

(12) PEDIDO INTERNACIONAL PUBLICADO SOB O TRATADO DE COOPERAÇÃO EM MATÉRIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organização Mundial da
Propriedade Intelectual
Secretaria Internacional



(43) Data de Publicação Internacional
19 de Junho de 2014 (19.06.2014)

WIPO | PCT

(10) Número de Publicação Internacional
WO 2014/091463 A1

(51) Classificação Internacional de Patentes :
A61K 39/008 (2006.01) *G01N 33/549* (2006.01)
C12N 15/30 (2006.01) *A61P 33/02* (2006.01)
C12N 15/10 (2006.01)

(21) Número do Pedido Internacional :
PCT/IB2013/060937

(22) Data do Depósito Internacional :
13 de Dezembro de 2013 (13.12.2013)

(25) Língua de Depósito Internacional : Português

(26) Língua de Publicação : Português

(30) Dados Relativos à Prioridade :
BR1020120320223
14 de Dezembro de 2012 (14.12.2012) BR
BR1020120335603
28 de Dezembro de 2012 (28.12.2012) BR
BR1020130319380
12 de Dezembro de 2013 (12.12.2013) BR
BR1020130319813
12 de Dezembro de 2013 (12.12.2013) BR

(71) Requerentes : UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS - UFMG [BR/BR]; Avenida Antônio
Carlos, 6627, Unidade Administrativa II, 2º andar, sala
2012. Pampuha., 31270-901 Belo Horizonte (BR).
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA -

UFU [BR/BR]; Avenida João Naves De Ávila, 2121,
Cx593, Campus Santa Mônica., 38408-100 Uberlândia
(BR).

(72) Inventores : FUJIWARA, Ricardo Toshio; Avenida
Antônio Carlos, 6627, Unidade Administrativa II, 2º andar,
sala 2012. Pampuha., 31270-901 Belo Horizonte (BR).
BARTHOLOMEU, Daniella Castanheira; Avenida
Antônio Carlos, 6627, Unidade Administrativa II, 2º andar,
sala 2012. Pampuha., 31270-901 Belo Horizonte (BR).
SOUZA, Daniel Menezes; Avenida Antônio Carlos, 6627,
Unidade Administrativa II, 2º andar, sala 2012. Pampuha.,
31270-901 Belo Horizonte (BR). SILVA, Ana Luiza
Teixeira; Avenida Antônio Carlos, 6627, Unidade
Administrativa II, 2º andar, sala 2012. Pampuha., 31270-
901 Belo Horizonte (BR). BUENO, Lilian Lacerda;
Avenida Antônio Carlos, 6627, Unidade Administrativa II,
2º andar, sala 2012. Pampuha., 31270-901 Belo Horizonte
(BR). GOMES, Matheus de Souza; Avenida João Naves
De Ávila, 2121, Cx593, Campus Santa Mônica., 38408-
100 Uberlândia (BR).

(74) Representante comum : UNIVERSIDADE FEDERAL
DE MINAS GERAIS - UFMG; Avenida Antônio Carlos,
6627, Unidade Administrativa II, 2º andar, sala 2012.
Pampuha., 31270-901 Belo Horizonte (BR).

(Continua na página seguinte)

(54) Title : METHOD FOR PRODUCING *LEISHMANIA* RECOMBINANT PROTEINS AND USE IN A DIAGNOSTIC KIT AND VACCINE AGAINST LEISHMANIASIS

(54) Título : PROCESSO PARA PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE *LEISHMANIA* E USO EM KIT PARA DIAGNÓSTICO E VACINA CONTRA LEISHMANIOSES

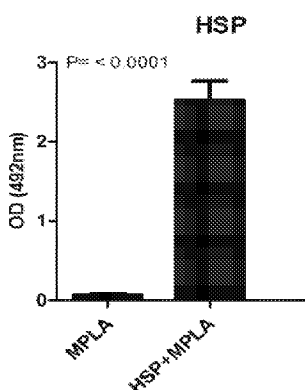


Figura 5

(57) Abstract : The present invention relates to the use of recombinant HSP 83-1, MAPK and MAPK3 antigens, proteins present in protozoa of the *Leishmania* genus, for producing vaccines and a leishmaniasis diagnostic kits for humans and/or dogs. These antigens were selected by bioinformatics analysis involving immunoproteomic and phylogenetic algorithms. The ELISA reaction with anti-HSP 83-1, anti-MAPK and anti-MAPK3 antibodies could correctly identify non-infected and infected dogs. The results obtained were validated by reference diagnostic assays for canine visceral leishmaniasis (CVL) (EIE-LVC Bio-Manguinhos® kit).

(57) Resumo : A presente invenção se refere ao uso dos antígenos recombinantes HSP 83-1, MAPK e MAPK3, proteínas presentes em protozoários do gênero *Leishmania*, na produção de vacinas e kit diagnóstico contra leishmanioses para seres humanos e/ou cães. Esses antígenos foram selecionados por meio de análise de bioinformática, envolvendo algoritmos de imunoproteômica e filogenia. A reação de ELISA com anticorpos anti-HSP 83-1, anti-MAPK e anti-MAPK3 permitiu identificar corretamente os cães não infectados e os cães infectados. Os resultados obtidos foram validados por testes de referência para diagnóstico de Leishmaniose Visceral Canina (LVC) (Kit EIE-LVC - Bio-Manguinhos®).



WO 2014/091463 A1



(81) **Estados Designados** (sem indicação contrária, para todos os tipos de proteção nacional existentes) : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) **Estados Designados** (sem indicação contrária, para todos os tipos de proteção regional existentes) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasiático (AM, AZ, BY, KG,

KZ, RU, TJ, TM), Europeu (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicado:

- com relatório de pesquisa internacional (Art. 21(3))
- antes da expiração do prazo para modificar as reivindicações e a republicar na eventualidade de receção de tais modificações (Regra 48.2(h))
- com listagem de sequências, parte da descrição (Regra 5.2(a))

PROCESSO PARA PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE LEISHMANIA E USO EM KIT PARA DIAGNÓSTICO E VACINA CONTRA LEISHMANIOSES

A presente invenção se refere ao uso dos antígenos recombinantes HSP 83-1, MAPK e MAPK3, proteínas presentes em protozoários do gênero *Leishmania*, na produção de vacinas e kit diagnóstico contra leishmanioses para seres humanos e/ou cães. Esses antígenos foram selecionados por meio de análise de bioinformática, envolvendo algoritmos de imunoproteômica e filogenia. A reação de ELISA com anticorpos anti-HSP 83-1, anti-MAPK e anti-MAPK3 permitiu identificar corretamente os cães não infectados e os cães infectados. Os resultados obtidos foram validados por testes de referência para diagnóstico de Leishmaniose Visceral Canina (LVC) (Kit EIE-LVC - Bio-Manguinhos[®]).

As *Heat shock proteins* (HSP) são moléculas altamente conservadas que exercem importante papel no dobramento, montagem de proteínas e translocação de proteínas através de compartimentos celulares. Devido ao fato destas proteínas serem altamente conservados em *Leishmania* sp, associado ao fato da prevalência de mais de uma espécie de *Leishmania* em áreas endêmicas, o uso destas proteínas como antígeno vacinal poderia gerar uma imunidade protetora contra espécies responsáveis pelas formas cutâneas e visceral da leishmaniose (KAUFMANN S.H.E. Heat shock proteins and the immune response. *Immunology Today*, v. 11, p. 129–136, 1990). Adicionalmente, estudos tem demonstrado que estas proteínas possuem efeito mitogênico sobre linfócitos B e esplenócitos, sugerindo que possuem papel proliferativo, o qual poderia ser explorado para estratégias vacinais (RICO, A. I. et al. The heat shock proteins, HSP70 and HSP83, of *Leishmania infantum* are mitogens for mouse B cells. *Cell Stress and Chaperones*, v.7, 339-346, 2002).

As proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) representam uma família de serina-treonina quinases envolvidas na regulação de uma ampla variedade de respostas celulares (Cross, T. et al. Serine/threonine protein kinases and apoptosis. *Experimental Cell Research*, v.256, p.34-41, 2000). As MAPKs transmitem sinais extracelulares captados por receptores de

membrana após variados estímulos, inclusive estresse e, através da fosforilação de substratos específicos em resíduos de serina e treonina essas enzimas podem regular positiva ou negativamente o substrato, modulando, assim, a expressão gênica, mitose, motilidade, metabolismo, proliferação, diferenciação, sobrevivência, interrupção do ciclo celular e apoptose (SU, B. *et al.* Mitogen-activated protein kinase cascades and regulation of gene expression. *Current Opinion in Immunology*, v.8, p.402-411, 1996; Wada, T. *et al.* Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. *Oncogene*, v.23, p.2838-2849, 2004).

O projeto genoma de *Leishmania* revelou que estes parasitos codificam em torno de 197 proteínas MAPKs e MAPKs-like, representando aproximadamente 2% do genoma e sugerindo que estas proteínas apresentam importante papel no ciclo biológico do parasito (Parsons, M. *et al.* Comparative analysis of the kinomes of three pathogenic trypanosomatids: *Leishmania major*, *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*. *BMC Genomics*, v.6, p.127, 2005). Algumas dessas proteínas foram previamente identificadas como importantes para mecanismos de virulência do parasito, bem como na biogênese flagelar (Rotureau, B. *et al.* The flagellum-MAP kinase connection in trypanosomatids: a key sensory role in parasite signaling and development-*Cellular Microbiology*, v.11, p.710-718, 2009). Adicionalmente, estudos funcionais demonstraram que alterações nas vias que estas proteínas estão envolvidas implicam negativamente na patogenicidade destes parasitos, fato este que torna as MAPKs como possíveis alvos para o desenvolvimento de drogas (NauLa, C. *et al.* Protein kinases as drug targets in trypanosomes and *Leishmania*. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1754, p.151-159, 2005). Neste contexto, o amplo número de proteínas desta família e a alta homologia entre estas proteínas associado à importância delas em estágios evolutivos encontrado no hospedeiro vertebrado, pode ser empregado como estratégia para desenvolvimento de testes de diagnóstico e imunobiológicos vacinais para leishmanioses.

Atualmente, são encontrados no estado da arte alguns documentos descrevendo estudos relacionados à família de proteínas HSP 83,

principalmente no que se refere ao seu uso no diagnóstico de leishmanioses. Skeiky e colaboradores identificaram que a proteína HSP 83 de *Leishmania* é um antígeno dominante que contribui para a resposta imunológica específica associada a anticorpos da subclasse IgG4 em pacientes brasileiros com leishmaniose cutânea difusa, sendo assim um potencial antígeno importante no diagnóstico da infecção por *L. amazonensis* (SKEIKY, Y. A. W. *et al.* Association of Leishmania Heat Shock Protein 83 Antigen and Immunoglobulin G4 Antibody Titers in Brazilian Patients with Diffuse Cutaneous Leishmaniasis. *Infection and Immunity*, v. 65, n. 121997, p. 5368–5370, 1997).

Já o trabalho de Celeste e colaboradores analisou o uso da proteína HSP 83 recombinante em ELISA para o diagnóstico de leishmaniose cutânea e mucocutânea. Esta proteína foi reconhecida por anticorpos anti-HSP 83 de *L. infantum* presentes no soro dos pacientes testados, além de não ter exibido reação cruzada com soro de pacientes manifestando doença de Chagas. Assim, a HSP 83 de *L. infantum* pode ser considerada um bom antígeno para sorodiagnóstico de leishmaniose tegumentar (CELESTE, B. J. *et al.* *Leishmania infantum* heat shock protein 83 for the serodiagnosis of tegumentary leishmaniasis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 37, p. 1591-1593, 2004).

Outro exemplo é o estudo realizado por Angel e colaboradores, no qual o gene de HSP 83 de *L. infantum* foi clonado e caracterizado molecularmente e avaliado como útil no sorodiagnóstico de leishmaniose canina (ANGEL, S. O. *et al.* During canine leishmaniasis a protein belonging to the 83-kDa heat-shock protein family elicits a strong humoral response. *Acta Tropica*, v.62, p. 45-56, 1996).

Badaro e colaboradores desenvolveram um estudo no qual pacientes com leishmaniose mucosa e apresentando resistência à medicação foram tratados com uma combinação de antígenos, dentre eles HSP 83 de *L. braziliensis*, cujo reconhecimento pelo soro de pacientes ou por células *in vitro* já era relatado no estado da técnica. Todos os pacientes tratados apresentaram remissão clínica da doença e permaneceram assintomáticos algum tempo após o término do tratamento, indicando que a terapia com a

combinação de determinados antígenos é segura e eficaz (BADARO, R. *et al.* Immunotherapy for Drug-Refractory Mucosal Leishmaniasis. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 194, p. 1151–1159, 2006).

Entretanto, são escassos os trabalhos que investigam o padrão de expressão desta família de proteínas HSP 83-1 em parasitos do gênero *Leishmania* no sentido de identificar o potencial destas proteínas como composto imunogênico para vacinas. O mesmo é verificado em relação às MAPKs, em que se encontra no estado da arte alguns documentos descrevendo estudos relacionados à família dessas proteínas, mas são encontrados poucos trabalhos com o objetivo pleiteado para a presente invenção, que é o desenvolvimento de kit diagnóstico e vacinas com esta proteína.

Apesar da extensiva busca por imunobiológicos mais sensíveis e específicos para vacinas contra leishmanioses, ainda são necessárias melhorias na eficácia destes métodos em diagnosticar a doença nos principais hospedeiros envolvidos no ciclo de vida do parasito, quais sejam o homem e os cães. Assim, a presente invenção é apresentada como uma alternativa para solucionar este problema. Trata-se do uso da forma recombinante das proteínas HSP 83-1, MAPK e MAPK3 de *Leishmania* como antígeno para método diagnóstico e vacinas contra leishmanioses em cães e/ou humanos.

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A **Figura 1** apresenta gráficos comparativos referentes à reatividade humoral anti-HSP 83-1 de *Leishmania (Viannia) braziliensis* e do kit EIE-LVC (Bio-Manguinhos®) em soro de cães de área endêmica para Leishmaniose Visceral Canina. O eixo X representa os grupos avaliados: cães não infectados (Negativo, n = 51) e cães infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi* (Positivo, n = 52). Já o eixo Y representa os valores médios de absorbância (450 nm) pela técnica de ELISA utilizando-se soros diluídos 1:100. O símbolo (*) significa *cut off* obtido pela curva ROC. O símbolo (#) significa *cut off* obtido de acordo com a recomendação do fabricante (duas vezes a média do valor obtida para o controle negativo que faz parte do kit de diagnóstico).

A **Figura 2** apresenta um gráfico comparando as curvas ROC obtidas da ELISA para HSP 83-1 (A) e do Kit EIE-LVC (Bio-Manguinhos®) (B). Essas curvas foram utilizadas para determinar o *cut off*, sensibilidade, especificidade e área abaixo da curva (AUC) da técnica de ELISA.

A **Figura 3** apresenta gráficos comparativos referentes à reatividade humoral anti-MAPK e anti-MAPK3 de *Leishmania (Viannia) braziliensis* e do kit EIE-LVC (Bio-Manguinhos®) em soro de cães de área endêmica para Leishmaniose Visceral Canina. O eixo X representa os grupos avaliados: cães não infectados (Negativo, n = 12) e cães infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi* (Positivo, n = 18). Já o eixo Y representa os valores médios de absorbância (450 nm) pela técnica de ELISA utilizando-se soros diluídos 1:100.

A **Figura 4** apresenta um gráfico comparando as curvas ROC obtidas da ELISA de MAPK e MAPK3. Essas curvas foram utilizadas para determinar o *cut off*, sensibilidade, especificidade e área abaixo da curva (AUC) da técnica de ELISA.

A **Figura 5** apresenta um gráfico com os resultados obtidos no ensaio de ELISA para HSP 83-1 que mostra produção de anticorpos após a imunização com adjuvante (MPLA) e adjuvante mais proteína (HSP+MPLA). Diferença significativa de $P < 0,0001$.

A **Figura 6** apresenta um gráfico com os resultados obtidos nos ensaios de ELISA para as proteínas MAPK1 e MAPK3. Em ambos os ensaios, a produção de anticorpos, após a imunização com adjuvante (MPLA) e adjuvante mais proteína (MAPK1+MPLA e MAPK3+MPLA), foi maior quando usada a proteína na formulação. Diferença estatísticas de $P = 0,0003$ para MAPK1 e $P = 0,0022$ para MAPK3.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção se refere ao uso dos antígenos recombinantes HSP 83-1, MAPK e MAPK3, presentes em protozoários do gênero *Leishmania*, para diagnóstico e formulação de vacina para as leishmanioses em seres humanos e/ou cães. Esses antígenos foram selecionados por meio de análise de bioinformática, envolvendo algoritmos de imunoproteômica e filogenia. De

modo geral, sequências de aminoácidos das proteínas dos parasitos *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Leishmania) infantum*, *Leishmania (Leishmania) donovani*, *Leishmania (Leishmania) major*, *Leishmania (Leishmania) mexicana* foram obtidas do proteoma predito, a partir do banco de dados GeneDB (<http://www.genedb.org>), onde foi gerado um sub-banco após a exclusão de pseudogenes e genes parciais.

Em seguida, as sequências de proteínas selecionadas anteriormente foram submetidas à análise de similaridade contra sequências do banco de dados ImmunoneBase (<http://bioinf.uta.fi/ImmunomeBase/home.html>), o qual contém sequências de proteínas intrinsecamente relacionadas ao sistema imunológico do hospedeiro e/ou à defesa contra patógenos (RANNIKKO, K. *et al.* Immunity genes and their orthologs: a multi-species database. *International Immunology*, v.19, p.1361-1370, 2007), utilizando o algoritmo BLASTP (Basic Local Alignment Search Tool, Disponível em <http://www.genbank.nlm.nih.gov>). Proteínas apresentando homologia com proteínas de referência depositadas no ImmunoneBase das espécies *Homo sapiens* (1375 entradas) e *Mus musculus* (1181 entradas) foram selecionadas e submetidas ao programa MultiLoc (<http://www-bs.informatik.uni-tuebingen.de/Services/MultiLoc>) para predição de localização celular. Para realizar essa classificação, o programa baseia-se na análise da presença de peptídeo sinal N-terminal, na identificação de domínios conservados, os quais estão presentes em famílias de proteínas com localização celular específica, e na composição de aminoácidos (Höglund, A. *et al.* Significantly improved prediction of subcellular localization by integrating text and protein sequence data. *Pacific symposium on biocomputing*, p.16-27, 2006).

As sequências destas proteínas selecionadas foram analisadas no software Pfam 24.0 (<http://pfam.sanger.ac.uk/>), o qual contém um amplo banco de dados de famílias e domínios conservados de proteínas, bem como informações sobre as funções biológicas dessas moléculas (PUNTA, M. *et al.* The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Research*, v. 40, p. 290-301, 2012). A partir dessa análise, foi identificada a presença de domínios protéicos potencialmente capazes de atuar como proteínas de interação ("protein-protein

interaction”, 917 entradas) nas sequências, servindo então como critério de seleção de proteínas para serem utilizadas nas etapas seguintes do presente trabalho, dentre elas a HSP 83-1, MAPK e MAPK3. Todas as análises *in silico* foram realizadas no servidor do laboratório, onde estão instalados os programas supracitados.

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

Exemplo 1: Clonagem do gene codificador das proteínas HSP 83-1, MAPK e MAPK3

Primers específicos para a amplificação por PCR (*Polimerase Chain Reaction*) dos genes completos de HSP 83-1, MAPK e MAPK3 foram desenhados (HSP 83-1: SEQ ID N°1 e SEQ ID N°2; MAPK: SEQ ID N°3 e SEQ ID N°4; MAPK3: SEQ ID N°5 e SEQ ID N°6), de forma a amplificar toda a sua região codificadora. Foram inseridos sítios de restrição para NheI nas extremidades 5' dos *primers* senso das três proteínas (SEQ ID N°1, SEQ ID N°3 e SEQ ID N°5). Já para os *primers* antisenso, foi inserido o sítio de restrição para HindIII na HSP 83-1 (SEQ ID N°2), para XhoI na MAPK (SEQ ID N°4) e para BamHI na MAPK3 (SEQ ID N°6), todos nas extremidades 5' dos *primers*. Isso foi feito para facilitar a transferência dos *amplicons* entre os vetores de clonagem (pGEM®-T, Promega) e de expressão (pET28a-TEV).

As amplificações por PCR foram realizadas utilizando como molde 20-100 ng de DNA genômico extraído de formas promastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Leishmania) infantum*, *Leishmania (Leishmania) donovani*, *Leishmania (Leishmania) major*, *Leishmania (Leishmania) mexicana*, além de tampão de reação comercial, 50-200µM de dNTP, 2-10 ng de cada um dos *primers* senso (SEQ ID N°1) e antisenso (SEQ ID N°2), e 0,5-1,25 U de Taq polimerase de alta fidelidade, em um volume final de 30-50 µL de reação.

Os *amplicons* obtidos nas PCRs foram misturados com tampão de amostra de DNA em concentração final de 1X e submetidos à separação em gel de agarose 1%, a 100-200 V, em tampão TAE 1X contendo brometo de etídio.

Após a separação, as bandas com tamanho de 2115 pares de base (pb) (HSP 83-1), 1092 pb (MAPK) e 1167 pb (MAPK3) foram excisadas do gel. O bloco de agarose contendo os *amplicons* desejados foi submetido à purificação utilizando um kit comercial. O DNA purificado foi, então, clonado no vetor pGEM[®]-T, através de incubação por 12-16 horas, a temperatura de 2-8°C, com a enzima T4-ligase, seguindo as instruções do fabricante. Este vetor possui gene de resistência à ampicilina para seleção de transformantes positivos.

Cerca de 1-10 µL dos sistemas de ligação foram incubados por 5-10 minutos no gelo com 50-100 µL de bactérias *Escherichia coli* eletrocompetentes da cepa XL1-Blue. Após este período, as amostras foram transferidas para cubetas de 0,1 cm e submetidas a um pulso de 2,00-2,50 kV em um eletroporador. Após a eletroporação, foram adicionados 50-300 µL do meio de cultura 2xYT líquido, seguido por incubação durante 1 hora, a 30-37°C e sob agitação (180-200 rpm). Após este período, as amostras foram plaqueadas em meio sólido 2xYT-ágar 1,5% com ampicilina (20-100 µg/mL). As placas foram colocadas em estufa durante 12-16 horas, para obtenção de colônias isoladas.

Os clones positivos obtidos foram inoculados em 3-10 mL de meio 2xYT, contendo ampicilina e cultivados durante 12-16 horas, a 30-37°C e sob agitação (180-200 rpm). A extração dos plasmídeos foi realizada utilizando um kit comercial.

Os plasmídeos contendo os insertos (*amplicons*) foram submetidos a dupla digestão, durante 12-16 horas, a 30-37°C, com as enzimas de restrição NheI e HindIII para HSP 83-1, NheI e XhoI para MAPK e NheI e BamHI para MAPK3, cujos sítios específicos estão presentes nas extremidades do *amplicon*. Após a digestão, as amostras foram submetidas à eletroforese e os insertos obtidos (2115 pb da HSP 83-1, 1092 pb da MAPK e 1167 pb da MAPK3), foram purificados do gel de agarose.

Exemplo 2: Expressão das proteínas HSP 83-1, MAPK e MAPK3 em *E. coli*

A ligação entre os fragmentos clonados, obtidos por digestão enzimática dos plasmídeos, conforme descrito no exemplo anterior, e o vetor pET28a-TEV, que também foi digerido com as enzimas de restrição NheI e HindIII para HSP

83-1, NheI e XhoI para MAPK e NheI e BamHI para MAPK3, e possui o gene de resistência à kanamicina para seleção positiva dos transformantes, foi realizada através de suas extremidades coesivas, por incubação a temperatura de 2-8°C, durante 12-16 horas, com a enzima T4 Ligase em tampão comercial específico. Após a incubação, o produto de ligação foi utilizado na transformação de bactérias *Escherichia coli*, cepa BL-21Star, através de eletroporação.

Colônias isoladas de BL-21Star apresentando o plasmídeo pET28a-TEV que contém o gene que codifica a proteína HSP 83-1, MAPK e MAPK3 foram inoculadas em 3 ou 20 mL de meio 2xYT líquido contendo kanamicina (10-50 µg/mL) e incubadas por 12-16 horas sob a agitação (180-200 rpm). Após este período, os inóculos foram diluídos 1:20 em 10 ou 400 mL de meio 2xYT contendo kanamicina (10-50 µg/mL) e incubados a 30-37°C, sob agitação (180-200 rpm) até atingirem densidade óptica (DO600) de 0,6-0,8. Em seguida, a expressão das proteínas recombinantes foi induzida através da adição de 0,5-1,0 mM IPTG, sendo as culturas, então, incubadas por 3-12 horas, a 30-37°C e sob agitação (180-200 rpm). Finalizado o tempo, as culturas foram centrifugadas a 3000-6000 rpm, por 10-30 minutos e a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* residual foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -80°C. Alíquotas das culturas imediatamente antes da adição de IPTG, e após 3-12 horas de expressão, foram também congeladas para confirmar a expressão das proteínas recombinantes.

Os sedimentos celulares mantidos a -80°C foram descongelados no gelo e ressuspensos em 5-50 mL de PBS para cada 50-500 mL de cultura inicial, na presença de lisozima (20-100 µg/mL), sendo, então, homogeneizados e deixados em repouso por 15-30 minutos. Após o repouso, as alíquotas foram submetidas a 4-5 ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho-maria à 37°C e passadas exaustivamente em seringas de insulina. As amostras foram centrifugadas por 10 a 30 minutos a 10000-14000 rpm, a 4°C, para separação das frações solúvel (sobrenadante) e insolúvel (*pellet*). Amostras destas duas frações foram analisadas em eletroforese gel de poliacrilamida-SDS para avaliar em qual

fração a proteína recombinante se encontra. Quando as proteínas se apresentaram insolúveis, foi adicionado ao tampão de ressuspensão 4-8 mol.L⁻¹ de uréia para torná-las solúveis.

O extrato protéico da fração sobrenadante do teste solubilidade foi aplicado em uma coluna HisTrap HP de 1 mL (GE Healthcare Life Sciences). A coluna foi primeiramente lavada com 5 volumes de coluna com o tampão A (fosfato de sódio 20mM; NaCl 500mM; imidazol 30mM). A eluição foi realizada através da adição do tampão B (fosfato de sódio 20mM; NaCl 500mM; imidazol 500mM). Todas as frações obtidas foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS.

As amostras obtidas nas expressões e purificações foram submetidas à separação por eletroforese em gel de poliacrilamida, utilizando Bis-acrilamida 40%. Após a corrida, os géis foram corados por incubação por 12-16 horas com a solução de Coomassie Blue e então, descorados em solução etanol 30% e ácido acético 10%.

As proteínas recombinantes purificadas e peptídeos foram analisados em espectrômetro de massas, tipo MALDI, Bruker Daltonic sautoflex III smartbeam.

Exemplo 3: Teste para imunodiagnóstico de leishmaniose

O teste para imunodiagnóstico de leishmaniose pode ser selecionado do grupo compreendendo ELISA, Western blot, dot blot, imunodifusão e imunocromatografia. 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.

Os ensaios de ELISA foram realizados utilizando as proteínas recombinantes HSP 83-1, MAPK e MAPK3, obtidas conforme descrito nos exemplos anteriores, ou o extrato bruto dos parasitos como antígeno. Placas de ELISA 96 poços foram sensibilizadas por 12-16 horas a 2-8°C com 0,005-0,500 µg de antígeno diluído em tampão carbonato. Após a sensibilização, a placa foi bloqueada com PBS acrescido de 1,0-2,5% de BSA durante 30-60 minutos, a 25-37°C. 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 25-37°C 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 37°C 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, Na₂PO₄ 0,2 M, TMB 0,05% e H₂O₂ 0,1% foram adicionados. As placas foram incubadas a 25-37°C 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 H₂SO₄ 2M. A absorbância resultante de cada proteína foi lida em leitor de ELISA a 450 nm e os resultados obtidos podem ser observados nas **Figuras 1 e 3**.

Avaliando os dados obtidos, a ELISA-HSP 83-1, ELISA-MAPK e ELISA-MAPK3 apresentaram melhor desempenho na capacidade simultânea de detectar resultados positivos e negativos, avaliados pela sensibilidade e especificidade (**Figuras 2 e 4**), quando comparado ao Kit EIE-LVC com *cut off* obtido pela forma recomendada pelo fabricante (**Tabela 1**). Além disso, avaliando a área abaixo da curva (AUC), observou-se que o teste ELISA-MAPK e ELISA-MAPK3 apresentaram valores próximos de 1,0 (0,9872 e 1,000 respectivamente), sendo então, eficiente em discriminar indivíduos doentes de saudáveis (**Tabela 1**).

Tabela 1: Performance de diagnóstico em amostras de soro de cães portadores de LVC utilizando ELISA-MAPK e ELISA-MAPK3 e EIE-LVC Kit. Símbolos: * *cut off* obtido pela curva ROC; # *cut off* obtido de acordo com o fabricante. Abreviações: NA: não aplicável; FN: falso negativo; FP: falso positivo; Se: sensibilidade; Es: especificidade; AUC: área abaixo da curva; VPP: valor preditivo positivo; VPN: valor preditivo negativo; RP+ (Razão de probabilidade positiva); RP- (Razão de probabilidade negativa); J: Índice Youden; AC: acurácia

Teste de diagnóstico	FN	FP	Se (%)	Ep (%)	AUC	VPP	VPN	RP+	RP-	AC
HSP 83-1	3/52	5/130	94,23	96,15	0,9861	90,74	97,66	>10,00	0,06	0,9560
EIE-LVC Kit [#]	2/52	7/51	96,15	86,27	NA	87,72	96,65	7,01	0,04	0,9126
EIE-LVC Kit*	6/52	2/51	88,46	96,08	0,9815	95,83	89,09	>10,00	0,12	0,9223
MAPK1	2/18	0/12	88,89	100,00	0,9872	100,00	85,71	>10,00	0,11	0,9333
MAPK3	0/18	0/12	100,00	100,00	1,000	100,00	100,00	>10,00	0,00	1,000

Conforme descrito na **Tabela 1**, o resultado dos valores preditivos positivo (VPP), negativo (VPN), razão de probabilidade positiva (RP+) se apresentaram maiores também na ELISA-HSP 83-1 (90,74 e 97,66), ELISA-MAPK 1 (100,00 e 85,71) e ELISA-MAPK3 (100,00 e 100,00), em comparação ao Kit EIE-LVC[#] (87,72 e 96,65) e Kit EIE-LVC* (95,83 e 89,09). Os valores para a razão de probabilidade positiva (RP+) se apresentaram maiores para ELISA-HSP 83-1 (>10,0), ELISA-MAPK1 (>10,0) e ELISA-MAPK3 (>10,0) quando comparado ao kit EIE-LVC[#] (7,01) com cut-off ajustado de acordo com fabricante e menores valores para razão de probabilidade negativa (RP-) para ELISA-HSP 83-1 (0,06), MAPK1 (0,011) e MAPK3 (0,00) quando comparado ao kit EIE-LVC* (0,12), sendo assim, a probabilidade de um resultado positivo ou negativo obtido pela ELISA-HSP 83-1, ELISA-MAPK1 e ELISA-MAPK3 estar correto é significativamente maior do que os resultados obtidos pelo teste de referência Kit EIE-LVC. Em adição, os valores para acurácia para ELISA-HSP 83-1 (0,9560), ELISA-MAPK (0,9333) e ELISA-MAPK3 (1,0000) estão mais próximos de 1,0000 quando comparado ao obtido pelo kit EIE-LVC[#] (0,9126) e kit EIE-LVC* (0,9223), indicando menor proporção total de erros de classificação no diagnóstico, classificando ELISA-HSP 83-1, ELISA-MAPK e ELISA-MAPK3 como melhores opções para diagnóstico da LVC.

Adicionalmente, através da análise de concordância utilizando o índice Kappa entre as técnicas avaliadas (**Tabela 2**), observou-se que a técnica de ELISA-MAPK e ELISA-MAPK3 apresentaram concordância considerada boa com a técnica EIE-LVC Kit[#]. Entre as técnicas EIE-MAPK e EIE-MAPK3 a concordância foi considerada muito boa

Tabela 2: Índice Kappa (k) entre os resultados dos testes de diagnóstico utilizando a proteína recombinante Mitogen-activated protein kinase e Mitogen-activated protein kinase 3 e análise comparativa com o kit de diagnóstico EIE-

LVC. Símbolos: * *cut off* obtido pela curva ROC; # *cut off* obtido de acordo com o fabricante. Abreviações: P: positivo; N: negativo; T: total; IC: Intervalo de confiança.

Teste de diagnóstico		EIE-LVC [#]			Mitogen-activated protein kinase 3*		
		P	N	T	P	N	T
Mitogen-activated protein kinase*	P	16	1	17	16	0	16
	N	2	11	13	2	12	14
	T	18	12	30	18	12	30
κ index (95% IC)		0,575 (0,575-1,014) - Boa			0,865 (0,686-1,044) - Muito boa		
Mitogen-activated protein kinase 3*	P	16	1	17			
	N	2	11	13			
	T	18	12	30			
κ index (95% IC)		0,575 (0,575-1,014) - Boa					

Portanto, a reação de ELISA mostrou-se útil em identificar corretamente os cães não infectados e os cães infectados, validado por testes de referência para diagnóstico para LVC Kit EIE-LVC (Bio-Manguinhos[®]). Estes dados permitem concluir pela validade das reações sorológicas utilizadas para o diagnóstico da LVC.

Exemplo 4: Imunização de camundongos com formulação contendo proteína HSP 83-1 recombinante

Camundongos BALB/c fêmeas de 6 a 8 semanas foram utilizadas de acordo com as diretrizes éticas institucionais para o experimento vacinal. As imunizações foram administradas por via subcutânea e o esquema do ensaio foi de 3 doses a cada 15 dias. Os animais foram divididos em dois grupos, para cada proteína, com 12 animais cada, sendo um grupo imunizado somente com o adjuvante (MPLA) e o outro com o adjuvante mais as proteínas recombinantes e purificadas (HSP+MPLA, MAPK1+MPLA ou MAPK3+MPLA) obtida conforme descrito no Exemplo 2. As formulações continham 50 ng a 50 µg de proteína. Antes de cada dose ser administrada, o sangue era coletado e centrifugado para a separação do soro, que foi usado para os ensaios de ELISA.

Os ensaios de ELISA foram realizados utilizando placas de ELISA Half Área (Greiner-Bio-One) que foram sensibilizadas por 12-16 horas a 4°C com

1µg da proteína purificada em 25µL de água MilliQ autoclavada. Após a sensibilização, a placa foi bloqueada com 150µL de PBS acrescido de 5% de BSA durante 1 hora a 37°C. Após o bloqueio, toda a solução dos poços será removida por aspiração. A seguir, 50µL dos soros dos animais imunizados diluídos 1:100 em PBS com BSA 2,5% foram adicionados aos poços e incubados a 37°C por 1 hora. As placas foram lavadas 4 vezes com a solução de lavagem (PBS-0,05% Tween20) e 50µL o anticorpo anti-IgG anti-mouse diluído 1:2.000 em PBS-BSA 2,5% foi adicionado. Após a incubação a 37°C por 1 hora, as placas foram novamente lavadas por quatro vezes com a solução de lavagem, e 100µL da solução reveladora, contendo ácido cítrico 0,1 M, Na₂PO₄ 0,2 M, OPD 0,05% e H₂O₂ 0,1% foram adicionados. As placas foram incubadas a 37°C ao abrigo de luz por 15 minutos com a solução reveladora, quando a reação foi interrompida pela adição de 50 µL de H₂SO₄. A absorbância resultante foi lida em leitor de ELISA a 492 nm.

Conforme se observa nas **Figuras 5 e 6**, as reações de ELISA com anticorpos anti-HSP 83-1, anti-MAPK1 e anti-MAPK3 permitiram demonstrar que há reconhecimento destas proteínas recombinantes produzidas pelo soro de camundongos, indicando que a HSP 83-1, MAPK e MAPK3 são importantes candidatas a antígeno vacinal contra leishmanioses.

REIVINDICAÇÕES

- 1) **VACINA CONTRA LEISHMANIOSES caracterizada por** compreender pelo menos uma das proteínas HSP 83-1, MAPK ou MAPK3, naturais ou sintéticas, de protozoários do gênero *Leishmania* e um adjuvante farmacologicamente aceitável.
- 2) **SEQUÊNCIA DE DNA caracterizada por** ser representada pela SEQ ID Nº 3 e apresentar sítio de restrição da enzima NheI.
- 3) **SEQUÊNCIA DE DNA caracterizada por** ser representada pela SEQ ID Nº 4 e apresentar sítio de restrição da enzima XhoI.
- 4) **SEQUÊNCIA DE DNA caracterizada por** ser representada pela SEQ ID Nº 5 e apresentar sítio de restrição da enzima NheI.
- 5) **SEQUÊNCIA DE DNA caracterizada por** ser representada pela SEQ ID Nº 6 e apresentar sítio de restrição da enzima BamHI.
- 6) **PROCESSO DE OBTENÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES caracterizado por** apresentar as seguintes etapas:
 - a. Amplificação por PCR do gene que codifica a proteína HSP 83-1, MAPK ou MAPK3 de protozoários do gênero *Leishmania* utilizando *primers* senso (SEQ ID Nº1, SEQ ID Nº3 e SEQ ID Nº5) e antisenso (SEQ ID Nº2, SEQ ID Nº4 e SEQ ID Nº6) específicos;
 - b. Inserção dos *amplicons* obtidos na **etapa a** em vetor de clonagem;
 - c. Transformação de bactérias *Escherichia coli* com a inserção do plasmídeo recombinante obtido na **etapa b**;
 - d. Crescimento em meio de cultura dos clones transformantes positivos obtidos na **etapa c**;
 - e. Extração dos plasmídeos contendo o gene que codifica para HSP 83-1, MAPK ou MAPK3;
 - f. Digestão enzimática dos plasmídeos obtidos na **etapa e** e obtenção dos genes clonados;
 - g. Inserção dos genes clonados obtidos na **etapa f** em vetor de expressão;

- h. Transformação de bactérias *Escherichia coli* com a inserção do plasmídeo recombinante obtido na **etapa g**;
- i. Crescimento em meio de cultura dos clones transformantes positivos obtidos na **etapa h**;
- j. Indução da expressão da proteína recombinante HSP 83-1, MAPK ou MAPK3;
- k. Purificação das proteínas recombinantes obtidas na **etapa j**.

7) PROCESSO DE OBTENÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES, de acordo com a reivindicação 6, etapas b e h, caracterizado pela transformação ser preferencialmente com bactérias *Escherichia coli* eletrocompetentes e por eletroporação.

8) PROCESSO DE OBTENÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES, de acordo com a reivindicação 6, etapa f, caracterizado pela digestão enzimática ser realizada com as enzimas de restrição NheI e HindIII para HSP 83-1, NheI e XhoI para MAPK e NheI e BamHI para MAPK3.

9) PROTEÍNAS RECOMBINANTES caracterizadas por serem equivalentes a HSP 83-1, MAPK e MAPK3 de protozoários do gênero *Leishmania*, obtidas por meio do processo descrito nas reivindicações 6 a 8.

10) KIT PARA DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSES caracterizado por compreender:

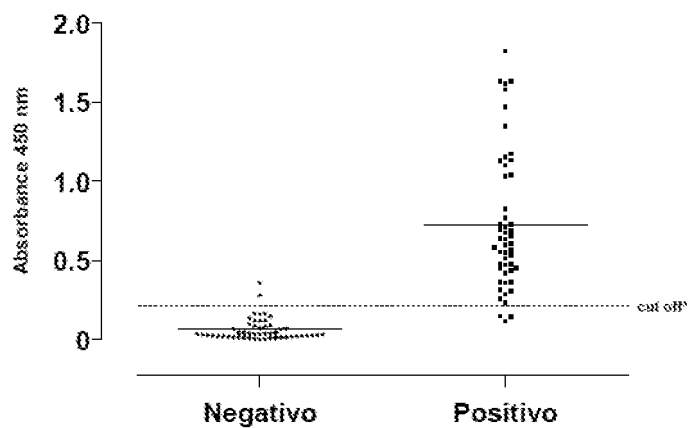
- a. proteínas MAPK e MAPK3 recombinantes de protozoários do gênero *Leishmania*, obtidas a partir do processo descrito nas reivindicações 6 a 8, ligadas a um suporte sólido ou a um carreador;
- b. anticorpos primários específicos para reconhecimento das proteínas descrita no item a;
- c. anticorpos secundários ou proteínas conjugados a uma enzima ou um marcador, específicos para reconhecerem o anticorpo primário descrito no item b; e
- d. um reagente para detectar a enzima ou o marcador mencionados no item c.

11)USO DE PROTEÍNAS DE LEISHMANIA caracterizadas pelas proteínas HSP 83-1, MAPK e MAPK3, naturais ou sintéticas, serem agentes antigênicos para vacinas contra leishmanioses em seres humanos e/ou cães.

12)USO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES caracterizadas pelas proteínas recombinantes equivalentes a MAPK e MAPK3 de protozoários do gênero *Leishmania* serem agentes antigênicos para diagnóstico de leishmanioses em seres humanos e/ou cães.

FIGURAS

HSP 83-1



EIE LVC Kit

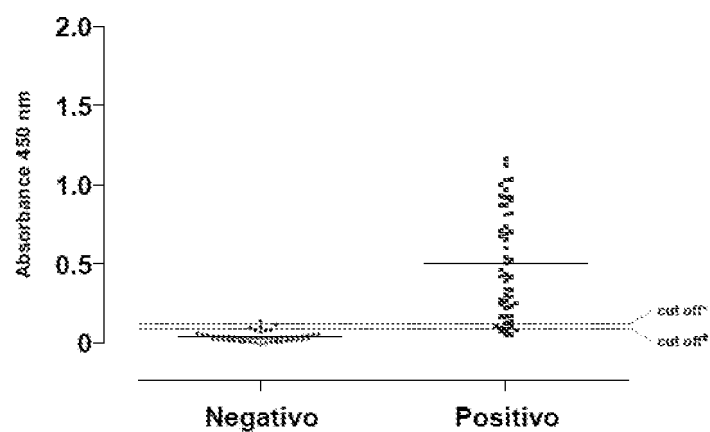


Figura 1

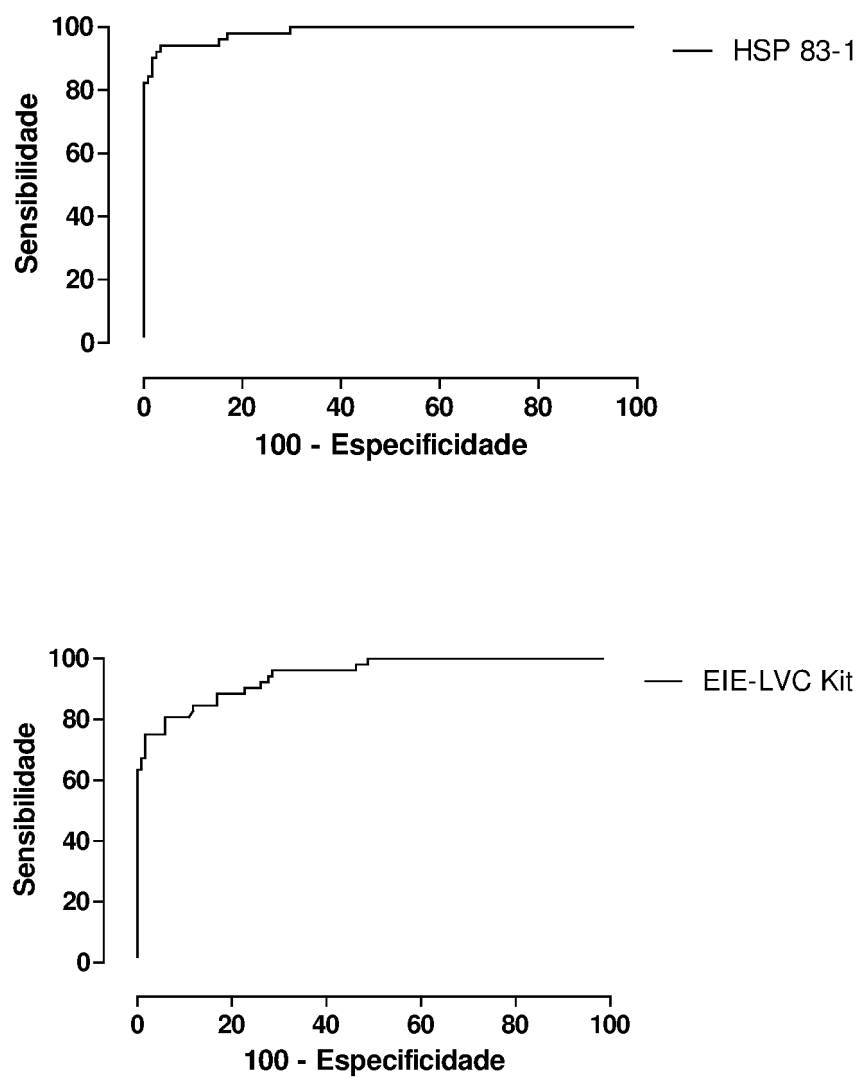


Figura 2

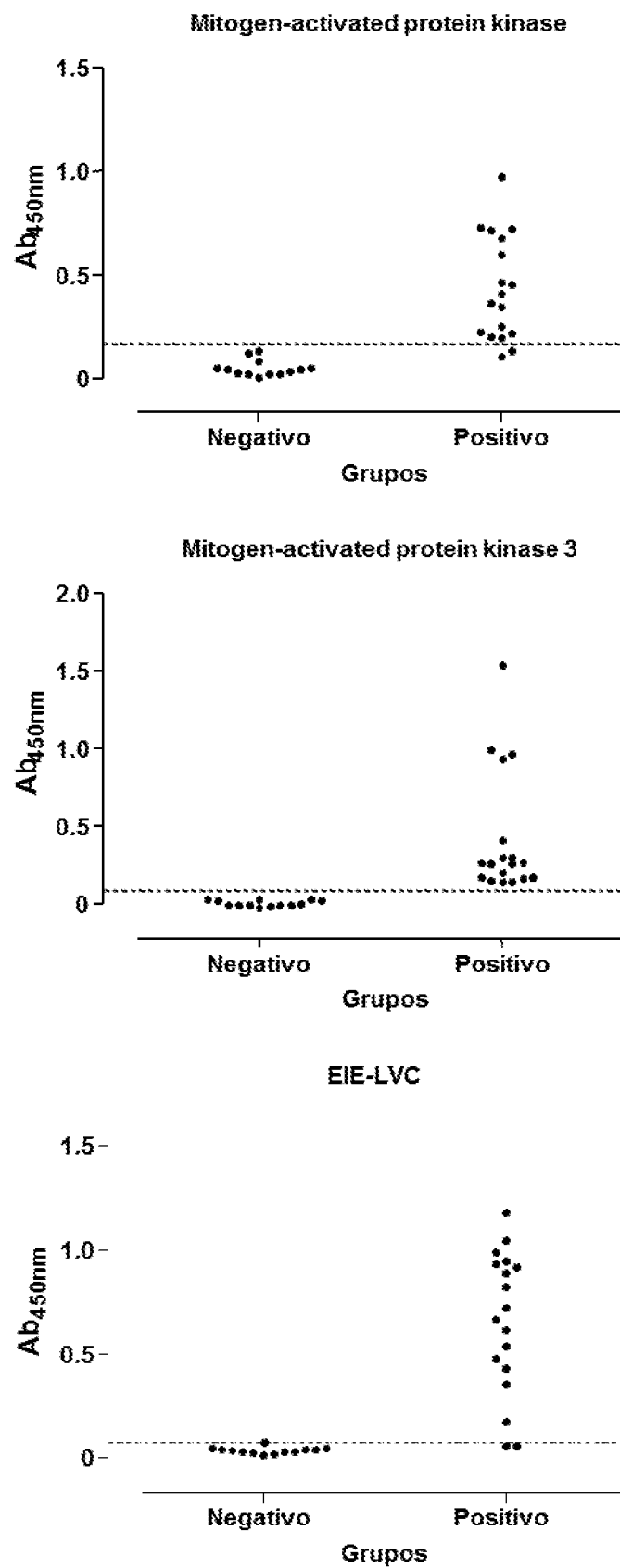


Figura 3

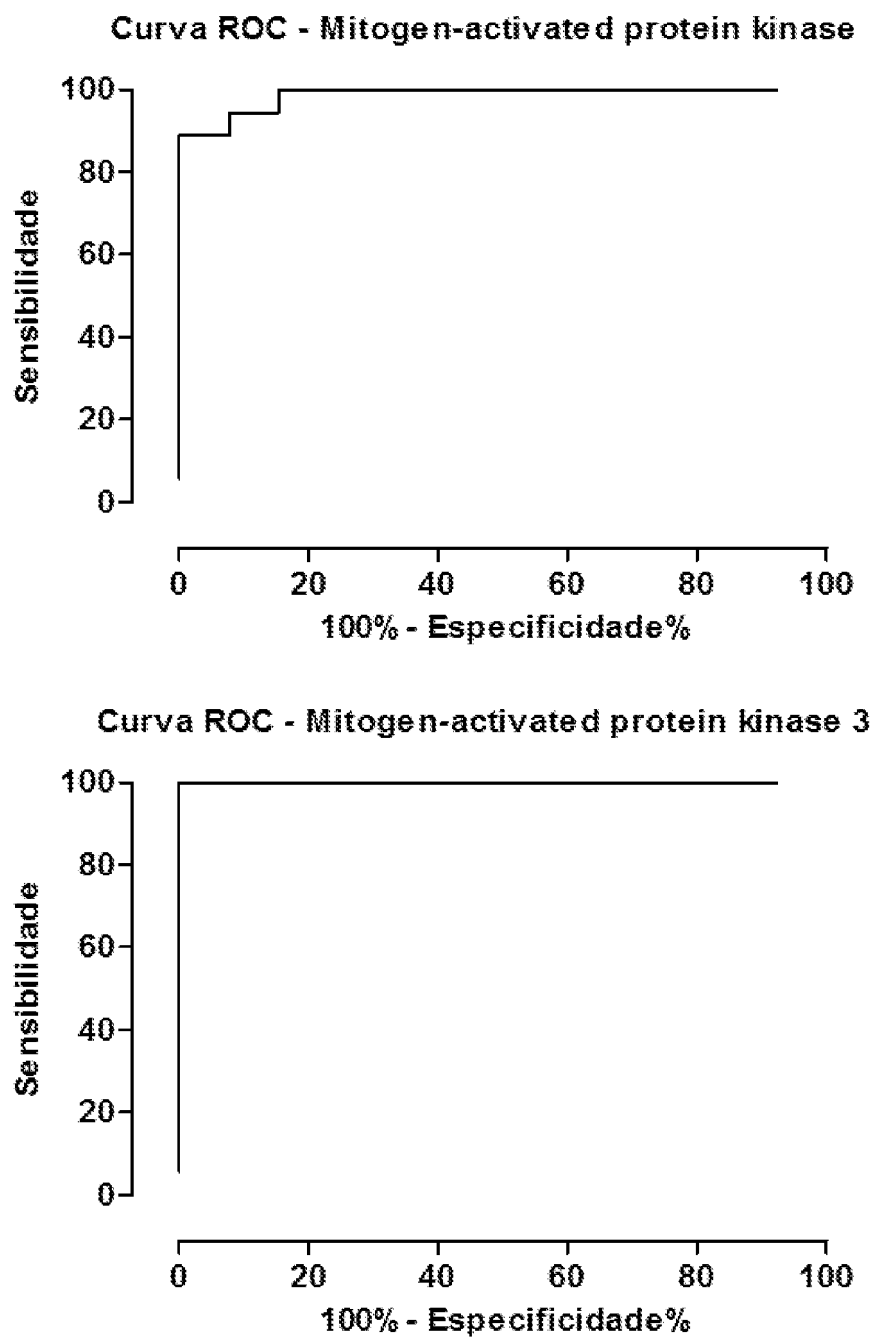


Figura 4

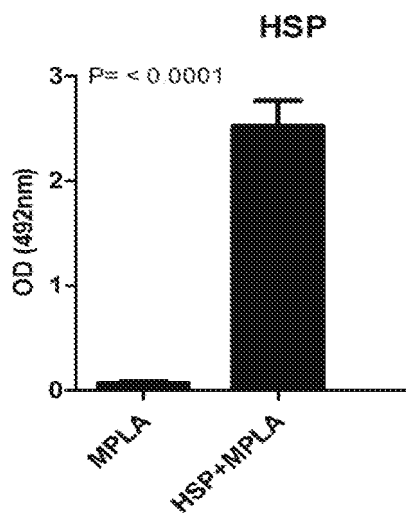


Figura 5

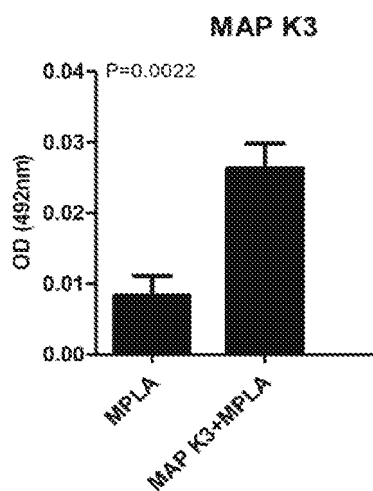
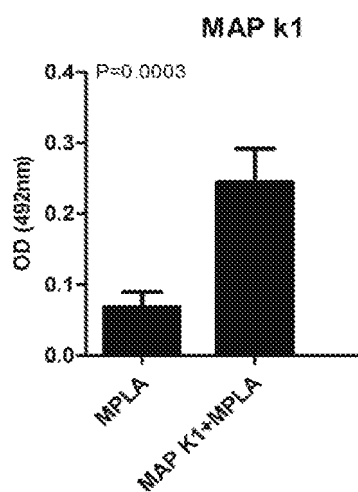


Figura 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB2013/060937

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61K 39/008 (2006.01), C12N 15/30 (2006.01), C12N 15/10 (2006.01), G01N 33/549 (2006.01), A61P 33/02 (2006.01) According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K39, C12N Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) MEDLINE, EPODOC, BIOSIS, CABS ABSTRACT		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Kaur et al., "Studies on the protective efficacy and immunogenicity of Hsp70 and Hsp83 based vaccine formulations in <i>Leishmania donovani</i> infected BALB/c mice". Acta Tropica, (2011) vol. 119, pages 50-56.	1, 11
A	The whole document	6 a 9
X	Echeverria et al., "Analysis of the adjuvant effect of recombinant <i>Leishmania infantum</i> Hsp83 protein as a tool for vaccination". Immunology Letters (2001), vol.76, pages 107-110.	1, 11
A	The whole document	6 a 9
X	Angel et al., "During canine leishmaniasis a protein belonging to the 83-kDa heat-shock protein family elicits a strong humoral response". Acta Tropica (1996), vol.62, pages 45-56.	6 a 9
A	page 48, material and methods	1, 11
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 24 April 2014		Date of mailing of the international search report 14 May 2014
Name and mailing address of the ISA/ INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL Facsimile No.		Authorized officer Camila Chaves Santos Telephone No. +55 21 3037-3984/3742

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB2013/060937

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Larreta et al., "The expression of HSP83 genes in <i>Leishmania infantum</i> is affected by temperature and by stage-differentiation and is regulated at the levels of mRNA stability and translation". BMC Molecular Biology (2004), vol. 5 (3), pages 1 a 18.	1, 6 a 9, 11
A	Teolinda et al., "Análisis de inmunoblot de antígenos de <i>Leishmania infantum</i> y <i>Leishmania donovani</i> en sueros de pacientes con leishmaniasis visceral de Venezuela." Rev Fac Farm. (2012), vol.54 (1): pages 21-30.	1, 6 a 9, 11
A	WO-0179276 A2 (PROBST PETERâ[US]) 25 October 2001 (2001-10-25) -----	1, 6 a 9, 11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB2013/060937

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The following groups of inventions were identified in the application:

1. HSP83 protein, diagnostic kit and vaccine composition using said protein
2. MAPK protein, diagnostic kit and vaccine composition using said protein
3. MAPK3 protein, diagnostic kit and vaccine composition using said protein

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1, 6 to 9 and 11

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/IB2013/060937

WO 0179276 A2	2001-10-25	WO 0179276 A3	2002-09-06
		AR 028333 A1	2003-05-07
		AT 310746 T	2005-12-15
		AT 530651 T	2011-11-15
		AT 243750 T	2003-07-15
		AU 5524101 A	2001-10-30
		AU 7242796 A	1997-04-09
		AU 2002305811 A1	2002-12-16
		BR 9610679 A	1999-03-30
		BR 9807332 A	2000-10-31
		DE 60115230 D1	2005-12-29
		DE 69628844 D1	2003-07-31
		EP 1113073 A2	2001-07-04
		EP 1287026 A2	2003-03-05
		EP 1422238 A2	2004-05-26
		EP 1681301 A1	2006-07-19
		EP 2284186 A1	2011-02-16
		EP 0854924 A1	1998-07-29
		EP 0981624 A2	2000-03-01
		ES 2255553 T3	2006-07-01
		ES 2373878 T3	2012-02-09
		ES 2391562 T3	2012-11-27
		ES 2205059 T3	2004-05-01
		MX 9802284 A	1998-08-30
		MX PA02010173 A	2003-06-04
		PT 1422238 E	2012-02-06
		PT 1681301 E	2012-10-26
		PT 854924 E	2003-11-28
		WO 02098359 A2	2002-12-12
		US 6375955 B1	2002-04-23
		WO 9711180 A1	1997-03-27
		WO 9835045 A2	1998-08-13
		US 6365165 B1	2002-04-02
		US 5834592 A	1998-11-10
		US 6500437 B1	2002-12-31
		US 6607731 B1	2003-08-19
		US 6613337 B1	2003-09-02
		US 6709661 B1	2004-03-23
		US 2002081320 A1	2002-06-27
		US 6638517 B2	2003-10-28
		US 2002169285 A1	2002-11-14

RELATÓRIO DE PESQUISA INTERNACIONAL

Depósito internacional Nº

PCT/IB2013/060937

A. CLASSIFICAÇÃO DO OBJETO

A61K 39/008 (2006.01), C12N 15/30 (2006.01), C12N 15/10 (2006.01), G01N 33/549 (2006.01), A61P 33/02 (2006.01)

De acordo com a Classificação Internacional de Patentes (IPC) ou conforme a classificação nacional e IPC

B. DOMÍNIOS ABRANGIDOS PELA PESQUISA

Documentação mínima pesquisada (sistema de classificação seguido pelo símbolo da classificação)

A61K39, C12N

Documentação adicional pesquisada, além da mínima, na medida em que tais documentos estão incluídos nos domínios pesquisados

Base de dados eletrônica consultada durante a pesquisa internacional (nome da base de dados e, se necessário, termos usados na pesquisa)

MEDLINE, EPODOC, BIOSIS, CABS ABSTRACT

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoria*	Documentos citados, com indicação de partes relevantes, se apropriado	Relevante para as reivindicações Nº
X	Kaur et al., "Studies on the protective efficacy and immunogenicity of Hsp70 and Hsp83 based vaccine formulations in <i>Leishmania donovani</i> infected BALB/c mice". Acta Tropica, (2011) vol. 119, págs. 50-56. - o documento todo -	1, 11
A		6 a 9
X	Echeverria et al., "Analysis of the adjuvant effect of recombinant <i>Leishmania infantum</i> Hsp83 protein as a tool for vaccination". Immunology Letters (2001), vol. 76, págs. 107-110. - o documento todo -	1, 11
A		6 a 9
X	Angel et al., "During canine leishmaniasis a protein belonging to the 83-kDa heat-shock protein family elicits a strong humoral response". Acta Tropica (1996), vol. 62, págs. 45-56.	6 a 9
A	- página 48, material e métodos -	1, 11

☒ Documentos adicionais estão listados na continuação do quadro C☒ Ver o anexo de famílias das patentes

* Categorias especiais dos documentos citados:

"A" documento que define o estado geral da técnica, mas não é considerado de particular relevância.

"E" pedido ou patente anterior, mas publicada após ou na data do depósito internacional

"L" documento que pode lançar dúvida na(s) reivindicação(ões) de prioridade ou na qual é citado para determinar a data de outra citação ou por outra razão especial

"O" documento referente a uma divulgação oral, uso, exibição ou por outros meios.

"P" documento publicado antes do depósito internacional, porém posterior a data de prioridade reivindicada.

"T" documento publicado depois da data de depósito internacional, ou de prioridade e que não conflita com o depósito, porém citado para entender o princípio ou teoria na qual se baseia a invenção.

"X" documento de particular relevância; a invenção reivindicada não pode ser considerada nova e não pode ser considerada envolver uma atividade inventiva quando o documento é considerado isoladamente.

"Y" documento de particular relevância; a invenção reivindicada não pode ser considerada envolver atividade inventiva quando o documento é combinado com um outro documento ou mais de um, tal combinação sendo óbvia para um técnico no assunto.

"&" documento membro da mesma família de patentes.

Data da conclusão da pesquisa internacional

24 de abril de 2014

Data do envio do relatório de pesquisa internacional

140514

Nome e endereço postal da ISA/BR



INSTITUTO NACIONAL DA
PROPRIEDADE INDUSTRIAL
Rua São Bento nº 1, 17º andar
cep: 20090-010, Centro - Rio de Janeiro/RJ
+55 21 3037-3663

Nº de fax:

Funcionário autorizado

Camila Chaves Santos

Nº de telefone:

+55 21 3037-3984/3742

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoria*	Documentos citados, com indicação de partes relevantes, se apropriado	Relevante para as reivindicações Nº
A	Larreta et al., "The expression of HSP83 genes in <i>Leishmania infantum</i> is affected by temperature and by stage-differentiation and is regulated at the levels of mRNA stability and translation". BMC Molecular Biology (2004), vol. 5 (3), págs. 1 a 18.	1, 6 a 9, 11
A	Teolinda et al., "Análisis de inmunoblot de antígenos de <i>Leishmania infantum</i> y <i>Leishmania donovani</i> en sueros de pacientes con leishmaniasis visceral de Venezuela." Rev Fac Farm. (2012), vol.54 (1): págs. 21-30.	1, 6 a 9, 11
A	WO 0179276 A2 (PROBST PETERA[US]) 25 outubro 2001 (2001-10-25) -----	1, 6 a 9, 11

Quadro II
ponto 2 da**Observações quando certas reivindicações não puderam ser objeto de pesquisa (Continuação do primeira página)**

Este relatório de pesquisa internacional não foi formulado em relação a certas reivindicações, sob Artigo 17.2).a), pelas seguintes razões:

1. ☐ Reivindicações:

porque estas se referem a matéria na qual esta Autoridade não está obrigada a realizar a pesquisa, a saber:

2. ☐ Reivindicações:

porque estas se referem a partes do pedido internacional que não estão de acordo com os requisitos estabelecidos, de tal forma que não foi possível realizar uma pesquisa significativa, especificamente:

3. ☐ Reivindicações:

porque estas são reivindicações dependentes e não estão redigidas de acordo com a segunda e terceira frase da Regra 6.4.a).

Quadro III Observações por falta de unidade de invenção (Continuação do ponto 3 da primeira página)

Esta Autoridade de pesquisa internacional encontrou múltiplas invenções neste depósito internacional, a saber:

Foram observados grupos de invenção no pedido:

- 1 - Proteína HSP83, kit de diagnóstico e composição de vacina usando a dita proteína
- 2 - Proteína MAPK, kit de diagnóstico e composição de vacina usando a dita proteína
- 3 - Proteína MAPK3, kit de diagnóstico e composição de vacina usando a dita proteína

1. ☐ como todas as taxas requeridas para pesquisas adicionais foram pagas pelo depositante dentro do prazo, este relatório de pesquisa cobre todas as reivindicações pesquisáveis.
2. ☐ como a pesquisa em todas as reivindicações pesquisáveis pode ser feita sem esforço que justifique pagamento adicional, esta Autoridade não solicitou o pagamento de taxas adicionais.
3. ☐ como somente algumas das taxas requeridas para pesquisas adicionais foram pagas pelo depositante dentro do prazo, este relatório de pesquisa internacional cobrará somente aquelas reivindicações cujas taxas foram pagas, especificamente as reivindicações:
4. ☒ as taxas de pesquisas adicionais requeridas não foram pagas dentro do prazo pelo depositante. Consequentemente, este relatório de pesquisa internacional se limita à invenção mencionada primeiramente nas reivindicações, na qual é coberta pelas reivindicações:

1, 6 a 9 e 11

Observações da reclamação

- ☐ as taxas adicionais para pesquisas foram acompanhadas pela reclamação do depositante e, se for o caso, pelo pagamento da taxa de reclamação.
- ☐ as taxas adicionais para pesquisa foram acompanhadas pela reclamação do depositante mas a taxa de reclamação não foi paga dentro do prazo especificado pela solicitação.
- ☐ o pagamento de pesquisas adicionais não acompanha nenhuma reclamação.

RELATÓRIO DE PESQUISA INTERNACIONAL

Informação relativa a membros da família da patentes

Depósito internacional Nº

PCT/IB2013/060937

Documentos de patente citados no relatório de pesquisa	Data de publicação	Membro(s) da família de patentes	Data de publicação
WO 0179276 A2	2001-10-25	WO 0179276 A3	2002-09-06
		AR 028333 A1	2003-05-07
		AT 310746 T	2005-12-15
		AT 530651 T	2011-11-15
		AT 243750 T	2003-07-15
		AU 5524101 A	2001-10-30
		AU 7242796 A	1997-04-09
		AU 2002305811 A1	2002-12-16
		BR 9610679 A	1999-03-30
		BR 9807332 A	2000-10-31
		DE 60115230 D1	2005-12-29
		DE 69628844 D1	2003-07-31
		EP 1113073 A2	2001-07-04
		EP 1287026 A2	2003-03-05
		EP 1422238 A2	2004-05-26
		EP 1681301 A1	2006-07-19
		EP 2284186 A1	2011-02-16
		EP 0854924 A1	1998-07-29
		EP 0981624 A2	2000-03-01
		ES 2255553 T3	2006-07-01
		ES 2373878 T3	2012-02-09
		ES 2391562 T3	2012-11-27
		ES 2205059 T3	2004-05-01
		MX 9802284 A	1998-08-30
		MX PA02010173 A	2003-06-04
		PT 1422238 E	2012-02-06
		PT 1681301 E	2012-10-26
		PT 854924 E	2003-11-28
		WO 02098359 A2	2002-12-12
		US 6375955 B1	2002-04-23
		WO 9711180 A1	1997-03-27
		WO 9835045 A2	1998-08-13
		US 6365165 B1	2002-04-02
		US 5834592 A	1998-11-10
		US 6500437 B1	2002-12-31
		US 6607731 B1	2003-08-19
		US 6613337 B1	2003-09-02
		US 6709661 B1	2004-03-23
		US 2002081320 A1	2002-06-27
		US 6638517 B2	2003-10-28
		US 2002169285 A1	2002-11-14

High-Throughput Analysis of Synthetic Peptides for the Immunodiagnosis of Canine Visceral Leishmaniasis

Angélica R. Faria¹, Míriam M. Costa², Mário S. Giusta², Gabriel Grimaldi Jr.³, Marcus L. O. Penido², Ricardo T. Gazzinelli^{2,4,5}, Héliida M. Andrade^{1*}

1 Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil, **2** Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil, **3** Instituto Oswaldo Cruz – Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil, **4** Centro de Pesquisas René Rachou – Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, Brasil, **5** Division of Infectious Diseases and Immunology, University of Massachusetts Medical School, Worcester, Massachusetts, United States of America

Abstract

Background: Visceral leishmaniasis is the most severe form of leishmaniasis. Approximately 20% of zoonotic human visceral leishmaniasis worldwide is caused by *Leishmania infantum*, which is also known as *Leishmania chagasi* in Latin America, and disease incidence is increasing in urban and peri-urban areas of the tropics. In this form of disease, dogs are the main reservoirs. Diagnostic methods used to identify *Leishmania* infected animals are not able to detect all of the infected ones, which can compromise the effectiveness of disease control. Therefore, to contribute to the improvement of diagnostic methods for canine visceral leishmaniasis (CVL), we aimed to identify and test novel antigens using high-throughput analysis.

Methodology/Principal Findings: Immunodominant proteins from *L. infantum* were mapped in silico to predict B cell epitopes, and the 360 predicted peptides were synthesized on cellulose membranes. Immunoassays were used to select the most reactive peptides, which were then investigated with canine sera. Next, the 10 most reactive peptides were synthesized using solid phase peptide synthesis protocol and tested using ELISA. The sensitivity and specificity of these peptides were also compared to the EIE-LVC Bio-Manguinhos kit, which is recommended by the Brazilian Ministry of Health for use in leishmaniasis control programs. The sensitivity and specificity of the selected synthesized peptides was as high as 88.70% and 95.00%, respectively, whereas the EIE-LVC kit had a sensitivity of 13.08% and 100.00% of specificity. Although the tests based on synthetic peptides were able to diagnose up to 94.80% of asymptomatic dogs with leishmaniasis, the EIE-LVC kit failed to detect the disease in any of the infected asymptomatic dogs.

Conclusions/Significance: Our study shows that ELISA using synthetic peptides is a technique with great potential for diagnosing CVL; furthermore, the use of these peptides in other diagnostic methodologies, such as immunochromatographic tests, could be beneficial to CVL control programs.

Citation: Faria AR, Costa MM, Giusta MS, Grimaldi G Jr, Penido MLO, et al. (2011) High-Throughput Analysis of Synthetic Peptides for the Immunodiagnosis of Canine Visceral Leishmaniasis. PLoS Negl Trop Dis 5(9): e1310. doi:10.1371/journal.pntd.0001310

Editor: Ana Rodriguez, New York University School of Medicine, United States of America

Received: May 6, 2011; **Accepted:** July 26, 2011; **Published:** September 13, 2011

Copyright: © 2011 Faria et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) and Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: helida@icb.ufmg.br

Introduction

Leishmaniasis, which is one of the major parasitic diseases recognized by the World Health Organization, affects approximately 1–2 million individuals annually. Dogs are considered the main domestic reservoir of *Leishmania infantum* (also known as *L. chagasi*) [1], which is the causative agent of zoonotic visceral leishmaniasis (VL) in both the Old and New Worlds [2]. In endemic areas, up to 85% of infected dogs may be asymptomatic [3], and they serve as reservoir for vector transmission to susceptible animals and humans [4].

The epidemiological control of VL in Brazil involves the elimination of infected dogs, widespread insecticide use and the systematic treatment of human cases [5]. Reliable diagnostic tests for *L. infantum* detection are essential to prevent disease transmission and the unnecessary culling of dogs. Given the

frequency of asymptomatic infections in dogs and the difficulty of direct parasite detection, the development of rapid and accurate indirect diagnostic methods for canine infection is essential for VL surveillance programs. The principal serodiagnostic tests include the immunofluorescent antibody test (IFAT) and the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). These conventional tests employ crude antigen preparations of either whole promastigotes or their soluble extracts, which limits assay standardization and result reproducibility [6].

An alternative method for the production of antigens for immunoassays is the synthesis of peptides. These peptides are relatively simple to synthesize and are cheaper to produce compared to the production of whole proteins [7]. In general, the use of synthetic peptides increases the specificity of immunoassays compared to crude antigens [8].

Author Summary

Globally, the number of new human cases of visceral leishmaniasis (VL) is estimated to be approximately 500,000 per year. This is the most severe of all forms of leishmaniasis, and the zoonotic form of VL, caused by *Leishmania infantum* (also known as *Leishmania chagasi*), represents 20% of human visceral leishmaniasis worldwide; additionally, its prevalence is increasing in urban and peri-urban areas of the tropics. In Brazil, the identification and elimination of infected dogs, which act as a reservoir for *Leishmania* parasites, is a control measure employed in addition to the use of insecticides against the vectors and the identification and treatment of infected humans. Currently, the diagnostic methods employed to identify infected animals are not able to detect all of these dogs, which compromises the effectiveness of control measures. Moreover, one of the most important issues in controlling VL is the difficulty of diagnosing asymptomatic dogs, which act as parasite reservoirs. Therefore, to contribute to the improvement of the diagnostic methods for CVL, we aimed to identify and characterize new antigens that were more sensitive and specific and could be applied in epidemiologic surveys.

In previous studies, we identified almost 50 immunodominant proteins of *L. infantum*, mapped their B cell epitopes and submitted 180 peptides to Spot synthesis and immunoassay. A total of 25 peptides showed promising characteristics for serodiagnosis of visceral leishmaniasis [9]. Here, we increased the B cell epitopes mapping, performed a high-throughput analysis of 360 peptides and selected the top 10 peptides for ELISA testing. When assessed, the specificity and sensitivity of the selected peptides was as high as 88.7% and 95.0%, respectively. These new antigens represent solid candidate peptides for the diagnosis of VL with great accuracy, especially in asymptomatic animals.

Methods

Ethics Statement

Experiments with dogs were performed in compliance with the guidelines of the Institutional Animal Care and Committee on Ethics of Animal Experimentation (Comitê de Ética em Experimentação Animal – CETEA, national guidelines Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008) from Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG); protocol 211/07 was approved on 03/12/2008.

Canine Sera

For the initial screening of *Leishmania* antigens on cellulose membranes, we used a pool of sera from ten animals per experimental group, i.e., chronically infected dogs and uninfected control dogs. The chronically infected dogs were naturally infected with *Leishmania*, and they were found in the metropolitan region of Belo Horizonte, Minas Gerais state, Brazil, rescued and maintained in our facility for laboratory and clinical evaluations. VL in chronically infected dogs was certified by the presence of clinical symptoms and parasitological tests that were conducted on bone marrow cells examined by optical microscopy. The uninfected dogs were negative based on parasitological as well as serological tests for VL; these animals served as negative controls in our study. Blood from all the dogs was withdrawn and maintained at room temperature for 3 h to obtain serum. For each animal in a group, 100 μ L of serum was deposited in a single tube

to obtain a pool of sera that was representative of chronically infected or uninfected dogs; each group was comprised of 10 dogs.

For the ELISA tests, we used the serum described above and 62 serum samples from 23 symptomatic and 39 asymptomatic dogs from PANCAS, Espírito Santo state, Brazil. Dogs were scored for 6 typical signs of canine visceral leishmaniasis: alopecia, dermatitis, chancres, conjunctivitis, onychogryphosis and lymphadenopathy. Each sign was scored on a semi-quantitative scale from 0 (absent) to 3 (severe), and these scores were added together to give an overall clinical score. Dogs with a total score of 0–2 were arbitrarily classed as asymptomatic, 3–6 as oligosymptomatic and 7–18 as symptomatic [10]. Additionally, several serum samples from dogs that were experimentally infected with other pathologies were also tested; samples from dogs that were seropositive for *Trypanosoma cruzi* by RIFI ($n = 15$) and positive for *Leishmania braziliensis* based on parasitological examination and molecular identification ($n = 20$) were kindly provided by Prof Dr. Ricardo Toshio Fujiwara of UFMG and Prof Dr. Alexandre Barbosa Reis of UFOP, respectively.

Epitope Identification and Spot Synthesis

Previously, we identified almost 50 immunodominant proteins from *L. infantum*, performed the mapping of their B cell epitopes using BepiPred program that is based on propensity scale methods (<http://www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred/> [11]), and a total of 180 peptides were submitted for Spot synthesis and immunoassays, and 25 peptides were shown to be of interest for use in VL serodiagnosis [9]. Here, we completed the mapping of the same proteins [9] using two different programs: ABCPred, based on machine learning methods that apply a recurrent neural network (<http://www.imtech.res.in/raghava/abcpred> [12]) and BCPreds, which is also based on machine learning methods but involve those that apply a support vector machine (<http://ailab.cs.iastate.edu/bcpreds/> [13]). Epitopes that were predicted by the two programs simultaneously (excluding those previously identified [9]) were synthesized using the Spot synthesis method [14] on derivatized cellulose membranes with an Ala-Ala linker; peptide size ranged from 9 to 14 amino acids [15].

Immunoassays with cellulose-bound peptides

Initially, the selection of the most immunoreactive peptides was performed using immunoassays of pooled canine serum (previously described in [9]) and alkaline phosphatase-conjugated goat anti-dog immunoglobulin G. We tested all of the peptides mapped in both studies. The relative intensity of the spots representing each peptide was determined by overlapping positive and negative membranes with ImageMasterTM Platinum program. Peptides with relative intensity values of 2 or greater ($RI \geq 2$) were considered potential candidate antigens [16]. Next, new membranes were synthesized with only the selected peptides, and they were tested with individual canine sera. To evaluate these assays, cut off values were calculated for each peptide using the mean color intensity + 2 standard deviations (SD) from 5 known negative individual canine sera. All assays were performed in duplicate.

Synthesis of soluble peptides

Based on the results of immunoassays conducted using cellulose-bound peptides that were probed with canine sera, 10 peptides that exhibited reactivity with the largest number of serum samples from infected animals were chemically synthesized using 9-fluorenyl-methoxy-carbonyl (Fmoc) chemistry [17] in an automated synthesizer, model PSSM8 (Shimadzu, Kyoto, Japan). Peptide purity was assessed with reverse-phase high performance liquid chromatography (HPLC) and mass spectrometry (MALDI-TOF-TOFAutoFlexIIITM, BrukerDaltonics, Billerica,

Massachusetts, USA). The synthetic peptides were diluted in PBS and used as antigens in ELISA assays.

ELISA

All ELISA procedures were optimized in terms of antigen concentrations and the dilutions of serum and conjugated immunoglobulins to develop a reproducible and robust assay. The optimal antigen concentration was 20 µg/mL. A clear separation between sera from *L. infantum*-infected and uninfected animals was possible using 1:100 dilutions for sera and 1:5,000 dilutions for the conjugated immunoglobulins.

Falcon flexible microtitration plates purchased from Becton Dickinson Labware Europe (Becton Dickinson, France S.A.) were coated for 16 h approximately with 100 µL/well of synthetic peptides (20 µg/mL) in PBS. Wells were then blocked with 5% powdered skim milk in PBS/T (PBS containing 0.05% Tween20) at 37°C for 1 hour. Serum samples, diluted 1:100 in PBS/T containing 0.5% powdered skim milk, were added and incubated at 37°C for 1 hour. Plates were washed three times with PBS/T and then incubated with peroxidase-conjugated anti-dog immunoglobulin G (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) diluted 1:5,000 in PBS/T containing 0.5% powdered skim milk at 37°C for 1 h. After washing three times with PBS/T, reactions were developed with Fast-OPDTM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Plates were incubated for 30 min in the dark. The reactions were stopped with 2 M H₂SO₄, and the plates were read at 492 nm in a Multiskan Plate Reader (MCC/340).

The results of the ELISA using synthetic peptides as antigens (EP) were compared with those obtained with the EIE-LVC Bio-Manguinhos kit, which is based on immunoenzymatic detection of canine visceral leishmaniasis. The EIE-LVC Bio-Manguinhos kit uses crude antigens and is currently recommended by the Brazilian Ministry of Health for the screening of seroreactive animals [18]. To do this comparison, the same serum samples were tested using both assays; the EIE-LVC kits were used according to the manufacturer's instructions and also calculating a different cut off, employing ROC curve and the same control serum samples already described.

Statistical analysis

A cut off point for optimal sensitivity and specificity was determined using ROC analysis [19], and the area under the curve (AUC) was calculated to assess the performance of the tests. All of the statistical analyses were performed using GraphPad PrismTM (version 5.0) and MedCalcTM (version 7.3).

Agreement beyond chance between the tests was assessed using the Cohen Kappa (κ) coefficient [20] and interpreted according to the following scale: 0.00–0.20, negligible; 0.21–0.40, weak; 0.41–0.60, moderate; 0.61–0.80, good and 0.81–1.00, excellent [21]. The accuracy of each test was evaluated according to the AUC referent to the ROC curve and the Youden index J [22].

Results

Epitope identification, Spot synthesis and immunoassays with cellulose-bound peptides

ABCPred and BCPreds programs simultaneously predicted 191 distinct peptides. However, 11 peptides predicted by both programs were previously predicted by BepiPred [9]. All of these peptides (n = 360) were synthesized in cellulose membranes and submitted to immunoassays. Among these 360 peptides, there were 48 with RI ≥ 2, which are presented in Table S1.

All of the 48 selected peptides were synthesized onto new cellulose membranes and subjected to immunoassays with

individual canine serum samples obtained from 5 uninfected dogs and 20 *L. infantum*-infected dogs. The pattern of recognition of the various serum samples was similar against the same peptide; furthermore, uninfected serum samples always showed lower reactivity compared to serum samples from infected animals. In this step, peptides that were reactive with pooled sera from *T. cruzi*-infected animals were excluded (data not shown).

Ten peptides were reactive against multiple individual canine serum samples (from 35% to 75% of samples) and also did not cross-react with pooled sera from *T. cruzi*-infected animals (presented in Table S2). Coincidentally, these 10 peptides resulted from the simultaneous prediction by two programs (ABCPred and BCPreds). These peptides were then synthesized in a soluble form using solid phase technique to be used in ELISA tests.

ELISA

The antigens (peptides) selected for ELISA testing were named as follows: PSLc1, PSLc2, PSLc3, PSLc4, PSLc5, PSLc6, PSLc7, PSLc8, PSLc9 and PSLc10. All of the peptides were mixed into a single solution (Mix10), which was used as another antigen in ELISA testing.

Peptide sensitivity and specificity were calculated using parasitological results as a gold standard. Most of the peptides were able to detect a large percentage of symptomatic and asymptomatic infected dogs, which was not observed with EIE-LVC kit. Diagnostic performances of the EP and EIE-LVC kit for canine serum samples are shown in Table 1. Based on the accuracy of the EP, those peptides with higher AUC and Youden index J values were selected. Thus, PSLc6, PSLc8 and PSLc10, as well as the Mix10, were tested again with a higher number of serum samples.

The next stage of testing was performed with 107 serum samples from *L. infantum*-infected dogs and the same 20 serum samples that were used as the negative controls in the previous assays. Additionally, 15 serum samples from *T. cruzi*-infected dogs and 20 from *L. braziliensis*-infected dogs were also tested. Figure 1 shows the results obtained with the three selected peptides and the Mix10 tested separately. Some cross-reactivity with *T. cruzi* and *L. braziliensis* occurred for all of the antigens, being cross-reactivity with *L. braziliensis* more frequent. For PSLc6, 40% of *T. cruzi* and 70% of *L. braziliensis*-infected serum samples were considered positive (Figure 1A). PSLc8 exhibited cross-reactivity with 26.6% of *T. cruzi* and 85% of *L. braziliensis*-infected serum samples (Figure 1B), whereas 93.3% of *T. cruzi* and 95.0% of *L. braziliensis*-infected samples reacted with PSLc10 (Figure 1C). Mix10 showed a similar pattern, with 80% of *T. cruzi*-infected serum samples and 70% of *L. braziliensis*-infected serum samples testing positive (Figure 1D).

The same serum samples were tested using the kit recommended by the Brazilian Ministry of Health (EIE-LVC kit). The cut off value obtained as recommended by manufacturer (negative control absorbance multiplied by two) was very high, and was therefore outside the detection range for many of the infected dogs (Figure 2A). Furthermore, when ROC curve was applied using the previous described control serum samples, the cut off obtained was lower, which increased sensitivity, but cross-reactivity occurred with 53.3% of *T. cruzi* infected sera and with 40.0% of *L. braziliensis* infected sera (Figure 2B).

The sensitivity, specificity, AUC and Youden index J values were calculated for the investigated serological tests (Table 2). The sensitivity of the widely used EIE-LVC kit performed according to the manufacturer was 13.08%, but when ROC curve was applied to calculate cut off value, the sensitivity was 87.85%. EP showed sensitivities that ranged between 71.03% and 84.10%, depending

Table 1. Diagnostic performance of EP and EIE-LVC kit in serum samples from symptomatic and asymptomatic dogs.

Antigen/test	Se %	Sp %	AUC	Youden index J	Sym + (%)	Asym + (%)	Total+ (%)
PSLc1	72.50	75.00	0.754	0.475	17 (73.9%)	28 (71.7%)	45 (72.5%)
PSLc2	75.80	70.00	0.769	0.458	16 (69.5%)	31 (79.4%)	47 (75.8%)
PSLc3	74.10	70.00	0.778	0.441	22 (95.6%)	24 (61.5%)	46 (74.1%)
PSLc4	75.80	70.00	0.797	0.458	11 (47.8%)	36 (92.3%)	47 (75.8%)
PSLc5	70.96	55.00	0.642	0.259	16 (69.5%)	28 (71.7%)	44 (70.9%)
PSLc6	79.00	85.00	0.904	0.64	16 (69.5%)	33 (84.6%)	49 (79.0%)
PSLc7	85.40	80.00	0.863	0.654	19 (82.6%)	34 (87.1%)	53 (85.4%)
PSLc8	82.26	95.00	0.944	0.772	17 (73.9%)	34 (87.1%)	51 (82.2%)
PSLc9	79.00	75.00	0.847	0.540	12 (52.1%)	37 (94.8%)	49 (79.0%)
PSLc10	88.70	85.00	0.947	0.737	20 (86.9%)	35 (89.7%)	55 (88.7%)
Mix10	75.81	95.00	0.916	0.708	13 (56.5%)	34 (87.1%)	47 (75.8%)
EIE-LVC kit *	8.00	100.00	NA	0.08	5 (21.7%)	0 (0%)	5 (8.0%)

Samples from symptomatic (n = 23), asymptomatic (n = 39) *L. infantum*-infected dogs and healthy dogs (n = 20) were tested. Se: sensitivity; Sp: specificity; Sym: number of symptomatic dogs diagnose as positive; Asym: number of asymptomatic dogs diagnose as positive;

*cut off obtained according to the manufacturer.

doi:10.1371/journal.pntd.0001310.t001

upon the peptide utilized. The EP Mix10 presented the highest AUC value (0.902), showing a high accuracy [23], followed by the EP PSLc10 with an AUC value of 0.888. The Youden index J values for these two tests were also the highest, with values of 0.585 and 0.641, for the EP Mix10 and EP PSLc10, respectively. Specificity rates were determined for all uninfected dogs. The

specificity of the kit was 100%, as a result of the high cut off value. In contrast, the specificity of EP ranged from 55% to 80%, depending on the peptide used.

When the ROC curves obtained from all of the investigated tests with synthetic peptides were combined, it was possible to observe that EP PSLc6 had the lowest AUC value, showing the

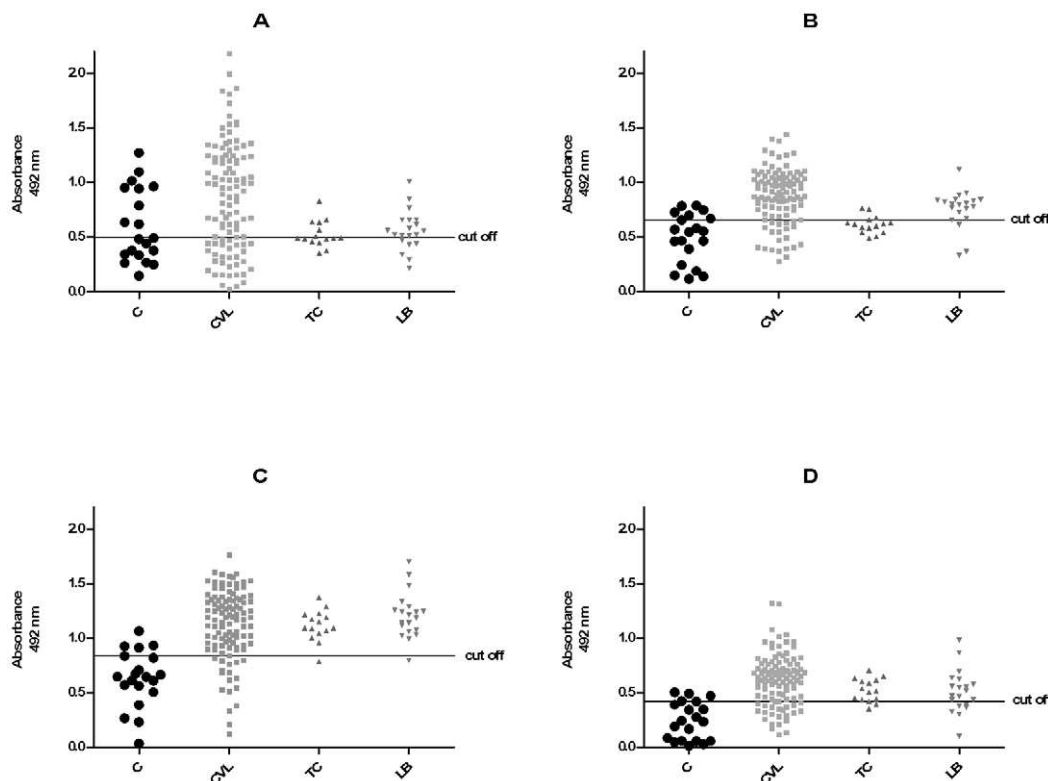


Figure 1. Comparison of ELISA reactivity of canine sera against PSLc6, PSLc8, PSLc10 and Mix10. ELISA was performed in different groups of dogs (C, control group, n = 20; CVL, *L. infantum* group, n = 107; TC, *T. cruzi* group, n = 15; LB, *L. braziliensis* group, n = 20) against PSLc6 (A), PSLc8 (B), PSLc10 (C) and Mix10 (D). doi:10.1371/journal.pntd.0001310.g001

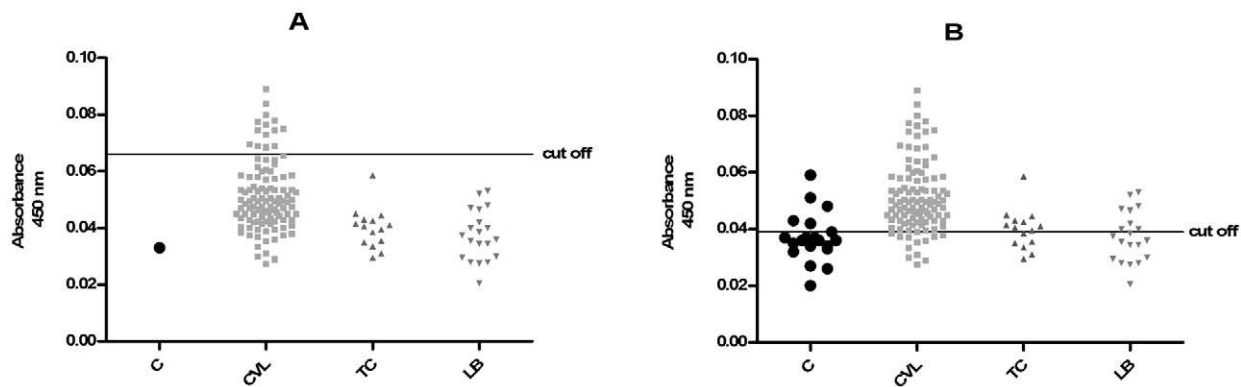


Figure 2. Comparison of ELISA reactivity of canine sera assessed by EIE-LVC kit. ELISA was performed in different groups of dogs (C, control group, $n=1$, given by the kit; CVL, *L. infantum* group, $n=107$; TC, *T. cruzi* group, $n=15$; LB, *L. braziliensis* group, $n=20$). In A, cut off was performed according to the manufacturer; in B, it was performed using ROC curve with serum samples from control group.
doi:10.1371/journal.pntd.0001310.g002

most ineffective performance of all of the tests. In contrast, the other tests presented similar performances, showing overlapping ROC curves (Figure 3).

A good agreement beyond chance (κ index) ranging from 0.402 to 0.751 was obtained when the results from each peptide (PSLc6, PSLc8, PSLc10) and Mix10 were cross-tabulated (Table 3). Among these results, the κ index value for PSLc6 and Mix10 was the lowest (0.402), showing weak agreement. The correlation between PSLc8 and Mix10 had the highest κ index value (0.751), showing a good agreement. When the EIE-LVC kit performed according to the manufacturer was cross-tabulated with the synthetic peptides, the agreement was very poor. The index ranged between 0.031 (compared to Mix10) to 0.064 (compared to PSLc8). All of these correlations indicate a negligible agreement between these tests. When EIE-LVC kit performed using ROC curve and 20 control serum samples was cross-tabulated with the synthetic peptides, the agreement was weak. It ranged from 0.213 (compared to PSLc6) to 0.406 (compared to PSLc10).

Discussion

Despite the efforts to search for new diagnostic methods, a method with satisfactory CVL diagnosis efficiency is not yet available. The use of accurate methods that are easy use in the field and are cheap is crucial for diagnosis and consequently, for disease control. Therefore, the identification of new antigens is an important research area for VL disease control. In this work, new

antigens for CVL serological diagnosis were investigated using bioinformatic tools and successive screenings with immunoassays.

Using bioinformatics, 360 epitopes were predicted from 47 immunogenic proteins that were identified by bidimensional electrophoresis and Western blot [9]. B cell prediction showed great efficiency because, in the immunoassays, the majority of the cellulose-bound peptides were immunogenic. Of the 48 peptides that could be used to differentiate infected and uninfected dogs, we selected the ten most specific ones.

The ten best peptides resulted from the prediction of two programs simultaneously (BCPreds and ABCPred), and none resulted from using BepiPred considering 2 as a minimum score. However, we observed that 60% of the ten best peptides were also predicted as epitopes based on BepiPred's default score (0.35). These results suggest that using the default score of prediction programs associated with the overlapping predictions by more than one program can be better than using a single type of prediction. Several authors have already shown that combined T cell epitopes generated using consensus predictions are believed to be more accurate [24,25]. It is important to mention that ABCPred and BCPreds approaches are similar (machine learning methods), whereas the BepiPred approach is based on propensity scale methods. This difference could potentially explain the differences between the epitope predictions made by BepiPred alone compared to those made by the ABCPreds and BCPreds programs together.

After the immunoassays in cellulose membranes, the ten peptides that reacted with multiple tested serum samples were

Table 2. Diagnostic performance of EP and EIE-LVC kit in a larger panel of canine serum samples.

Serological test	Sensitivity in CVL group % (95% CI)	Specificity in control group % (95% CI)	AUC	Youden index J
EP PSLc6	71.03 (61.4–79.3)	55.0 (31.5–76.9)	0.661	0.260
EP PSLc8	81.3 (72.6–88.1)	70.0 (45.7–88.1)	0.876	0.513
EP PSLc10	84.1 (75.7–90.4)	80.0 (56.3–94.2)	0.888	0.641
EP Mix10	78.5 (69.5–85.8)	80.0 (56.3–94.2)	0.902	0.585
EIE-LVC kit *	13.08 (7.3–20.9)	100.0 (2.5–100.0)	NA	0.130
EIE-LVC kit #	87.85 (80.12– 93.3)	75.0 (50.9–91.3)	0.848	0.620

Samples from *L. infantum*-infected dogs ($n=107$) and healthy dogs ($n=20$) were tested. CI: confidence interval; AUC: area under the curve; NA: not applicable;

*cut off obtained according to the manufacturer;

#cut off obtained by ROC curve using 20 control serum samples.

doi:10.1371/journal.pntd.0001310.t002

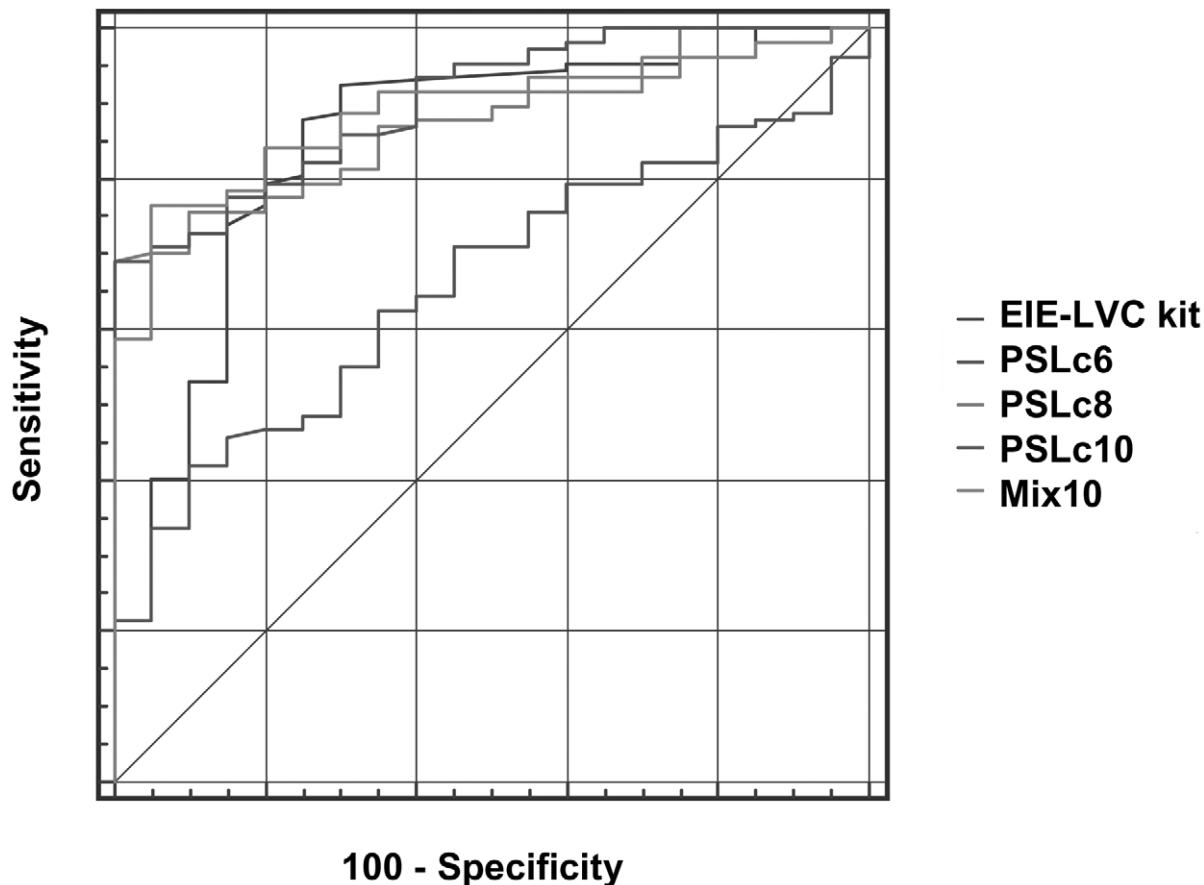


Figure 3. Comparison of ROC curves obtained from all the tests. The curves were used to determine ELISA cut off, sensitivity, specificity and AUC.

doi:10.1371/journal.pntd.0001310.g003

synthesized using Fmoc technique. These peptides showed good reactivity as antigens and were able to recognize specific antibodies in ELISA. The performance observed for the new antigens presented in this work (maximum of sensitivity and specificity of approximately 84.1% and 80.0% respectively) is compatible with the performance of many antigens, mainly recombinant proteins, that have been developed in recent years for CVL diagnosis [26–28] with the advantage of being cheaper and faster to produce.

However, there are other ELISA methods described for CVL that have greater sensitivity or specificity compared to EP. A study conducted in Brazil investigated sera from negative controls ($n = 30$) and from *L. infantum*-infected dogs ($n = 60$) in a fucose-mannose ligand based ELISA. Using ROC curve, the sensitivity was 90% and specificity was 93.3% in oligosymptomatic dogs [29]. Another Brazilian study analyzed 209 sera samples from *L. infantum*-infected dogs in a recombinant cysteine proteinase based ELISA. The cut off value was obtained by adding two standard deviation values to the mean absorbance of 22 sera samples from healthy dogs. It provided values of 98% and 96% from sensitivity and specificity respectively [30]. In Europe, some researchers investigated soluble antigens derived from promastigote or amastigote-like stages of *L. infantum* in ELISA. The cut off value was the arithmetic mean plus 3 standard deviations of 48 negative controls. When a group of 47 *L. infantum*-infected dogs was tested, sensitivity varied from 94.1 to 100%, and specificity varied from 96 to 100% [31]. All of these findings show that much has been done to improve CVL diagnosis,

but the results are similar. Higher values of sensitivity and specificity are motivations for our antigen improvement.

We compared the results obtained in EP with those obtained with the widely used kit recommended by the Brazilian Ministry of Health, the EIE-LVC kit. Evaluation of EIE-LVC kit, used as recommended by manufacturer, revealed a sensitivity of 13.08% and a specificity of 100%. This low sensitivity could be explained by the high cut off value, which missed many infected dogs. However, following this manufacturer's instruction, test accuracy is related to the composition of only one negative control provided by the kit. Then, we used also 20 serum samples from known uninfected dogs, and the cut off values were obtained using ROC curves. This way, it was possible to obtain sensitivity of 87.8% and specificity of 75.0%. The performance of this kit, when evaluated by other authors is variable. Values of sensitivity of approximately 87.5% and specificity of approximately 100% were obtained elsewhere; 15 false negative results were reported, being 11 in asymptomatic dogs, in a group of 120 samples. Therefore, the prevalence of CVL was underestimated [32]. However, using the same kit, another study showed a sensitivity of 72% and a specificity of 87.5%. These authors indicated the use of EIE-LVC kit in parallel with another kit produced by Bio-Manguinhos, which employed indirect immunofluorescence, to minimize the number of false negatives [33].

Previous data have shown that serologic test performance in CVL depends on infection status [34,35] and an important limitation in CVL control programs is the inability to identify

Table 3. Kappa index (κ) between paired results of diagnostic tests.

Serological test		Serological test														
		EIE-LVC kit *			EP PSLc6			EP PSLc8			EP PSLc 10			EP Mix10		
		P (+)	N (-)	T	P (+)	N (-)	T	P (+)	N (-)	T	P (+)	N (-)	T	P (+)	N (-)	T
EIE-LVC kit #	P(+)	14	87	101	73	28	101	81	20	101	84	17	101	76	25	101
	N(-)	0	26	26	12	14	26	12	14	26	10	16	26	12	14	26
	T	14	113	127	85	42	127	93	34	127	94	33	127	88	39	127
κ index (95% CI)		0.062 (-0.049–0.172)			0.213 (0.011–0.415)			0.306 (0.097–0.514)			0.406 (0.208–0.605)			0.245 (0.041–0.450)		
EP Mix10	P(+)	11	77	88	70	18	88	84	4	88	81	7	88	-	-	-
	N(-)	3	36	39	15	24	39	9	30	39	13	26	39	-	-	-
	T	14	113	127	85	42	127	93	34	127	94	33	127	-	-	-
κ index (95% CI)		0.031 (-0.098–0.161)			0.402 (0.227–0.578)			0.751 (0.622–0.878)			0.613 (0.458–0.769)					
EP PSLc 10	P(+)	13	81	94	75	19	94	85	9	94	-	-	-	-	-	-
	N(-)	1	32	33	10	23	33	8	25	33	-	-	-	-	-	-
	T	14	113	127	85	42	127	93	34	127	-	-	-	-	-	-
κ index (95% CI)		0.060 (-0.061–0.182)			0.455 (0.280–0.629)			0.655 (0.503–0.808)								
EP PSLc8	P(+)	13	80	93	75	18	93	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	N(-)	1	33	34	10	24	34	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	T	14	113	127	85	42	127	-	-	-	-	-	-	-	-	-
κ index (95% CI)		0.064 (-0.059–0.186)			0.477 (0.306–0.648)											
EP PSLc6	P(+)	11	74	85	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	N(-)	3	39	42	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	T	14	113	127	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
κ index (95% CI)		0.041 (-0.094–0.175)														

Samples from *L. infantum*-infected dogs (n = 107) and healthy dogs (n = 20) were tested. P: positive; N: negative; T: total; CI: confidence interval;

*cut off obtained according to the manufacturer;

#cut off obtained by ROC curve using 20 control serum samples.

doi:10.1371/journal.pntd.0001310.t003

asymptomatic dogs because classic diagnostic tests are insufficiently sensitive [36]. Thus, a sensitive and specific antigen for the detection of asymptomatic dogs would be highly desirable because it would allow for effective control intervention in areas where CVL occurs. In our tests, the EIE-LVC kit was not able to detect any of the 39 serum samples from asymptomatic dogs, while the new antigens exhibited strong reactivity to the tested sera. For example, in symptomatic dogs, positive reactions reached up to 95.6% and in asymptomatic dogs, reached up to 94.8%, depending upon the used peptide.

Among the tested peptides, PSLc6, PSLc8, PSLc10 and Mix10 showed the highest accuracies when tested with serum samples from animals with defined clinical statuses. Thus, they were selected to be tested with more serum samples. Then, we observed that EP Mix10 showed the best performance, with an AUC of 0.902, characterizing the test as highly accurate. EP PSLc8 and EP PSLc10 had AUC values that characterized these tests as moderately accurate; only PSLc6 generated a test with low accuracy. The highest value of sensitivity (84.1%) also was obtained when PSLc10 was used as antigen. In a canine epidemiological screening, a test with high sensitivity is desirable.

In addition, all of the EP assays showed a good agreement according to the κ index, when they were cross-tabulated. However, when the EP tests were cross-tabulated with the EIE-LVC kit, the agreement was poor in both situations: as performed according to the manufacturer, it was negligible and as performed with our control serum samples, it was weak. It could be explained mainly by the different antigens employed in the

tests. The EP appeared to be more sensitive, once it uses synthetic peptide while the EIE-LVC kit employs crude antigen. Thus, even using the ROC curve, the agreement still remained weak between EIE-LVC kit and EP tests.

The occurrence of cross-reactivity with *T. cruzi* and *L. braziliensis* in EP were observed with all synthetics antigens. These results corroborate other researchers' findings concerning to new antigens in CVL diagnosis [26,27,37,38]. In all of them, some cross-reactivity with these parasites occurred.

Although there has been speculation on the role of dogs in the zoonotic cycle of tegumentary leishmaniasis (TL) caused by *L. braziliensis*, only circumstantial evidence supports this hypothesis [39]. Indeed, the primary reservoirs of *L. braziliensis* are small mammals, particularly wild rodents [40], making the importance of this kind of cross-reactivity in the diagnosis of CVL controversial. Therefore, it could be considered that TL infected dogs have low antibodies levels similar to human TL infections. Some authors described the immune response in human TL infection as predominantly cellular, with low levels of circulating antibodies [41].

Importantly, canine infection with *L. braziliensis* is associated with rural areas. Our test has been developed with the intention of being used in urban surveys, as a diagnostic tool in the control of urban LV. Besides, the prevalence rates of *L. braziliensis* in dogs are low (3.1%), when parasitological examination was performed in Brazil [42]. About the prevalence of *T. cruzi* in dogs, few data have been published. In a study conducted with 244 dogs in nine municipalities in Paraná state, Brazil, no dogs were found to be

infected with *T. cruzi* [43]. For this reason, it is difficult to establish the real importance of cross-reactivity with these trypanosomatids in EP tests.

The existence of false positives related to these tripanosomatids (*L. braziliensis* and *T. cruzi*) raises the suspicion of cross reaction with another parasites with higher prevalence in urban dogs, such as *Ehrlichia canis* and *Babesia canis*. Further investigation will be necessary in order to characterize the occurrence of potential cross reactions in EP.

Recent studies have evaluated multiple-epitope chimeric antigens as diagnostic markers for the serodiagnosis of CVL [26,44], which represents an interesting approach to our peptides. The development of an immunochromatographic strip would also be desirable, as it is a common approach in the diagnosis of CVL (rK39 strips) and other pathologies [45–47]. It would be interesting to combine multiple peptides to improve the accuracy, as CHEMBIO has done with the DPPTM immunochromatographic test that employs recombinant antigens K39 and K26 to diagnose CVL. It is feasible to use in the same strip test an antigen with good sensitivity and another with good specificity. Taken together, to improve the diagnostic specificity preventing the unnecessary culling of dogs, some alternatives employing the synthetic peptides should be further investigated. For example, structural changes in the antigens, such as the production of conjugated peptides would be an interesting approach in order to increase both sensitivity and specificity.

In conclusion, we have designed new synthetic peptides for the improved serodiagnosis of CVL. The synthetic peptides named PSLc6, PSLc8, PSLc10 and Mix10 afforded high accuracy in

detecting CVL cases and are faster and cheaper to produce. Our findings indicate that synthetic peptides will be useful for serodiagnosis and allow for the detection of asymptomatic dogs. The development of an immunochromatographic test using these peptides would be a valuable tool for the rapid diagnosis of CVL, an important issue for the control of this neglected disease in endemic areas.

Supporting Information

Table S1 Peptides with relative intensity (RI) equal or greater than 2.
(XLS)

Table S2 Reactivity of serum samples to 48 different peptides.
(XLS)

Acknowledgments

The authors want to thank Dr. Maria Norma Melo, Dr. Ricardo Toshio Fujiwara and Dr. Alexandre Barbosa Reis for providing the canine serum samples and Bio-Manguinhos/FIOCRUZ-RJ for providing the EIE-LVC kits.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: ARF MMC RTG HMA. Performed the experiments: ARF MMC MSG MLOP. Analyzed the data: ARF GG RTG HMA. Contributed reagents/materials/analysis tools: GG MSG MLOP RTG HMA. Wrote the paper: ARF RTG HMA.

References

- Mauricio IL, Stothard JR, Miles MA (2000) The strange case of *Leishmania infantum*. Parasitol Today 16: 188–189.
- Deane LM (1961) Reservoirs of *Leishmania donovani* in Brazil. Rev Assoc Med Bras 7: 161–169.
- Dantas-Torres F, Brito ME, Brandão-Filho SP (2006) Seroepidemiological survey on canine leishmaniasis among dogs from an urban area of Brazil. Vet Parasitol 140: 54–60.
- Michalsky EM, Rocha MF, da Rocha Lima AC, França-Silva JC, Pires MQ, et al. (2007) Infectivity of seropositive dogs, showing different clinical forms of leishmaniasis, to *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sand flies. Vet Parasitol 147: 67–76.
- Tesh R (1995) Control of zoonotic visceral leishmaniasis: is it time to change strategies? Am J Trop Med Hyg 52: 287–292.
- Scalone A, Luna R, Oliva G, Baldi L, Satta G, et al. (2002) Evaluation of the *Leishmania* recombinant K39 antigen as a diagnostic marker for canine leishmaniasis and validation of a standardized enzyme-linked immunosorbent assay. Vet Parasitol 104: 275–285.
- González L, Boyle RW, Zhang M, Castillo J, Whittier S, et al. (1997) Synthetic-peptide-based enzyme-linked immunosorbent assay for screening human serum or plasma for antibodies to human immunodeficiency virus type 1 and type 2. Clin Diagn Lab Immunol 4: 598–603.
- Ferrer E, Benítez L, Foster-Cuevas M, Bryce D, Wamaw LW, et al. (2003) *Taenia saginata* derived synthetic peptides with potential for the diagnosis of bovine cysticercosis. Vet Parasitol 111: 83–94.
- Costa MM, Andrade HM, Bartholomeu DC, Freitas L, Pires SF, et al. (2011) Analysis of *Leishmania chagasi* by 2-D Difference Gel Electrophoresis (2-D DIGE) and Immunoproteomic: identification of novel candidate antigens for diagnostic tests and vaccine. J Proteome Res 10: 2172–84.
- Quinnell RJ, Courtenay O, Davidson S, Garcez L, Lambson B, et al. (2001) Detection of *Leishmania infantum* by PCR, serology and cellular immune response in a cohort study of Brazilian dogs. Parasitology 122: 253–261.
- Larsen JE, Lund O, Nielsen M (2006) Improved method for predicting linear B-cell epitopes. Immunome Res 2: 2–5.
- Saha S, Raghava GP (2006) Prediction of continuous B-cell epitopes in an antigen using recurrent neural network. Proteins 65: 40–48.
- El-Manzalawy Y, Dobbs D, Honavar V (2008) Predicting linear B-cell epitopes using string kernels. J Mol Recogn 21: 243–255.
- Frank R (1992) Spot-synthesis: an easy technique for the positionally addressable parallel chemical synthesis on a membrane support. Tetrahedron 48: 9217–9232.
- Frank R, Overwin H (1996) SPOT-synthesis: epitope analysis with arrays of synthetic peptides prepared on cellulose membranes. Methods Mol Biol 66: 149–169.
- Soutullo A, Santi MN, Perin JC, Beltrami LM, Borel IM, et al. (2007) Systematic epitope analysis of the p26 EIAV core protein. J Mol Recogn 20: 227–237.
- Atherton E, Bridgen J, Sheppard R (1976) A polyamide support for solid-phase protein sequencing. FEBS Lett 64: 173–175.
- Alves WA, Bevilacqua PD (2004) Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993–1997. Cad Saude Publica, 20: 259–265.
- Greiner M, Pfeiffer D, Smith RD (2000) Principles and practical application of the receiver-operating characteristic analysis for diagnostic tests. Prev Vet Med 45: 23–41.
- Cohen J (1968) Weighted kappa: nominal scale agreement with provisions for scales disagreement of partial credit. Psychol Bull 70: 213–220.
- Landis JR, Koch GG (1977) An application of hierarchical kappa-type statistics in the assessment of majority agreement among multiple observers. Biometrics 33: 363–374.
- Youden WJ (1950) Index for rating diagnostic tests. Cancer 3: 32–35.
- Swets JA (1988) Measuring the accuracy of diagnostic systems. Science 240: 1285–1293.
- Yang X, Yu X (2009) An introduction to epitope methods and software. Rev Med Virol 19: 77–96.
- Trost B, Bickis M, Kusalik A (2007) Strength in numbers: Achieving greater accuracy in MHC-I binding prediction by combining the results from multiple prediction tools. Immunome Res 24: 3–5.
- Soto M, Requena JM, Quijada L, Alonso C (1998) Multicomponent chimeric antigen for serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. J Clin Microbiol 36: 58–63.
- Porrozz R, Costa MV, Teva A, Falqueto A, Ferreira A (2007) Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays based on crude and recombinant leishmanial antigens for serodiagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania infantum* visceral infections in dogs. Clin Vacc Immunol 14: 544–548.
- Maia C, Campino L (2008) Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. Vet Parasitol 158: 274–287.
- Cândido TC, Perri SH, Gerzoshkowitz T, Luvizotto MC, Lima VM (2008) Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay based on crude and purified antigen in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in symptomatic and oligosymptomatic dogs. Vet Parasitol 157: 175–181.
- Pinheiro PH, Pinheiro AN, Ferreira JHL, Costa FA, Katz S, et al. (2009) A recombinant cysteine proteinase from *Leishmania (Leishmania) chagasi* as an antigen for delayed-type hypersensitivity assays and serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. Vet Parasitol 162: 32–39.

31. Mettler M, Grimm F, Capelli G, Camp H, Deplazes P (2005) Evaluation of enzyme-Linked immunosorbent assays, an immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania* infections in dogs. *J Clin Microbiol* 43(11): 5515–5519.
32. Machado-Coelho GL, Silva MV, Souza DM, Araújo AP, Ferreira WR, et al. (2005) Reprodutibilidade do diagnóstico sorológico da Leishmaniose Visceral Canina utilizando a reação de ELISA em sangue dessecado em papel de filtro. In: XXXI Reunião Anual de Pesquisa Aplicada em Doenças de Chagas e Leishmanioses, Uberaba, Minas Gerais, Brasil.
33. Lira RA, Cavalcanti MP, Nakazawa M, Ferreira AGP, Silva ED, et al. (2006) Canine visceral leishmaniosis: A comparative analysis of the EIE-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos and the IFI-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos kits. *Vet Parasitol* 137: 11–16.
34. Quinnell RJ, Courtenay O, Davidson S, Garcez L, Lambson B, et al. (2001) Detection of *Leishmania infantum* by PCR, serology and immune response in a cohort study of Brazilian dogs. *Parasitology* 122: 253–261.
35. Reithinger R, Quinnell RJ, Alexander B, Davies CR (2002) Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic dipstick test, enzyme-linked immunosorbent assay, and PCR. *J Clin Microbiol* 40: 2352–2356.
36. Dye C, Vidor E, Dereure J (1993) Serological diagnosis of leishmaniasis: on detecting infection as well as disease. *Epidemiol and Infect* 103: 647–656.
37. Rosário EY, Genaro O, França-Silva JC, da Costa RT, Mayrink W, et al. (2005) Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay using crude *Leishmania* and recombinant antigens as a diagnostic marker for canine visceral leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100: 197–203.
38. Romero HD, Silva L, Silva-Vergara M, Rodrigues V, Costa RT, et al. (2009) Comparative study of serologic tests for the diagnosis of asymptomatic visceral leishmaniasis in an endemic area. *Am J Trop Med Hyg* 81: 27–33.
39. Dantas-Torres F (2007) The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Vet Parasitol* 149: 139–146.
40. Brandão-Filho SP, Brito ME, Carvalho FG, Ishikawa EA, Cupolillo E, et al. (2003) Wild and synanthropic hosts of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco State, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 97: 291–296.
41. Ajdary S, Alimohammadian MH, Eslami MB, Kemp K, Kharazmi A (2000) Comparison of the immune profile of nonhealing cutaneous leishmaniasis patients with those with active lesions and those who have recovered from infection. *Infect and Immun* 68: 1760–1764.
42. Castro EA, Thomaz-Soccol V, Augur C, Luz E (2007) *Leishmania (Viannia) braziliensis*: epidemiology of canine cutaneous leishmaniasis in the state of Paraná (Brazil). *Exp Parasitol* 117: 13–21.
43. Falavigna-Guilherme AL, Santana R, Pavanelli GC, Lorosa ES, Araújo SM (2004) Triatomine infestation and vector-borne transmission of Chagas disease in northwest and central Paraná, Brazil. *Cad Saude Publica* 20: 1191–1200.
44. Boarino A, Scalone A, Gradoni L, Ferroglio E, Vitale F, et al. (2005) Development of recombinant chimeric antigen expressing immunodominant B epitopes of *Leishmania infantum* for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Clin Diag Lab Immun* 12: 647–653.
45. Wang Y, Li X, Wang G, Yin H, Cai X, et al. (2011) Development of an immunochromatographic strip for the rapid detection of *Toxoplasma gondii* circulating antigens. *Parasitol Int* 60: 105–107.
46. Li Y, Hou L, Ye J, Liu X, Dan H, et al. (2010) Development of a convenient immunochromatographic strip for the diagnosis of infection with Japanese encephalitis virus in swine. *J Virol Meth* 168: 51–56.
47. Zhang J, Guo Y, Xiao Y, Li Z, Hu S, et al. (2010) A simple and rapid strip test for detection of antibodies to avian infectious bronchitis virus. *J Vet Med Sci* 72: 883–886.