REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA ECONOMIA
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº BR 102014004107-9

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito: BR 102014004107-9

(22) Data do Depósito: 21/02/2014

(43) Data da Publicação Nacional: 17/11/2015

(51) Classificação Internacional: C07K 7/06; C07K 7/08; G01N 33/569.

(54) Título: MÉTODO E KIT PARA DIAGNÓSTICO DAS LEISHMANIOSES UTILIZANDO PEPTÍDEOS SINTÉTICOS

(73) Titular: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS - UFMG. CGC/CPF: 17217985000104. Endereço: Av. Antonio Carlos, 6627, Pampulha, Belo Horizonte, MG, BRASIL(BR), 31270-901

(72) Inventor: DANIELA CASTANHEIRA BARTHOLOMEU; RICARDO TOSHIO FUJIWARA; TIAGO ANTÔNIO DE OLIVEIRA MENDES; DANIEL MENEZES SOUZA.

Código de Controle: E6F3A83AB2DC04E5 308DE89E36C3E2D5

Prazo de Validade: 20 (vinte) anos contados a partir de 21/02/2014, observadas as condições legais

Expedida em: 06/07/2021

Assinado digitalmente por:
Liane Elizabeth Caldeira Lage
Diretora de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados

05

MÉTODO E KIT PARA DIAGNÓSTICO DAS LEISHMANIOSES UTILIZANDO PEPTÍDEOS SINTÉTICOS

[001] A presente invenção descreve um método e Kit para imunodiagnóstico das leishmanioses e os peptídeos sintéticos utilizados nesse método. Os peptídeos aqui desenvolvidos foram capazes de identificar indivíduos e animais infectados pela leishmaniose visceral e tegumentar, permitindo o desenvolvimento de um método e um Kit diagnóstico com maior sensibilidade e especificidade, e o aperfeiçoamento da reatividade dos testes sorológicos. Para isto, foi realizada uma busca no proteoma de parasitos do gênero *Leishmania de regiões* que apresentam epitopos para Linfócitos B com polimorfismo com ortólogos presentes no agente etiológico da Doença de Chagas, *Trypanossomacruzi*, onde com frequência observa-se reatividade sorológica cruzada.

[002] As leishmanioses estão presentes em 88 países e são amplamente distribuídas na América Latina e Brasil, com estimativas de 12 milhões de pessoas infectadas, sendo consideradas entre as dez doenças infecciosas de maior impacto para a saúde pública e das principais doenças negligenciadas presentes em países em desenvolvimento (Desjeux P *et al.*CompImmunolMicrobiolInfectDis. 2004 Sep; 27(5): 305-18). Infecções causadas por parasitos pertencentes ao gênero *Leishmania* são consideradas um grave problema de saúde pública para o Brasil e o diagnóstico correto e de forma precoce é um dos mais relevantes desafios para o controle e erradicação da doença.

[003] O uso de antígenos recombinantes e peptídeos sintéticos no diagnóstico das leishmanioses têm sido preferencialmente usados em substituição a lisados do parasito. Essas novas metodologias possuem maior reprodutibilidade dos resultados e eliminação de etapas que envolvem a manutenção e processamento de parasitos vivos (Frasch AC *et al.*Parasitol Today. 1991 Jun;7(6):148-51; Da-Silveira JF *et al.*Trends Parasitol. 2001 Jun;17(6):286-91; Meira WS*et al.*J Clin Microbiol. 2002 Oct;40(10):3735-40).

06

[004] No estado da técnica foram encontrados documentos de patente que sugerem o uso de peptídeos no diagnóstico de leishmanioses, como exemplos, o documento PI1020120335522 e PI1320120335599 que descrevem o uso de polipeptídeos derivados do proteoma de *Leishmaniainfantum* para o diagnóstico da infecção. No entanto, todos os documentos encontrados no estado da técnica, dentre os quais se encontram os acima citados, apresentam peptídeos diferenciados dos apresentados nessa invenção e, ainda, não permitem um diagnóstico tão eficaz, através do qual se faz a distinção de outras infecções causadas por parasitos presentes em áreas endêmicas para leishmaniose tegumentar e visceral humana e leishmaniose visceral canina, como a espécie de protozoário *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da Doença de Chagas, como na presente tecnologia. Além do mais, não está descrito na literatura métodos que fazem diagnóstico da forma tegumentar e visceral, humana e canina, utilizando mesmo antígeno mapeado no proteoma de parasitos do gênero *Leishmania*. Assim, apesar dos avanços obtidos nos últimos anos, os métodos de diagnóstico disponíveis das leishmanioses ainda possuem diversas limitações. Além disso, na ausência de métodos de diagnóstico efetivos, a eficiência do tratamento e de qualquer iniciativa de bloqueio da transmissão ou vacinação fica comprometida (Ministério da Saúde. Doenças Infecciosas e Parasitárias: guia de bolso. Brasília. 2006).

[005] Apesar da extensiva busca em desenvolver imunobiológicos para testes de diagnósticos mais sensíveis e específicos contra leishmanioses, ainda são necessárias melhorias na eficácia destes métodos em diagnosticar a doença em todos hospedeiros envolvidos no ciclo de vida do parasito. Assim, a presente invenção apresenta uma alternativa para solucionar este problema. Trata-se de peptídeos sintéticos desenhados a partir de epitopos de linfócitos B preditos por imunoinformática e o uso dos mesmos em método e kit para diagnosticar leishmanioses em cães e/ou humanos.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[006] A **Figura 1** apresenta gráficos comparativos referentes à reatividade humoral contra o peptídeo-1, 2 e 3em soro de indivíduos portadores da Leishmaniose Tegumentar Humana.O eixo X representa os grupos avaliados:

indivíduos controle (CT, n=50), indivíduos portadores da Doença de Chagas (DC, n=20)indivíduos portadores da Leishmaniose Tegumentar Humana (LTH) forma clínica cutânea (LTH-C, n=45) e muco-cutânea (LTH-MC, n=20). O eixo Y representa os valores médios de absorbância (450 nm) pela técnica de ELISA utilizando-se soros diluídos 1:100. O *cut off* foi estabelecido utilizando curva ROC.

[007] A **Figura 2** apresenta gráficos comparativos referentes à reatividade humoral contra o peptídeo-1, 2 e 3 em soro de indivíduos portadores da Leishmaniose Visceral Humana. O eixo X representa os grupos avaliados: indivíduos controle (CT, n=50), indivíduos portadores da Doença de Chagas (DC, n=20) indivíduos portadores da Leishmaniose Visceral Humana (LVH, n=55). O eixo Y representa os valores médios de absorbância (450 nm) pela técnica de ELISA utilizando-se soros diluídos 1:100. O *cut off* foi estabelecido utilizando curva ROC.

[008] A **Figura 3** apresenta gráficos comparativos referentes à reatividade humoral contra o peptídeo-1, 2 e 3 em soro de cães portadores da Leishmaniose Visceral canina. O eixo X representa os grupos avaliados: cães controle (CT, n=30), indivíduos portadores da Doença de Chagas (DC, n=15) indivíduos portadores da Leishmaniose Visceral Canina (LVC, n=30). O eixo Y representa os valores médios de absorbância (450 nm) pela técnica de ELISA utilizando-se soros diluídos 1:100. O *cut off* foi estabelecido utilizando curva ROC.

[009] A **Figura 4** apresenta um gráfico comparando as curvas ROC obtidas da ELISA para o peptídeo-1, 2 e 3 no imunodiagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Humana. Essas curvas foram utilizadas para determinar o *cut off*, sensibilidade (Se), especificidade (Ep) e área abaixo da curva (AUC) da técnica de ELISA.

[010] A **Figura 5** apresenta um gráfico comparando as curvas ROC obtidas da ELISA para o peptídeo-1, 2 e 3 no imunodiagnóstico da Leishmaniose Visceral Humana. Essas curvas foram utilizadas para determinar o *cut off*, sensibilidade (Se), especificidade (Ep) e área abaixo da curva (AUC) da técnica de ELISA.

08

[011] A **Figura 6** apresenta um gráfico comparando as curvas ROC obtidas da ELISA para o peptídeo-1, 2 e 3 no imunodiagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina. Essas curvas foram utilizadas para determinar o *cut off*, sensibilidade (Se), especificidade (Ep) e área abaixo da curva (AUC) da técnica de ELISA.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA TECNOLOGIA

[012] Na presente invenção foram identificados peptídeos conservados e polimórficos entre as diferentes espécies do gênero *Leishmania*, derivados de epitopos de célula B consistindo das sequências representadas pelas SEQ ID Nº1, 2 e 3, modificados ou não em suas extremidades, visando contribuir para melhorar o sorodiagnóstico da Leishmaniose visceral canina e das Leishmanioses tegumentar e visceral humana. O método para imunodiagnóstico de leishmaniose pode ser selecionado do grupo compreedendo ELISA, Western blot, dotblot, imunodifusão, imunocromatografia e apresentar os seguintes passos:

a) ligação de anticorpos antileishmaniais de uma amostra a um ou mais polipeptídios consistindo das sequências de aminoácidos SEQ ID N^{os} 1, 2 e 3, ligados a um suporte sólido ou um carreador, preferencialmente partícula de ouro;

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 enzimas podem ser selecionadada do grupo compreedendo fosfatase alcalina, peroxidase, β-galactosidase, urease, xantina oxidase, glicose oxidase e penicilinase e o marcador pode ser selecionado do grupo compreendendo enzimas, radioisótopos, biotina, cromóforos, fluoróforos e quimioluminescentes;

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

[013] O método pode ser realizado utilizando-se amostras de sangue, soro, plasma ou outro fluído corporal do animal ou humano infectado.

[014] A tecnologia compreende ainda um Kit para teste imunodiagnóstico das leishmanioses que compreende os peptídeos consistindo das sequências SEQ

09

IDN^{os} 1, 2 e 3 associados ou isolados e um anticorpo secundário ou uma proteína (proteína A ou G), onde o anticorpo secundário ou a proteína está conjugado a um enzima (como fosfatase alcalina, peroxidase, β-galactosidase, urease, xantina oxidase, glicose oxidase e penicilinase) ou marcador (como enzimas, radioisótopos, biotina, cromóforos, fluoróforos e quimioluminescentes), e um reagente para detectar a dita enzima ou marcador. No Kit as proteínas recombinantes ou os peptídeos estarão ligados a um suporte sólido ou carreador, sendo que esse suporte sólido poderá ser de nitrocelulose, nylon, látex, polipropileno e poliestireno e o carreador consistir de partículas de ouro.

[015] A técnica de ELISA foi escolhida na presente invenção por ser menos invasiva, de fácil execução e automação, permitindo estudos e aplicação em grande número de amostras.

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

Exemplo 1- Identificação *in silico* de epitopos lineares de células B

[017]Inicialmente, epitopos lineares de célula B foram preditos em todo o proteoma da cepa M2904 de *Leishmania braziliensis* utilizando o programa BepiPred (Larsen JE, Lund O e Nielsen M. Immunome Res. 2006 Apr 24;2:2). Nesta análise foi utilizada uma abordagem conservativa com valor de corte igual a 1.3 que fornece 96% de especificidade e 13 % de sensibilidade, minimizando a seleção de muitos epitopos falso-positivos. Sequências com o somatório dos scores de polimorfismo acima de 6 e score médio de predição do Bepipred acima de 1.3 foram consideradas como epitopos polimórficos. Sequências de 15 aminoácidos com score médio de predição de epitopo igual entre as duas sequências e acima de 1.3 e score de polimorfismo igual a zero foram considerados epitopos conservados. Para minimizar a chance de reação cruzada com outros parasitos filogeneticamente relacionados, sequências de peptídeos com alta similaridade com proteínas de outros parasitos foram identificadas utilizando o algoritmo BLAST (AltschulSF et al.J Mol Biol. 1990 Oct 5;215(3):403-10) e descartadas. A versão do algoritmo denominada blastp foi utilizada para comparar epitopos polimórficos e conservados com o

proteoma predito de *L. braziliensis*, *L. infantum*, *L. major* e *T. cruzi*. Epitopos com mais de 70% de identidade ao longo de mais de 70% da sequência foram eliminados das análises subsequentes.

[018]Avaliando os dados obtidos, foram identificados 3 peptídeos no proteoma predito de *Leishmania braziliensis* com potencial uso para imunodiagnóstico das leishmanioses. A análise por imunoinformática do peptídeo-1 (EEDESKKKSCGDEGEPKVE), localizado no cromossomo 33, apresentou score de predição para epitópo de linfócitos B de 1,81 em uma região com score de desordem de 0,62. A análise por imunoinformática do peptídeo-2 (VTEGGEDKKK), localizado no cromossomo 33, apresentou score de predição para epitópo de linfócitos B de 1,71 em uma região com score de desordem de 0,62. A análise por imunoinformática do peptídeo-3 (EEVAEAPPAEAAPA), localizado no cromossomo 33, apresentou score de predição para epitópo de linfócitos B de 1,80 em uma região com score de desordem de 0,75. Os peptídeos foram sintetizados em fase sólida para posteriomente ser analisado o desempenho como antígeno para imunodiagnóstico das leishmanioses.

Exemplo 2-Síntese dos peptídeos solúveis

[019]Os peptídeos selecionados foram sintetizados em fase sólida pelo método de N-9-fluorenilmetoxicarbonil (Wellings DAeAtherton E.MethodsEnzymol. 1997;289:44-67) na escala de 20-30 µmol. Toda síntese foi realizada no equipamento PSSM8. Fmoc-aminoácidos foram ativados por 30-60 minutos com 1 equivalente de HObt e 2 equivalentes de DIC. Após este tempo, os aminoácidos ativados foram colocados em contato com a resina Rinkamidada com grau de substituição de 0,61 por 45-60 minutos. Os grupos Fmoc foram então removidos com solução de 4-metilpiperidina 25%. A ativação, incorporação na resina e desproteção do grupo Fmoc foram então repetidas até síntese completa da cadeia dos peptídeos. Após a síntese, os peptídeos foram clivados da resina juntamente com a desproteção da cadeia lateral com uma mistura contendo 9,4% de TFA, 2,4% de água e 0,1% de triisopropilsilano. O peptídeo foi precipitado do material bruto com éter diisopropílico por 16 horas a 4°C, seguido de centrifugação a 3000 G por 5-10 minutos. Os peptídeos sintetizados, Peptídeo-1 (SEQIDNº1- EEDESKKKSCGDEGEPKVE),

Peptídeo-2 (SEQ ID Nº2- VTEGGEDKKK) e Peptídeo-3 (SEQIDNº3 – EEVAEAPPAEAAPA), foram purificados por cromatografia em fase reversa utilizando-se a coluna Sephasil Peptide C18 (Shimadzu) acoplada a sistema de HPLC (Shimadzu) utilizando-se gradiente de 0 a 25% de acetonitrila durante 75-90 minutos com 0–10 minutos até 10% de acetonitrila. Após a purificação, os peptídeos foram submetidos à espectrometria de massa em equipamento AutoflexSpeed MALDI/TOF (Bruker) para confirmação de sua massa molecular.

Exemplo 3 - Validação dos peptídeos frente a soro de indivíduos portadores de LTH, LVH e cães portadores de LVC

[020]Ensaios de ELISA foram realizados para validar e caracterizar a reatividade dos peptídeos frente a parasitos do gênero *Leishmania*. Foram testados soros de indivíduos portadores de LTH, LVH e cães portadores de LVC. Os ensaios foram realizados em placas de PVC flexível de 96 poços (Costar). Cada poço foi sensibilidado com 2-10µg de peptídeo sintético. Após a sensibilização, a placa foi bloqueada com PBS acrescido de 1,0-5,0% de BSA durante 30-60 minutos, a 25-37ºC. Após o bloqueio, toda a solução dos poços foi removida por aspiração. A seguir, 50-100 µL dos soros diluídos 1:100 em PBS com 1,0-2,5% de BSA foram adicionados aos poços e incubados a 25-37ºC por 30-60 minutos. As placas foram lavadas 4 vezes com a solução de lavagem (PBS-0,05% Tween20) e, em seguida, foi adicionado aos poços 50-100 µL do anticorpo anti-IgG humano ou canino diluído 1:5000 em PBS-BSA 1,0-2,5%. Após incubação a 37ºC por 30-60 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_2PO_4 0,2 M, TMB 0,05% e H_2O_2 0,1% foram adicionados. As placas foram incubadas a 25-37ºC ao abrigo de luz por 10 a 30 minutos com a solução reveladora, quando a reação foi interrompida pela adição de 50-100 µL de H_2SO_4 2M. A absorbância resultante foi lida em leitor de ELISA a 450 nm.

[021]Avaliando os dados descritos na **Figura 1**, a ELISA utilizando o peptídeo-1, 2 e 3 aprese ntou excelente desempenho na capacidade simultânea de detectar resultados positivos para Leishmaniose Tegumentar Humana (forma cutânea e muco-cutânea) e negativos (indivíduos controles e portadores da

Doença de Chagas), avaliados pela sensibilidade e especificidade (Peptídeo-1: Se=63,08% e Ep=94,29%; Peptídeo-2: Se=63,08% e Ep=90,00%; Peptídeo-3: Se=89,23% e Ep=91,43%;dados apresentados na **Tabela 1**). Conforme descrito na **Tabela 1**, o resultado dos valores preditivos positivo (VPP) e negativo (VPN) apresentou elevados (Peptídeo-1: VPP=91,11% e VPN=73,33%; Peptídeo-2: VPP=85,42% e VPN=72,41%; Peptídeo-3: VPP=90,63% e VPN=90,14%; dados apresentados na **Tabela 1**), assim como a acurácia (Peptídeo-1: AC=79,26%; Peptídeo-2: AC=77,04%; Peptídeo-3: AC=90,37%; dados apresentados na **Tabela 1**), sendo assim, a probabilidade de um resultado positivo ou negativo obtido pelo peptídeo-1, 2 e 3 ser verdadeiro é elevada, classificando como uma excelente opção para diagnóstico da LTH. Avaliando a área abaixo da curva (AUC)(**Tabela 2** e **Figura 4**), observou-se que os testes utilizando os peptídeos-1, 2 e 3 apresentou elevada AUC (Peptídeo-1: AUC=0,8810; Peptídeo-2: AUC=0,8187; Peptídeo-3: AUC=0,9608; dados apresentados na **Tabela 2**), indicando que não houve incidência significativa de resultados falsos positivos e falsos negativos, sendo então, eficiente em discriminar indivíduos doentes de sadios.

[022]Avaliando os dados descritos na **Figura 2**, a ELISA utilizando o peptídeo-1, 2 e 3 apresentou excelente desempenho na capacidade simultânea de detectar resultados positivos para Leishmaniose Visceral Humanae negativos (indivíduos controles e portadores da Doença de Chagas), avaliados pela sensibilidade e especificidade(Peptídeo-1: Se=83,64% e Ep=95,71%; Peptídeo-2: Se=85,45% e Ep=92,86%; Peptídeo-3: Se=87,27% e Ep=94,29%;dados apresentados na **Tabela 1**). Conforme descrito na **Tabela 1**, o resultado dos valores preditivos positivo (VPP) e negativo (VPN) apresentaramelevados (Peptídeo-1: VPP=93,88% e VPN=88,16%; Peptídeo-2: VPP=90,38% e VPN=89,60%; Peptídeo-3: VPP=92,31% e VPN=91,20%; dados apresentados na **Tabela 1**), assim como a acurácia (Peptídeo-1: AC=90,40%; Peptídeo-2: AC=89,60%; Peptídeo-3: AC=91,20%; dados apresentados na **Tabela 1**), sendo assim, a probabilidade de um resultado positivo ou negativo obtido pelo peptídeo-1, 2 e 3 ser verdadeiro é elevada, classificando como uma excelente opção para diagnóstico da LVH. Avaliando a

área abaixo da curva (AUC)(**Tabela 2** e **Figura 5**), observou-se que os testes utilizando os peptídeos-1, 2 e 3 apresentou elevada AUC (Peptídeo-1: AUC=0,9338; Peptídeo-2: AUC=0,9240; Peptídeo-3: AUC=0,9434; dados apresentados na **Tabela 2**), indicando que não houve incidência significativa de resultados falsos positivos e falsos negativos, sendo então, eficiente em discriminar indivíduos doentes de sadios.

[023]Avaliando os dados descritos na **Figura 3**, a ELISA utilizando o peptídeo-1, 2 e 3 apresentou excelente desempenho na capacidade simultânea de detectar resultados positivos para Leishmaniose Visceral Canina e negativos (indivíduos controles e portadores da Doença de Chagas), avaliados pela sensibilidade e especificidade (Peptídeo-1: Se=96,67% e Ep=93,33%; Peptídeo-2: Se=63,33% e Ep=80,00%; Peptídeo-3: Se=93,33% e Ep=97,78%; dados apresentados na **Tabela 1**). Conforme descrito na **Tabela 1**, o resultado dos valores preditivos positivo (VPP) e negativo (VPN) apresentaram elevados (Peptídeo-1: VPP=90,63% e VPN=97,67%; Peptídeo-2: VPP=67,86% e VPN=76,60%; Peptídeo-3: VPP=96,65% e VPN=95,65%; dados apresentados na **Tabela 1**), assim como a acurácia (Peptídeo-1: AC=94,67%; Peptídeo-2: AC=73,33%; Peptídeo-3: AC=96,00%; dados apresentados na **Tabela 1**), sendo assim, a probabilidade de um resultado positivo ou negativo obtido pelo peptídeo-1, 2 e 3 ser verdadeiro é elevada, classificando como uma excelente opção para diagnóstico da LVC. Avaliando a área abaixo da curva (AUC)(**Tabela 2** e **Figura 6**), observou-se que os testes utilizando os peptídeos-1, 2 e 3 apresentou elevada AUC (Peptídeo-1: AUC=0,9496; Peptídeo-2: AUC=0,7548; Peptídeo-3: AUC=0,9867; dados apresentados na **Tabela 2**), indicando que não houve incidência significativa de resultados falsos positivos e falsos negativos, sendo então, eficiente em discriminar indivíduos doentes de sadios.

Tabela 1: Performance de diagnóstico em amostras de soro de indivíduos portadores de LTH, LVH e cães portadores de LVC utilizando os peptídeos 1, 2 e 3.

Antígeno	Doença	Cut-off	Parâmetros[a]						
			Se (%)	IC 95%	Ep (%)	IC 95%	VPP (%)	VPN (%)	AC (%)
Peptídeo-1	LTH	0.5165	63.08	50.20-74.72	94.29	86.01-98.42	91.11	73.33	79.26
Peptídeo-1	LVH	0.5693	83.64	71.20-92.23	95.71	87.98-99.11	93.88	88.16	90.40
Peptídeo-1	LVC	0.1031	96.67	82.78-99.92	93.33	81.73-98.60	90.63	97.67	94.67
Peptídeo-2	LTH	0.4884	63.08	50.20-74.72	90.00	80.48-95.88	85.42	72.41	77.04
Peptídeo-2	LVH	0.5096	85.45	73.34-93.50	92.86	84.11-97.64	90.38	89.04	89.60
Peptídeo-2	LVC	0.1669	63.33	43.86-80.07	80.00	65.40-90.42	67.86	76.60	73.33
Peptídeo-3	LTH	0.2713	89.23	79.06-95.56	91.43	82.27-96.79	90.63	90.14	90.37
Peptídeo-3	LVH	0.2901	87.27	75.52-94.73	94.29	86.01-98.42	92.31	90.41	91.20
Peptídeo-3	LVC	0.0520	93.33	77.93-99.18	97.78	88.23-99.24	96.65	95.65	96.00

Abreviações: LTH: Leishmaniose Tegumentar Humana; LVH: Leishmaniose Visceral Humana; LVC: Leishmaniose Visceral Canina; Se: sensibilidade; Ep: especificidade; IC: intervalo de confiança; VPP: valor preditivo positivo; VPN: valor preditivo negativo; AC: acurácia.

Tabela 2: Análise da curva ROC obtida em amostras de soro de indivíduos portadores de LTH, LVH e cães portadores de LVC utilizando os peptídeos 1, 2 e 3.

Antígeno	Doença	AUC	IC 95%
Peptídeo-1	LTH	0.8810	0.8263-0.9357
Peptídeo-1	LVH	0.9338	0.8796-0.9879
Peptídeo-1	LVC	0.9496	0.8939-1.0050
Peptídeo-2	LTH	0.8187	0.7478-0.8895
Peptídeo-2	LVH	0.9240	0.8670-0.9810
Peptídeo-2	LVC	0.7548	0.6437-0.8659
Peptídeo-3	LTH	0.9608	0.9329-0.9886
Peptídeo-3	LVH	0.9434	0.8921-0.9947
Peptídeo-3	LVC	0.9867	0.9668-1.0070

Abreviações: LTH: Leishmaniose Tegumentar Humana; LVH: Leishmaniose Visceral Humana; LVC: Leishmaniose Visceral Canina; AUC: área abaixo da curva; IC: intervalo de confiança.

[024] O ganho de sensibilidade no teste diagnóstico de leishmaniosoe, obtido pelo uso dos peptídeos-1, 2 e 3, possivelmente devido ao fato destes peptídeos apresentarem epitópos com alta imunogenicidade e polimórficos, é importante para realizar o correto diagnóstico das leishmanioses possibilitando o tratamento de indivíduos infectados . Adicionalmente, o correto diagnóstico é importante para prevenir a manutenção de cães infectados (LVC) em áreas endêmicas e evitar o sacrifício desnecessário de animais por limitações na especificidade do teste devido à infecção por outros microrganismos, gerando

resultados falsos positivos, comumente observados em testes de diagnósticos que utilizam antígeno bruto do parasito. Avaliando a alta capacidade de detectar infecções causadas por diferentes espécies de *Leishmania,* os dados permitem concluir pela validade das reações sorológicas utilizando os peptídeos-1, 2 e 3 no imunodiagnóstico com elevada acurácia das leishmanioses tegumentar e visceral humana e canina.

REIVINDICAÇÕES

1. Uso dos peptídeos sintéticos definidos pelas SEQ ID Nº 1, 2 e 3, caracterizado por ser no diagnóstico da Leishmaniose visceral canina e das Leishmanioses tegumentar e visceral humana.

2. Método para teste imunodiagnóstico das leishmanioses caracterizado por compreender:

a. Ligação de anticorpos antileishmaniais de uma amostra a pelo menos um dos polipeptídios consistindo das sequências de aminoácidos SEQ ID Nºs 1, 2 e 3, isolados e ligados a um suporte sólido ou um carreador;

b. Contatar 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 do passo (a) pela detecção do anticorpo secundário ou proteína, especificamente ligados aos anticorpos antileishmaniais.

3. Método para teste imunodiagnóstico das leishmanioses, de acordo com a reivindicação 2, passo "a", caracterizado pelas amostras serem selecionadas do grupo consistindo de sangue, soro, plasma e outro fluído corporal.

4. Método para teste imunodiagnóstico das leishmanioses, de acordo com a reivindicação 2, passo "a", caracterizado pelo carreador ser uma partícula de ouro.

5. Método para teste imunodiagnóstico das leishmanioses, de acordo com a reivindicação 2, passo "b", caracterizado pela proteína ser selecionada do grupo consistindo de proteína A e proteína G.

6. Método para teste imunodiagnóstico das leishmanioses, de acordo com a reivindicação 2, passo "b", caracterizado pela enzima

ser selecionada do grupo consistindo de fosfatase alcalina, peroxidase, β-galactosidase, urease, xantina oxidase, glicose oxidase e penicilinase.

7. Método para teste imunodiagnóstico das leishmanioses, de acordo com a reivindicação 2, passo "b", caracterizado pelo marcador ser selecionado do grupo consistindo de enzimas, radioisótopos, biotina, cromóforos, fluoróforos e quimioluminescentes.

8. Kit para teste imunodiagnóstico das leishmanioses, **caracterizado por** compreender: pelo menos um dos peptídeos definidos pelas sequências SEQ ID Nos 1, 2 e 3 isolados, um anticorpo secundário ou uma proteína, onde o anticorpo secundário ou a proteína está conjugado a uma enzima ou marcador, e um reagente para detectar a dita enzima ou marcador.

9. Kit para teste imunodiagnóstico das leishmanioses, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelos peptídeos estarem ligados a um suporte sólido ou carreador.

10. Kit para teste imunodiagnóstico das leishmanioses, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo suporte sólido ser selecionado do grupo de material consistindo de nitrocelulose, nylon, látex, polipropileno e polistireno.

11. Kit para teste imunodiagnóstico das leishmanioses, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo carreador consistir de partículas de ouro.

12. Kit para teste imunodiagnóstico das leishmanioses, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pela proteína ser selecionada do grupo consistindo de proteína A e proteína G.

13. Kit para teste imunodiagnóstico das leishmanioses, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo dito marcador ser selecionado do grupo consistindo de enzimas, radioisótopos, biotina, cromóforos, fluoróforos e quimioluminescentes.

14. Kit para teste imunodiagnóstico das leishmanioses, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pela enzima ser selecionada do grupo compreendendo fosfatase alcalina, peroxidase, β-galactosidase, urease, xantina oxidase, glicose oxidase e penicilinase.

FIGURAS

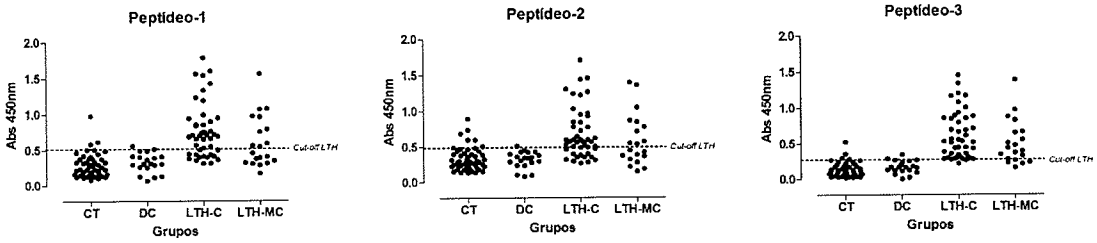


FIGURA 1

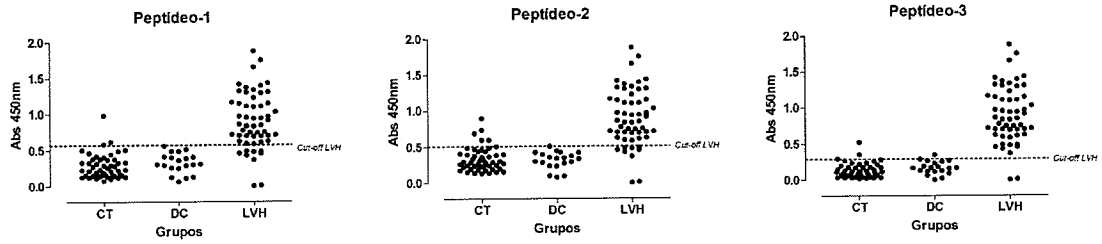


FIGURA 2

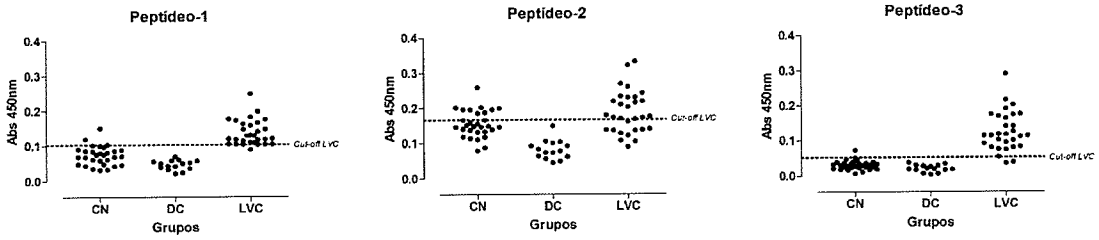


FIGURA 3

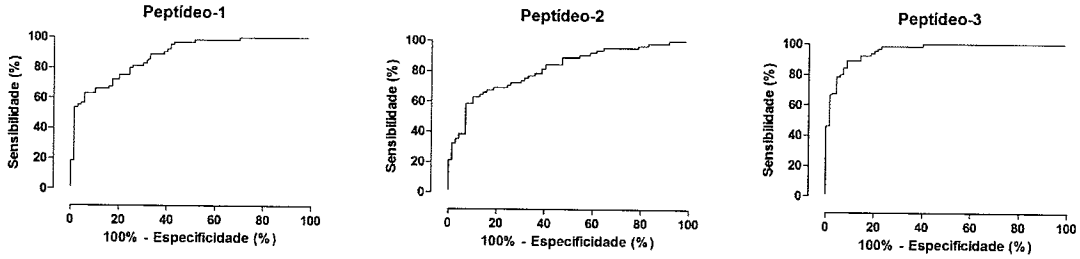


FIGURA 4

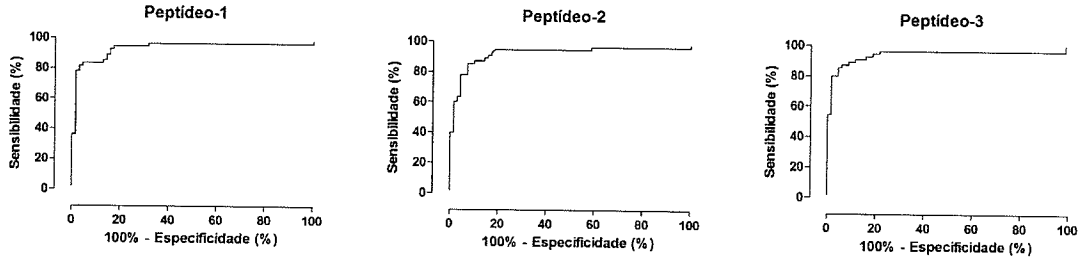


FIGURA 5

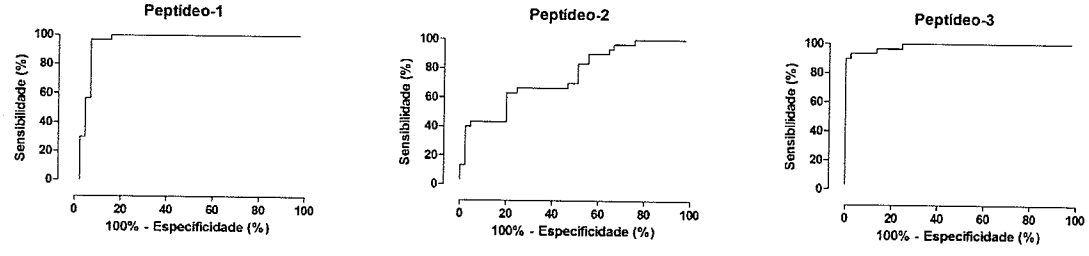


FIGURA 6