释放出聚糖。⁴⁰ 6 mL血清用12 mL 2% SDS变性后，60°C for 10 min，n-聚糖从血清糖蛋白中酶释放，每个样品含有6 mL 4%NP-40, 6mPBS（100mM磷酸在5X PBS）和0.6 mL PNGase F，在37°C孵育过夜⁰C。

质谱分析的衍生化、纯化和制备

自动样品制备包括衍生化、亲水相互作用液相色谱（HILIC）纯化和使用自动液体处理平台进行的MALDI-目标平板检测。⁴⁰ 乙基酯化，以稳定和连接特异性衍生唾液酸，与新鲜制备的化学物质和溶液进行。因此，将2 mL释放的聚糖样品加入40 mL乙酯化试剂中，其中由0.25 M EDC和0.25 M HOBt溶解于100%乙醇中，在37°C孵育1h⁰C。⁸⁸ 随后，加入40 mL的乙腈。为了纯化n-聚糖，使用了内部组装的棉花HILIC微头（约。每根针尖有3毫米或180毫克的棉线）。尖端用MQ水和85%乙腈预洗。然后，通过上下移液20次，将这些聚糖结合到棉花上。尖端用85%乙腈和1% TFA洗涤，然后用85%乙腈洗涤，在20 mL MQ水中洗脱。随后，7 mL纯化样品加7 mL sDHB基质（2.5 mg/mL在50% ACN与0.1 毫摩尔氢氧化钠）⁸⁹ 在384孔板中预混合。然后，将2 mL的混合物放在MALDI靶板上（800/384 MTP锚芯片，布鲁克达尔宁，不来梅，德国）上，风干后用麦芽法测量斑点。

MALDI-FTICR-MS和质谱数据的预处理

分析使用基质辅助激光解吸电离-傅里叶变换离子回旋共振质谱（故障-质谱）在Bruker 15T固体XXR FTICR质谱仪上配备通信源和副电池（Bruker达尔顿）。该系统由ftms控制版本2进行控制。1.0，m/z范围为1011.40~5000.00，每个光谱记录约170万个数据点。每个单光谱是由样品点内每个光栅点200次激光拍摄的10次扫描产生的。使用数据分析5.0SR1（构建203.2.3586，Bruker道尔顿学）进行可视化、校准（表S1），并将故障光谱导出为xy文件格式，该格式与软件兼容以进行进一步处理。

数据处理

使用光谱的xy文本文件格式和116个聚糖组成的列表（包括两个虚拟聚糖）（表S1）提取峰面积，与聚糖相对定量参数相关联

和数据质量评估由吉祥物工具软件版本1.0.2-alpha构建180703b。⁹⁰ 提取根据公式 ‘ $(0.00003 * “m/z”) - 0.02690$ ’，窗口范围从0.00719到0.08921以适应不断大的m/z值的峰值宽度。该公式是由来自手动峰值宽测量（全宽）的线性趋势线。向排除质量差的光谱，光谱的总强度，分析物面积的比例（减去背景-地面面积）高于信噪比（S/N）9，并且被分析物中的光谱比例应该更高比这些参数的平均值减去标准差的三倍。每个参数对每个生物组进行评估。分析物管理是根据以下质量进行标准：S/N应大于9，同位素模式质量（IPQ）小于0.2，绝对PPM误差每个生物组中至少有25%的所有光谱低于10。所有筛选的聚糖区域均正常利用每个光谱的面积和R-Studio软件计算糖基化性状（表S2）。³⁵

量化与统计分析

分析在R编程语言版本4中进行。1.0（R统计基础计算，维也纳，奥地利）和R-Studio软件版本1.4.1106（RStudio，波士顿，马）。⁹¹ 监控采用维森森标准和混合法对样品制备的质量和重复性进行了测试血清样本中，通过分析25个最丰富的聚糖。

对完整的数据集进行了主成分分析（PCA），以调查是否有四种不同的数据集感兴趣的组可以根据各自的n-糖体特征来区分。为此，值是日志10在进行主成分分析前进行变换和紫外标度。为了进一步评估这些差异在各组间，比较各个体的聚糖和糖基化特性的平均值克鲁斯卡尔-沃利斯检验，在有显著性的情况下，用一个额外的事后邓恩检验。生物标志物然后，通过调查一组逐组比较的折叠变化，使用a对发现集的Wilcoxon秩和检验，并在火山图中进行了说明。同样的测试也是如此应用于严重程度组的比较（U-VL vs. C-VL）。在意义测试研究范围的意义设置为=值为5.0e-5。这个值是通过使用默认值a为0.05而获得的，Bonferroni由在研究范围内进行的测试数量（73个聚糖+ 153个糖基化性状乘以1个克鲁斯卡尔-沃利斯检验加上= 1130检验： $0.05/1130 = 4.4248e-5$ z 5.0e-5）。日志2（折变）火山地块的截止点设置为0.3。然后将这些测试应用于使用一个0.05的阿尔法。与发现集中的聚糖和性状相匹配的聚糖和性状具有显著性和充分性在受试者工作特征（ROC）分析中，使用折叠变化作为参数选择的输入ysis. 该分析采用EC-VL比较和ASYMP-进行逐组比较在发现集和严重性组上不复杂-在总集合上复杂，因为验证集将只包含两个复杂的情况。使用SES实现了特征选择MXM r-软件包的算法⁹² 应用于日志10-对剩余聚糖的标准化和缩放数据以及威尔科克森测试中的特征。该算法在理论上可以输出多组协变量单一的比较。对于每一组协变量，都计算了一个一般的逻辑模型在卡方检验中p值最低的一个被用于十倍交叉验证程序。在交叉验证周期的每一次迭代，以相同的选择再次应用SES算法协变量的过程。从这个交叉验证程序中，曲线下面积（AUC）是calcu-迟来的作为一个独立的验证，所得到的模型被应用于验证集和一个ROC创建了曲线。

治疗后用于随访的样本数量太低，无法进行统计分析。因此本文只讨论了所观察到的趋势。

