



INPI INSTITUTO
NACIONAL
DA PROPRIEDADE
INDUSTRIAL
Assinado
Digitalmente

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA, COMÉRCIO E SERVIÇOS
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº BR 102020009366-5

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 102020009366-5

(22) Data do Depósito: 12/05/2020

(43) Data da Publicação Nacional: 23/11/2021

(51) Classificação Internacional: G01N 33/569; C07K 14/44.

(54) Título: KIT E MÉTODO ELISA PARA IMUNODIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL E CUTÂNEA HUMANA E LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA UTILIZANDO NOVO ANTÍGENO PEPTÍDEO SINTÉTICO PSLI409

(73) Titular: UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANA, Instituição de Ensino e Pesquisa. CGC/CPF: 75095679000149. Endereço: RUA JOÃO NEGRÃO, 280 2O ANDAR, CURITIBA, PR, BRASIL(BR), 80010-200, Brasileira

(72) Inventor: VANETE THOMAZ SOCCOL; JOYCE CARVALHO PEREIRA; PEDRO HENRIQUE DOS SANTOS SOUSA; CARLOS RICARDO SOCCOL; SUSAN GRACE KARP.

Código de Controle: D5E9338C8A57CE75 40A99452A444343D

Prazo de Validade: 20 (vinte) anos contados a partir de 12/05/2020, observadas as condições legais

Expedida em: 02/01/2024

Assinado digitalmente por:

Alexandre Gomes Ciancio

Diretor Substituto de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados



KIT E MÉTODO ELISA PARA IMUNODIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL E CUTÂNEA HUMANA E LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA UTILIZANDO NOVO ANTÍGENO PEPTÍDEO SINTÉTICO PSLi409

Campo da invenção

[001] A presente invenção trata de um kit e um método que contemplam o uso de novo antígeno para imunodiagnóstico de leishmaniose visceral humana (LVH), leishmaniose cutânea humana (LCH) e leishmaniose visceral canina (LVC), decorrente da 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” - BR102017022744-8. A presente invenção reivindica um método baseado em ELISA padronizado para o antígeno PSLi409, produzido por síntese química, e reivindica também o kit diagnóstico a ser utilizado neste método, os quais apresentam maior sensibilidade e especificidade para leishmaniose, e cujo antígeno permite o aperfeiçoamento da reatividade dos testes diagnósticos sorológicos.

Fundamentos da invenção e estado da técnica

[002] De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se que ocorram anualmente 1,2 milhões de novos casos de leishmaniose cutânea (LC), em 98 países e nos cinco continentes, enquanto a forma visceral (LV) afeta até 400.000 pessoas a cada ano (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). Esta última forma clínica tem alta letalidade na ausência de diagnóstico precoce e tratamento adequado, com taxa de mortalidade de 10%. A LV é endêmica na Índia, Bangladesh, Sudão do Sul, Sudão, Etiópia e Brasil. Já a LC está distribuída na Ásia Ocidental, Mediterrâneo e América Latina (World Health Organization. Control of the leishmaniasis. World Health Organ Tech Rep

Ser. 949:1-186, 2010; 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).

[003] O diagnóstico das leishmanioses é realizado a partir de uma combinação de vários dados, tais como aspecto clínico ou sinais clínicos em cães, dados epidemiológicos e exames laboratoriais. Nos métodos laboratoriais as técnicas indiretas são as mais usadas por sua facilidade. Porém, novos antígenos precisam ser desenvolvidos visando sua reprodutibilidade, os quais devem ser de fácil uso e baixo custo. Os antígenos recombinantes no diagnóstico das leishmanioses têm sido preferencialmente usados em substituição a lisados totais do parasito. Essas novas metodologias possuem maior reprodutibilidade dos resultados, maior rapidez no processo de produção e eliminação de etapas que envolvem a manutenção e processamento de parasitos vivos (Frasch, A.C., Cazzulo, J.J., Aslund, L., Pettersson, U. Comparison of genes encoding *Trypanosoma cruzi* antigens. Parasitol. Today. 7(6):148-151, 1991; da Silveira, J.F., Umezawa, E.S., Luquetti, A.O. Chagas disease: recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens for serological diagnosis. Trends Parasitol. 17(6):286-291, 2001; Meira, W.S., Galvão, L.M., Gontijo, E.D., Machado-Coelho, G.L., Norris, K.A., Chiari, E. *Trypanosoma cruzi* complement regulatory protein: a novel antigen for use in enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of Chagas disease. J. Clin. Microbiol. 40(10):3735-3740, 2002; Fernández-Robledo, J.A. & Vasta, G.R. Production of recombinant proteins from protozoan parasites. Trends in Parasitology. 26(5):244-254, 2010; Barizon, L.M.S., Carvalho, J., Bates, M.D., Pettele, R.R., Thomaz-Soccol, V., Bates, P.A. Production of a kinesin-related recombinant protein (Lbk39) from *Leishmania braziliensis* by *Leishmania tarentolae* promastigotes and its application in the serodiagnosis of leishmaniasis. One Health. 8:100111, 2019). No entanto, a proteína inteira muitas vezes não é desejável, e se epítomos antigênicos destas proteínas

forem identificados, um antígeno com maior especificidade pode ser sintetizado quimicamente, isoladamente ou em forma de polímeros constituídos de repetições da mesma sequência peptídica, podendo ser separadas por qualquer método de separação, incluindo espaçadores e *linkers*.

[004] Apesar dos avanços obtidos nos últimos anos, os métodos de diagnóstico disponíveis no mercado para as leishmanioses possuem diversas limitações. Para contextualizar o estado da arte que levou ao desenvolvimento desta invenção, inicialmente, a literatura foi consultada na base de dados Pubmed e os documentos de patente foram pesquisados nas bases PATENT INSPIRATION e INPI.

[005] No Pubmed foram encontrados 35 artigos para os termos: *Leishmania** AND diagnoses kit AND serology. Dentre esses artigos, apenas três estavam relacionados a estudos de diferentes antígenos para diagnóstico de LV humana (LVH) e dois para LV canina (LVC), esses apresentando maior sensibilidade e especificidade em relação aos testes utilizados atualmente. Pesquisando outro grupo de palavras: *Leishmania** AND diagnoses kit, foram encontrados 109 artigos, 11 deles faziam menção ao assunto de interesse e apresentavam objetivos semelhantes aos da **presente invenção**. Todavia, apresentavam baixos valores de sensibilidade e especificidade, quando comparados com a **presente invenção**, utilizando antígenos diferentes do antígeno aqui reivindicado.

[006] Para a busca de patentes, na primeira etapa foi usada a plataforma INPI e foram localizados 26 processos solicitando patentes que incluem desenvolvimento de kit ELISA para diagnóstico de leishmanioses. Desses, 16 apresentavam o mesmo objetivo e utilizavam uma variedade de peptídeos sintéticos, porém com sequências diferentes em relação à do antígeno da **presente invenção**. Ao analisar os resultados obtidos, verificou-se a necessidade do desenvolvimento de

um kit e de um método com melhor sensibilidade e especificidade, e também de um kit pronto para uso imediato.

[007] Já na busca na plataforma PATENT INSPIRATION foram encontrados 429 documentos de patente, dentre as quais seis com os mesmos objetivos, porém não apresentando a mesma sequência do peptídeo aqui reivindicado. Da mesma forma, verificou-se a necessidade do desenvolvimento de um kit e um método com maior sensibilidade e especificidade.

[008] Na busca específica por peptídeo derivado de uma proteína recombinante, foi encontrado um documento de patente que sugere o uso de proteína recombinante no diagnóstico de leishmanioses. Nesse documento (BR102017022744-8) é descrito o uso de uma proteína que resulta de um conjunto de sequências de nucleotídeos expressas em *Leishmania tarentolae* como vetor de expressão, capaz de traduzir antígenos recombinantes semelhantes a peptídeos de *Leishmania braziliensis* e/ou *Leishmania infantum*. Esse documento de patente foi depositado por nosso grupo para diagnóstico da infecção e/ou construção de agentes imunizadores contra leishmaniose. O documento de patente BR102017022744-8 reivindica a produção das sequências por clonagem em *L. tarantolae* e não sintetizadas quimicamente pela estratégia Fmoc (fluorenilmetiloxicarbonila). **Esta invenção** contempla um método que utiliza antígeno sintetizado quimicamente com modificações de aminoácidos e um kit imunodiagnóstico pronto para uso para detecção da LVH, LVC e LCH. Em geral, os documentos de patente encontrados no estado da técnica descrevem métodos e kits com valores baixos de sensibilidade e especificidade, além de ter sido utilizado baixo número de amostras biológicas para a validação dos testes.

Descrição da abordagem do problema técnico

[009] Mesmo que haja inúmeras iniciativas para desenvolver imunobiológicos para testes de diagnósticos mais sensíveis e específicos contra leishmanioses, ainda são necessárias melhorias na eficácia destes métodos tanto nos hospedeiros envolvidos no ciclo de vida do parasito quanto na fase da doença. Assim, a **presente invenção** apresenta uma alternativa para solucionar este problema, por meio de um kit e um método de baixo custo, não tóxicos e não invasivos para o paciente.

[0010] A **presente invenção** descreve um kit pronto para uso, utilizando como novo antígeno sintético PSLi409, para diagnosticar leishmanioses em cães ou em humanos. Este kit contém reagentes concentrados, o que facilita a logística de transporte, o armazenamento, e tem os peptídeos imobilizados em suporte sólido, o que garante a estabilidade e a praticidade do método. 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.

[0011] **Esta invenção** apresentou maior sensibilidade, especificidade, acurácia, evitando falsos positivos e falsos negativos. Além disso, número de amostras utilizadas para validação em relação ao estado da técnica foi maior assegurando os resultados do teste. Também por meio **desta invenção** é possível diagnosticar portadores sintomáticos e assintomáticos. O ganho de sensibilidade obtido pelo teste ELISA-peptídeo PSLi409 **desta invenção** é devido ao fato desta proteína apresentar sequência de aminoácidos palindrômicos que gera alta imunogenicidade e conseqüentemente permite a detecção de anticorpos contra o parasito.

Descrição detalhada da invenção

[0012] Na **presente invenção** foi utilizado um antígeno heterólogo sintético no teste imunoensaio (ELISA), para detecção de indivíduos portadores de leishmanioses visceral (LV) e cutânea (LC). O peptídeo sintético PSLi409 foi produzido a partir de uma sequência da proteína recombinante sintética gerada a partir de um gene relativo à cinesina de *L. braziliensis*, como descrito na patente BR102017022744-8 "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".

[0013] **Esta invenção** reivindica um kit ELISA para imunodiagnóstico da leishmaniose visceral e cutânea humana e leishmaniose visceral canina utilizando novo antígeno peptídeo sintético PSLi409, caracterizado por compreender o peptídeo sintético PSLi409 (SEQ ID NO: 1) como antígeno, tampão de lavagem, tampão de bloqueio, tampão de incubação, anticorpo secundário ou proteína conjugado(a) a uma enzima ou marcador, solução reveladora e solução de parada.

[0014] O peptídeo sintético PSLi409 está ligado a um suporte sólido, o qual pode ser, mais especificamente, nitrocelulose, nylon, látex, polipropileno ou poliestireno.

[0015] O tampão de lavagem deve ser concentrado 12x, e é composto de NaCl em concentração entre 7,2 e 10,8% (m/v) + Tween 20 em concentração entre 0,4 e 0,6% (m/v), acondicionado em frasco de 10 mL.

[0016] O tampão de bloqueio é composto de caseína a 2% (m/v) em tampão PBS pH 7,4, acondicionado em frasco de 20 mL.

[0017] O tampão de incubação deve ser concentrado entre 8 e 12x, e é composto de caseína em concentração entre 1,6 e 2,4% (m/v) em tampão PBS pH 7,4, acondicionado em frasco de 20 mL.

[0018] O anticorpo secundário ou a proteína (A ou G) está conjugado(a) a uma enzima ou marcador, acondicionado(a) em frasco (vial) de 0,600 mL com 100 a 150 μ L. Essa enzima pode ser, mais especificamente, uma peroxidase, e o marcador pode ser um radioisótopo, a biotina, um cromóforo, um fluoróforo ou uma substância quimioluminescente.

[0019] A solução reveladora é composta de ácido cítrico 0,1 M, Na_2PO_4 0,2 M, dicloridrato de o-fenilenodiamina (OPD) 2 mg para 10 mL e H_2O_2 0,1%, acondicionada em frasco de 15 mL.

[0020] A solução de parada (stop) é composta de H_2SO_4 5M acondicionada em frasco de 20 mL.

[0021] A **presente invenção** contempla ainda um método ELISA para imunodiagnóstico da leishmaniose visceral e cutânea humana e leishmaniose visceral canina utilizando novo antígeno peptídeo sintético PSLi409, o qual emprega o kit descrito anteriormente, caracterizado por compreender as seguintes etapas:

a) ligação de anticorpos anti-leishmaniais de uma amostra de fluido biológico como sangue, soro, plasma, saliva, urina ou lágrima, a um ou mais (poli)peptídeos consistindo de sequência(s) de aminoácidos do PSLi409, ligadas a um suporte sólido.

b) contato dos anticorpos do passo (a) com um anticorpo secundário ou uma proteína, conjugado(a) a uma enzima ou a um marcador e que se ligam aos anticorpos do passo (a).

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

[0022] A etapa (a) é realizada mediante o uso do peptídeo PSLi409 em sua forma original, com modificação em suas extremidades ou na forma

de polímeros constituídos de repetições de uma sequência peptídica, podendo ser separadas por qualquer método, incluindo espaçadores e *linkers*.

[0023] As etapas (a) e (b) são realizadas mediante a diluição do tampão de lavagem para a concentração de 1x, com água destilada, e do tampão de incubação para a concentração de 1x, com tampão PBS.

[0024] A etapa (b) é realizada mediante a diluição do anticorpo secundário ou proteína na proporção de 1:7500 no tampão de incubação.

[0025] A etapa (c) é realizada mediante a diluição da solução de parada na proporção de 1:20 na reação.

[0026] Para a validação do kit e método da **presente invenção**, foram testados soros de cães e de humanos infectados com *L. infantum* frente ao antígeno reivindicado e de *Leishmania braziliensis* (No exemplo 1 é mostrada a validação para soro de cães, mas o teste foi realizado para humanos com LV e LC).

[0027] O ganho de sensibilidade obtido pelo teste ELISA-peptídeo PSLi409 da **presente invenção** é devido ao fato desta proteína apresentar sequência de aminoácidos palindrômicos que gera alta imunogenicidade e conseqüentemente permite a detecção de anticorpos contra o parasito. O diagnóstico preciso é importante para prevenir a manutenção de cães infectados (LVC) em áreas endêmicas, o que não reduziria a pressão parasitária. Também é importante para evitar a eutanásia desnecessária de animais por limitações na especificidade do teste devido à infecção por outros micro-organismos, resultando em resultados falsos positivos, comumente observados em testes de diagnósticos que utilizam antígeno bruto do parasito ou Tr-DPP.

Exemplo 1- Validação do peptídeo PSLi409 frente a soro de cães infectados com *Leishmania infantum* e humanos contra *L. infantum* e *L. braziliensis*

[0028] Ensaio ELISA foram realizados para validar e caracterizar a reatividade do peptídeo PSLi409 frente à infecção por parasitos do gênero *Leishmania*. 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 (Na₂CO₃ 0,16%, NaHCO₃ 0,29%, pH 9,6), e deixadas overnight a 4°C. Após 12 horas de incubação a solução inicial foi descartada e a placa lavada uma vez com solução de lavagem (NaCl 0,9%, Tween 20 0,05%) para remoção do antígeno não fixado. Após a placa foi bloqueada com tampão PBS pH 7,4 acrescido de 2% de caseína durante 60 minutos, a 37°C. Toda a solução dos poços foi removida por aspiração. A seguir, 100 µL dos soros diluídos 1:200, em PBS pH 7,4 com caseína 0.2%, foram adicionados aos poços e incubados a 37°C por 60 minutos. As placas foram lavadas, seis vezes, com a solução de lavagem (PBS-0,05% Tween20) e, em seguida, foram adicionados aos poços 100 µL do anticorpo anti-IgG humano ou 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, Na₂PO₄ 0,2 M, OPD 2 mg e H₂O₂ 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. A reação foi interrompida pela adição de 25 µL de H₂SO₄ 5 M. A absorbância resultante foi lida em leitor de microplacas a 492 nm.

[0029] Avaliando os dados obtidos, o teste ELISA, utilizando como antígeno o peptídeo PSLi409, apresentou a capacidade simultânea de detectar resultados positivos e negativos para cães portadores de LVC (Figura 1).

[0030] Avaliando os dados obtidos, o teste ELISA, utilizando como antígeno o peptídeo PSLi409, apresentou a capacidade de detectar resultados positivos e negativos para humanos com LC (Figura 2a) e LV (Figura 2b).

[0031] Avaliando a AUC, observou-se que o teste ELISA-peptídeo PSLi409 apresentou área sob a curva de 0,968 para soro de cães (Figura 1), e de 0,918 para soros humanos portadores de *L. infantum* (Figura 2a) e 0,941 para portadores de *L. braziliensis* (Figura 2b), indicando que praticamente não houve incidência de resultados falsos positivos e/ou falsos negativos, mostrando que o novo antígeno sintético aqui apresentado é eficiente em discriminar indivíduos doentes de sadios, em ambos os tipos da doença.

[0032] Conforme descrito na Tabela 1, os resultados dos valores de sensibilidade e especificidade apresentaram, respectivamente: 90,00% e 95,00% para o diagnóstico da LV em cães, 83,33 e 100,00% para diagnóstico em humanos com *L. infantum* e 93,48 e 87,50% para humanos com LC por *L. braziliensis*. Em adição, o valor para o índice de Youden do teste ELISA-peptídeo PSLi409 é de 0,828 para o diagnóstico em cães, 0,833 para o diagnóstico de *L. infantum* em humanos, e 0,810 para o diagnóstico de *L. braziliensis* em humanos. Ser próximo de 1 indica menor proporção total de erros de classificação no diagnóstico, qualificando como uma excelente opção para diagnóstico de LVC, LVH e LCH.

[0033] Para verificar se o kit ELISA apresentava reatividade cruzada com outros agentes patogênicos, foi testado o kit com soros de cães infectados com *Toxoplasma gondii* (Figura 3).

Tabela 1: Performance de diagnóstico em amostras dos soros de cães portadores de leishmaniose visceral canina (LVC), humanos portadores

de leishmaniose visceral (LV) e humanos portadores de leishmaniose cutânea (LC) utilizando o peptídeo PSLi409.

Teste	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)
Cães LVC	90,00	95,00
Humanos LV	83,33	100,00
Humanos LC	93,48	87,50

[0034] Pode-se concluir que os soros dos animais infectados não apresentaram reatividade cruzada com o peptídeo PSLi409 para este agente patogênico. A reação do teste ELISA-PSLi409 mostrou-se útil e eficiente em identificar corretamente os cães e humanos não infectados, e os cães e humanos infectados. Esses dados permitem concluir a validade das reações sorológicas utilizadas para o diagnóstico das leishmanioses.

Breve descrição dos desenhos

[0035] Figura 1 – Resultados de sensibilidade e especificidade bem como o nível de corte da reação entre soros positivos e negativos de cães. As curvas ROC e AUC obtidas do teste Enzima-Imuno-Ensaio (ELISA) referentes à reatividade humoral contra o antígeno PSLi409 são exemplificadas em soros de cães positivos para LVC.

Figura 2 – Reatividade humoral contra o antígeno PSLi409 em soro de humanos positivos para LV e LC e curvas ROC e AUC obtidas do teste Enzima-Imuno-Ensaio (ELISA).

Figura 3 – Reatividade com *Toxoplasma gondii*, demonstrando não haver reação cruzada com este organismo patogênico.

Figura 4 – Desenho da placa de 96 poços que será produzida para uso comercial, no kit, e seus componentes como uma placa de 96 poços, 1

frasco de tampão de lavagem concentrado 10x, um frasco de tampão de bloqueio 1x, 1 frasco de tampão de incubação 10x, 1 frasco de solução reveladora, 1 frasco de solução stop, 1 microtubo de 2 mL de soro controle positivo, 1 microtubo de 2 mL de soro controle negativo e 1 microtubo de 0,6 mL de soro de IgG-peroxidase.

REIVINDICAÇÕES

1. KIT ELISA PARA IMUNODIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL E CUTÂNEA HUMANA E LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA UTILIZANDO NOVO ANTÍGENO PEPTÍDEO SINTÉTICO PSLi409 **caracterizado por** compreender o peptídeo sintético PSLi409, o qual consiste na SEQ ID NO: 1, como antígeno, tampão de lavagem, tampão de bloqueio, tampão de incubação, anticorpo secundário ou proteína conjugado(a) a uma enzima ou marcador, solução reveladora e solução de parada.

2. KIT ELISA de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** conter o peptídeo sintético PSLi409, o qual consiste na SEQ ID NO: 1, ligado a um suporte sólido.

3. KIT ELISA de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado pelo** fato de o suporte sólido ser, mais especificamente, nitrocelulose, nylon, látex, polipropileno ou poliestireno, mas não se restringindo a estes.

4. KIT ELISA de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** conter tampão de lavagem concentrado 12x, composto de NaCl em concentração entre 7,2 e 10,8% (m/v) + Tween 20 em concentração de 0,5% (m/v), acondicionado em frasco de 10 mL.

5. KIT ELISA de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** conter tampão de bloqueio composto de caseína a 2% (m/v) em tampão PBS pH 7,4, acondicionado em frasco de 20 mL.

6. KIT ELISA de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** conter tampão de incubação concentrado entre 8 e 12x, composto de caseína

em concentração de 2,0% (m/v) em tampão PBS pH 7,4, acondicionado em frasco de 20 mL.

7. KIT ELISA de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** conter anticorpo secundário ou uma proteína (proteína A ou G) conjugado(a) a uma enzima ou marcador, acondicionado(a) em frasco com 100 a 150 μL .

8. KIT ELISA de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado pelo** fato de a enzima ser, mais especificamente, uma peroxidase.

9. KIT ELISA de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado pelo** fato de o marcador ser um radioisótopo, a biotina, um cromóforo, um fluoróforo ou uma substância quimioluminescente.

10. KIT ELISA de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** conter solução reveladora composta de ácido cítrico 0,1 M, Na_2PO_4 0,2 M, dicloridrato de o-fenilenodiamina (OPD) 2 mg (na forma de pastilha para ser diluído no momento de uso) e H_2O_2 0,1%, em volume de 10 mL acondicionado em frasco de 15 mL.

11. KIT ELISA de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** conter solução de parada (stop) composta de H_2SO_4 5M acondicionada em frasco de 20 mL.

12. MÉTODO ELISA PARA IMUNODIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL E CUTÂNEA HUMANA E LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA UTILIZANDO NOVO ANTÍGENO PEPTÍDEO SINTÉTICO PSLI409 o qual emprega kit de acordo com reivindicação 1, **caracterizado por** compreender as etapas de:

- a) ligação de anticorpos anti-leishmaniais de uma amostra de fluido biológico como sangue, soro, plasma, saliva, urina ou lágrima, a um ou mais (poli)peptídeos consistindo de sequência(s) de aminoácidos do PSLi409, ligadas a um suporte sólido;
- b) contato dos anticorpos do passo (a) com um anticorpo secundário ou uma proteína, conjugado(a) a uma enzima ou a um marcador e que se ligam aos anticorpos do passo (a);
- c) detecção dos anticorpos anti-leishmaniais na amostra supracitada pela detecção do anticorpo secundário ou proteína especificamente ligados ao dito anticorpo anti-leishmanial.

13. MÉTODO ELISA de acordo com a reivindicação 12, **caracterizado pela** realização da etapa (a) mediante o uso do peptídeo PSLi409, o qual consiste na SEQ ID NO: 1.

14. MÉTODO ELISA de acordo com a reivindicação 12, **caracterizado pela** realização das etapas (a) e (b) mediante a diluição do tampão de lavagem para a concentração de 1x, com água destilada, e do tampão de incubação para a concentração de 1x, com tampão PBS.

15. MÉTODO ELISA de acordo com a reivindicação 12, **caracterizado pela** realização da etapa (b) mediante a diluição do anticorpo secundário ou proteína na proporção de 1:7500 no tampão de incubação.

16. MÉTODO ELISA de acordo com a reivindicação 12, **caracterizado pela** realização da etapa (c) mediante a diluição da solução de parada na proporção de 1:20 na reação.

DESENHOS

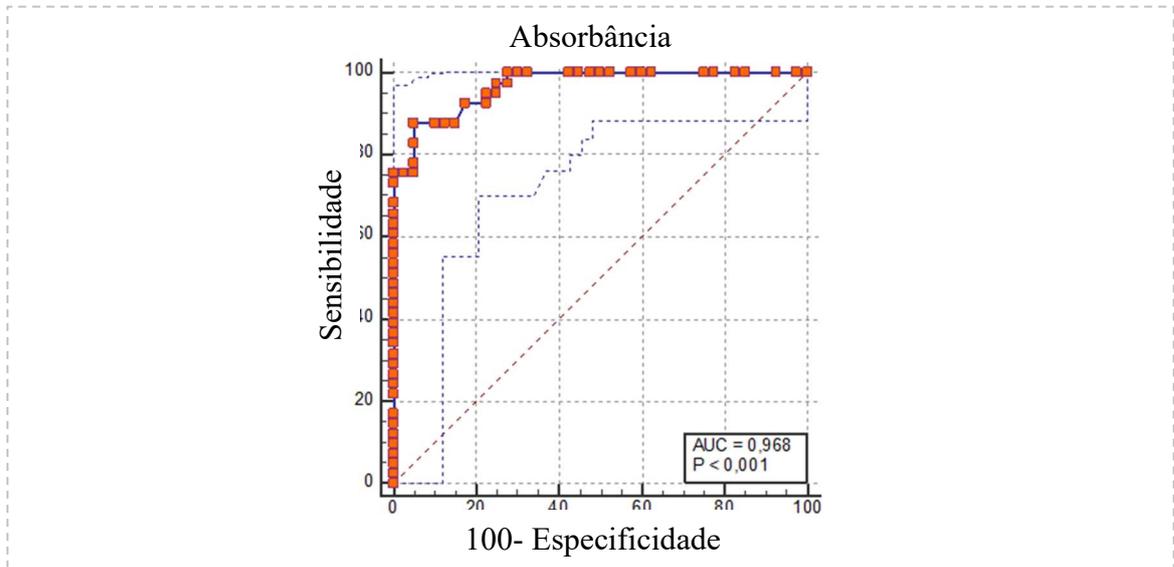


Figura 1

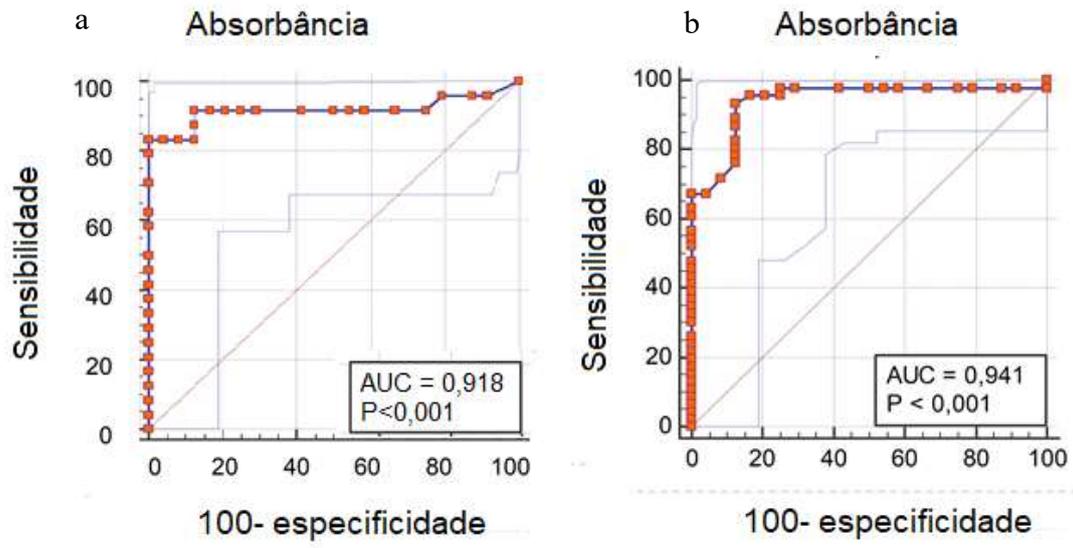


Figura 2

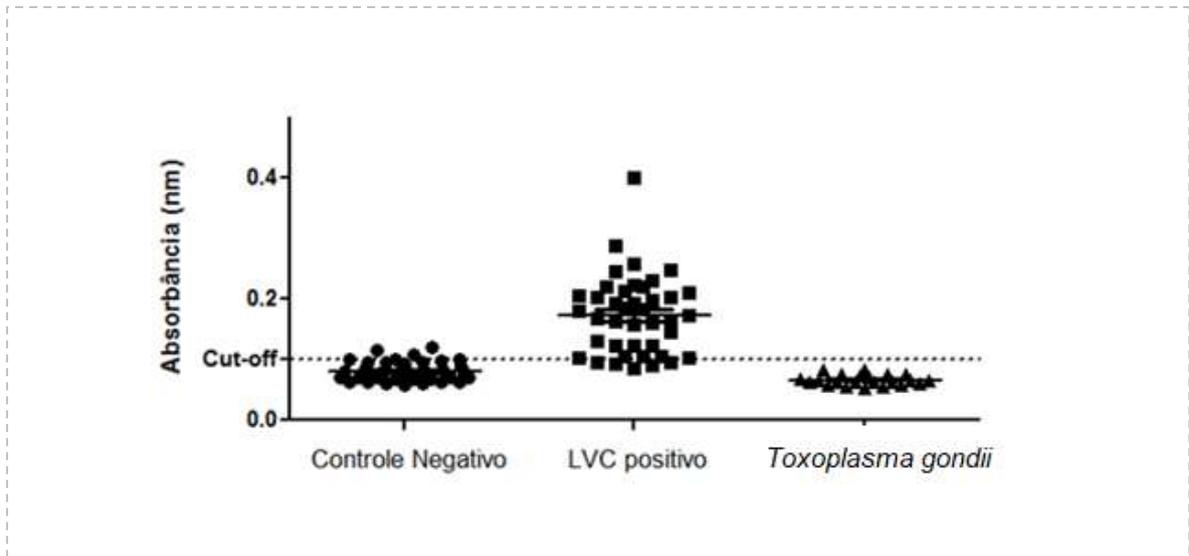


Figura 3



Figura 4