



República Federativa do Brasil  
Ministério da Economia  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102019026180-3 A2



(22) Data do Depósito: 10/12/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 15/06/2021

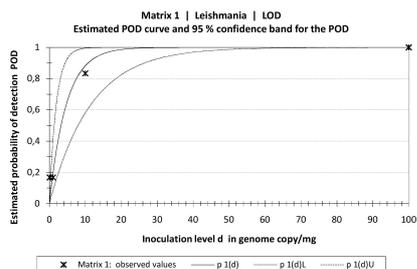
(54) **Título:** KIT PARA DIAGNÓSTICO E/OU QUANTIFICAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA DE LEISHMANIA: MÉTODO, OLIGONUCLEOTÍDEOS E SONDAS

(51) **Int. Cl.:** C12Q 1/6893; C12Q 1/6851.

(71) **Depositante(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANA.

(72) **Inventor(es):** VANETE THOMAZ SOCCOL; MANUEL HOSPINAL; CARLOS RICARDO SOCCOL.

(57) **Resumo:** KIT PARA DIAGNÓSTICO E/OU QUANTIFICAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA DE LEISHMANIA: MÉTODO, OLIGONUCLEOTÍDEOS E SONDAS. A presente invenção trata de kit para detecção e quantificação de infecções por Leishmaniaspp.incluindo ométodo (PCR e ou qPCR) e insumos (oligonucleotídeos, sondas, controles positivo, controle negativo, e controle de extração do DNA). O ácido desoxirribonucleico quer seja DNA ou cDNA serão usados para amplificação na reação em cadeia da polimerase e consequente o diagnóstico e/ou quantificação da carga parasitária em amostras biológicas de pacientes suspeitos de serem portadores de leishmaniose tegumentar ou leishmaniose visceral.



## **COMPOSIÇÃO REACIONAL PARA DIAGNÓSTICO E QUANTIFICAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA DE *LEISHMANIA* E SEU MÉTODO DE USO EM PCR E qPCR**

### Campo da Invenção

[001]. A presente invenção trata de uma composição reacional (oligonucleotídeos, sondas, controle de extração de DNA, controles positivos e negativos e outros aditivos em concentrações adequadas) para detecção e quantificação de infecções por *Leishmania* spp. por método molecular de reação da polimerase em cadeia (PCR-ponto final) e PCR quantitativa (qPCR). O ácido desoxirribonucleico (DNA e cDNA) isolados de amostras biológicas serão usados para amplificação na PCR *endpoint* ou qPCR e o consequente diagnóstico ou quantificação da carga parasitária. A reação apresenta alta sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade. A presente patente se situa no campo da biotecnologia industrial.

### Fundamentos da Invenção e Descrição do Estado da Técnica

[002]. A leishmaniose é um complexo de infecções causadas por parasitos do gênero *Leishmania* Ross, 1903. Mais de 20 espécies são capazes de infectarem seres humanos e causam diversas manifestações clínicas. Estes protozoários são dimórficos com uma fase intracelular (amastigotas) em fagócitos mononucleares dos mamíferos, e uma fase no intestino de seus vetores (promastigotas). Os vetores são insetos hematófagos pertencentes à família *Psychodidae* e gêneros *Lutzomyia*, (presentes no novo mundo) e *Phlebotomus* (no velho mundo). A transmissão se dá pela hematofagia de fêmeas que estando infectadas injetam a forma infecciosa do protozoário (promastigotas). Estas, após serem fagocitadas por macrófagos ou células dendríticas, se transformam para amastigotas que ficam em compartimentos

vacuolares (fagolisossomas) das células mononucleares (FARRELL, 2002; KIMA, 2007; MAROLI et al., 2013; NADERER; MCCONVILLE, 2008; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017).

[003]. As leishmanioses são classificadas de acordo com as manifestações clínicas em: leishmaniose visceral (LV), pós-Kala-azar (PKDL, leishmaniose cutânea (LC), mucocutânea (LCM). A LV, na ausência de tratamento, pode ser fatal. A LC se manifesta por lesões cutâneas ulceradas, enquanto que a MCL gera lesões que são localizadas na mucosa naso-oro-faríngea/laríngea. Estas se não forem tratadas podem destruir o tecido e causar sequelas irreversíveis. A leishmaniose pós-Kala-azar (PKDL), é gerada a partir de infecção de LV que depois do tratamento, alguns pacientes, desenvolvem lesões cutâneas não ulceradas (HANDMAN, 2001; ARONSON et al., 2016).

[004]. O diagnóstico das leishmanioses (LV, LC e LCM) representa um grande desafio, devido a amplo espectro de manifestações clínicas, duração da doença, e da diversidade do parasito que pode causar a doença. Vários métodos foram desenvolvidos para solucionar o diagnóstico e obter precisão e exatidão evitando sofrimentos e sequelas aos pacientes.

[005]. No entanto, a especificidade, a sensibilidade e a reprodutibilidade das metodologias dependem de vários fatores, incluindo o conhecimento técnico das pessoas responsáveis pela realização dos testes (treinamento de equipe), a qualidade do equipamento e de reagentes usados, o uso de controles de qualidade intrínseco do método, padronização das amostras dos pacientes a serem colhidas, evolução das lesões, formas clínicas e as espécies dos parasitos envolvidos na doença (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2016; MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2006, 2017).

[006]. Para fins ilustrativos, no Brasil, o diagnóstico da infecção por *Leishmania* se dá em duas etapas: avaliação clínica e triagem laboratorial. Na avaliação clínica, a sintomatologia é avaliada em busca dos sinais característicos da LC ou LV e dados epidemiológicos da região. Na triagem laboratorial são utilizados testes auxiliares com o objetivo de detectar direta ou indiretamente a presença do parasito. Os seguintes testes são utilizados: testes indiretos como exames sorológicos (imunofluorescência indireta/IFI ou enzyme linked immunosorbent assay/ ELISA), teste intradérmico (Intradermoreação de Montenegro); e testes diretos caracterizados pela demonstração direta do parasito por microscopia (amostras de sangue, de tecido) ou isolamento em cultivo in vitro ou pela detecção do DNA do parasito por reação em cadeia da polimerase (PCR) (MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2006, 2017).

[007]. O diagnóstico molecular realizado por meio da PCR em tempo real (qPCR) para a detecção de sequências genômicas de *Leishmania* na amostra clínica apresenta alta sensibilidade e especificidade devido à amplificação de fragmentos de ácido desoxirribonucleico (DNA) pré-determinados mediante o uso de dois oligonucleotídeos iniciadores (senso e antisenso). É capaz de detectar e quantificar em tempo real (menos de duas horas) os produtos da PCR durante a reação de amplificação, medindo a uso de uma sonda duplamente marcada com dois fluoróforos (TaqMan Probes), que é clivada em uma reação de PCR. Desta forma, a qPCR possibilita a detecção de DNA de *Leishmania* em pacientes humanos ou animais que se encontram no período de janela imunológica, paciente HIV positivo ou pacientes com imunossupressão. Além dessas características, é possível avaliar a qualidade da extração de DNA da amostra utilizando um controle de extração durante a preparação da amostra para o qPCR. Diversos autores descreveram diferentes protocolos de qPCR para o diagnóstico e quantificação de *Leishmania* por meio da amplificação de diferentes

regiões como: regiões não codificadoras de proteínas (Kinetoplast DNA, gene SSU rRNA 5.8S, ITS1 e ITS2) (MARTÍNEZ-CALVILLO et al., 2001; ), ou regiões codificadoras de proteínas (Heat Shock Protein 70 kDa, DNA polimerase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, glucose phosphate isomerase, mannose phosphate isomerase, 6-phosphogluconate dehydrogenase, trypanredoxin peroxidase) (GALLUZZI et al., 2018). Portanto, na atualidade existem vários alvos ou protocolos descritos para o diagnóstico de leishmaniose usando as técnicas moleculares.

[008]. No entanto, muitos desses métodos apresentam deficiências na padronização, seus processos de validação são incompletos, ou ausência de controles de extração de DNA, controles positivos e negativos dentro da execução do método. Estes fatores impactam diretamente na confiabilidade, sensibilidade e especificidade dos resultados.

[009]. Os inventores, até o presente momento, não têm conhecimento da existência de testes diagnósticos **comerciais** baseados em qPCR para *Leishmania* spp. que permita detectar, quantificar e que inclui controles (positivos e negativos) para avaliar a eficiência do processo de extração de DNA e de controle positivo da reação para evitar resultados falsos negativos. Este controle positivo tem como base na construção de vetores plasmídeos sintéticos, clones do DNA de *Leishmania*, contendo um gene selecionado e capaz de ser duplicado e clonado em *Escherichia coli*. A implementação da tecnologia aqui descrita poderia permitir a conclusão rápida e segura do diagnóstico das leishmanioses evitando sequelas ou tratamentos desnecessários aos pacientes.

[010]. A este respeito, os inventores apontam como vantagens da presente invenção: a) é uma metodologia capaz de detectar a presença do DNA ou cDNA do parasito, e de quantificar a carga

parasitária em diferentes amostras clínicas (como biópsia de pele em infecção natural ou artificial, punção de medula, punção de linfonodos, secreção lacrimal, mas não se limitando a estas). A presença do controle de extração de DNA servirá para avaliar a qualidade do processo de extração do DNA e, com o controle endógeno e padrão para quantificar a carga parasitária (plasmídeo sintético contendo clones do DNA de *Leishmania*). **Estes controles não foram encontrados nos métodos descritos, na avaliação do estado da arte e são sequências artificiais.**

[011]. Na presente invenção foram realizados os processos de validação em relação aos parâmetros analíticos, da sensibilidade e limite de detecção da técnica (LoD).

#### Definições

[012]. A curva para limite de detecção foi feita por meio de diluições seriadas de controles positivos, nas quais o limite de detecção da técnica (LoD) é definido como a última diluição que apresentou curva de amplificação com mais de 50% em todas as amostras biológicas na mesma concentração.

[012]. A especificidade do método foi avaliada primeiramente em teste *in silico* testando o conjunto de iniciadores e sondas e em teste *in vitro* por meio de reações que contemplavam os parasitos *Trypanosoma cruzi* e *T. rangeli*, e amostras de pacientes com diagnóstico negativo de leishmaniose com sintomas semelhantes.

[013]. A reprodutibilidade do método foi avaliada por meio de intra-ensaios, utilizando diferentes concentrações do analito (alta, baixa e nula).

#### Descrição da abordagem do problema técnico

[014]. A presente invenção provê uma composição reacional contendo oligonucleotídeos sintéticos para replicação in vitro de DNA ou cDNA para detecção ou quantificação de *Leishmania* spp., sondas específicas para aumentar a especificidade da reação, controle positivo (plasmídeo contendo sequência de leishmania) para eliminar resultados falsos negativos, e reagentes e parâmetros específicos para a realização de métodos moleculares adequados para a detecção de *Leishmania* spp. em amostra biológica proveniente de infecção natural ou experimental.

#### Descrição detalhada da invenção

##### Oligonucleotídeos, sondas e composição reacional para diagnóstico de leishmanioses

[015]. Os oligonucleotídeos, de acordo com a presente invenção, incluem dois iniciadores e uma sonda. As sequências são sintéticas e apresentadas na direção de 5' para 3'. Ditos oligonucleotídeos podem estar em estados diferentes, por exemplo, em solução/suspensão e em uma concentração desejada ou liofilizados, mas não se limitando a estas condições. O técnico no assunto, dependendo do estado, determina as condições de armazenamento. Os oligonucleotídeos de acordo com a invenção podem apresentar vários graus de pureza. Além disto, deve ser aqui lembrado que, apesar das funções preferidas poderem ser mencionadas em relação a alguns oligonucleotídeos pode assumir diversas funções, e pode ser utilizado em diferentes formas de acordo com a presente invenção.

[016]. Os oligonucleotídeos iniciadores providos pela presente invenção são sintéticos e desenhados com base nas sequências consensos da região gênica da subunidade catalítica A da DNA polimerase do gênero *Leishmania* spp., resultantes da análise de várias espécies de

*Leishmania* spp. (para detalhes ver Figuras 1 e 2). Estes iniciadores são capazes de hibridizar com uma sequência alvo em condições adequadas, particularmente a um iniciador compreendendo pelo menos 15 a 22 nucleotídeos consecutivos de qualquer uma das sequências descritas nas SEQ ID NO: 1 e 2, e suas sequências complementares, capaz de amplificar uma região gênica da subunidade catalítica A da DNA polimerase do *Leishmania* spp.

[017]. A definição de sonda inclui qualquer oligonucleotídeo que seja capaz de hibridizar com uma sequência alvo complementar em condições de hibridização adequadas. Uma vez que a sonda é marcada, ela pode ser usada para detectar a presença de determinadas sequências nucleotídicas. As sondas providas pela presente invenção também são desenhadas baseadas nas sequências consensos da região gênica da subunidade catalítica A da DNA polimerase do *Leishmania* spp., resultantes da análise de várias espécies de *Leishmania* spp. Assim, de acordo com a presente invenção, a sonda pode incluir ou compreender pelo menos 8-15 nucleotídeos consecutivos de qualquer uma das sequências descritas nas SEQ ID No 3. As sondas de acordo com esta invenção são do tipo TaqMan (mas não se limitando a esta), cuja região 5' terminal é modificada com um fluoróforo e a região 3' terminal é modificada com um quencher. Os fluoróforos, podem ser FAM, TAMRA, VIC, JOE, TET, HEX, ROX, RED610, RED670, NED, Cy3, Cy5, e Texas Red. Os quenchers podem ser, 6-TAMRA, BHQ- 1,2,3 e MGB-NFQ, mas pode haver outros fluoróforos e quenchers (mas não se limitando a estes). Durante a realização da reação qPCR a fluorescência é monitorada para a detecção de amplificação do alvo. O sinal de fluorescência é proporcional à quantidade do amplicon específico produzido. Na presença da sequência alvo de *Leishmania* spp. a fluorescência irá aumentar. Na

ausência da sequência alvo, a fluorescência manter-se-á consistentemente baixa ao longo da reação.

[018]. Para provar que o processo de isolamento do DNA alvo foi realizado corretamente, ou para determinar a presença ou ausência de potenciais inibidores de reação, a presente invenção inclui um controle externo de extração (analito fortificante) conjuntamente aos iniciadores compreendendo a sequência de SEQ ID NO: 5 e 6 e uma sonda compreendendo a SEQ ID NO: 7.

[019]. Ao método também foi incorporado um controle positivo de reação (plasmídeo sintético), que pode ser usado como um padrão para a quantificação de *Leishmania* SEQ ID NO: 4.

[020]. A composição reacional, objeto desta invenção, compreende pelo menos um conjunto de oligonucleotídeos de acordo com a invenção, desenhados e sintetizados especificamente para *Leishmania*. Ditos oligonucleotídeos podem ser mantidos separados ou parcialmente misturados, ou totalmente misturados em solução ou substâncias gelificantes. Os oligonucleotídeos podem ser providos na forma liofilizados ou solubilizados.

[021]. Em uma forma de concretização da composição reacional foi realizado o método contendo os reagentes aqui desenvolvidos e os reagentes adicionais necessários e na concentração adequados para a amplificação de DNA de diferentes espécies de *Leishmania*. A composição reacional inclui água livre de nuclease, água ultrapura, sais (magnésio, potássio), tampões (como os tampões convencionais de PCR, conhecidos no estado da arte), polimerases termoestáveis, como Taq, Pfu, transcriptase reversa, e similares, nucleotídeos como deoxinucleotídeos, dideoxinucleotídeos, dNTPs, dATP, dTTP, dCTP, dGTP, dUTP, outros reagentes, como aditivos, inibidores de RNase ou DNase. Os

reagentes podem ser concentrados para posterior diluição para uma concentração apropriada pelo usuário final, ou pode ser provida na forma de pré-mix. Os reagentes podem ser embalados em microtubos, tubos, placas específicas para PCR com diferentes quantidades de poços, chips, ou qualquer outro meio adequado.

[022]. Ainda, na invenção são incluídas instruções para o uso adequado e eficiente da composição e do método. As instruções podem estar sob duas formas: detalhada, trazendo informações exaustivas com relação ao método e ao uso do mesmo; e outra simples, na forma de uma guia rápido, trazendo informações essenciais necessárias para o uso do método.

#### INOVAÇÕES DA PRESENTE INVENÇÃO

##### 1. Etapa de Extração do ácido nucleico a partir de amostras biológicas

[023]. A inovação desta invenção nesta etapa é que no processo de extração é adicionado o analito fortificante (controle externo de extração). Durante a fase de homogeneização ou preparação de amostras biológicas para iniciar o processo de extração do DNA ou mRNA, é adicionado o analito fortificante a fim de avaliar a qualidade do processo de extração, evitando resultados de exames falsos negativos por erros no processo de extração dos ácidos nucleicos.

[024]. Os procedimentos para a extração e purificação de ácidos nucleicos são bem conhecidos no estado da arte e protocolos para extrair ácidos nucleicos (DNA ou mRNA) a partir de sangue total e tecidos estão disponíveis em SAMBROOK; RUSSELL, (2001). Além disso, vários kits comerciais estão disponíveis para o isolamento de ácidos nucleicos a partir de sangue total ou tecidos. Exemplos destes incluem,

mas não estão limitados a, DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen); wizard genomic DNA purification kit (Promega) e PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen™).

## 2. Insumos Inovadores para realização da PCR ou qPCR

[025]. A presente invenção provê um par de oligonucleotídeos iniciadores SEQ ID Nos: 1 e 2. Estes são capazes de se ligarem à região de DNA polymerase A de *Leishmania* e cada um ser adequado como iniciador, compreendendo pelo menos de 15 a 20 nucleotídeos consecutivos das sequências selecionadas de SEQ ID Nos: 1 e 2.

[026]. Outra inovação da presente invenção é uma sequência capaz de ser ligar à região DNA polymerase A de *Leishmania* e ser adequada como sonda marcadora para aumentar a precisão e especificidade do diagnóstico. O dito oligonucleotídeo sonda compreende pelo menos de 10 a 20 nucleotídeos consecutivos das sequências selecionadas (SEQ ID No: 3). Em uma concretização adicional, o oligonucleotídeo adequado como sonda é marcado com uma marcação detectável, preferencialmente, um grupamento fluorescente, compreendendo um par de fluoróforo doador e um quencher, mas não se limitando a este.

[027]. Em outro aspecto da invenção, é provido um polinucleotídeo como controle positivo, constituído de um plasmídeo contendo uma sequência de DNA de *Leishmania* sintetizada artificialmente para uso como alvo de referência (ou seja, um controle positivo da reação) que consiste da sequência localizada entre as posições 694 a 845 da SEQ ID NO: 4. A vantagem deste controle positivo é que, o laboratório não precisará realizar cultivos do parasito para usar como controle positivo.

[028]. A composição reacional da presente invenção inclui um controle negativo, e um padrão para quantificar a carga parasitária.

[029]. A presente invenção é ilustrada pelos exemplos abaixo, que têm o intuito de exemplificar uma das inúmeras maneiras de se realizar a invenção, contudo, sem limitar o escopo da mesma.

### Exemplos

#### [030]. Exemplo 1: Análise in silico e definição da região alvo - Desenho dos Iniciadores e Sondas

[031]. Para definição da região gênica foram realizados alinhamentos múltiplos com as sequências da região gênica da subunidade catalítica A da DNA polimerase de *Leishmania* spp, disponíveis em um banco de dados público com auxílio do software Mega-X (versão 10.0.1 2019), os quais utilizam o algoritmo Clustal W. Os números de acesso das sequências utilizadas estão descritos na Figura 1

[032]. Os iniciadores e sondas foram sintetizados quimicamente com base nas recomendações descritas a seguir: para os iniciadores e sondas, a temperatura de melting (Tm) deve estar entre 55 e 60°C; as últimas bases da extremidade 3' foram compostas com o menor número possível de bases citosina (C) e/ou guanina (G); O conteúdo de G/C dentro da faixa de 30 a 80%. O sistema minor groove binder (MGB) foi utilizado para desenho das sondas.

[033]. Um total de dois iniciadores e uma sonda foram desenhados e sintetizados para a metodologia TaqMan™ dirigido para região gênica da subunidade catalítica A da DNA polimerase de *Leishmania* spp, Tabela 1 e nas SEQ. No 1, SEQ. No 2, SEQ. No 3.

Tabela 1. Iniciadores sintéticos e sonda para a detecção do *Leishmania* spp.

SEQ ID	Iniciador/sonda	Sequência (5'-3')
1	DpolyAF	GAC(G/A)GTGAATTACAGG(C/A)TGC

<b>2</b>	DpolyAR	ATACTTGCAGCAGCACATCG
<b>3</b>	DpolyAS	TCACTTGCAC(A/C)CCAGAT(G/T)CA

[034]. Na Tabela 1, a sonda de SEQ ID NO: 3 foi marcada com o fluoróforo FAM na extremidade 5'e MGB na extremidade 3, mas o uso destas sequências não se limitam a este fluoróforo (SEQ ID NO 1-3), foram desenhados para amplificar e identificar SEQ ID NO 4.

[035]. Exemplo 2: Construção do plasmídeo pDNApolyA como controle positivo

[036]. O fragmento da região gênica da subunidade catalítica A da DNA polimerase de *Leishmania* spp, contém 150 pares de bases (bp) e foram sintetizados quimicamente e inseridas no plasmídeo DNA (pTOP Blunt V2).

[037]. Exemplo 3: Clonagem e propagação do plasmídeo pDNApolyA numa cepa de *Escherichia coli* para ser usado como controle positivo

[038]. Depois da construção do plasmídeo pDNApolyA, uma cepa quimicamente competente de *Escherichia coli* foi escolhida para a clonagem e propagação do plasmídeo e o procedimento para cultivo foi seguido de acordo com (FROGER; HALL, 2007). Uma nanograma do DNA do plasmídeo foi homogeneizado com 200 µL de células competentes recém-preparadas em microtubo que após fechado foi incubado em gelo. Após 30 min, o foi dado choque térmico por 60 s a 42 ° C e transferido instantaneamente no gelo por 2 min, seguido pela adição de 800 µL de caldo Super Optimal com repressão catabólica (SOC). Finalmente, as células foram incubadas a 37 ° C por 2 h, seguidas por alíquotas de 100 µL em placas de agar nutriente contendo 50 µg / mL de ampicilina. Posteriormente, o plasmídeo foi purificado a partir da cepa *E. coli* usando a metodologia segundo GREEN; SAMBROOK, (2016).

[039]. Exemplo 4: Padronização da reação de qPCR

[040]. Para avaliar a eficiência e correlação linear ( $R^2$ ) da reação de qPCR no formato singleplex (presença de um alvo e uma sonda por reação) foi realizada diluições decimais seriadas ( $10^4$  a  $10^0$  cópias gene/reação) das pDNApolyA. Estas diluições foram utilizadas nas reações de PCR em tempo real para demonstrar o formato de curva padrão.

[041].A reação de amplificação consistiu em 1  $\mu$ L de DNA e 2,5  $\mu$ L TaqMan Universal PCR Master Mix. A concentração utilizada dos iniciadores 10 nmol e das sondas foi 5 nmol. O volume de água foi ajustado a cada reação para um volume final de 10  $\mu$ L/reação. As condições de ciclagem térmicas consistiram em um primeiro passo de ativação a 95°C por 10 minutos seguidos de 40 ciclos a 95°C por 30 segundos, 58°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos (Figura 3).

[042]. Exemplo 5: Padronização da concentração de sonda e iniciadores utilizadas nas reações de qPCR

[043].A reação de PCR em tempo real foi padronizada utilizando TaqMan Universal PCR Master Mix e as condições térmicas de ciclagem, amplificação e aquisição dos dados foram realizadas de acordo com o exemplo 4. Cada reação de amplificação consistiu em 1  $\mu$ L, de DNA obtido a partir do controle positivo 2,5  $\mu$ L, TaqMan Universal PCR Master Mix. As concentrações dos iniciadores variaram de 5 a 15 nmol. As concentrações das sondas para DpolyAS (marcada com o fluorocromo FAM) variou de 1,25 a 5 nmol.

[044]. Exemplo 6: Processo de validação aplicado a testes diagnósticos: precisão

[045]. Nos testes de precisão são avaliados os parâmetros de repetibilidade (intra-ensaio) e reprodutibilidade (inter-ensaio). A repetibilidade refere-se à máxima concordância entre testes repetidos da mesma amostra sob as mesmas condições operacionais. Este teste foi realizado a partir de três concentrações de *Leishmania braziliensis* e de *L. amazonensis* contendo  $10^3$ , 10 e 0 cópias de parasito/reação com cinco réplicas de cada diluição. Três corridas de qPCR foram realizadas no mesmo dia, utilizando o mesmo lote de reagentes e preparadas por um único operador. A concentração de parasito (*L. braziliensis* e *L. amazonensis*) detectada foi até 10 cópias nas três corridas realizadas e cinco réplicas.

[046]. A reprodutibilidade avalia a máxima concordância entre resultados sucessivos do mesmo analito em diferentes condições operacionais. Este teste foi realizado a partir de três concentrações de *L. braziliensis* e de *L. amazonensis* contendo  $10^3$ , 10 e zero cópias do parasito/reação com cinco réplicas de cada diluição. Cinco corridas de qPCR foram realizadas no mesmo dia, utilizando o mesmo lote de reagentes e preparadas por cinco operadores distintos. Aqui também a reprodutibilidade foi de 100%.

[047]. Exemplo 7: Processo de validação aplicado a testes diagnósticos: Sensibilidade analítica

[048]. A sensibilidade analítica ou, limite mínimo de detecção, avalia a menor concentração ou quantidade que um método diagnóstico é capaz de detectar. Para atender a este parâmetro foram realizadas diluições do controle positivo (plasmídeo pDNA<sub>polyA</sub>) e DNA de *L. braziliensis* e de *L. amazonensis*. O primeiro ponto da reação continha  $10^5$  cópias do gene ou genoma do parasito. A partir dessa solução, foram realizadas seis diluições seriadas de razão dez, até a obtenção de uma solução contendo 0,1 do gene ou genoma do parasito. A cada

diluição realizada, a amostra foi homogeneizada em vortex durante 10 segundo, seguida de rápida centrifugação para minimizar a formação de aerossóis. Os resultados obtidos foram utilizados para o cálculo da sensibilidade analítica pelo método estatístico de regressão linear Probit em um intervalo de confiança de 95%, com o auxílio do Software MedCalc versão 18.11.3 (MedCalc Software bvba). A sensibilidade para para o controle positivo foi próximo a 85%.

Tabela 2. Avaliação da sensibilidade analítica para DNAPolyA

Copias/reação	Nº de replicas detectadas	LOD (IC 95%)
10000	6/6	14,009 (5,698-34,443)
1000	6/6	
100	6/6	
10	5/6	
1	1/6	
0,1	1/6	

Exemplo 8: Processo de validação aplicado a testes diagnósticos:

Especificidade analítica

[049]. A especificidade analítica corresponde à habilidade do teste em identificar exclusivamente a substância alvo ou organismo ao invés de substâncias ou organismos semelhantes em uma amostra. Para tanto, testes *in silico* e *in vitro* foram realizados.

[050]. Para a avaliação dos oligonucleotídeos desenvolvidos para o teste, 42 sequências da subunidade catalítica da DNA polimerase A de diferentes espécies de leishmania, foram alinhadas para posteriormente verificar o alinhamento dos oligonucleotídeos (SEQ ID NO 1 e SEQ ID NO 2) e da sonda (SEQ ID NO 3). Obtendo que as sequências testadas

estejam corretamente alinhadas nas sequências de *Leishmania* (Figura 2). Uma vez verificado o alinhamento correto dos oligonucleotídeos e da sonda, foi feita uma a validação *in silico* do producto da PCR. Esta etapa foi realizada pelo confronto da sequência amplificada pelos oligonucleotídeos contra um banco de dados público, BLAST, a fim de verificar possíveis homologias com outros organismos. Verificou-se que nenhuma homologia foi observada com outros microorganismos ou DNA humano o que indica uma boa especificidade com base em metodologia de avaliação *in silico*.

[051]. Para avaliação *in vitro* dos oligonucleotídeos SEQ ID NO 1 e SEQ ID NO 2) e da sonda (SEQ ID NO 3) se realizou um painel com amostras de infecção experimental em hamsters e amostras de cultura gerando os seguintes grupos: Grupo 1 infecção experimental em hamsters com o parasito *L. braziliensis* (6 amostras); Grupo 2 infecção experimental em hamsters com o parasito *L. amazonensis* (6 amostras); Grupo 3 amostras de cultura do parasito *L. braziliensis* (5 amostras); Grupo 4 amostras de cultura do parasito *L. amazonensis* (5 amostras); Grupo 5 amostras de cultura do parasito *L. infantum* (5 amostras); Grupo 6 amostras de cultura do parasito *T. cruzi* (5 amostras) Grupo 7 amostras de cultura do parasito *T. rangeli* (5 amostras); e Grupo 8 hamsters sem infecção (6 amostras). As reações qPCR foram realizadas de acordo com as condições estabelecidas no exemplo 4 e 5 em duplicata de cada reação. Na tabela 3 são apresentados os resultados obtidos para cada espécie de *Leishmania*.

Tabela 3. Resultado da avaliação da especificidade analítica para os oligonucleotídeos (SEQ ID NO 1 e SEQ ID NO 2) e da sonda (SEQ ID NO 3).

Grupos	Nº de amostras
--------	----------------

	detectadas
Grupo 1	6/6
Grupo 2	6/6
Grupo 3	5/5
Grupo 4	5/5
Grupo 5	5/5
Grupo 6	0/5
Grupo 7	0/5
Grupo 8	0/6

[052]. As reações não apresentaram reatividade cruzada com outras espécies e Trypanosomatídeos testados. Portanto, a composição reacional é adequado para o ensaio de qPCR.

[053]. Como os resultados obtidos realizou-se uma tabela de contingência (tabela 4) para a determinação da sensibilidade, desvio negativo, e exatidão relativa. A sensibilidade será verificada com a relação dos verdadeiros positivos (PVP) através de um teste de proporção, O desvio negativo será verificado com a taxa de falsos negativos através de um teste de proporção e a precisão relativa deve ser verificada com a proporção de resultados consistente com os esperados por um teste de proporção.

Tabela 4: Tabela de contingência dos resultados da avaliação *in vitro*

Resultados do método	Amostras de referência		
	Positivo (Detectado)	Negativo (No detectado)	Total
Positivo (Detectado)	54	0	54
Negativo (No detectado)	0	32	32

Total	54	32	86
-------	----	----	----

[054]. Tendo os seguintes resultados de p-value: 1,000 para sensibilidade, 1,000 para desvio negativo, e 1,000 para exatidão relativa, é maior do que o nível de significância (0,05), conclui-se que, com 95% de confiança, o método é sensível, a proporção de falsos negativos é zero, e os resultados são exatos.

[055]. Exemplo 9: Definição do Threshold para as reações de qPCR

[056]. O threshold ou linha de corte das reações de qPCR foi definido com base na escolha automática dos threshold pelo software Stepone plus versão 2.0.5 (Applied Biosystems), obtidos a partir do controle positivo para região gênica da subunidade catalítica A da DNA polimerase do *Leishmania* spp., em 6 corridas de qPCR realizadas em dias alternados. Após o cálculo da mediana, o threshold para DpolyAF foi definido em 0,01239.

[057]. Exemplo 10: Determinação da carga parasitária por qPCR: RNA e extração de DNA genômico

[058]. O isolamento do DNA genômico foi preparado a partir de 50 mg de amostras de tecido. Estas foram homogeneizadas usando um gral e pistilo com 1 mL do tampão de lise. Com o objetivo de atingir o rendimento máximo, a digestão da amostra biológica foi realizada durante a noite com proteinase K (20 mg/mL) em um tampão de lise a 56°C. A extração do DNA do tecido homogeneizado foi realizada utilizando um método padrão de extração de fenol-clorofórmio (Sambrook e Russell 2001). O DNA foi eluído em 100 µL de água ultra pura e foi usado como modelo para amplificação no qPCR para determinar a carga do parasito. Para a qPCR foi usado o RNA total extraído de 50 mg de tecido conservado com RNAlater usando o

RNeasy Mini Kit (Qiagen). As etapas foram realizadas de acordo com a recomendação do fabricante.

[059]. O RNA foi tratado com um kit contendo DNase (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. A finalidade foi remover qualquer contaminação de DNA genômico. Os RNAs foram quantificados medindo a densidade óptica a 260 nm (OD<sub>260</sub>) usando um espectrofotômetro NanoVue Plus. O RT-qPCR foi realizado para sintetizar o DNA complementar (cDNA) usando a First-Strand cDNA Synthesis (Thermo Scientific) de acordo com a recomendação do fabricante com o primer oligo (dT) e 400 ng de RNA total. A qPCR, baseado em TaqMan, foi aplicado para a estimativa de uma carga parasitária de *Leishmania* em amostras de tecido usando uma curva padrão para comparação (exemplo 4). Para uma sensibilidade precisa, a DNA polimerase de DNA específico de *Leishmania* foi escolhida como a região alvo segundo Hospinal-Santiani (2018).

[060]. O qPCR foi realizado em um volume final de 5 µL contendo 2,5 µL de TaqMan master mix (2×) (Applied Biosystems), 1 µL de água ultrapura, 1 µL de modelo de DNA, 0,5 µL (10 µM) de primers forward e reverse, DPlα F: 5'-ACGGTGAATTACAGGCTGCT-3', DPlα R 5'-ATACTTGCAGCAGCACATCG-3', uma sonda 0,25-µL (10-µM), e DPlαS: FAM-TCACTTGCACACATCAGATGCA-BHQ1 (Macrogênio, Coréia). A amplificação foi realizada usando um sistema de PCR em tempo real StepOnePlus (Applied Biosystems). As condições de ciclo térmico incluíram uma desnaturação inicial a 95°C durante 10 min e 40 ciclos a 95°C durante 15 s, 56°C durante 30 s, e 72°C durante 30 s cada. Cada amostra foi testada em duplicata. Uma curva padrão foi construída com diluições em série do DNA de *Leishmania*. Uma solução de estoque de DNA de *L. braziliensis* foi obtida por extração de  $1 \times 10^5$  promastigotas. Após a eluição em 100 µL de água ultra-pura, a

concentração foi de  $10^5$  parasitos/ $\mu\text{L}$  assumindo que a extração foi 100% eficiente (100 parasitos de *Leishmania* têm 3,45 pg de DNA). A curva padrão foi construída com diluições em série de 10 vezes da solução de estoque de DNA, com a qual a curva padrão foi elaborada com seis pontos em uma curva tomando como intervalo de 0,1 a  $10^4$  parasitos.

[061]. A média  $\pm$  SD dos genomas parasitos por mg de tecido de animais infectados experimentalmente com *L. braziliensis* foi de  $324,43 \pm 35,1$  e para *L. amazonensis* foi de  $3,49 \times 10^4 \pm 84,5$

#### Descrição das Figuras

[062]. Figura 1: Isolados de *Leishmania* spp. utilizados no múltiplo alinhamento.

[063]. Figura 2: Alinhamento da região gênica da subunidade catalítica A da DNA polimerase de *Leishmania* spp. Iniciadores e sonda para detecção do *Leishmania* spp.

[064]. Figura 3: Curvas de amplificação e curvas padrão no formato singleplex. Diluições decimais seriadas variando de  $10^4$  a 10 cópias do parasito/ reação

[065]. Figura 4: Curva de estimação da carga parasitária a 95%

#### **REFERÊNCIAS**

[066]. ARONSON, N. et al. Diagnosis and Treatment of Leishmaniasis: Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society of Tropical Medicine and Hygiene (ASTMH). **Clinical Infectious Diseases**, v. 63, p. 1539–1557, 2016.

[067]. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Parasites-Leishmaniasis: Resources for Health Professionals. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/dpdx/Leishmaniasis/index.html>>.

[068]. FARRELL, J. P. (ED.). Leishmania. Boston, MA: **Springer US**, 2002. v. 4

[069]. FROGER, A.; HALL, J. E. Transformation of Plasmid DNA into *E. coli* Using the Heat Shock Method. **Journal of Visualized Experiments**, n. 6, p. 2007, 2007.

[070]. GALLUZZI, L. et al. Real-time PCR applications for diagnosis of leishmaniasis. **Parasites & vectors**, v.11, n.1, p. 273, 2018

[071]. GREEN, M. R.; SAMBROOK, J. Preparation of Plasmid DNA by Alkaline Lysis with Sodium Dodecyl Sulfate: Minipreps. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2016, n. 10, p. pdb prot093344, 2016.

[072]. HANDMAN, E. Leishmaniasis: Current Status of Vaccine Development Leishmaniasis: Current Status of Vaccine Development. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 2, p. 229–243, 2001.

[073]. HOSPINAL-SANTIANI. **Quantification of parasitic load by qPCR for evaluation of a candidate for *Leishmania* vaccine**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná (2018).

[074]. KIMA, P. E. The amastigote forms of *Leishmania* are experts at exploiting host cell processes to establish infection and persist. **International Journal for Parasitology**, v. 37, n. 10, p. 1087–1096, ago. 2007.

[075]. MAROLI, M. et al. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 27, n. 2, p. 123–147, 2013.

[076]. MARTÍNEZ-CALVILLO, S. et al. Genomic organization and functional characterization of the *Leishmania major* Friedlin ribosomal RNA gene locus. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 116, n. 2, p. 147–57, 3 set. 2001.

[077]. MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. [s.l: s.n.]. v. 1ª edição

[078]. MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. **Manual De Vigilância Da Leishmaniose Tegumentar**. [s.l: s.n.].

[079]. NADERER, T.; MCCONVILLE, M. J. The *Leishmania*-macrophage interaction: A metabolic perspective. **Cellular Microbiology**, v. 10, n. 2, p. 301–308, 2008.

[080]. SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. [s.l.] Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

[081]. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniasis. World Health Organization Fact Sheet**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>>.

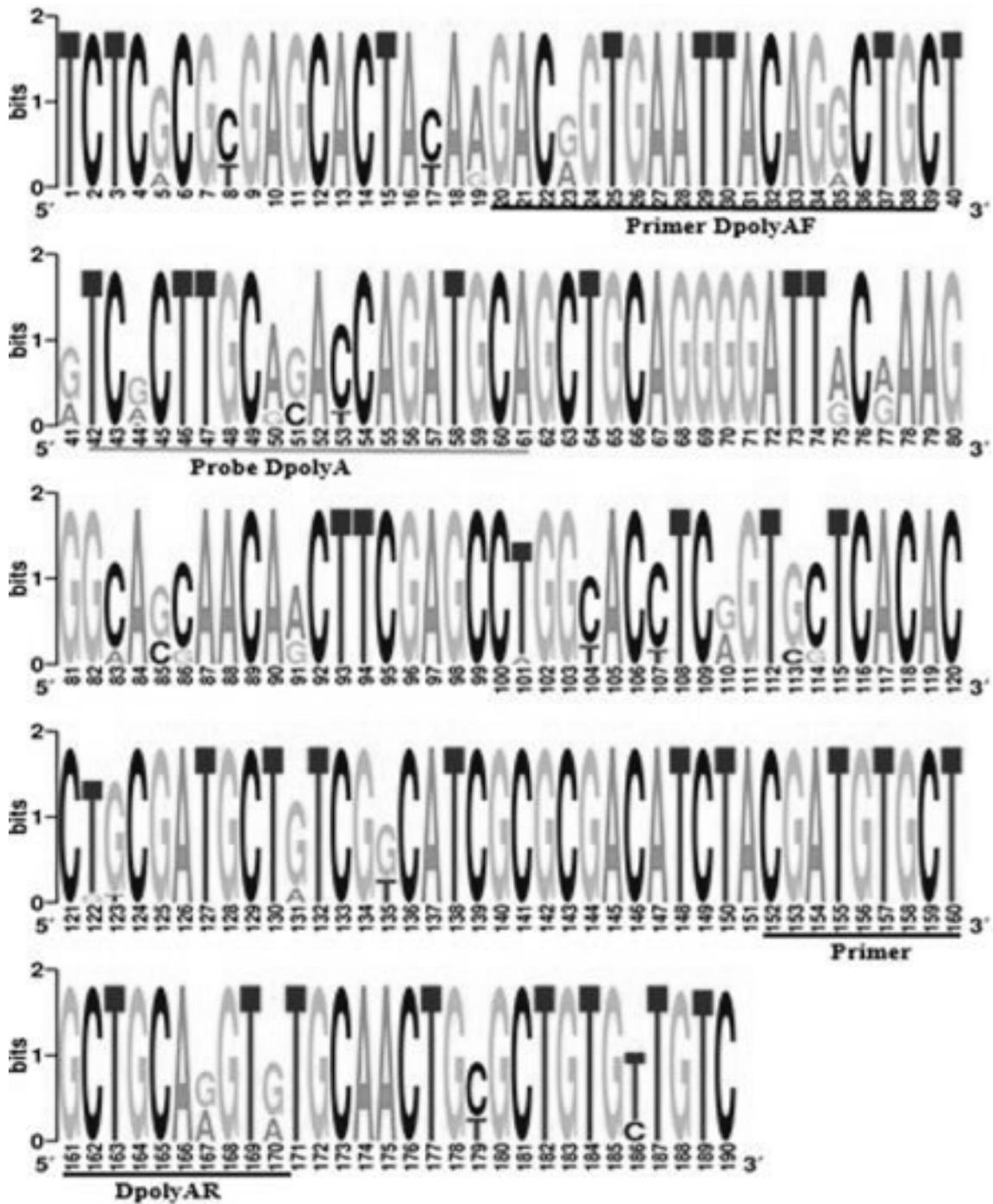
## **REIVINDICAÇÕES**

1. COMPOSIÇÃO REACIONAL PARA DIAGNÓSTICO E QUANTIFICAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA DE *Leishmania* caracterizada por conter os seguintes reagentes:
  - a. oligonucleotídeos iniciadores constituídos das SEQ ID NOS 1 e 2 para a detecção da *Leishmania* spp.;
  - b. sonda complementar aos oligonucleotídeos caracterizada por consistir na SEQ ID NO 3 para a detecção da *Leishmania* spp.;
  - c. controle positivo caracterizado por ser um plasmídeo contendo a SEQ ID NO 4;
  - d. oligonucleotídeos iniciadores constituídos das SEQ ID NOS 5 e 6 para uso como controle interno de amplificação;
  - e. sonda complementar aos oligonucleotídeos caracterizada por consistir na SEQ ID NO 7 para uso como controle de amplificação interno;
  - f. demais reagentes do Master Mix.
2. COMPOSIÇÃO de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por conter oligonucleotídeos ou conjunto de oligonucleotídeos constituídos das SEQ ID NOS 1 e 2 (a) que hibridizam especificamente com a região DNA polimerase A do parasito, para identificar ou quantificar *Leishmania* em amostras biológicas de pacientes ou infecções experimentais.
3. COMPOSIÇÃO de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por conter sonda de SEQ ID NO 3 (b) que aumenta a especificidade por hibridizar especificamente entre as regiões amplificadas pelos oligonucleotídeos, na região DNA polymerase A do parasito, para identificar ou quantificar *Leishmania* em amostras biológicas de pacientes ou infecções experimentais.
4. COMPOSIÇÃO de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de os demais reagentes do Master Mix (f) serem enzimas, tampões e desoxirribonucleotídeos trifosfatos.
5. MÉTODO para detecção de *Leishmania* em uma amostra biológica de seres humanos ou animais utilizando composição reacional tal qual descrita na reivindicação 1, caracterizado por:

- a) ao preparar uma amostra de interesse para análise por PCR ou qPCR adicionar um controle interno, ou seja, um plasmídeo contendo sequência SEQ ID NO 4;
  - b) reação de amplificação de ácido desoxirribonucleico (DNA) ou ácido desoxirribonucleico complementar (cDNA), contido em uma amostra biológica, usando os oligonucleotídeos SEQ ID NOS 1 e 2 e sonda SEQ ID NO 3 que hibridizam especificamente com a região da DNA polimerase A de *Leishmania* spp.;
  - c) detecção da presença ou ausência do produto alvo de amplificação, representado por curvas de amplificação ou não, sendo a presença um resultado positivo e ausência um resultado negativo, desde que os controles positivos e negativos sejam incluídos no teste.
6. MÉTODO de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de a amostra biológica ser constituída de biopsia de pele ou mucosas, de linfonodos, de medula óssea, de secreção lacrimal, sangue, mas não se limitando a estas.
  7. MÉTODO de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de a reação de amplificação do ácido nucleico (i) ser uma reação de polimerização em cadeia da polimerase (PCR) ou uma reação de polimerização em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR).
  8. MÉTODO de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pela realização da etapa (i) com um Master Mix preparado de modo a conter 0,1 U/ $\mu$ L a 0,5 U/ $\mu$ L de enzima Taq Polimerase recombinante, preferencialmente a Brazil Platinum Taq DNA Polimerase ou Brazil Taq DNA Polimerase Recombinante, 20 a 100 mM de Tris-HCl, 20 a 100 mM de KCl, 1 a 10 mM de  $MgCl_2$ , 0,1 a 1 mM de cada dNTP de desoxirribonucleotídeos (adenina, timina, uracila, citosina e/ou guanina), 0,1 $\times$  a 0,1–1 mM de fluoróforo ativo (sonda SEQ ID NOS 3 e 7), 0,1 $\times$  a 2,0 $\times$  de fluoróforo passivo, preferencialmente Reference Dye qPCR e 0,1 a 1 mM de oligonucleotídeos (SEQ ID NOS 1, 2, 5 e 6).
  9. MÉTODO de acordo com as reivindicações 5 a 8, caracterizado por conter um controle positivo que é uma solução de 1.000 a 10.000 cópias do plasmídeo (SEQ NO 4)/ $\mu$ L diluído em 20 a 100 mM de tampão Tris-HCl.
  10. MÉTODO de acordo com as reivindicações 5 a 9, caracterizado por conter um controle negativo que é uma solução de 20 a 100 mM de Tris-HCl.

<i>Sequence accession no.</i>	<i>Identification of sequence</i>
AF009134.1	<i>SauroLeishmaniaadleri</i> DNA polymerase alpha gene, partial cds
AF009135.1	<i>Leishmaniaaethiopica</i> DNA polymerase alpha gene, partialcds
AF009136.1	<i>Leishmaniaamazonensis</i> DNA polymerase alpha gene, partialcds
AF009138.1	<i>Leishmaniabraziliensis</i> DNA polymerase alpha gene, partial cds
AF009139.1	<i>Leishmaniachagasi</i> DNA polymerase alpha gene, partialcds
AF009141.1	<i>Leishmaniadonovani</i> DNA polymerase alpha gene, partialcds
AF009143.1	<i>SauroLeishmaniagymnodactyli</i> DNA polymerase alpha gene, partialcds
AF009146.1	<i>Leishmaniahoogstraali</i> DNA polymerase alpha gene, partial cds
AF009147.1	<i>Leishmaniainfantum</i> DNA polymerase alpha gene, partialcds
AF009148.1	<i>Leishmania major</i> DNA polymerase alpha gene, partial cds
AF009149.1	<i>Leishmania mexicana</i> DNA polymerase alpha gene, partialcds
AF009150.1	<i>Leishmaniapanamensis</i> DNA polymerase alpha gene, partialcds
AF009151.1	<i>Leishmaniatarentolae</i> DNA polymerase alpha gene, partialcds
AF009152.1	<i>Leishmania tropica</i> DNA polymerase alpha gene, partialcds
AF151728.1	<i>Leishmaniaenriettii</i> DNA polymerase gene, partialcds
AJ304942.1	<i>Leishmaniaturanicapartialdnap</i> gene for DNA polymerase
AJ304943.1	<i>Leishmania major</i> partial dnap gene for DNA polymerase
AJ304944.1	<i>Leishmaniaguyanensis</i> partial dnap gene for DNA polymerase
AJ304945.1	<i>Leishmaniagerbilli</i> partial dnap gene for DNA polymerase
CP009385.1	<i>Leishmaniapanamensis</i> strain MHOM/PA/94/PSC-1 chromosome 16 sequence
CP018582.1	<i>Leishmaniadonovani</i> strain MHOM/IN/1983/AG83 isolate early passage chromosome 16 sequence
CP019523.1	<i>Leishmaniadonovani</i> strain MHOM/IN/1983/AG83 isolate Late passage chromosome 16 sequence
CP022631.1	<i>Leishmaniadonovani</i> strain pasteur chromosome 16, complete sequence
CP027814.1	<i>Leishmaniainfantum</i> strain TR01 isolate Lin_TR01 chromosome 16, complete sequence
FR796412.1	<i>Leishmania major</i> strain Friedlin complete genome, chromosome 16
FR796448.1	<i>Leishmaniainfantum</i> JPCM5 genomechromosome 16
FR798990.1	<i>Leishmaniabraziliensis</i> MHOM/BR/75/M2904 complete genome, chromosome 16
FR799569.1	<i>Leishmania mexicana</i> MHOM/GT/2001/U1103 complete genome, chromosome16
FR799603.2	<i>Leishmaniadonovani</i> BPK282A1 complete genome, chromosome16
KJ667104.1	<i>Leishmaniasp.</i> MHOM/CN/85/GS4 DNA polymerase alpha catalytic subunit (polA) gene, partial cds
KJ667106.1	<i>Leishmaniasp.</i> MHOM/CN/89/GS5 DNA polymerase alpha catalytic subunit (polA) gene, partial cds
KJ667107.1	<i>Leishmaniasp.</i> MHOM/GS/90/SC10H2 DNA polymerase alpha catalytic subunit (polA) gene, partial cds
KJ667109.1	<i>Leishmaniasp.</i> MHOM/CN/83/GS2 DNA polymerase alpha catalytic subunit (polA) gene, partial cds
LN609207.1	<i>LeishmaniaperuvianagenomeassemblyLeishmaniaperuviana</i> LEM-1537_V1, chromosome : 16
LN609244.1	<i>LeishmaniaperuvianagenomeassemblyLeishmaniaperuviana</i> PAB-4377_V1, chromosome : 16
U78172.1	<i>Leishmaniadonovani</i> DNA polymerase alpha catalytic subunit gene, complete cds
XM_001464606.1	<i>Leishmaniainfantum</i> JPCM5 putative DNA polymerase I alpha catalytic subunit partial mRNA
XM_001563712.2	<i>Leishmaniabraziliensis</i> MHOM/BR/75/M2904 putative DNA polymerase I alpha catalytic subunit partial mRNA
XM_001682185.1	<i>Leishmania major</i> strain Friedlin putative DNA polymerase I alpha catalytic subunit partial mRNA
XM_003859800.1	<i>Leishmaniadonovani</i> DNA polymerase I alpha catalytic subunit, putative (LDBPK_161640), partial mRNA
XM_003873795.1	<i>Leishmaniamexicana</i> MHOM/GT/2001/U1103 DNA polymerase I alpha catalytic subunit, putative partial mRNA
XM_010699377.1	<i>Leishmaniapanamensis</i> DNA polymerase I alpha catalytic subunit, putative partial mRNA

**Figura 1**



**Figura 2**

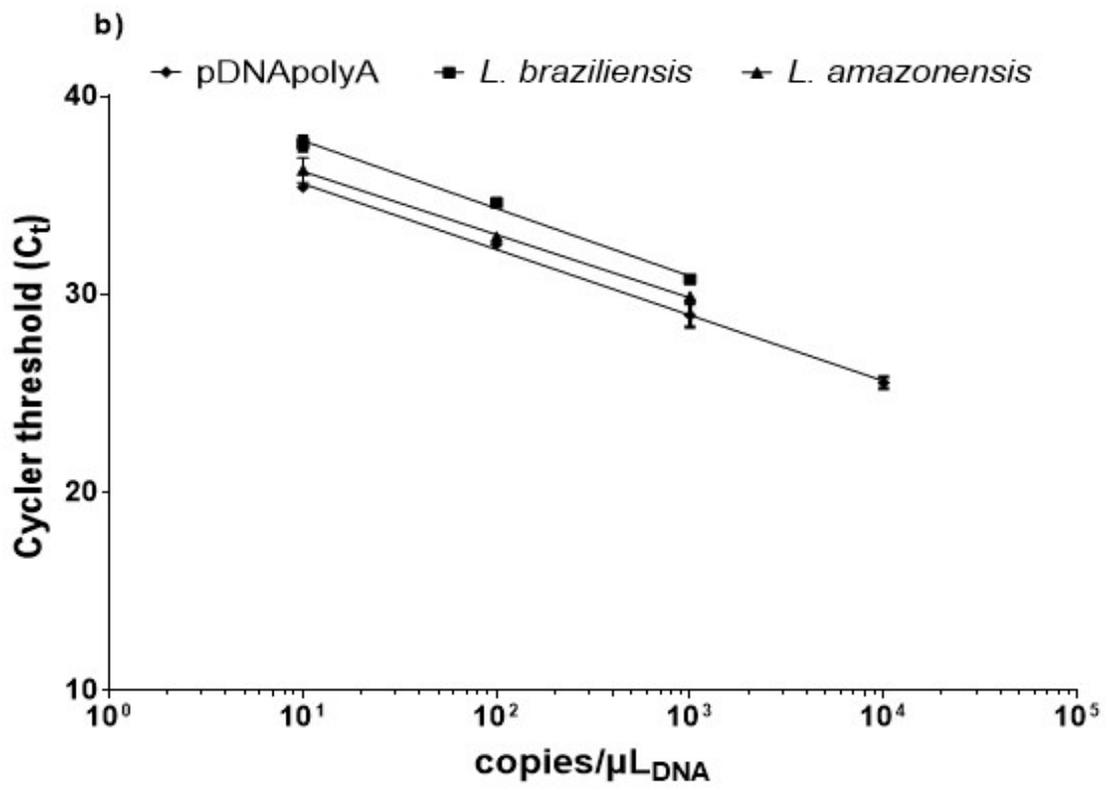
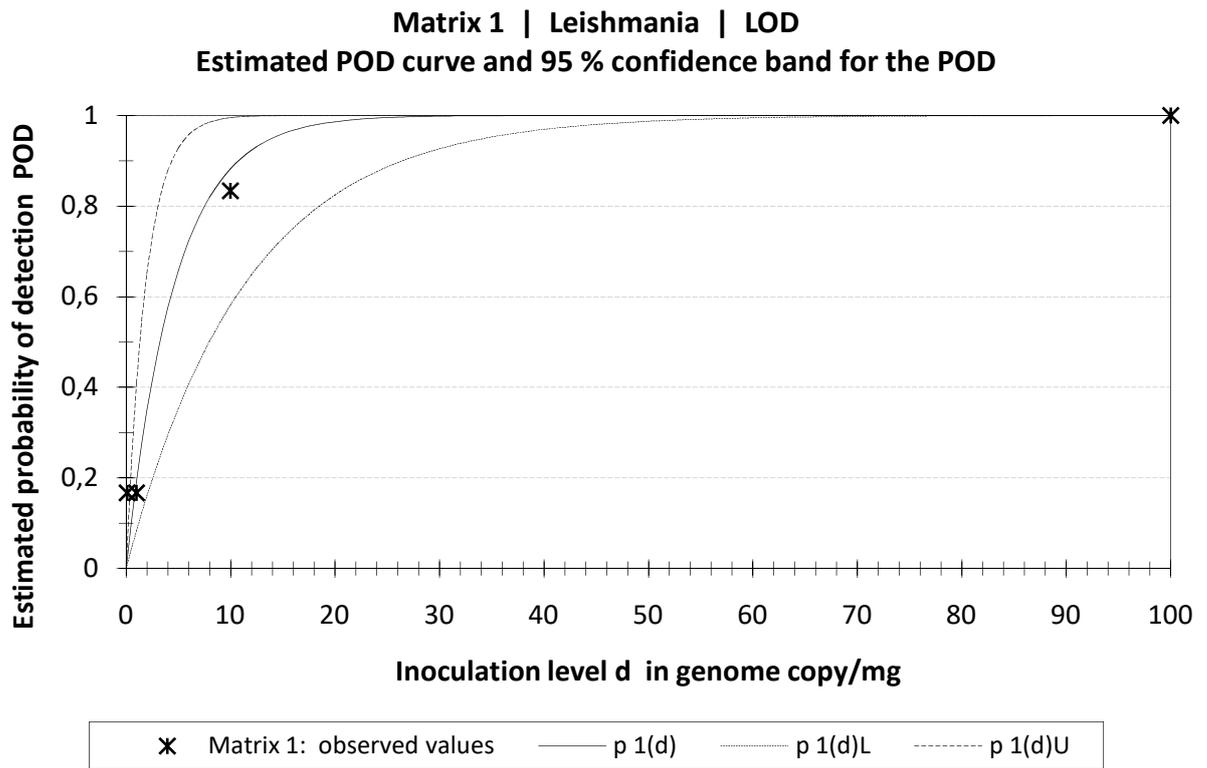


Figura 3



**RESUMO****COMPOSIÇÃO REACIONAL PARA DIAGNÓSTICO E QUANTIFICAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA DE *LEISHMANIA* E SEU MÉTODO DE USO EM PCR E qPCR**

A presente invenção trata uma composição reacional para detecção e quantificação de infecções por *Leishmania* spp. incluindo insumos (oligonucleotídeos, sondas, controles positivos, controle negativo, e controle de extração do DNA), e os métodos de PCR e de qPCR para diagnóstico de leishmanioses humana e animal e, quantificação do parasito. A invenção está relacionada à detecção de ácido desoxirribonucleico genômico (DNA) ou ácido desoxirribonucleico complementar (cDNA) em amostras biológicas de pacientes com lesões características da doença. A composição reacional apresenta alta sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade. A presente patente se situa no campo da biotecnologia industrial.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

### Código de Controle

Campo 1



Campo 2



### Outras Informações:

- Nome do Arquivo: Listagem de sequência.txt
- Data de Geração do Código: 18/02/2021
- Hora de Geração do Código: 15:11:43
- Código de Controle:
  - Campo 1: 0F1B411BEB0C5C48
  - Campo 2: E757E51B4ED47F17