



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

(21) BR 102020007615-9 A2



(22) Data do Depósito: 16/04/2020

(43) Data da Publicação Nacional: 26/10/2021

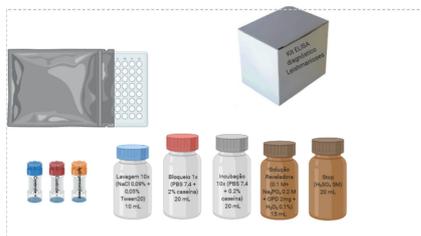
(54) **Título:** PEPTÍDEO SINTÉTICO PSLI379 E KIT PARA IMUNODIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

(51) **Int. Cl.:** G01N 33/569; G01N 33/68; C07K 7/08.

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

(72) **Inventor(es):** VANETE THOMAZ SOCCOL; JOYCE CARVALHO PEREIRA; PEDRO HENRIQUE DOS SANTOS SOUSA.

(57) **Resumo:** PEPTÍDEO SINTÉTICO PSLI379 E KIT PARA IMUNODIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA. A presente invenção descreve a produção de um kit ELISA utilizando um novo antígeno, o peptídeo (SEQ no. 1) PSLi379, para imunodiagnóstico de leishmanioses visceral canina (LVC), doença causada pelo protozoário *Leishmania infantum*. Os métodos de diagnóstico são baseados na interação de tal peptídeo com componentes de amostras biológicas e posterior detecção da resultante interação. O kit de diagnóstico ELISA compreende o uso do peptídeo e reagentes de detecção da reação entre peptídeos e componentes da amostras biológicas. A invenção também se refere a composições imunológicas que contenham peptídeos como princípio ativo. O peptídeo sintético descrito na presente invenção apresenta utilidade em quaisquer métodos, kit de diagnóstico e biosensores, usados para detectar a infecção e/ou a doença, em cães, com maior sensibilidade e especificidade para LVC, reduzindo resultados falsos positivos e falsos negativos. O produto reivindicado na presente invenção não apresenta toxicidade. Foram testados com soros caninos. A aplicação está relacionada com a saúde humana e veterinária.



## PEPTÍDEO SINTÉTICO PSLI379 E KIT PARA IMUNODIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

### **Campo da invenção**

[001]. A presente invenção trata de novo antígeno para imunodiagnóstico de leishmaniose visceral canina (LVC). A presente invenção reivindica a produção do Kit diagnóstico, com o uso do peptídeo PSLi379 como antígeno, sintetizado quimicamente a partir de uma sequência palindrômica (SEQ No. 1). O kit usará o método de imunoenensaio (ELISA), padronizado para esta invenção, na qual o diagnóstico para LVC apresenta maior sensibilidade e especificidade. O antígeno permite o aperfeiçoamento da reatividade dos testes diagnósticos sorológicos. A presente patente se situa no campo industrial.

### **Fundamentos da invenção**

[002]. Leishmaniose é uma doença tropical negligenciada, causada por mais de 20 espécies de protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania* Ross, 1903. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se que ocorra 1.2 milhões de novos casos de Leishmaniose Cutânea (LC), em 98 países e, nos cinco continentes (Alvar et al., 2012). Já a forma visceral (LV) afeta até 400.000 pessoas a cada ano, em todo o mundo. A LV é endêmica na Índia, Bangladesh, Sudão do Sul, Sudão, Brasil e Etiópia, já a LC está distribuída na Ásia Ocidental, Mediterrâneo e, América Latina (WHO 2010; Alvar et al., 2012). A LV em humanos tem alta letalidade na ausência de diagnóstico precoce e tratamento adequado, com taxa de mortalidade de até 10%. É a segunda maior infecção parasitária causadora de mortes no mundo, depois da Malária (Mathers, Ezzati &

Lopez 2007; Alvar et al., 2012). Para cães, que são os reservatórios do parasito, não existe estatísticas oficiais. Mas a taxa de prevalência é variável de um país a outro e de região para região podendo chegar a 20% (Thomaz Soccol et al., 2017). A LV é uma doença crônica progressiva, caracterizada como uma antropozoonose de grande importância, pelo fato de cães infectados possuírem intenso parasitismo facilitando a contaminação dos vetores (Abranches & Silva Pereira 1991; Carvalho Neta et al., 2007). O reservatório, como um sistema ecológico no qual o parasito sobrevive, deve ser consistente, equilibrado e ser considerado sempre em uma escala espaço-temporal único (Ashford, 1997; Haydon et al., 1997). Com isso, os critérios utilizados para definir uma espécie como reservatório são complexos e é de difícil distinção entre hospedeiro primário e secundário. Atualmente, além dos registros de infecção em animais silvestres, (roedores, marsupiais, edentados e canídeos silvestres) ocorre também infecções em animais domésticos (*Canis familiaris*, *Equus caballus*, *Felis catus domesticus*) por várias espécies de *Leishmanias* sp. (Ms-sinan, 2007). A urbanização da doença facilitou a transmissão pois há um grande número de cães nos grandes centros urbanos o que facilita a manutenção do complexo parasitário (Feitosa et al., 2000; Carvalho Neta et al., 2007). Devido à variedade de sinais clínicos, da doença nestes animais, o diagnóstico clínico é difícil de ser realizado. Assim, os animais podem permanecer assintomáticos por toda a vida ou desenvolver sinais clínicos após períodos que variam de três meses a alguns anos (Ikeda-Garcia & Marcondes, 2007), permanecendo parasitado e infectando vetores. O método utilizado para prevenção é o uso de inseticidas e vacinação dos cães (Solano-Gallego et al., 2009), todavia, não tem sido efetivo. Em alguns países o controle da LVC é dado pela eutanásia dos cães soropositivos (Dantas-Torres et al., 2012; Brasil, 2014), mas estudos mostraram que essa medida não diminui o número de casos do país, e

a população não aceita esse tipo de método, por razões éticas (Costa, 2011; Pereira-da-Silva et al., 2017). Atualmente no Brasil, para mitigar os problemas éticos, foi autorizado o uso de medicamentos em cães que não sejam usados em humanos.

[003]. Para o diagnóstico da LVC o Ministério da Saúde (MS) considera o método parasitológico como padrão ouro (Cota et al., 2012). No entanto, o método é invasivo e necessita detectar a forma amastigota por microscopia, o que leva a baixa sensibilidade. A cultura em meio bifásico ou líquido é altamente suscetível à contaminação (Boelaert et al., 2007; Goto & Lindoso, 2010; De Vries, Reedijk & Schallig, 2015). A técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), a qual detecta o DNA do parasito apresenta sensibilidade variada dependendo da fase que se encontra o ciclo, apesar da alta especificidade (Gomes et al., 2017; Rampazzo et al., 2017). Testes sorológicos como ensaios imunoenzimático (ELISA), teste de imunofluorescência (IFAT), teste de aglutinação direta, Western blot e testes imunocromatográficos detectam anticorpos específicos presentes nas amostras de soro dos pacientes. Mas apresentam problemas de sensibilidade e especificidade (Georgiadou, Makaritsis & Dalekos, 2015; Magalhães et al., 2017). Para o diagnóstico da LV canina, foi implementada a Nota Técnica Conjunta nº 01/2011-CGDT-CGLAB/DEVIT/SVS/MS, que prevê a aplicação do teste TR DPP (Biomanguinhos) na triagem diagnóstica, e teste ELISA como diagnóstico confirmatório (Brasil, 2011). O teste TRDPP mostrou baixa sensibilidade, especificidade e, em algumas regiões e apresenta reação-cruzadas com outras doenças. Isso gera resultados falsos-positivos levando animais erroneamente para eutanásia (Solano-Gallego et al., 2009; Grimaldi et al., 2012).

[004]. Além da modulação negativa da resposta imune diretamente, as espécies causadoras da LV possuem diversos mecanismos de evasão

do sistema imune do hospedeiro. Estudos têm mostrado que alterações fisiológicas teciduais e remodelações vasculares que são causadas pela doença também contribuem para replicação e persistência do parasito no hospedeiro. Células inflamatórias são recrutadas pelo sistema imune quando as formas promastigotas são depositadas na derme do hospedeiro vertebrado, levando a ativação do sistema imune adaptativo (Liu & Uzonna, 2012). Após serem reconhecidas, há a ativação de vias de sinalização intracelular que são necessárias para o início das respostas inflamatórias e controle da proliferação do parasito pela resposta imune inata (McFarlane et al., 2008), e possuem papel vital na produção de citocinas pró-inflamatórias que são fundamentais para a imunidade do hospedeiro contra a doença (Srivastava et al., 2012).

[005]. Para contextualizar o estado da arte desta invenção inicialmente a literatura foi consultada na base de dados Pubmed e, foram encontrados 35 artigos para os termos: *Leishmania*\* AND Kit diagnóstico AND serology. Dentre esses artigos, apenas três (3) artigos estavam relacionados a estudos de diferentes antígenos para diagnóstico de LV humana (LVH) e 2 para LVC, estes apresentando uma maior sensibilidade e especificidade em relação aos testes utilizados atualmente. Pesquisando outro grupo de palavras: *Leishmania*\* AND Kit diagnóstico, encontramos 109 artigos, 11 deles faziam menção ao assunto de interesse e apresentavam os objetivos semelhantes a **presente invenção**, porém, apresentavam baixos valores de sensibilidade e especificidade, quando comparados com a **presente invenção além do antígeno ser diferente**. Para a busca de patentes foi usada a plataforma INPI e resultou em 26 processos solicitando patentes que incluem desenvolvimento de um kit ELISA para diagnóstico de leishmanioses. Destes, 16 apresentaram o mesmo objetivo, no qual utilizavam uma variedade de peptídeos sintéticos e, ao analisar os

resultados obtidos e, comparar com **a presente invenção**, nosso estudo apresentou melhor sensibilidade e especificidade em comparação as demais patentes, além de não apresentarem a mesma sequência de aminoácidos do antígeno e, as demais invenções não desenvolvem um kit pronto para uso imediato. Já na busca na plataforma PATENT INSPIRATION foram encontradas 429 patentes, sendo destas seis com os mesmos objetivos. Porém, com sequências diferentes e com sensibilidade e especificidade menores que a encontrada por nosso grupo. Na busca específica por peptídeo derivado de uma proteína recombinante, foi encontrado documento de patente que sugere o uso de proteína recombinante no diagnóstico de leishmanioses, solicitada por nosso grupo BR102017022744-8. Todavia, a produção dos peptídeos é realizada por via biológica (o conjunto de sequências de nucleotídeos são expressas em *Leishmania tarentolae* como vetor de expressão, capaz de traduzir antígenos recombinantes semelhantes a peptídeos de *L. braziliensis* e/ou *L. infantum*) e não por síntese química, por Fmoc (fluorenilmetiloxycarbonila), utilizando-se, para tal, um protocolo de síntese de peptídeos em fase sólida (resina como suporte sólido insolúvel), que usa aminoácidos especiais para a síntese *in vitro*. **Nossa patente** aborda a síntese química do antígeno com modificações e, de um kit de imunodiagnóstico ELISA pronto para uso para detecção da LVC. Outro fator importante que difere da **nossa reivindicação** é que as patentes incluem valores baixos de sensibilidade e especificidade, além de terem usado baixo número de amostras biológicas para a validação do teste diagnóstico. Em geral, as técnicas sorológicas são propostas como diagnóstico de rotina e mostram boa precisão diagnóstica na maioria dos estudos (Rodríguez-Cortés et al., 2010). Diferentes métodos imunológicos são empregados para o diagnóstico das leishmanioses como:

[006]. **Teste de intradermorreação de Montenegro**, ou teste cutâneo de Montenegro. Este é um teste desenvolvido por Montenegro em 1926 para diagnosticar a leishmaniose cutânea (LC) (Montenegro, 1926), e tem sido o método mais utilizado nos países endêmicos. O teste é baseado em uma resposta de hipersensibilidade tardia usando extrato proteico total de *L. amazonensis* (cepa OMS-MHOM/BR73/PH8) no Brasil; que é inoculada intradermicamente no antebraço do paciente com suspeita da doença, usado especialmente para leishmaniose na forma cutânea. A presença de reações de endurecimento com diâmetro maior que 5 mm em 48 horas é considerada positiva. Embora seja uma técnica de baixo custo para diagnóstico, outras infecções cutâneas (esporotricose), alergia ao diluente ou reações cruzadas que podem resultar em falsos positivos. Além disso, os testes podem dar negativo nos primeiros meses da infecção, durante a fase de janela imunológica (de Lima Barros, 2005; Schubach et al., 2005; World health organization, 2010).

[007]. **Teste de aglutinação direta**. O princípio do teste de aglutinação direta é a aglutinação do antígeno do parasito com anticorpos usando beads de látex que tenham sido previamente sensibilizadas com anticorpos contra o antígeno de *Leishmania*. O teste de aglutinação direta tem uma elevada precisão diagnóstica em algumas áreas geográficas. No entanto, os resultados estão sujeitos a pipetagem múltipla, um longo tempo de incubação e interpretação técnica pessoal, o que pode introduzir uma variação ou erro potencial (Adams et al., 2012).

[008]. **Teste de fluxo lateral em tira imunocromatográfica**. O teste da tira imunocromatográfica é baseado na impregnação de uma tira de nitrocelulose com um antígeno específico de *Leishmania*, e a sua reação com anticorpos anti-*Leishmania* do soro do doente que produz

uma mudança de cor visível. Foi desenvolvido por ser facilmente realizado independentemente do nível particular de especialização, rápido, barato e boa reprodutibilidade no campo (Chappuis et al., 2006). Atualmente, os antígenos específicos de *Leishmania* para a tira imunocromatográfica estão em constante desenvolvimento, com diferentes propostas de antígenos específicos incluindo rK39, rK28, rK16, proteína de choque térmico 70 (hsp70), proteína de choque térmico 83 (hsp83), glicoproteína 63 (gp63), e outros (Sundar & Rai, 2002; Mbui et al., 2013; Mukhtar et al., 2015; Siripattanapipong et al., 2017). O antígeno de *Leishmania* mais utilizado é o rK39, uma sequência de repetição de 39 aminoácidos que faz parte da proteína relacionada com a cinesina de *L. infantum*. Muitos destes testes são restritos ao serviço público ou exigem importação o que aumenta o custo para os médicos veterinários e conseqüentemente para os proprietários de animais.

[009]. **Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)**. O teste imunoensoio é uma técnica em que um antígeno de *Leishmania* (recombinante ou bruto) é imobilizado e se liga ao anticorpo específico. A reação pode ser detectada quando um segundo anticorpo dirigido contra as imunoglobulinas da espécie e ligado a uma enzima é capaz de gerar o produto detectável pela alteração da cor. A intensidade da alteração da cor permite quantificar a concentração de anticorpos anti-*Leishmania* a partir do soro do doente. Os antígenos usados neste tipo de teste são semelhantes aos propostos para o teste imunocromatográfico em fita, como as proteínas relacionadas com a cinesina (por exemplo, rK9, rK26, rK39), as proteínas de choque térmico (por exemplo, rHSP70) e outros (rlep12, *L. infantum* P0 ribosomal protein) (Mohapatra et al., 2010; Srividya et al., 2012). Deve-se destacar a importância da técnica ELISA, no conjunto de métodos imunológicos, pois seria a técnica padrão para estudos populacionais devido à sua rapidez, baixo custo e facilidade de automatização. Além disso, as

leituras com esta técnica são em escala contínua, com a qual é possível classificar em formato binário (infectado e não infectado) ou em mais de duas categorias, dependendo da abordagem. Com esta versatilidade dos dados, é possível analisar a partir de testes diagnósticos ordinais ou contínuos, mesmo sem aplicar um valor de corte. Isto é importante porque a seleção incorreta do valor de corte pode distorcer severamente os resultados.

[010]. Na tabela 1 é apresentada a comparação entre os métodos imunológicos

**Tabela 1 Comparação entre métodos imunológicos para diagnósticos de Leishmaniose**

<b>Método</b>	<b>Sensibilidade</b>	<b>Especificidade</b>	<b>Limitação</b>	<b>Referências</b>
<b>Teste de Intradermorreação de Montenegro</b>	82.0 –100.0%	90 –100%	Não é quantitativo. O antígeno não foi padronizado no mundo. Necessita de implementação de controle de qualidade (CQ).	Faber <i>et al.</i> , 2003; Reis <i>et al.</i> , 2008
<b>Teste de aglutinação direta</b>	40.9 –85.6%	76.7 – 99.2%	Disponibilidade limitada antígeno qualidade controlada. A alta taxa de falsos negativos em condições especiais (HIV co-infectado)	Chappuis <i>et al.</i> , 2006; Boelaert <i>et al.</i> , 2014
<b>Teste de fluxo Lateral em tira</b>	74.5 –99.5%	76.1 – 97.7%	Não é quantitativo Variação regional significativa da sensibilidade	WORLD HEALTH ORGANIZATION,

<b>Imunocromatográfica</b>			e especificidade Resultado positivo em indivíduos saudáveis em regiões endêmicas	2011
<b>ELISA</b>	88.0 –93%	77.0 – 90.0%	Resposta sorológica baixa em pacientes com LC/LMC Necessita do uso de um padrão.	SARKARI <i>et al.</i> 2014; WOLF <i>et al.</i> , 2014

[011]. O diagnóstico da leishmaniose visceral canina é realizado a partir de uma combinação de vários dados, tais como aspecto clínico do animal, dados epidemiológicos e, exames laboratoriais. Porém, devido à falta de um teste diagnóstico com alta especificidade e sensibilidade para esta doença, o desenvolvimento de um método com estas especificações ainda precisa ser desenvolvido, devendo ser de fácil uso e baixo custo.

[012]. **Nossa patente** apresentou maior sensibilidade, especificidade, acurácia e número de amostras utilizadas exigidos pelas normas laboratoriais. Mesmo que haja inúmeras buscas para desenvolver imunobiológicos para testes de diagnósticos mais sensíveis e específicos contra leishmanioses ainda são necessárias melhorias na eficácia destes métodos de diagnóstico da doença, tanto nos hospedeiros envolvidos no ciclo de vida do parasito quanto na fase na doença, pois os disponíveis no mercado para as leishmanioses possuem diversas limitações. A ausência de métodos de diagnóstico efetivos, a eficiência do tratamento e de qualquer iniciativa de bloqueio da transmissão ou vacinação compromete campanhas de controle da doença (Ministério da Saúde. Doenças Infecciosas e Parasitárias: guia de bolso. Brasília. 2006).

[013]. Assim, a **presente invenção** trata da produção de um kit ELISA utilizando o peptídeo sintético PSLi379 que pode ser produzido em grande escala, tem reprodutibilidade e alta sensibilidade e especificidade para diagnosticar leishmanioses em cães (LVC), além do baixo custo de produção, não é tóxico nem invasivo para o paciente. A vantagem da presente invenção é ser um kit pronto para uso, utilizando como antígeno o peptídeo sintético PSLi379, para diagnosticar leishmanioses em cães,

### **Breve descrição dos desenhos**

[014]. Figura 1: apresenta o gráfico da curva ROC e AUC obtidas no teste Enzima-Imuno-Ensaio (ELISA) referentes à reatividade humoral das amostras biológicas aqui usando soro de cães proveniente de áreas endêmicas e não endêmicas para Leishmaniose Visceral Canina (LVC) contra o peptídeo PSLi379. O eixo X representa a sensibilidade dos grupos avaliados e, o eixo Y representa o valor da especificidade. Amostras de cães não infectados (Controle negativo, n = 40) e, cães infectados por *Leishmania infantum* (Li, n = 40). Na técnica de ELISA utilizou-se soros diluídos 1:200. Essa curva foi usada para determinar o nível de corte (cut off), entre soros reagentes e não reagentes (positivos e negativos) que foi definida em absorbância igual ou inferior a 0.130

[015]. Figura 2 – Pesquisa de reatividade cruzada com outros agentes patogênicos. Exemplo mostrado na figura 2 refere-se aos dados de soros positivos para *Toxoplasma gondii* que se mostraram negativos frente ao antígeno.

[016]. Figura 3 - Apresenta o desenho da placa que será produzida para uso comercial e, seus componentes como uma placa de 96 poços, 1 frasco de tampão de lavagem 10x, 1 frasco de solução de bloqueio 1x, 1 frasco de tampão de incubação 10x, 1 frasco de solução reveladora,

1 frasco de solução de parada (stop), 1 frasco com soro de controle positivo, 1 frasco para soro controle negativo e, 1 frasco contendo IgG-peroxidase.

### **Descrição da invenção**

[017]. Na presente invenção um antígeno heterólogo sintético específico para detecção de cães portadores de LVC foi usado na metodologia ELISA mostrando alta sensibilidade e especificidade. O peptídeo sintético PSLi379 está contido no gene relativo à cinesina de *L. braziliensis*, como descrito na patente "ANTÍGENO RECOMBINANTE DE *Leishmania* E SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS QUE A CODIFICA OU QUE CODIFICA SEUS PEPTÍDEOS, MÉTODO PARA PRODUZIR OS REFERIDOS ANTÍGENOS, E USO DOS MESMOS". O peptídeo foi sintetizado quimicamente pela estratégia fluorenilmetiloxycarbonila (Fmoc), utilizando-se, para tal, um protocolo de síntese de peptídeos em fase sólida (resina como suporte sólido insolúvel), que usa aminoácidos especiais para a síntese in vitro (ver Alban et al., 2014). Esses aminoácidos possuem o grupamento amina protegido pelo grupamento Fmoc e são acoplados à resina. O protocolo foi realizado conforme descrito em MERRIFIELD (1965) usando o sintetizador de peptídeos automático MultiPep RS (Intavis Bioanalytical Instruments, Nattermannallee, Alemanha). Esta técnica consiste em fixar o aminoácido C-terminal do peptídeo sobre um suporte sólido insolúvel e depois alongar a cadeia peptídica por adições sucessivas de resíduos da porção C-terminal para N-terminal. Estes aminoácidos possuem o grupamento amina protegido pelo grupamento Fmoc, sua cadeia lateral também está protegida por um grupo protetor para evitar reações indesejadas. Ciclos de acoplamento (de aminoácidos com seus ativadores) e desproteção (remoção do grupamento Fmoc pela presença de piperidina 20%) são realizados até que todos os

aminoácidos do peptídeo estejam acoplados. Após o término do último ciclo, o peptídeo já sem o grupamento Fmoc do último aminoácido é removido da resina por uma etapa chamada de clivagem. Nesta etapa também se elimina os grupamentos protetores da cadeia lateral. Em seguida esta solução é filtrada e precipitada com éter etílico gelado obtendo-se assim o peptídeo. Após centrifugação o éter é eliminado por evaporação. Em seguida o peptídeo é liofilizado, pesado, dissolvido em água ultra-pura e armazenado a -20°C ou -80 °C em alíquotas na concentração de 1 mg/mL. No kit o antígeno irá já sensibilizado na placa de ELISA para manter a estabilidade do reagente. O método para imunodiagnóstico de LVC pode ser selecionado do grupo compreendendo ELISA, mas não se limitando a estes e apresentar os seguintes passos:

a) ligação de anticorpos antileishmaniais de uma amostra clínica (soro, lágrima, urina, mas não se limitando a estes) ao peptídeo (SEQ.no1- isolado ou em formação de polímeros constituídos da repetição de uma sequência peptídica podendo ser separadas por qualquer método de separação, incluindo espaçadores e *linkers*) ligados a um suporte sólido.

b) contactar os anticorpos do passo (a) com um anticorpo secundário ou uma proteína (proteína A ou G), conjugados a uma enzima ou a um marcador e que se ligam aos anticorpos do passo (a); sendo que as conjunto de enzimas que podem ser selecionada(s) do grupo compreendendo peroxidase (mas não se limitando a esta) e, o marcador pode ser selecionado do grupo compreendendo enzimas, radioisótopos, biotina, cromóforos, fluoróforos e quimioluminescentes;

c) detectar os anticorpos antileishmaniais na amostra biológica supracitada pela detecção do anticorpo secundário ou proteína especificamente ligadas ao dito anticorpo anti-leishmanial.

[018]. O método ELISA pode ser realizado utilizando-se amostras biológicas de sangue, soro ou plasma do animal infectado ou outro fluído biológico como saliva, mas não se limitando a estes,

[019]. A tecnologia compreende um Kit ELISA para teste imunodiagnóstico da LVC com o antígeno PSLi379 e, um anticorpo secundário ou uma proteína (proteína A ou G), onde o anticorpo secundário ou a proteína está conjugado a uma enzima (peroxidase), e um reagente para detectar a dita enzima ou marcador, mas não se limitando a este sistema revelador. No Kit o peptídeo sintético estará ligado a um suporte sólido, sendo que esse suporte sólido poderá ser de nitrocelulose, nylon, látex, polipropileno e poliestireno, mas não se limitando a estes.

[020]. Componentes do kit:

a) Tampão de lavagem, o qual é composto de NaCl 0,9% + 0,05% Tween20. O tampão será acondicionado em um frasco de 10 mL, concentrado 10x, precisando ser diluído em água destilada, para ficar na concentração 1x.

b) Tampão de bloqueio composto de caseína a 2% em tampão PBS 7.4. Este reagente será enviado em um frasco de 20 mL, podendo ser aliquotado e estocado a -20°C.

c) Tampão de incubação composto de caseína a 0.2% em PBS 7.4. Será acondicionado em um frasco de 20 mL, concentrado 10x, precisando ser diluído em PBS, para ficar na concentração de 1x e, guardado em alíquotas no freezer -20°C.

d) O anticorpo secundário ou uma proteína (proteína A ou G), onde o anticorpo secundário ou a proteína está conjugado a uma enzima (peroxidase). Este anticorpo será acondicionado num frasco com 100 µL, no qual deverá ser usado na diluição de 1:7500 no tampão de incubação.

e) A solução reveladora, composta de ácido cítrico 0,1 M, Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2 M, OPD 2 mg e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,1%, irá em um frasco de 15 mL.

f) A solução de parada (stop), é composta de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5M, na proporção de 1:20, irá em um frasco de 20 mL.

[021]. A técnica ELISA foi escolhida na presente invenção por ser menos invasiva, de fácil execução e automação, permitindo estudos e aplicação em grande número de amostras ou simplesmente no diagnóstico individual.

[022]. A presente invenção pode ser melhor compreendida, mas de modo não limitante, com os exemplos a seguir.

[023]. **Exemplo - Validação do peptídeo PSLi379 frente a soro de cães infectados com *Leishmania***

Ensaio ELISA foram realizados para validar e caracterizar a reatividade do peptídeo PSLi379, composto pela sequência XXXERLQDAKKRAAELGR, frente a infecção por parasitos do gênero *Leishmania*. Foram testados soros de cães infectados com *L. infantum*. Os ensaios foram realizados em placas de PVC flexível de 96 poços (Costar). Cada poço foi sensibilizado com 0.031 µg de antígeno em coating buffer (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,16%, NaHCO<sub>3</sub> 0,29%, pH 9,6), e deixadas overnight a 4°C. A solução inicial foi descartada e a placa lavada com solução de lavagem (NaCl 0,9%, Tween 20 a 0,05%) para remoção do antígeno não fixado. Após a sensibilização, a placa foi bloqueada com tampão PBS 7,4 acrescidos de 2% de caseína durante 60 minutos, a 37 °C. Após o bloqueio, toda a solução dos poços foi removida por aspiração. A seguir, 100 µL dos soros diluídos 1:200 em PBS 7,4 com caseína 0,2% foram adicionados aos poços e incubados a 37°C por 60 minutos. As placas foram lavadas quatro vezes com a solução de lavagem (PBS 7,4, 0,05% Tween20) e, em

seguida, foi adicionado aos poços 100 µL do anticorpo anti-IgG canino diluído 1:200 em PBS 7,4-caseína 0.2%. Após incubação a 37°C por 60 minutos, as placas foram novamente lavadas por quatro vezes com a solução de lavagem, e 100 µL da solução reveladora, contendo ácido cítrico 0,1 M, Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2 M, OPD 2 mg e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,1 % foram adicionados. As placas foram incubadas a temperatura ambiente (25-37°C) ao abrigo de luz por 10 a 30 minutos com a solução reveladora, quando então a reação foi interrompida pela adição de 25 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5M. A absorbância resultante foi lida em leitor de microplaca a 492 nm.

[024]. O teste ELISA utilizando o antígeno aqui reivindicado PSLi379 (Figura 1) apresentou excelente desempenho na capacidade simultânea de detectar resultados positivos e negativos para cães. O ganho de sensibilidade obtido pelo teste ELISA usando o peptídeo sintético (PSLi379), é devido ao fato desta proteína apresentar aminoácidos com alta imunogenicidade e ser palindrômico na proteína nativa. Esta invenção conseguiu sintetizar quimicamente uma pequena região antigênica com múltiplas cópias e usar numa concentração que é capaz de reconhecer os anticorpos em animais infectados com o parasito. É importante evitar a manutenção de cães infectados (LVC) em áreas endêmicas, bem como evitar a eutanásia desnecessária de animais por limitações na sensibilidade ou especificidade do teste devido à infecção por outros microrganismos, resultando em resultados falsos positivos, comumente observados em testes de diagnósticos que utilizam antígeno bruto do parasito ou Tr-DPP. Avaliando a AUC, observou-se que o teste ELISA-PSLi379 apresentou área de 0.992 para cães, indicando que praticamente não houve incidência de resultados falsos positivos e falsos negativos. Portanto, esse antígeno é eficiente em discriminar indivíduos doentes de sadios.

[025]. Conforme descrito na Tabela 2, o resultado dos valores de sensibilidade e especificidade foram respectivamente de 95,00 e 100% para cães. Em adição, o valor para o índice de Youden do teste ELISA- usando o peptídeo aqui em pauta foi de 0,950 para os soros de cão. Ser próxima de 1 indica menor proporção total de erros de classificação no diagnóstico, classificando como uma excelente opção para diagnóstico da LVC.

[026]. Tabela 2: Performance de diagnóstico em amostras dos soros de cães portadores de LVC utilizando o peptídeo PSLi379.

Teste	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)
Cães LVC	95,00	100,00

[027]. Para verificar se o Kit ELISA apresentava reatividade cruzada, foi testado o mesmo frente a soros de cães infectados com *Toxoplasma gondii*, para verificar a reatividade cruzada (Figura 2). Pode-se concluir que os soros dos animais infectados não apresentaram reatividade cruzada com o peptídeo PSLi379.

[028]. A reação do teste ELISA- PSLi379 mostrou-se útil e eficiente em identificar corretamente os cães infectados e não infectados. Estes dados permitem concluir pela validade das reações sorológicas utilizadas para o diagnóstico da LVC.

## Referências

Alban, S.M., de Moura, J. F., Thomaz-Soccol, V., Sékula, S.B., Alvarenga, L.M., Mira, M.T., Olortegi, C.C., Minozzo, J.C. Phage display and synthetic peptides as promising biotechnological tools for the serological diagnosis of leprosy. **PLoS One**, 9(8):e106222, 2014.

Abranches, P., Santos-Gomes, G., Rachamim, N. An experimental model for canine leishmaniasis. **Parasitol. Immunol.** 13(5):537-550, 1991.

Adams, E.R., Jacquet, D., Schoone, G., Gidwani, K., Boelaert, M., Cunningham, J. Leishmaniasis direct agglutination test: using pictorials as training materials to reduce inter-reader variability and improve accuracy. **PLOS Negl. Trop. Dis.** 6(12):e1946, 2012.

Alvar, J., Velez, I.D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano J, Jannin, J., den Boer, M., WHO leishmaniasis Control Team. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS One.** 7(5): e35671, 2012.

Ashford R.W. What it takes to be a reservoir. **Host. Bel. J. Zool.** 127(1): 85–90, 1997.

Boelaert, M., Bhattacharya, S., Chappuis, F., El Safi, S.H., Hailu, A., Mondal, D. Evaluation of rapid diagnostic tests: visceral leishmaniasis. **Nat. Rev. Microbiol.** 5(11 supp): S30-S39, 2007.

Boelaert, M., Verdonck, K., Menten, J., Sunyoto, T., van Griensven, J., Chappuis, F., Rijal, S. Rapid tests for the diagnosis of visceral leishmaniasis in patients with suspected disease. **Cochrane Database of Systematic Reviews.** (6):CD009135, 2014.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral.** Brasília, 2014. 120p.

Carvalho Neta, A.V., Paixão, T.A., Silva, F.L., Santos, R.L. Panofthalmite em cão com leishmaniose visceral: relato de caso. **Clínica Veterinária.** 66:52-56, 2007.

Chappuis, F., Rijal, S., Soto, A., Menten, J., Boelaert, M. A meta-analysis of the diagnostic performance of the direct agglutination test and rK39 dipstick for visceral leishmaniasis. **B.M.J.**, 333(7571):723, 2006.

Costa, C.H.N. How effective is dog culling in controlling zoonotic visceral leishmaniasis? A critical evaluation of the science, politics and ethics behind this public health policy. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 44(2): 232–242, 2011.

Cota, G.F., Sousa, M.R., Demarqui, F.N., Rabello, A. The diagnostic accuracy of serologic and molecular methods for detecting visceral leishmaniasis in HIV infected patients: metaanalysis. **PLoS Negl. Trop. Dis.** 6(5):e1665, 2012.

Dantas-Torres, F., Solano-Gallego, L., Baneth, G., Ribeiro, V.M., de Paiva-Cavalcanti, M., Otranto, D. Canine leishmaniosis in the Old and New Worlds: unveiled similarities and differences. **Trends Parasitol.** 28(12):531–538, 2012.

de Lima Barros, M. B., Schubach, A., Francesconi-do-Valle, A.C., Gutierrez-Galhardo, M.C., Schubach, T.M., Conceição-Silva, F., de Matos Salgueiro, M., Mouta-Confort, E., Reis, R.S., de Fátima Madeira, M., Cuzzi, T., Quintella, L.P., da Silva Passos, J.P., Conceição, M.J., Almeida Marzochi, M.C. Positive Montenegro skin test among patients with sporotrichosis in Rio De Janeiro. **Acta Trop.**, 93(1):41-47, 2005.

de Vries, H.J., Reedijk, S.H., Schallig, H.D. Cutaneous leishmaniasis: recent developments in diagnosis and management. **Am. J. Clin. Dermatol.** 16(2):99-109, 2015.

Faber, W.R., Oskam, L., van Gool, T., Kroon, N.C., Kneegt-Junk, K.J., Hofwegen, H., van der Wal, A.C., Kager, P.A. Value of diagnostic techniques for cutaneous leishmaniasis. **J. Am. Academy of Dermatol.** 49(1):70-74, 2003.

Faria, A.R., Andrade, H.M. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina: grandes avanços tecnológicos e baixa aplicação prática. **Rev. Pan-Amaz Saude.** 3(2):47-57, 2012.

Feitosa, M.M., Ikeda, F.A., Luvizotto, M.C.R., Perri, S.H.V. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba –São Paulo (Brasil). **Clínica Vet.** 28(28):36-44, 2000.

Georgiadou, S.P., Makaritsis, K.P., Dalekos, G.N. Leishmaniasis revisited: current aspects on epidemiology, diagnosis and treatment. **J. Transl. Int. Med.** 3(2):43–50, 2015.

Gomes, C.M., Cesetti, M.V., Paula, N.A., Vernal, S., Gupta, G., Sampaio, R.N., Roselino, A.M. Field validation of SYBR green- and TAQMAN-based real-time PCR using biopsy and swab samples to diagnose American tegumentary leishmaniasis in an area where *Leishmania (Viannia) braziliensis* is endemic. **J. Clin. Microbiol.** 55(2):526–534, 2017.

Goto, H. & Lindoso, J.A.L. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert Rev. Anti. Infect. Ther.** 8(4):419–433, 2010.

Grimaldi, G. Jr., Teva, A., Ferreira, A.L., dos Santos, C.B., Pinto, I.S., de Azevedo, C.T. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP® CVL rapid test) for the

serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 2012;106:54-59.

Haydon, D.T., Cleaveland, S., Taylor, L.H., Laurenson, M.K. Identifying reservoirs of infection: A conceptual and practical challenge. **Emerg. Infect. Dis.** 8(12):468-1473, 1997.

Ikeda-Garcia, F.A., Marcondes, M. Métodos de diagnóstico da leishmaniose visceral canina. **Clínica Veterinária.** 71(12):34-42, 2007.

Liu, D & Uzonna, J.E. The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. **Front. Cell. Infect. Microbiol.** 2(83):1-8, 2012.

Magalhães, F.B., Castro-Neto, A.L., Nascimento, M.B., Santos, W.J.T., Medeiros, Z.M., Neto, A.S.L, Costa, D.L., Costa, C.H.N., dos Santos, W.L.C., Pontes de Carvalho, L.C., Oliveira, G.G.S., de Melo Neto, O.P. Evaluation of a new set of recombinant antigens for the serological diagnosis of human and canine visceral leishmaniasis. **PLoS One.** 12(9): e0184867, 2017.

Mathers, C.D., Ezzati, M., Lopez, A.D. Measuring the burden of neglected tropical diseases: the global burden of disease framework. **PLoS Negl. Trop. Dis.** 1(2):e114, 2007.

Mbui, J., Wasunna, M., Balasegaram, M., Laussermayer, A., Juma, R., Njenga, S.N., Kirigi, G., Riongoita, M., de la Tour, R., van Peteghem, J., Omollo, R., Chappuis, F. Validation of Two Rapid Diagnostic Tests for Visceral Leishmaniasis in Kenya. **PLoS Negl. Trop. Dis.** 7(9):e2441, 2013.

McFarlane, E., Perez, C., Charmoy, M., Allenbach, C., Carter, K.C., Alexander, J., Tacchini-Cottier, F. Neutrophils contribute to development

of a protective immune response during onset of infection with *Leishmania donovani*. **Infect. Immun.** 76(2):532–541, 2008.

Merrifield, R.B. (1965). Solid-phase peptide synthesis. **Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.** (32):221-296.

Mohapatra, T. M., Singh, D.P., Sem, M.R., Bharti, K., Sundar, S. Compararative evaluation of rK9, rK26 and rK39 antigens in the serodiagnosis of Indian visceral leishmaniasis. **J. Infect. Dev. Countr.** 4(2):114-117, 2010.

Montenegro, J. Cutaneous reaction in leishmaniasis. **Arch. Dermatol. Syphilol.** 13(2):187-194, 1926.

Mukhtar, M., Mukhtar, M., Abdoun, A., Ahmed, A.E., Ghalib, H., Reed, S.H., Boelaert, M., Menten, J., Khair, M.M., Howard, F.R. Diagnostic accuracy of rK28-based immunochromatographic rapid diagnostic tests for visceral leishmaniasis: a prospective clinical cohort study in Sudan. **Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.** 109(9):594–600, 2015.

MS-SINAN- Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. Ed. Ministério da Saúde. Brasília. 2007. 177p

Pattabhi, S., Whittle, J., Mohamath, R., El-Safi, S., Moulton, G.G., Guderian, J.A., Colombara, D., Abdoon, A.Q., Mukhtar, M.M., Mondal, D., Esfandiari, J., Kumar, S., Chun, P., Reed, S.G., Bhatia, A. Design, development and evaluation of rK28-based point-of-care tests for improving rapid diagnosis of visceral leishmaniasis. **PLoS Negl. Trop. Dis.** 4(9): e822, 2010.

Pereira-da-Silva, S., Marques, L.F.V., Lamounier, K.C., de Castro, J.M., BorjaCabrera, G. Leishmaniose visceral humana: reflexões éticas e jurídicas acerca do controle do reservatório canino no Brasil, **Rev. Bioética Derecho**. 39: 135–151, 2017.

Rampazzo, R.C.P., Solcà, M.D.S., Santos, L.C.S., Pereira, L.N., Guedes Jr, J.C.O., Veras, P.S.T., Fraga, D.B.M., Krieger, M.A., Costa, A.D.T. A ready-to-use duplex qPCR to detect *Leishmania infantum* DNA in naturally infected dogs. **Vet. Parasitol.** 246:100–107, 2017.

Reis, L.D.C., de Brito, M.E.F., de Almeida, E.L., Félix, S.M., Medeiros, A.C.R., Silva, C.J., Pereira, V.R.A. Clinical, epidemiological and laboratory aspects of patients with American cutaneous leishmaniasis in the State of Pernambuco. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 41(5):439-443, 2008.

Rodríguez-Cortés, A., Ojeda, A., Francino, O., López-Fuertes, L., Timón, M., Alberola, J. *Leishmania* infection: laboratory diagnosing in the absence of a “gold standard”. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 82(2):251-256, 2010.

Schubachl, A.O., Keyla, B., Marzochil, F., Moreiral, J.S., Schubachl, T.M.P., Araújo, M.L., do Valell, A.C.F., Passos, S.R.L., Marzochil, M.C.A. Retrospective study of 151 patients with cutaneous leishmaniasis treated with meglumine antimoniate. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 38(3):213-217, 2005.

Siripattanapipong, U., Kato, H., Tan-Ariya, P., Mungthin, M., Leelayoova, S. Comparison of Recombinant Proteins of Kinesin 39, Heat Shock Protein 70, Heat Shock Protein 83, and Glycoprotein 63 for Antibody Detection of *Leishmania martiniquensis* Infection. **J. Eukaryot. Microbiol.** 64(6):820-828, 2017.

Solano-Gallego, L., Koutinas, A., Miró, G., Cardoso, L., Pennisi, M.G., Ferrer, L., Bourdeau, P., Oliva, G., Baneth, G. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. **Vet. Parasitol.** 165(1-2):1–18, 2009.

Srivastava, A., Singh, N., Mishra, M., Kumar, V., Gour, J.K., Bajpai, S., Singh, S., Pandey, H.P., Singh, R.K. Identification of TLR inducing Th1-responsive *Leishmania donovani* amastigote-specific antigens. **Mol. Cell Biochem.** 359(1–2):359–368, 2012.

Srividya, G., Kulshrestha, A., Singh, R., Salotra, P. Diagnosis of visceral leishmaniasis: developments over the last decade. **Parasitol. Res.** 110(3):1065-1078, 2012.

Sundar, S & Rai, M. Laboratory Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. **Clinical and Diag. Lab. Immunol.** 9(5):951–958, 2002.

Thomaz-Soccol, V., Pasquali, A.K.S., Pozzolo, E.M., Leandro, A.S., Chiyo, L., Baggio, R., Michaliszyn, M.S., Silva, C., Cubas, P.H., Peterlle, R., Paz, O.L.S., Belmonte, I.L., Bisetto Jr, A. More than the eyes can see: the worrying scenario of canine leishmaniasis in the Brazilian side of the triple border. **Plos One.** 12(12):e0189182, 2017.

Wolf, D., Failing, K., Taubert, A., Pantchev, N. Serological diagnosis of canine leishmaniosis: comparison of three commercially available tests. **Parasitol. Res.** 113(5):1997–2002, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Control of leishmaniases. Expert committee. [S.l.]. 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. On Serie Diagnostics Evaluation Series No.4 Visceral leishmaniasis rapid diagnostic test performance. Geneva. 2011.

## REIVINDICAÇÕES

1. A metodologia ELISA caracterizada por compreender o peptídeo sintético PSLi379.
2. A metodologia ELISA caracterizada por compreender os componentes do kit imunodiagnóstico.
3. O kit imunodiagnóstico ELISA caracterizado por compreender o peptídeo sintético PSLi379.
4. O kit imunodiagnóstico caracterizado por compreender o peptídeo sintético PSLi379 para diagnóstico da Leishmaniose visceral canina.
5. O kit imunodiagnóstico caracterizado por compreender:
  - a) ligação de anticorpos antileishmaniais de uma amostra a um ou mais polipeptídios consistindo das sequências de aminoácidos do PSLi379, ligados a um suporte sólido;
  - b) contactar os anticorpos do passo (a) com um anticorpo secundário ou uma proteína, conjugados a uma enzima ou a um marcador e que se ligam aos anticorpos do passo (a);
  - c) detectar os anticorpos antileishmaniais na amostra supracitada pela detecção do anticorpo secundário ou proteína especificamente ligados ao dito anticorpo anti-leishmanial.
6. Método para teste imunodiagnóstico das leishmanioses, de acordo com a reivindicação 5, passo "a", caracterizado pelo peptídeo PSLi379 poder ser modificada em suas extremidades, podendo ser usado individualmente ou a formação de polímeros constituídos da repetição de uma sequência peptídica podendo ser separadas por qualquer método de separação, incluindo espaçadores e *linkers*.

7. Método para teste Imunodiagnóstico das leishmanioses, de acordo com a reivindicação 5, passo "a", caracterizado pelas amostras serem selecionadas do grupo consistindo de sangue, soro ou plasma, mas não se restringindo a estes.
8. Método para teste imunodiagnóstico das leishmanioses, de acordo com a reivindicação 5, passo "b", caracterizado pela proteína ser selecionada do grupo consistindo de proteína A ou G.
9. Método para teste Imunodiagnóstico das leishmanioses, de acordo com a reivindicação 5, passo "b", caracterizado pela enzima ser selecionada do grupo consistindo de peroxidase.
10. Método para teste Imunodiagnóstico das leishmanioses, de acordo com a reivindicação 5, passo "b", caracterizado pelo marcador ser selecionado do grupo consistindo de enzimas, radioisótopos, biotina, cromóforos, fluoróforos e quimioluminescentes.
11. Kit para teste imunodiagnóstico das leishmanioses, caracterizado por compreender:
  - a) Tampão de lavagem, o qual é composto de NaCl 0,9% + 0,05% Tween20. O tampão será acondicionado em um frasco de 10 mL, concentrado 10x, precisando ser diluído em água destilada, para ficar na concentração 1x;
  - b) Tampão de bloqueio composto de caseína a 2% em tampão PBS 7.4. Este reagente irá em um frasco de 20 mL, podendo ser aliquoteado e estocado a -20°C;
  - c) Tampão de incubação composto de caseína a 0.2% em PBS 7.4. Será acondicionado em um frasco de 20 mL, concentrado 10x, precisando ser diluído em PBS, para ficar na concentração de 1x e, guardado em alíquotas no freezer -20°C;

- d) O anticorpo secundário ou uma proteína (proteína A ou G), onde o anticorpo secundário ou a proteína está conjugado a uma enzima (peroxidase). Este anticorpo será acondicionado num vial com 100  $\mu$ L, no qual deverá ser usado na diluição de 1:7500 no tampão de incubação;
  - e) A solução reveladora, composta de ácido cítrico 0,1 M,  $\text{Na}_2\text{PO}_4$  0,2 M, OPD 2 mg e  $\text{H}_2\text{O}_2$  0,1%, irá em um frasco de 15 mL;
  - f) A solução de parada (stop), é composta de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  5M, na proporção de 1:20, irá em um frasco de 20 mL.
12. Kit para teste imunodiagnóstico das leishmanioses, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo peptídeo sintético estar ligado a um suporte sólido.
  13. Kit para teste imunodiagnóstico das leishmanioses, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo suporte sólido ser selecionado do grupo de material consistindo de nitrocelulose, nylon, látex, polipropileno e polistireno.
  14. Kit para teste imunodiagnóstico das leishmanioses, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo buffer de lavagem concentrado;
  15. Kit para teste imunodiagnóstico das leishmanioses, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pela solução de bloqueio;
  16. Kit para teste imunodiagnóstico das leishmanioses, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pela solução de incubação concentrada;
  17. Kit para teste imunodiagnóstico das leishmanioses, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pela proteína ser selecionada do grupo consistindo de proteína A ou G.
  18. Kit para teste imunodiagnóstico das leishmanioses, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo dito marcador ser

selecionado do grupo consistindo de enzimas, radioisótopos, biotina, cromóforos, fluoróforos e quimioluminescentes.

19. Kit para teste imunodiagnóstico das leishmanioses, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pela enzima ser selecionada do grupo compreendendo peroxidase.

## DESENHOS

Figura 1

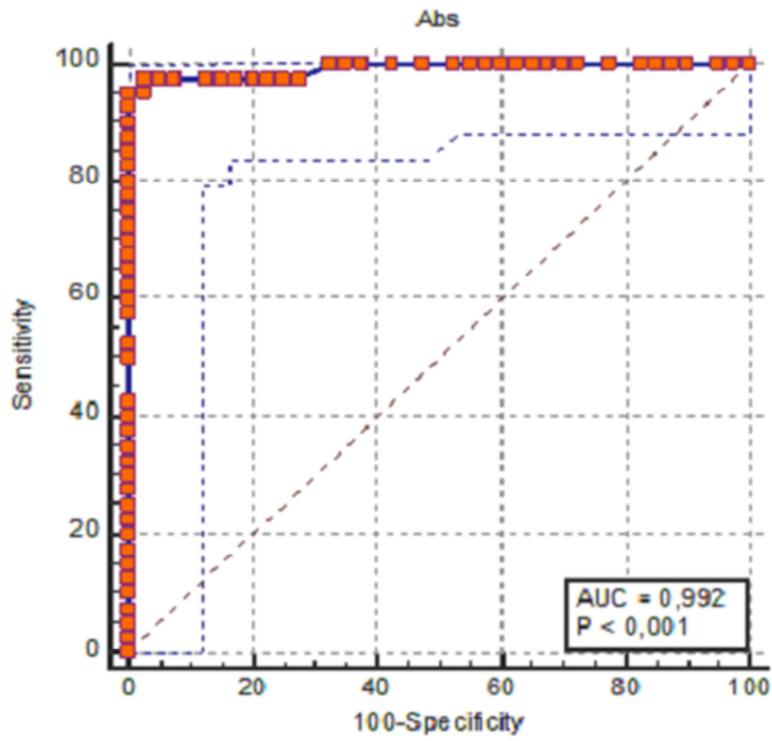


Figura 2

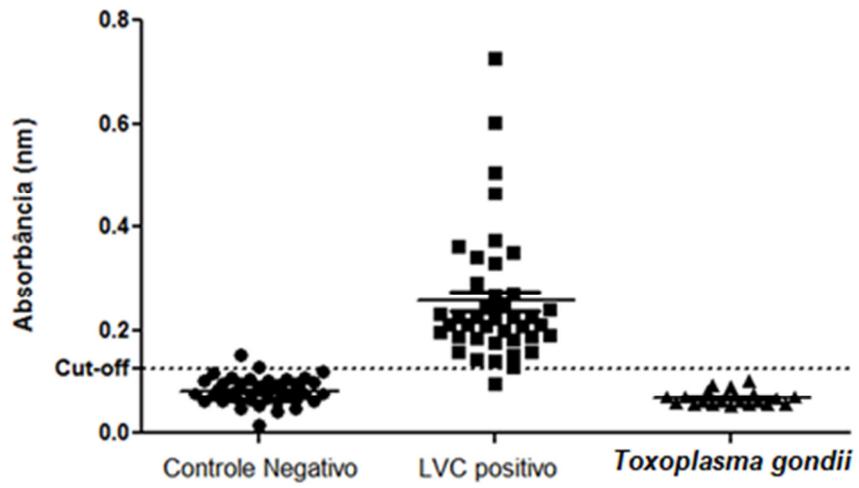


Figura 3



**RESUMO****PEPTÍDEO SINTÉTICO PSLI379 E KIT PARA IMUNODIAGNÓSTICO DA  
LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA**

A presente invenção descreve a produção de um kit ELISA utilizando um novo antígeno, o peptídeo (SEQ no. 1) PSLi379, para imunodiagnóstico de leishmanioses visceral canina (LVC), doença causada pelo protozoário *Leishmania infantum*. Os métodos de diagnóstico são baseados na interação de tal peptídeo com componentes de amostras biológicas e posterior detecção da resultante interação. O *kit* de diagnóstico ELISA compreende o uso do peptídeo e reagentes de detecção da reação entre peptídeos e componentes da amostras biológicas. A invenção também se refere a composições imunológicas que contenham peptídeos como princípio ativo. O peptídeo sintético descrito na presente invenção apresenta utilidade em quaisquer métodos, *kit* de diagnóstico e biosensores, usados para detectar a infecção e/ou a doença, em cães, com maior sensibilidade e especificidade para LVC, reduzindo resultados falsos positivos e falsos negativos. O produto reivindicado na presente invenção não apresenta toxicidade. Foram testados com soros caninos. A aplicação está relacionada com a saúde humana e veterinária.

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: 16/04/2020
- Hora de Geração do Código: 16:07:46
- Código de Controle:
  - Campo 1: 27F0F67CC3F0F1B3
  - Campo 2: 1DC2400B3533DE45