

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 681 227**

51 Int. Cl.:

G01N 33/569 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.07.2013 PCT/IB2013/055423**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.01.2015 WO15001383**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.07.2013 E 13766679 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.04.2018 EP 3017305**

54 Título: **Péptidos y métodos para la detección de la leishmaniasis**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.09.2018

73 Titular/es:

**INSTITUT DE RECHERCHE POUR LE
DÉVELOPPEMENT (50.0%)
Le Sextant, 44 bd de Dunkerque, CS 90009
13572 Marseille Cedex 02, FR y
UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**AREVALO, JORGE;
DEHARO, ERIC y
PRIVAT-MALDONADO, ANGELA**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 681 227 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Péptidos y métodos para la detección de la leishmaniasis

La presente invención se refiere a péptidos y métodos para la detección de anticuerpos anti-leishmania en individuos sospechosos de infección con el parásito protozoario del género *Leishmania*, especialmente infección con una cepa sudamericana que produce la leishmaniasis tegumentaria americana (LTA).

La leishmaniasis comprende un grupo heterogéneo de enfermedades producido por parásitos protozoarios intracelulares del género *Leishmania* que están extendidos en 88 países endémicos, con una incidencia anual estimada de 2 millones de casos [1].

Los organismos *Leishmania* son parásitos protozoarios intracelulares de macrófagos que producen un amplio rango de enfermedades clínicas en los seres humanos y animales domésticos, principalmente perros. Los ciclos de vida de la *Leishmania* implican un huésped vertebrado (p. ej., un humano) y un vector (una mosca de la arena) que transmite el parásito entre huéspedes vertebrados. En el vector, el parásito toma una forma morfológica característica conocida como promastigote y se reproduce asexualmente en el estómago del vector. Cuando el vector muerde a un huésped vertebrado, los promastigotes son inyectados en el huésped. Los promastigotes entran entonces en las células del huésped vertebrado y cambian a una forma conocida como amastigote. El amastigote se reproduce en las células del huésped y, cuando las células eventualmente mueren, los amastigotes son liberados e infectan a otras células. Los síntomas y la patología asociada con la leishmaniasis se producen porque los amastigotes matan las células del huésped.

En Sudamérica la forma más común de la enfermedad es la leishmaniasis cutánea (LC), mientras que la leishmaniasis mucosa (LM) y la leishmaniasis visceral (LV) son mucho menos prevalentes [2]. Las manifestaciones clínicas de la LC y la LM, aunque no son letales, pueden producir una morbilidad importante, consecuencias sociales y traumas psicológicos en la gente afectada debido a cicatrices estigmatizantes. La LV, la forma más grave de la enfermedad, es menos prevalente en la región [3].

El diagnóstico de la enfermedad se realiza mediante la combinación de ensayos clínicos, epidemiológicos, parasitológicos e inmunológicos. La tinción de Giemsa de frotis de biopsia es el método más común empleado en áreas rurales endémicas con una sensibilidad que varía de 20% a 95% [4-6]. El cultivo parasitario en un medio de NNN puede alcanzar 54% de sensibilidad, pero es frecuente la contaminación bacteriana y fúngica que afecta al éxito del cultivo [6-9]. Además, la sensibilidad puede variar con la carga parasitaria, la recogida de la muestra y la pericia técnica.

El diagnóstico molecular, tal como con PCR, aunque es más específico y sensible, también es más caro y requiere mayor experiencia que los procedimientos convencionales [4, 5, 10].

En el pasado se han buscado métodos de diagnóstico serológico para la LC usando extractos de parásitos completos; desafortunadamente, las diferencias en las cepas parasitarias, la preparación del antígeno y las características antigénicas han hecho que sean inadecuados para el desarrollo de métodos de serodiagnóstico estandarizados [11-15].

Otros estudios recogen el uso de proteínas recombinantes debido a la variedad de determinantes antigénicos que contienen [16-20]; sin embargo, pueden incluir epítomos con reacción cruzada, que a su vez comprometen la especificidad del ensayo [21].

Una nueva mejora para el serodiagnóstico de varias enfermedades es el uso de péptidos sintéticos que pueden aumentar la sensibilidad y especificidad del ensayo por ELISA [22, 23].

Las histonas y las proteínas ácidas ribosómicas (PAR) de *L. infantum* se han identificado previamente como proteínas antigénicas en suero canino con LV [24] y se han mapeado sus epítomos de células B lineales en las regiones más divergentes de la proteína [18, 24-28]. Se ha construido una proteína quimérica que contiene determinantes antigénicos de la histona y las proteínas ácidas ribosómicas de *L. infantum* para diagnosticar la LVC canina [51]. Sin embargo, estos experimentos se realizaron solo con muestras caninas y solo se hizo un estudio con un número limitado de sueros humanos con LM con P2a y P2b [29]. Solo se ha realizado un estudio con muestras de suero humano con LC y LMC usando péptidos sintéticos para investigar la región amino-terminal de la proteína ribosómica de *L. braziliensis* L25 con resultados no satisfactorios [30], la existencia de epítomos de diagnóstico candidatos para el serodiagnóstico de la LC humana todavía es desconocida.

Por lo tanto, todavía hay una necesidad en la técnica para un ensayo de diagnóstico rápido y eficaz de la leishmaniasis cutánea que se pueda emplear fácilmente sobre el terreno.

Los inventores han realizado un amplio estudio de los epítomos lineales de histonas y proteínas ácidas ribosómicas de *L. infantum*, se cribaron un total de 75 péptidos sintéticos y se identificaron péptidos cortos que son reconocidos por sueros con LC.

Subsiguientemente, estos péptidos inmunodominantes se evaluaron en cuanto a su eficacia para el diagnóstico con un panel de sueros con LC; basándose en su conocimiento clínico avanzado de la leishmaniasis tegumentaria americana, los inventores han definido dos niveles de criterios que pueden ser aplicados para elegir el(los) péptido(s) más apropiado(s) para el diagnóstico de la LC (véanse los ejemplos), a continuación han elegido dos péptidos específicos, H2A-P9 y P2a-P6, y han diseñado un ensayo de diagnóstico mejorado que permiten un diagnóstico muy exacto y sensible de cepas de la *Leishmania* sudamericana que producen la leishmaniasis tegumentaria americana.

Los inventores han demostrado que un análisis indirecto por ELISA usando los péptidos H2A-P9 y P2a-P6 puede discriminar sueros LC positivos y negativos para la leishmaniasis. Los parámetros de diagnóstico obtenidos en este ensayo demuestran una buena eficacia cuando se llevan a escenarios clínicos en áreas endémicas (véanse los ejemplos).

La presente invención se refiere por lo tanto a la selección y la combinación de dos péptidos inmunodominantes específicos de *L. infantum*: H2A-P9 de secuencia KGGKKGKATPSA (SEQ. ID. N° 9) y P2a-P6 de secuencia AGAGAGAVAEAKKEEPEEEEE (SEQ. ID. N° 67) para usarlos en un método de diagnóstico.

Consecuentemente, la presente invención proporciona un método para usar esos dos péptidos para la detección de anticuerpos anti-leishmania presentes en el suero de pacientes que padecen leishmaniasis cutánea o leishmaniasis mucocutánea producida por la infección con una cepa de leishmaniasis sudamericana. Las cepas de *Leishmania* sudamericanas comprenden cepas del grupo *Viannia* (*L. (Viannia) braziliensis*, *L. (Viannia) panamensis*, *L. (Viannia) peruviana*, *L. (Viannia) guyanensis*, *L. (Viannia) lainsoni*, *L. (Viannia) colombiensis*) y cepas del grupo *Leishmania* (*L. (Leishmania) amazonensis*, *L. (Leishmania) garnhami*, *L. (Leishmania) infantum*, *L. (Leishmania) mexicana*, *L. (Leishmania) pifanoi*, *L. (Leishmania) venezuelensis*); la presente invención se refiere preferiblemente al diagnóstico de la leishmaniasis producida por la infección con *L. braziliensis*, *L. mexicana*, *L. major*, *L. amazonensis* o *L. infantum*; estos trastornos también se denominan leishmaniasis tegumentaria americana.

La presente invención proporciona además un kit de diagnóstico que comprende los dos péptidos que consisten en la secuencia SEQ. ID. N° 9 y la secuencia SEQ. ID. N° 67, siendo útil dicho kit para detectar anticuerpos anti-leishmania presentes en el suero de un paciente que padece leishmaniasis cutánea o leishmaniasis mucocutánea producida por infección con una cepa de *Leishmania* sudamericana, más particularmente *L. braziliensis*, *L. mexicana*, *L. major*, *L. amazonensis* o *L. infantum*; o leishmaniasis tegumentaria americana.

Los parámetros de diagnóstico del método según la presente invención cuando se aplican al serodiagnóstico de la LC han demostrado ser comparables a los obtenidos por PCR en la que respecta a la sensibilidad (S) y valor predictivo positivo (VPP) [4]. La sensibilidad de esta técnica es comparable a las de la PCR (97%) y mucho mejor que la observación microscópica de frotis (49%) o cultivo parasitario convencional (58%) para el diagnóstico de la LC [43-45]. En comparación con métodos serológicos como ELISA, IFAT y transferencia de Western usando antígenos brutos de *L. braziliensis*, *L. major* o *L. amazonensis*, el método descrito en la presente memoria proporciona resultados de diagnóstico comparables o mejores [11, 12].

En el caso específico de la LC, la exactitud del valor predictivo negativo (VPN) parece ser particularmente importante porque un diagnóstico negativo exacto evita la administración de compuestos de antimonio pentavalente durante 20 días, lo que es doloroso y potencialmente tóxico para los individuos con úlceras en la piel similares a las lesiones por leishmaniasis [42].

Además, un diagnóstico diferencial correcto contribuirá a reducir la carga de morbilidad en pacientes que deben viajar largas distancias para ser tratados.

Finalmente, en comparación con los métodos de diagnóstico clásicos empleados en las áreas rurales como el ensayo cutáneo Leishmanin, frotis y cultivo parasitario tradicional en medio de NNN, el método presente demostró prestaciones mejoradas, produciendo valores de VPN y S elevados [48].

Considerando la facilidad de elaboración de péptidos sintéticos en comparación con las proteínas recombinantes o proteínas de extracto bruto aislado, la presente invención permite el desarrollo de nuevos reactivos de diagnóstico serológico con bajo coste y susceptibles de ser sometidos a evaluación de control de calidad.

La presente invención también permite el diseño de herramientas de diagnóstico de laboratorio que pueden ser aplicadas en escenarios de atención primaria sanitaria que usen diagnóstico por ELISA como diagnóstico de rutina.

Un primer objetivo de la presente invención es un método de diagnóstico *in vitro* para la detección de la presencia o ausencia de anticuerpos indicativos de una cepa de *Leishmania* sudamericana responsable de la leishmaniasis tegumentaria americana, que comprende las etapas de:

- a) poner en contacto los péptidos H2A-P9 que consiste en la secuencia SEQ. ID. N° 9 y P2a-P6 que consiste en la secuencia SEQ. ID. N° 67, separadamente o mezclados juntos, con una muestra biológica durante un tiempo y en condiciones suficientes para formar un complejo inmune, siendo capaz cada uno de dichos

- péptidos de formar un complejo inmune con anticuerpos indicativos de una cepa de *Leishmania* sudamericana responsable de la leishmaniasis tegumentaria americana; y
- b) detectar la presencia o ausencia del complejo inmune formado en a), donde la detección de la presencia del complejo inmune indica la presencia de anticuerpos indicativos de una cepa de *Leishmania* sudamericana responsable de la leishmaniasis tegumentaria americana.

Las secuencias de los péptidos usados en el método de diagnóstico según la presente invención son:

- H2A-P9: KGGKKGKATPSA (SEQ. ID. N° 9) y
- P2a-P6: AGAGAGAVAEAKKEEPEEEEE (SEQ. ID. N° 67).

Estos péptidos han sido identificados en la cepa *L. infantum* con el método descrito en los ejemplos. Pueden ser preparados y aislados por técnicas bien conocidas, tal como síntesis en fase sólida [41].

En la presente invención, el método de diagnóstico *in vitro* usa péptidos sintéticos aislados de las secuencias SEQ. ID. N° 9 y SEQ. ID. N° 67.

Estos péptidos pueden estar cada uno en contenedores separados o mezclados en el mismo contenedor; opcionalmente están inmovilizados en un soporte apropiado como el formato de flujo lateral. En este dispositivo, el péptido de diagnóstico está inmovilizado sobre una membrana, tal como un fluoruro de polivinileno o una membrana de nitrocelulosa.

Para los objetivos de detección, anti-IgG humana marcada con un generador de señal (cromógeno sustrato u oro coloidal) se deposita sobre una tira de fibra de vidrio (almohadilla de aplicación de la muestra); cuando se aplica sobre la almohadilla una disolución del suero que se debe ensayar, disuelve el indicador marcado y este se enlaza a todos los anticuerpos en la muestra. Esta mezcla es transportada a continuación por capilaridad (principio de la cromatografía) a la siguiente membrana que contiene el péptido de diagnóstico.

Si hay presentes anticuerpos frente al péptido de diagnóstico, se enlazan al péptido de diagnóstico depositado sobre la membrana generando una señal. Se usa un anticuerpo específico adicional para el anticuerpo coloidal marcado para producir una señal de control.

Debe ser implícito para un experto en la técnica, que cualquier formato de ensayo de proteínas convencional, particularmente formatos de inmunoensayo, se puede diseñar para usar los péptidos elegidos en la presente memoria para la detección de la infección por *Leishmania*. Esta invención por lo tanto no está limitada por la elección del formato de ensayo particular, y se cree que incluye formatos de ensayo que son conocidos por los expertos en la técnica.

Los reactivos para ELISA u otros ensayos de inmunodetección se pueden proporcionar en forma de kits. En un modo de realización, un kit contiene una mezcla de péptidos adecuados o medios para preparar dichas mezclas, y/o reactivos para detectar complejos de péptido-anticuerpo. Una "muestra biológica" incluye varios tipos de muestras obtenidas de un individuo y puede ser utilizada en un ensayo de diagnóstico o de control. La definición incluye la sangre y otras muestras líquidas de origen biológico, muestras de tejido sólido tales como un espécimen de biopsia o cultivos celulares o células derivadas de ellas. El término "muestra biológica" incluye una muestra clínica y también incluye células en cultivo, sobrenadantes celulares, lisados celulares, suero, plasma, fluidos biológicos y muestras de tejido.

La técnica más común para realizar la etapa b) es el análisis de inmunoadsorción enzimática (ELISA). Implica al menos un anticuerpo con especificidad para un antígeno particular, en este caso los péptidos inmovilizados sobre un soporte sólido (generalmente una placa de microtitulación de poliestireno o una tira reactiva) mediante la adsorción en la superficie o más específicamente (mediante la captura de otro anticuerpo específico para el mismo antígeno, en un ensayo ELISA de fase doble). Se añade el anticuerpo de detección (la muestra) que forma un complejo con el péptido. El anticuerpo de detección puede estar enlazado covalentemente con una enzima o puede ser detectado él mismo mediante un anticuerpo secundario que está enlazado covalentemente con una enzima por bioconjugación. Entre cada etapa, la placa se lava generalmente con una disolución de detergente suave para eliminar cualquier proteína o anticuerpo que no se haya enlazado de forma específica. Después de la etapa final de lavado, la placa se revela añadiendo un sustrato enzimático para producir una señal visible que indica la cantidad de antígeno en la muestra.

Según un modo de realización particular, si el resultado del método de diagnóstico *in vitro* es dudoso, se pueden añadir etapas adicionales para analizar de nuevo el suero con el péptido H2A-P9 para aumentar la exactitud y sensibilidad, dichas etapas adicionales comprenden:

- c) poner en contacto dicha muestra biológica con el péptido H2A-P9 que consiste en la secuencia KGGKKGKATPSA (SEQ. ID. N° 9) durante un tiempo y en condiciones suficientes para formar un complejo inmune, y
- d) detectar la presencia o ausencia del complejo inmune formado en c).

La presente invención también proporciona un kit de diagnóstico para detectar anticuerpos anti-leishmania presentes en el suero de un paciente que padece leishmaniasis tegumentaria americana, en el que dicho kit de diagnóstico

comprende los dos péptidos, uno que consiste en la secuencia SEQ. ID. N° 9 y el otro que consiste en la secuencia SEQ. ID. N° 67.

- 5 El kit puede incluir placas de microtitulación en las que se ha(n) pre-adsorbido el(los) péptido(s) de la invención, otro dispositivo de ensayo adecuado, varios diluyentes y tampones, conjugados marcados u otros agentes para la detección de antígenos o anticuerpos enlazados específicamente, y otros reactivos generadores de señal, tales como sustratos enzimáticos, cofactores y cromógenos. Otros componentes de un kit pueden ser determinados fácilmente por un experto en la técnica. Dichos componentes pueden incluir reactivos de revestimiento, anticuerpos de captura monoclonales o policlonales específicos para un péptido de la invención, o un coctel de dos o más de los anticuerpos, extractos purificados o semipurificados de estos antígenos como patrones, anticuerpos detectores MAb y anticuerpos anti-ratón o anti-humano con una molécula indicadora conjugada con ellos, una placa de ELISA preparada para absorción, cartas de indicador para comparaciones colorimétricas, guantes desechables, instrucciones para la descontaminación, bastoncillos aplicadores o contenedores, un recipiente de preparación de la muestra, etc. En un modo de realización, un kit comprende tampones u otros reactivos apropiados para constituir un medio de reacción que permita la formación de un complejo péptido-anticuerpo.
- 10
- 15 El kit de diagnóstico comprende preferiblemente: los dos péptidos que consisten en las secuencias SEQ. ID. N° 9 y SEQ. ID. N° 67; reactivo(s) para detectar el complejo inmune polipéptido-anticuerpo; opcionalmente una muestra biológica de referencia sin anticuerpos que se enlacen inmunológicamente con dichos péptidos; y opcionalmente una muestra de comparación que comprende anticuerpos que se pueden enlazar específicamente con dichos péptidos; donde dichos péptidos, reactivo(s), muestra biológica de referencia y muestra de comparación están presentes en una cantidad suficiente para realizar dicha detección.
- 20

En un modo de realización particular, el kit de diagnóstico consiste en un kit de ELISA; preferiblemente, el kit de ELISA comprende H2A-P9 que consiste en la secuencia SEQ. ID. N° 9 y P2a-P6 que consiste en la secuencia SEQ. ID. N° 67, placas de ELISA pre-revestidas, control positivo, control negativo, diluyentes adecuados, anti-IgG humana conjugado con enzima, por ejemplo, anti-IgG humana (H&L) conjugado en cabra (peroxidasa, fosfatasa) (véase también <http://www.polysciences.com/Core/Display.aspx?pagelId=98&categoryId=158&productId=1518>), sustrato cromógeno (ejemplos para peroxidasa: 3,3-dimetoxibenzidina, O-dianisidina (ODN) vira al rojizo; 3,3-diaminobenzidina vira al rojizo; 3-amino-9-etilcarbazol vira al rojizo; 4-cloro-1-naftol vira al azulado; y para la fosfatasa alcalina: fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo (BCIP) vira al azulado o nitroazul de tetrazolio (NBT) que vira al azulado), tampón de sustrato y un manual de instrucciones para usar el kit.

25

30 El kit de diagnóstico puede estar en forma de una tira reactiva que puede ser sumergida en varios pocillos, comprendiendo cada uno la muestra reactiva y los reactivos.

La figura 1 representa cuatro gráficos que muestran la reactividad de los sueros con LC (barras punteadas) y sueros con LMC (barras sólidas) frente a los péptidos sintéticos, 20 unidades monoméricas que solapan cinco restos (H2A) y diez restos (H2B, H3, H4) que cubren la secuencia completa de las proteínas. Se representan los valores medios de la DO450 de un grupo de dos a seis sueros frente a cada uno de los péptidos. Los sueros se utilizaron con una dilución de 1:150.

35

La figura 2 representa cuatro gráficos que muestran la reactividad de los sueros con LC (barras punteadas) y sueros con LMC (barras sólidas) frente a los péptidos sintéticos, 20 unidades monoméricas que solapan cinco restos, que cubren la secuencia completa de LiP2a, LiP2b y P0. Se representan los valores medios de la DO450 de un grupo de dos a seis sueros frente a cada uno de los péptidos. Los sueros se utilizaron con una dilución de 1:150.

40

La presente invención se entenderá más fácilmente con referencia al ejemplo siguiente. Este ejemplo es ilustrativo del amplio grado de aplicabilidad de la presente invención y no pretende limitar su alcance. Aunque en la práctica se puede usar cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en la presente memoria para el ensayo de la presente invención, se describen los métodos y materiales preferidos.

45 **EJEMPLO 1 – Identificación de péptidos inmunodominantes de las histonas y PAR de *L. infantum***

I.A. Métodos

I.A.1. Sueros humanos

Las muestras de suero utilizadas se dividieron en tres grupos:

- 50 - *Grupo I:* se obtuvieron sueros de veinte pacientes con LM y veintidós pacientes con LC del banco de sueros del Laboratorio de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de San Antonio Abad de Cuzco, Perú. Todas las muestras eran reactivas en al menos un ensayo de laboratorio convencional para LTA, tal como cultivo parasitario, IFA o microscopía. Este grupo se ensayó frente a histonas recombinantes y PAR y de dos a cinco sueros hiperreactivos de cada manifestación clínica se agruparon para el mapeo de epítomos.
- 55 - *Grupo II:* se obtuvieron sueros de quince LC, diez controles endémicos negativos (CEN) de Cuzco, Perú, del banco de sueros del Proyecto FP7 RAPSODI. También se incluyeron muestras de pacientes con chagas (7)

y esporotricosis (6) de Lima, Perú. Estas muestras se ensayaron individualmente frente a los diez péptidos sintéticos elegidos.

- *Grupo III*: se ensayaron individualmente dieciocho sueros con LC y treinta sueros de CEN del banco de sueros del Proyecto FP7 RAPSODI con los dos epítomos candidatos para el diagnóstico.

5 *I.A.2. Mapeo de epítomos*

Para el mapeo de epítomos, se empleó una biblioteca de péptidos solapados que cubren la secuencia completa de LiH2A, LiH2B, LiH3, LiH4, LiP0, LiP2a y LiP2b de *L. infantum*. La selección se realizó con un grupo de sueros obtenidos de pacientes con LTA.

10 Los péptidos se sintetizaron por el método de síntesis de múltiples péptidos en fase sólida usando una resina de poliamida y química FMOC [41]. Se evaluó la pureza por análisis de aminoácidos y HPLC. Para LiH2A [26], LiH3 [27], LiP2a y LiP2b [25], y LiP0 [28] los péptidos solapan en 5 aminoácidos. Para LiH2B y LiH4, los péptidos solapan en 10 aminoácidos [24]. Se analizaron un total de 75 péptidos, todos los péptidos tenían una longitud de 20 unidades monoméricas, excepto H2A-P9 (12 unidades monoméricas), P2a-P7 (16 unidades monoméricas), H3-P12 (19 unidades monoméricas) y H2B-P10 y P2b-P7 (21 unidades monoméricas).

15 *I.A.3. Medidas de ELISA*

Para elegir los dos sueros más reactivos frente a los antígenos recombinantes y realizar el mapeo de epítomos, se ensayaron sueros del Grupo I usando la técnica de prueba de selección por ensayo Falcon-ensayo de inmunoadsorción enzimática (FAST-ELISA; Becton Dickinson) [27]. La concentración de antígenos para las proteínas recombinantes fue de 2 µg/ml y 100 µg/ml para los péptidos sintéticos. Se incubaron las cubiertas revestidas con antígeno durante 1 hora con la disolución de bloqueo y se usaron grupos de las dos a seis muestras de suero más reactivas para cada proteína recombinante para el mapeo de epítomos.

20 Las muestras de suero se diluyeron a 1:200 para las proteínas recombinantes y 1:150 para los péptidos sintéticos en disolución de bloqueo y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación. Como anticuerpo secundario se usaron anticuerpos anti-IgG marcados con peroxidasa de rábano (dilución 1:2.000, Nordic Immunology).
25 Después de 1 hora de incubación a temperatura ambiente, se lavaron las cubiertas y los complejos inmunes se revelaron con ortofenilendiamina como sustrato cromogénico. La absorbancia se leyó a 450 nm.

I.B Resultados: Mapeo de epítomos de células B usando los péptidos sintéticos

Para elegir las muestras de suero más reactivas de un panel de sueros con LC y LM correspondientes al Grupo I, se analizaron individualmente las proteínas recombinantes (datos no mostrados). Fue posible combinar al menos 3
30 sueros para el mapeo de epítomos de H2A, H2B, H4, P0 y P2b. Para P2a y H3 solo se agruparon dos sueros para LM y LC respectivamente. Una colección de péptidos sintéticos abarcando las secuencias completas de la proteína se analizaron por FAST-ELISA, con la excepción de la proteína LiP0 en la que las posiciones entre 170 y 180 no estaban disponibles.

35 Se demostró que los péptidos localizados en la región N-terminal de las histonas (H2A-P1, H2B-P1, H3-P2, H3-P3, H4-P1), en la región C-terminal de LiH2A (H2A-P9), LiP2a (P2a-P6) y LiP2b (P2b-P7) y en el centro de LiH4 (H4-P7) y LiP0 (P0-P8) eran inmunodominantes (figuras 1 a 7). Se eligieron un total de diez epítomos lineales como péptidos candidatos para la determinación de su valor diagnóstico: H2A-P1 (SEQ. ID. N° 1), H2A-P9 (SEQ. ID. N° 9), H2B-P1 (SEQ. ID. N° 10), H3-P2 (SEQ. ID. N° 21), H3-P3 (SEQ. ID. N° 22), H4-P1 (SEQ. ID. N° 32), H4-P7 (SEQ. ID. N° 38), P0-P8 (SEQ. ID. N° 48), P2a-P6 (SEQ. ID. N° 67) y P2b-P7 (SEQ. ID. N° 75).

40 **EJEMPLO 2: Evaluación del valor de diagnóstico de los péptidos candidatos: análisis individual de los péptidos candidatos**

Los diez péptidos elegidos se analizaron con muestras de suero del Grupo II para confirmar su naturaleza altamente antigénica; su potencial interés para el diagnóstico ha sido evaluado usando una primera serie de parámetros de diagnóstico definidos por los inventores. Considerando que el ensayo de diagnóstico necesita ser sensible y con una
45 tasa mínima de falsos positivos porque los falsos positivos conducirían a la aplicación de tratamientos innecesarios que son costosos, arriesgados y dolorosos, los péptidos reconocidos por más de 70% de sueros con LC y con menos de 15% de reactividad cruzada se consideraron arbitrariamente como candidatos potenciales para el diagnóstico.

II.A Método

Los diez péptidos inmunodominantes, elegidos después del mapeo de epítomos, fueron proporcionados por Bio-Synthesis, Inc. (612 East Main Street Lewisville, TX 75057, Estados Unidos). Los péptidos se analizaron adicionalmente usando ELISA convencional según las condiciones descritas anteriormente y sueros del Grupo II. Después de la selección de los dos péptidos de diagnóstico candidatos, se analizaron usando muestras de suero del Grupo III. Todas las muestras se procesaron por duplicado.

Los valores de corte se definieron por el área debajo de la curva receptor-característica de operación.

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos para cada muestra de suero analizada se usaron para obtener tablas de contingencia 2x2 en las que los sueros se clasificaron adicionalmente según la presencia o ausencia de la enfermedad, como positivo o negativo.

5 **II.B. Resultados**

Los resultados se presentan en la tabla 1 siguiente.

	LC		CONTROLES NEGATIVOS		OTRAS PATOLOGÍAS				Otras patologías combinadas		Todos los sueros No-leishmaniasis	
	Nº de muestras ensayadas	%	Nº de positivos	%	Chagas	Esporotricosis	%	Nº de positivos	%	Nº de positivos	%	Nº de positivos
	15		10		7	6		13		23		
H2A-P1	60,00	9	10,00	1	42,66	3	66,67	4	53,85	7	34,78	8
H2A-P9	73,33	11	0,00	0	0,00	0	16,67	1	7,69	1	4,35	1
H2B-P1	93,33	14	20,00	2	14,29	1	33,33	2	23,08	3	21,74	5
H3-P2	80,00	12	10,00	1	28,57	2	16,67	1	23,08	3	17,39	4
H3-P3	46,67	7	30,00	3	28,57	2	33,33	2	30,77	4	30,43	7
H4-P1	66,67	10	20,00	2	28,57	2	66,67	4	46,15	6	34,78	8
H4-P7	60,00	9	30,00	3	0,00	0	16,67	1	7,69	1	17,39	4
P0-P8	66,67	10	10,00	1	0,00	0	0,00	0	0,00	0	4,35	1
P2a-P6	80,00	12	0,00	0	14,29	1	0,00	0	7,69	1	4,35	1
P2b-P7	88,67	13	50,00	5	71,43	5	0,00	0	38,46	5	43,48	10

Tabla I – Ensayos individuales de péptidos candidatos

Con estos criterios, se eligieron los péptidos H2A-P9 y P2a-P6.

II.C. Confirmación del valor de diagnóstico de los péptidos H2A-P9 y P2a-P6

10 El objetivo es ahora confirmar que el uso de la combinación de los dos péptidos elegidos, H2A-P9 y P2a-P6, permite un diagnóstico muy fiable de la leishmaniasis tegumentaria americana.

Se calcularon los parámetros de diagnóstico usados para describir la exactitud del ensayo de diagnóstico, incluyendo:

- **Exactitud:** número y proporción de todas las observaciones en la tabla que han sido clasificadas correctamente en el ensayo.
- 15 - **Kappa:** este parámetro toma el valor de 1 si hay una concordancia perfecta; es decir el ensayo predice correctamente siempre el resultado (1 perfecto, > 0,75 excelente, 0,4-0,75 justo, < 0,4 pobre). Kappa es una medida de la concordancia y toma el valor cero si no hay una concordancia mayor entre el ensayo y el resultado que la que puede esperarse en función de la suerte. Kappa toma el valor de 1 si hay una concordancia perfecta; es decir: el ensayo predice correctamente siempre el resultado. Se considera que valores de kappa menores de 0,4 representan una concordancia pobre, valores entre 0,4 y 0,75 concordancia justa a buena y valores superiores a 0,75 concordancia excelente. Valores negativos de kappa indican un problema en la aplicación del ensayo. Kappa no solo es dependiente de la calidad del ensayo, es decir el interior de la tabla, sino también de la prevalencia de la enfermedad en la población en la que se realiza el ensayo, kappa también es sensible a la distribución de los casos en el margen de la tabla. Básicamente, lo que kappa muestra es que para la misma sensibilidad y especificidad, la concordancia entre el ensayo y el resultado disminuirá al disminuir la prevalencia. En términos de kappa, un ensayo tendrá peor desempeño en poblaciones con baja prevalencia.

30 *Modo de cálculo:*

$$Kappa = \frac{(concordancia\ observada - concordancia\ esperada)}{1 - concordancia\ esperada}$$

(véase http://epiville.ccnmtl.columbia.edu/popup/how_to_calculate_kappa.html)

- **Sensibilidad (S):** es la probabilidad de que un individuo que está enfermo sea ciertamente diagnosticado como enfermo.
El nivel de sensibilidad que debe ser aplicado en un ensayo de diagnóstico se define teniendo en cuenta la gravedad de la “enfermedad” y el coste y disponibilidad del tratamiento; es decir, la sensibilidad de un ensayo debe ser alta si la “enfermedad” es relativamente grave y la “cura” es relativamente barata y fácilmente disponible.
- **Especificidad (E):** es la probabilidad de que un individuo que no está enfermo sea diagnosticado como no enfermo.
El nivel de especificidad es generalmente alto si la enfermedad no es grave y la “cura” es relativamente cara económicamente o desde otro punto de vista.
Hay una relación entre especificidad y sensibilidad, alta especificidad significa generalmente baja sensibilidad, y viceversa.
- **Valor diagnóstico del resultado positivo (VPP):** indica cuánto más probable es obtener un diagnóstico positivo en el grupo enfermo frente al grupo no enfermo.
- **Valor diagnóstico del resultado negativo (VPN):** indica cuánto más probable es obtener un diagnóstico negativo en el grupo no enfermo frente al grupo enfermo.
- **Probabilidad de diagnóstico:** este parámetro se usa a menudo como una medida del poder discriminatorio del ensayo; tiene el valor uno si el ensayo no discrimina entre individuos enfermos y no enfermos. Valores muy altos por encima de uno significa que un ensayo discrimina bien. Valores inferiores a uno significan que hay algo erróneo en la aplicación del ensayo.
- **Probabilidad de error:** este parámetro indica si la probabilidad de ser clasificado erróneamente es mayor en el grupo enfermo o en el grupo no enfermo. Si la probabilidad de error es mayor que uno, la probabilidad es mayor en el grupo enfermo (y la especificidad del ensayo es mejor que la sensibilidad), si el valor es inferior a uno, la probabilidad de una clasificación incorrecta es mayor en el grupo no enfermo (y la sensibilidad del ensayo es mejor que la especificidad).
- **J de Youden:** este parámetro se usa para estudiar las prestaciones totales de un ensayo; toma el valor de 1 si un ensayo de diagnóstico discrimina perfectamente y sin tener ningún error. Como consecuencia, si el objetivo es minimizar la probabilidad de tener un error, la J de Youden debe ser maximizada; por supuesto, esto tiene solo una importancia teórica, de forma que las decisiones deben ser tomadas en base de un análisis de coste-beneficio del tratamiento frente al no tratamiento.
- **Exactitud predictiva positiva:** en una tabla representativa de la población, este parámetro da: 1) la probabilidad después del ensayo, la probabilidad para un individuo en la población que fue diagnosticado positivo de tener la enfermedad; 2) de aquellos que se diagnosticaron positivo, las fracciones que se clasificaron correctamente y las que se clasificaron no correctamente.
- **Exactitud predictiva negativa:** en una tabla representativa de la población, este parámetro da: 1) la probabilidad después del ensayo, la probabilidad para un individuo en la población que fue diagnosticado negativo de no tener la enfermedad; 2) de aquellos que se diagnosticaron negativo, las fracciones que se clasificaron correctamente y las que se clasificaron no correctamente.

Basándose en la amplia experiencia clínica en la leishmaniasis tegumentaria americana de los inventores, han elegido los parámetros, sensibilidad y especificidad y las dos exactitudes predictivas (exactitud y kappa), que se consideran como los más valiosos de los indicadores.

El valor umbral para cada péptido es 3 veces la desviación estándar del valor obtenido cuando los péptidos se ensayaron con sueros de control negativo verdadero.

La sensibilidad y la especificidad dan una buena visión de la calidad del ensayo relativamente independiente de la circunstancias. Las exactitudes predictivas dan una visión de qué ocurre en diferentes situaciones prácticas desde el punto de vista de los números y proporciones diagnosticadas con resultados correctos e incorrectos. Las exactitudes predictivas también dan la probabilidad de tener la enfermedad después del análisis, un dato esencial para comunicar al paciente junto con su resultado del análisis.

RESULTADOS

Para determinar los parámetros de diagnóstico mencionados anteriormente para H2A-P9 y P2a-P6, se ensayó un nuevo panel de muestras de suero (Grupo III) y se analizan en combinación con los resultados obtenidos para el Grupo II. Todos los péptidos mostraron elevados niveles de especificidad (> 80%) pero su sensibilidad individual fue menor de 80% (tabla II). Sin embargo, cuando los resultados obtenidos para cada uno de los tres péptidos sintéticos se analizaron juntos, treinta y uno de los treinta y tres pacientes de LC confirmados se diagnosticaron correctamente. Esta combinación proporcionó 94% de sensibilidad, 83% de especificidad, 84% de VPP y 94% de VPN.

H2A-P9 CT	H2A-P9 CT + P2A-P6 Ct	P2A-P6
Casos analizados: 69	Casos analizados: 69	Casos analizados: 69
23+1 = 24 diagnosticados positivo	28+2 = 30 diagnosticados positivo	26+1 = 27 diagnosticados positivo
10+35 = 45 diagnosticados negativo	5+34 = 39 diagnosticados negativo	7+35 = 42 diagnosticados negativo
23+10 = 33 fueron positivo	28+5 = 33 fueron positivo	26+7 = 33 fueron positivo
1+35 = 36 fueron negativo	2+34 = 36 fueron negativo	1+35 = 36 fueron negativo

ES 2 681 227 T3

Verdaderos positivos 23/69 = 0,333 Varianza: 0,00322; Error estándar: 0,05675 IC del 95%: 0,191<Vp<0,475 IC de Wilson: 0,205<Vp<0,491	Verdaderos positivos 28/69 = 0,406 Varianza: 0,00349; Error estándar: 0,05911 IC del 95%: 0,258<Vp<0,554 IC de Wilson: 0,266<Vp<0,562	Verdaderos positivos 26/69 = 0,377 Varianza: 0,0034; Error estándar: 0,05834 IC del 95%: 0,231<Vp<0,523 IC de Wilson: 0,241<Vp<0,534
Verdaderos negativos 35/69 = 0,507 Varianza: 0,00362; Error estándar: 0,06019 IC del 95%: 0,357<Vn<0,658 IC de Wilson: 0,356<Vn<0,657	Verdaderos negativos 34/69 = 0,493 Varianza: 0,00362; Error estándar: 0,06019 IC del 95%: 0,342<Vn<0,643 IC de Wilson: 0,343<Vn<0,644	Verdaderos negativos 35/69 = 0,507 Varianza: 0,00362; Error estándar: 0,06019 IC del 95%: 0,357<Vn<0,658 IC de Wilson: 0,356<Vn<0,657
Falsos positivos 1/69 = 0,014 Varianza: 0,00021; Error estándar: 0,01439 IC del 95%: -0,021<Fp<0,05 IC de Wilson: 0,001<Fp<0,119	Falsos positivos 2/69 = 0,029 Varianza: 0,00041; Error estándar: 0,0202 IC del 95%: -0,022<Fp<0,079 IC de Wilson: 0,004<Fp<0,141	Falsos positivos 1/69 = 0,014 Varianza: 0,00021; Error estándar: 0,01439 IC del 95%: -0,021<Fp<0,05 IC de Wilson: 0,001<Fp<0,119
Falsos negativos 10/69 = 0,145 Varianza: 0,0018; Error estándar: 0,04238 IC del 95%: 0,039<Fn<0,251 IC de Wilson: 0,064<Fn<0,289	Falsos negativos 5/69 = 0,072 Varianza: 0,00097; Error estándar: 0,03121 IC del 95%: -0,006<Fn<0,15 IC de Wilson: 0,022<Fn<0,2	Falsos negativos 7/69 = 0,101 Varianza: 0,00132; Error estándar: 0,03635 IC del 95%: 0,011<Fn<0,192 IC de Wilson: 0,037<Fn<0,237
Exactitud (23+35)/69 = 0,841 Varianza: 0,00194; Error estándar: 0,04407 IC del 95%: 0,73<Ex<0,951 IC de Wilson: 0,695<Ex<0,926	Exactitud (28+34)/69 = 0,899 Varianza: 0,00132; Error estándar: 0,03635 IC del 95%: 0,808<Ex<0,989 IC de Wilson: 0,763<Ex<0,963	Exactitud (26+35)/69 = 0,884 Varianza: 0,00149; Error estándar: 0,03854 IC del 95%: 0,788<Ex<0,98 IC de Wilson: 0,746<Ex<0,954
Medida de la concordancia Kappa (58-(2412/69))/((69-(2412/69))) = 0,677 Varianza: 0,01348; Error estándar: 0,1161 IC del 95%: 0,387<Kappa<0,967	Medida de la concordancia Kappa (62-(2394/69))/((69-(2394/69))) = 0,796 Varianza: 0,01438; Error estándar: 0,11992 IC del 95%: 0,496<Kappa<1,096	Medida de la concordancia Kappa (61-(2403/69))/((69-(2403/69))) = 0,766 Varianza: 0,01405; Error estándar: 0,11852 IC del 95%: 0,47<Kappa<1,062
Sensibilidad 23/33 = 0,697 Varianza: 0,0064; Error estándar: 0,08 IC del 95%: 0,497<Sens<0,897 IC de Wilson: 0,465<Sens<0,862	Sensibilidad 28/33 = 0,848 Varianza: 0,0039; Error estándar: 0,06242 IC del 95%: 0,692<Sens<1,005 IC de Wilson: 0,622<Sens<0,954	Sensibilidad 26/33 = 0,788 Varianza: 0,00506; Error estándar: 0,07116 IC del 95%: 0,61<Sens<0,966 IC de Wilson: 0,557<Sens<0,921
Especificidad 35/36 = 0,972 Varianza: 0,00075; Error estándar: 0,02739 IC del 95%: 0,904<Esp<1,041 IC de Wilson: 0,788<Esp<0,999	Especificidad 34/36 = 0,944 Varianza: 0,00146; Error estándar: 0,03818 IC del 95%: 0,849<Esp<1,04 IC de Wilson: 0,75<Esp<0,993	Especificidad 35/36 = 0,972 Varianza: 0,00075; Error estándar: 0,02739 IC del 95%: 0,904<Esp<1,041 IC de Wilson: 0,788<Esp<0,999
Verosimilitud del resultado positivo 0,697/(1-0,972) = 25,091 IC del 95%: 2,098<VP<300,121	Verosimilitud del resultado positivo 0,848/(1-0,944) = 15,273 IC del 95%: 2,714<VP<85,957	Verosimilitud del resultado positivo 0,788/(1-0,972) = 28,364 IC del 95%: 2,386<VP<337,128
Verosimilitud del resultado negativo (1-0,697)/0,972 = 0,312 IC del 95%: 0,16<VN<0,605	Verosimilitud del resultado negativo (1-0,848)/0,944 = 0,16 IC del 95%: 0,057<VN<0,452	Verosimilitud del resultado negativo (1-0,788)/0,972 = 0,218 IC del 95%: 0,094<VN<0,506
Probabilidad de diagnóstico 0,697/(1-0,697)/(0,972/(1-0,972)) = 80,5 Varianza: 7595,175; Error estándar: 87,1503 IC del 95%: -137,376<Pd<298,376 IC de Wald: 5,375<Pd<1205,667	Probabilidad de diagnóstico 0,848/(1-0,848)/(0,944/(1-0,944)) = 95,2 Varianza: 6934,368; Error estándar: 83,27285 IC del 95%: -112,982<Pd<303,382 IC de Wald: 10,689<Pd<847,904	Probabilidad de diagnóstico 0,788/(1-0,788)/(0,972/(1-0,972)) = 130 Varianza: 20447,14286; Error estándar: 142,99351 IC del 95%: -227,484<Pd<487,484 IC de Wald: 8,312<Pd<2033,288

Probabilidad de error	Probabilidad de error	Probabilidad de error
$0,697/(1-0,697)/(0,972/(1-0,972)) = 0,066$ Varianza: 0,00506; Error estándar: 0,07114 IC del 95%: $-0,112 < Pe < 0,244$ IC de Wald: $0,004 < Pe < 0,984$	$0,848/(1-0,848)/(0,944/(1-0,944)) = 0,329$ Varianza: 0,08303; Error estándar: 0,28814 IC del 95%: $-0,391 < Pe < 1,05$ IC de Wald: $0,037 < Pe < 2,934$	$0,788/(1-0,788)/(0,972/(1-0,972)) = 0,106$ Varianza: 0,01363; Error estándar: 0,11673 IC del 95%: $-0,186 < Pe < 0,398$ IC de Wald: $0,007 < Pe < 1,66$
J de Youden	J de Youden	J de Youden
$0,972+0,697-1 = 0,669$ Varianza: 0,00715; Error estándar: 0,08456 IC del 95%: $0,458 < J < 0,881$	$0,944+0,848-1 = 0,793$ Varianza: 0,00535; Error estándar: 0,07317 IC del 95%: $0,61 < J < 0,976$	$0,972+0,788-1 = 0,76$ Varianza: 0,00581; Error estándar: 0,07625 IC del 95%: $0,569 < J < 0,951$
Prevalencia	Prevalencia	Prevalencia
$(23+10)/69 = 0,478$ Varianza: 0,00362; Error estándar: 0,06014 IC del 95%: $0,328 < Pr < 0,629$ IC de Wilson: $0,33 < Pr < 0,631$	$(28+5)/69 = 0,478$ Varianza: 0,00362; Error estándar: 0,06014 IC del 95%: $0,328 < Pr < 0,629$ IC de Wilson: $0,33 < Pr < 0,631$	$(26+7)/69 = 0,478$ Varianza: 0,00362; Error estándar: 0,06014 IC del 95%: $0,328 < Pr < 0,629$ IC de Wilson: $0,33 < Pr < 0,631$
Exactitud predictiva positiva	Exactitud predictiva positiva	Exactitud predictiva positiva
$23/24 = 0,958$ Varianza: 0,00166; Error estándar: 0,04079 IC del 95%: $0,856 < Epp < 1,06$ IC de Wilson: $0,705 < Epp < 0,999$	$28/30 = 0,933$ Varianza: 0,00207; Error estándar: 0,04554 IC del 95%: $0,819 < Epp < 1,047$ IC de Wilson: $0,709 < Epp < 0,992$	$26/27 = 0,963$ Varianza: 0,00132; Error estándar: 0,03634 IC del 95%: $0,872 < Epp < 1,054$ IC de Wilson: $0,731 < Epp < 0,999$
Exactitud predictiva negativa	Exactitud predictiva negativa	Exactitud predictiva negativa
$35/45 = 0,778$ Varianza: 0,00834; Error estándar: 0,06197 IC del 95%: $0,623 < Epn < 0,933$ IC de Wilson: $0,583 < Epn < 0,9$	$34/39 = 0,872$ Varianza: 0,00287; Error estándar: 0,05353 IC del 95%: $0,738 < Epn < 1,006$ IC de Wilson: $0,671 < Epn < 0,962$	$35/42 = 0,833$ Varianza: 0,00331; Error estándar: 0,05751 IC del 95%: $0,69 < Epn < 0,977$ IC de Wilson: $0,636 < Epn < 0,938$
Chi cuadrados	Chi cuadrados	Chi cuadrados
(todos con un grado de libertad): Pearson = 33,989 (p = 0) LRX = 39,536 (p = 0) Yate = 31,103 (p = 0) M-Haenszel = 33,497 (p = 0) Correlación de Pearson: 0,70185	(todos con un grado de libertad): Pearson = 44,05 (p = 0) LRX = 50,957 (p = 0) Yate = 40,883 (p = 0) M-Haenszel = 43,412 (p = 0) Correlación de Pearson: 0,79901	(todos con un grado de libertad): Pearson = 41,763 (p = 0) LRX = 49,123 (p = 0) Yate = 38,633 (p = 0) M-Haenszel = 41,158 (p = 0) Correlación de Pearson: 0,77799

Tabla II

Ejemplo 3: Ensayo de diagnóstico para la leishmaniasis del Nuevo Mundo (IgG)

Materiales

- 5 El kit de ELISA para medir la IgG anti-leishmania contiene componentes necesarios para realizar un ensayo inmunológico enzimático para la medida específica de la IgG humana. Se proporcionan suficientes cantidades de reactivos para obtener 4 placas de 96 pocillos si se sigue el procedimiento de ensayo recomendado y el almacenamiento y manipulación de materiales recomendados como se especifica en la presente memoria.

Control: control de suero humano (monoclonal)

Forma: líquido, 1 vial x 0,2 ml; almacenamiento: almacenamiento prolongado a -20°C o menos.

- 10 Utilización: agitar suavemente para disolver completamente antes de su uso. El control de suero humano se diluyen en glicerol [1/2] y la dilución de trabajo recomendada es 1/150 en tampón de bloqueo.

Anticuerpo secundario: anti-IgG humana conjugada con peroxidasa de rábano

Forma: polvo, 1 vial x 0,3 mg; almacenamiento: conjugado liofilizado, puede almacenarse a +4°C; almacenamiento prolongado a -20°C o menos.

- 15 Utilización: reconstituir el reactivo añadiendo 0,1 ml de agua destilada estéril; disolverlo y añadir un volumen igual de glicerol (concentración final de 0,5 mg/ml). Dividir en alícuotas pequeñas, congelar y almacenar a -20°C o menos. Antes de su uso, se descongela una alícuota lentamente a temperatura ambiente y se usa para preparar las diluciones de trabajo añadiendo tampón de bloqueo en una relación de 1:200. No prepare más disolución diluida de anti-IgG humana que la necesaria. El descongelado y congelado repetido debe evitarse. Las diluciones de trabajo deben almacenarse a +4°C, no volver a congelar y usarse preferiblemente el mismo día.
- 20

Cromógeno: comprimidos de OPD de Sigma, código P6662

Forma: 33 comprimidos de OPD de 1 mg cada uno; almacenamiento: almacene los comprimidos a 2-8°C. Proteger del calor, la luz y la humedad. Dejar que alcancen la temperatura ambiente 10 minutos antes de su utilización.

- 5 Utilización: disolver un comprimido en 2,5 ml de tampón de fosfato-citrato 0,05M, pH 5,0, hasta una concentración final de 0,4 mg/ml para preparar la disolución de revelado. Añadir 1 ml de peróxido de hidrógeno al 30% recién preparado por 2,5 ml de disolución tampón de sustrato inmediatamente antes de su utilización.

Disolución de parada: H₂SO₄ 3M, Merck

Forma: líquido, 1 vial x 20 ml; almacenamiento: almacenar a temperatura ambiente.

Utilización: para detener la reacción, añadir 50 µl de H₂SO₄ 3M por pocillo.

- 10 *Agente de bloqueo: caseína (leche en polvo comercial)*

Forma: polvo, 1 vial x 8 g; almacenamiento: almacenar a 4-8°C.

Utilización: disuelva la caseína en tampón de lavado para obtener una disolución de tampón de lavado con 3% de caseína. Agitar hasta que se disuelva el polvo. La disolución de bloqueo debe ser utilizada preferiblemente el mismo día.

- 15 *Tampón de lavado: concentrado de tampón de lavado (30x)*

Forma: líquido, 1 vial x 10 ml; almacenamiento: almacenar a 4-8°C.

Utilización: diluir 1 volumen del concentrado 10x de tampón de lavado con 9 volúmenes de agua desionizada para obtener el tampón de lavado de trabajo 1x (es decir: 1 ml puede diluirse hasta 10 ml).

Placa:

- 20 Forma: una microplaca con el péptido elegido, ocho tiras de pocillos revestidos por cada antígeno (A, B, C). Almacenamiento: almacenar a 4-8°C.

Protocolo

- 25 *Materiales adicionales necesarios:* pipetas y temporizador; lector de microplacas con un detector que pueda medir la absorbancia a 450 nm o escala de color; cilindro graduado de 1 litro; lavador de placas o botella lavadora; tubos de polipropileno para patrones y diluciones de la muestra, si es necesario.

Principio del ensayo

- 30 Este kit es un tipo indirecto de análisis ELISA que usa un sistema de detección de la peroxidasa de rábano. Una placa de microtitulación revestida con antígenos específicos son reconocidos por la IgG anti-leishmania humana. A su vez, los antígenos se enlazan con la IgG humana. La IgG anti-leishmania es marcada a continuación con un reactivo de anti-IgG humana conjugada con peroxidasa de rábano. A continuación se genera la señal de detección proporcional a la cantidad de anticuerpo humano.

Procedimiento de ensayo

Antes de su utilización, deje que el kit se caliente a temperatura ambiente. Retirar el número de tiras de pocillos según el plan de diseño.

- 35 *Procedimiento de dilución de la muestra:* las muestras ensayadas y el suero de control humano deben ser diluidas a 1:150 en tampón de bloqueo.

Lavar los pocillos 3 veces con 100 µl de tampón de lavado durante 5 minutos antes de su utilización.

1.- Bloquear los pocillos con 100 µl de disolución de bloqueo durante 2 horas.

2.- Desechar el tampón de bloqueo dando golpecitos en el fondo.

- 40 3.- Añadir 100 µl de la dilución adecuada de muestra de suero humano a cada pocillo. Para los pocillos de control positivo, añadir 100 µl de muestra de suero humano de control diluida. Todas las muestras de suero deben ser diluidas en tampón de bloqueo. Incubar a temperatura ambiente durante 2 horas.

- 45 4.- Eliminar los contenidos volcando la placa en el desagüe. Añadir 200 µl de tampón de lavado de trabajo 1x en cada pocillo y eliminar volcando la placa en el desagüe y golpeándola sobre papel absorbente para eliminar el líquido. Repetir los lavados tres veces, cinco minutos cada lavado.

ES 2 681 227 T3

5.- Añadir 100 µl de disolución de conjugado de anti-IgG humana con peroxidasa de rábano en cada pocillo. Incubar a temperatura ambiente durante 1 hora.

6.- Eliminar los contenidos volcando la placa en el desagüe. Repetir los lavados como en la etapa 4, tres veces, cinco minutos cada lavado.

5 7.- Añadir 100 µl de disolución de revelado en cada pocillo. Incubar a temperatura ambiente durante 10-15 minutos.

8.- Añadir rápidamente 50 µl de disolución de parada en cada pocillo y agitar durante unos pocos segundos. Se debe producir un cambio drástico de color del amarillo al naranja oscuro.

9.- Medir la absorbancia a 490 nm en 1 hora después de añadir la disolución de parada.

Verificación del ensayo

10 El ensayo puede considerarse válido si el protocolo ha sido seguido correctamente; la densidad óptica del control positivo es superior a 0,8 y la relación entre el calibrador de corte y el control negativo es mayor que 2,0.

Interpretación de los resultados

Clasificar los resultados con una densidad óptica mayor que el valor de corte 0,3 como positivo.

Clasificar los resultados con una densidad óptica menor que el valor de corte 0,1 como negativo.

15 Los resultados entre estos dos valores, es decir $0,1 < \text{valor de corte} < 0,3$ son ambiguos y deben ser repetidos para confirmar el estado.

Si el resultado es dudoso, se añaden etapas adicionales al método para aumentar la exactitud y sensibilidad:

c) poner en contacto dicha muestra biológica con una del péptido H2A-P9 de secuencia KGGKKGKATPSA (SEQ. ID. N° 9), y

20 d) detectar la presencia o ausencia del complejo inmune formado en c).

REFERENCIAS

1. Braz RF, Nascimento ET, Martins DR, et al. The sensitivity and specificity of *Leishmania chagasi* recombinant K39 antigen in the diagnosis of American visceral leishmaniasis and in differentiating active from subclinical infection. *Am J Trop Med Hyg* 2002; 67:344-8.
- 5 2. Reithinger R, Dujardin JC, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis*. 2007 Sep;7(9):581-96. Review. PMID: 17714672
3. Alvar J, Croft S and Olliaro P. Chemotherapy in the treatment and control of leishmaniasis. *Adv Parasitol* 2006;61:223-74
- 10 4. Boggild AK, Ramos AP, Espinosa D, et al. Clinical and demographic stratification of test performance: a pooled analysis of five laboratory diagnostic methods for American cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 2010;83:345-50
- 5 5. Cuba CAC. Diagnostico Parasitologico de la Leishmaniasis Tegumentaria Americana. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica* 2000:39-42
- 15 6. Luz ZM, Silva AR, Silva Fde O, Caligiorne RB, Oliveira E and Rabello A. Lesion aspirate culture for the diagnosis and isolation of *Leishmania* spp. from patients with cutaneous leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009;104:62-6
7. Romero GA, Sampaio RN, O. MV and Marsden PD. Sensitivity of a vacuum aspiratory culture technique for diagnosis of localized cutaneous leishmaniasis in an endemic area of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* transmission. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999;94:505-8
- 20 8. Marzochi MC, Teixeira PC, Marzochi KB, da Conceição NF, Coutinho W and de Brito DB. Vacuum aspiratory puncture system for *Leishmania* culturing, isolation and transport. Preliminary report. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1993;35:301-3
9. Saki J, Akhlaghi L, Maraghi S, et al. Evaluation of Modified Novy-MacNeal-Nicolle Medium for Isolation of *Leishmania* Parasites from Cutaneous Lesions of Patients in Iran. *Res J Parasitol* 2009;4:56-62
- 25 10. Aviles H, Belli A, Armijos R, Monroy FP and Harris E. PCR detection and identification of *Leishmania* parasites in clinical specimens in Ecuador: a comparison with classical diagnostic methods. *J Parasitol* 1999;85:181-7
11. Barroso-Freitas AP, Passos SR, Mouta-Confort E, et al. Accuracy of an ELISA and indirect immunofluorescence for the laboratory diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2009;103:383-9
- 30 12. Junqueira Pedras M, Orsini M, Castro M, Passos VM and Rabello A. Antibody subclass profile against *Leishmania braziliensis* and *Leishmania amazonensis* in the diagnosis and follow-up of mucosal leishmaniasis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003;47:477-85
- 35 13. Ryan JR, Smithyman AM, Rajasekariah G, Hochberg L, Stiteler JM and Martin SK. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Based on Soluble Promastigote Antigen Detects Immunoglobulin M (IgM) and IgG Antibodies in Sera from Cases of Visceral and Cutaneous Leishmaniasis. *J Clin Microbiol* 2002;40:1037-43
14. Guimaraes MC, Celeste BJ and Franco EL. Diagnostic performance indices for immunofluorescent tests and enzyme immunoassays of leishmaniasis sera from northern and north-eastern Brazil. *Bull World Health Organ* 1990;68:39-43
- 40 15. Guimaraes MC, Celeste BJ, Franco EL, Cucé LC and Belda WJ. Evaluation of serological diagnostic indices for mucocutaneous leishmaniasis: immunofluorescence tests and enzyme-linked immunoassays for IgG, IgM and IgA antibodies. *Bull World Health Organ* 1989;67:643-8
16. Carmelo E, Martinez E, Gonzales AC, et al. Antigenicity of *Leishmania braziliensis* Histone H1 during Cutaneous Leishmaniasis: Localization of Antigenic Determinants. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002;9:808-11
- 45 17. Webb JR, Campos-Neto A, Ovendale PJ, et al. Human and murine immune responses to a novel *Leishmania* major recombinant protein encoded by members of a multicopy gene family. *Infect Immun* 1998;66:3279-89
18. Montoya Y, Leon C, Talledo M, et al. Recombinant antigens for specific and sensitive serodiagnosis of Latin American tegumentary leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1997;91:674-6
19. Celeste BJ, Angel SO, Castro LG, Gidlund M and Goto H. *Leishmania infantum* heat shock protein 83 for the serodiagnosis of tegumentary leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res* 2004;37:1591-3

20. Amorim A, Carrington M, Miles MA, Barker DC and de Almeida LC. Identification of the C-terminal region of 70kDa heat shock protein from *Leishmania (Viannia) braziliensis* as a target for the humoral immune response. *Cell Stress Chaperones* 1996;1:177-87
- 5 21. Myler HA, McVay S, Kratzsch J. Troubleshooting PEG-hGH detection supporting pharmacokinetic evaluation in growth hormone deficient patients. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2010 Mar Apr;61(2):92-7. Epub 2010 Jan 4.
22. Noya O, Patarroyo ME, Guzman F and B. AdN. Immunodiagnosis of Parasitic Diseases with Synthetic Peptides. *Current Protein and Peptide Science* 2003;4:299-308
- 10 23. Gomara MJ, Haro I. Synthetic peptides for the immunodiagnosis of human diseases. *Curr Med Chem* 2007;14:531-46
24. Soto M, Requena JM, Quijada L, et al. Antigenicity of the *Leishmania infantum* histones H2B and H4 during canine visceral leishmaniasis. *Clin Exp Immunol* 1999;115:342-9
- 15 25. Soto M, Requena J, Quijada L, et al. During active visceral leishmaniasis the anti-P2 humoral response is specifically triggered by the parasite P proteins. *Clinical and Experimental Immunology* 1995;100:246-52
26. Soto M, Requena JM, Quijada L, et al. Mapping of the linear antigenic determinants from the *Leishmania infantum* histone H2A recognized by sera from dogs with leishmaniasis. *Immunol Lett* 1995;48:209-14
- 20 27. Soto M, Requena JM, Quijada L, et al. Characterization of the antigenic determinants of the *Leishmania infantum* histone H3 recognized by antibodies elicited during canine visceral leishmaniasis. *Clin Exp Immunol* 1996;106:454-61
28. Soto M, Requena JM, Quijada L, Guzman F, Patarroyo ME and Alonso C. Identification of the *Leishmania infantum* P0 ribosomal protein epitope in canine visceral leishmaniasis. *Immunol Lett* 1995;48:23-8
29. Soto M, Requena JM, Quijada L and Alonso C. Specific serodiagnosis of human leishmaniasis with recombinant *Leishmania* P2 acidic ribosomal proteins. *Clin Diagn Lab Immunol* 1996;3:387-91
- 25 30. Gonzalez AC, Martinez E, Carmelo E, et al. Analysis of NLS and rRNA binding motifs in the L25 ribosomal protein from *Leishmania (viannia) braziliensis*: investigation of its diagnostic capabilities. *Parasitology* 2002;125:51-7
31. Coleman AS, Rossmann E, Yang X, et al. BBK07 immunodominant peptides as serodiagnostic markers of Lyme disease. *Clin Vaccine Immunol* 2011;18:406-13
- 30 32. Pau CP, Lam LL, Spira TJ, et al. Mapping and serodiagnostic application of a dominant epitope within the human herpesvirus 8 ORF 65-encoded protein. *J Clin Microbiol* 1998;36:1574-7
33. Singh KK, sharma N, Vargas D, et al. Peptides of a novel *Mycobacterium tuberculosis* specific cell wall protein for immunodiagnosis of tuberculosis. *J Infect Dis* 2009;200:571-81
- 35 34. Soto M, Requena JM, Gomez LC, Navarrete I and Alonso C. Molecular characterization of a *Leishmania donovani* infantum antigen identified as histone H2A. *Eur J Biochem* 1992;205:211-6
35. Soto M, Requena JM, Morales G and Alonso C. The *Leishmania infantum* histone H3 possesses an extremely divergent N-terminal domain. *Biochim Biophys Acta* 1994;1219:533-5
36. Soto M, Quijada L, Alonso C and Requena JM. Molecular cloning and analysis of expression of the *Leishmania infantum* histone H4 genes. *Mol Biochem Parasitol* 1997;90:439-47
- 40 37. Iborra S, Soto M, Carrion J, et al. The *Leishmania infantum* acidic ribosomal protein P0 administered as a DNA vaccine confers protective immunity to *Leishmania major* infection in BALB/c mice. *Infect Immun* 2003;71:6562-72
38. Soto M, Requena JM and Alonso C. Isolation, characterization and analysis of the expression of the *Leishmania* ribosomal PO protein genes. *Mol Biochem Parasitol* 1993;61:265-74
- 45 39. Soto M, Requena JM, Garcia M, Gomez LC, Navarrete I and Alonso C. Genomic organization and expression of two independent gene arrays coding for two antigenic acidic ribosomal proteins of *Leishmania*. *J Biol Chem* 1993;268:21835-43
40. Soto M, Requena J, Quijada L and Alonso C. Multicomponent Chimeric Antigen for Serodiagnosis of Canine Visceral Leishmaniasis. *Journal of Clinical Microbiology* 1998;36:58-63

41. Houghten RA. General method for the rapid solid-phase synthesis of large numbers of peptides: specificity of antigen-antibody interaction at the level of individual amino acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985;82:5131-5
42. Zagui D, Panosian C, Gutierrez MA, Gregson A, Taylor E and Ochoa MT. New World cutaneous leishmaniasis: current challenges in diagnosis and parenteral treatment. *J Am Acad Dermatol* 2011;64:587-92
- 5 43. Boggild AK, Miranda-Verastegui C, Espinosa D, et al. Evaluation of a microculture method for isolation of *Leishmania* parasites from cutaneous lesions of patients in Peru. *J Clin Microbiol* 2007;45:3680-4
44. Boggild AK, Ramos AP, Valencia BM, et al. Diagnostic performance of filter paper lesion impression PCR for secondarily infected ulcers and nonulcerative lesions caused by cutaneous leishmaniasis. *J Clin Microbiol* 2011;49:1097-100
- 10 45. Pirmez C, da Silva Trajano V, Paes-Oliveira Neto M, et al. Use of PCR in diagnosis of human american tegumentary leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. *J Clin Microbiol* 1999;37:1819-23
46. Brito ME, Mendonca MG, Gomes YM, Jardim ML and Abath FG. Identification of Potentially Diagnostic *Leishmania braziliensis* Antigens in Human Cutaneous Leishmaniasis by Immunoblot Analysis. *Clin Diagn Lab Immunol* 2000;7:318-21
- 15 47. Goncalves CC, Reiche EM, De Abreu Filho BA, et al. Evaluation of antigens from various *Leishmania* species in a Western blot for diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 2002;66:91-102
48. Goto H, Lauletta Lindoso JA. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Reviews of Anti-infective Therapy* 2010;8:419-33
- 20 49. Maalej IA, Chenik M, Louzir H, et al. Comparative evaluation of ELISAs based on ten recombinant or purified *Leishmania* antigens for the serodiagnosis of Mediterranean Visceral Leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 2003;68:312-20
50. Levin MJ, Vazquez M, Kaplan D and Schijman AG. The *Trypanosoma cruzi* Ribosomal P Protein Family: Classification and Antigenicity. *Parasitol Today* 1993;9:381-4
- 25 51. Soto M, Ramirez R, Pineda MA, et al. Searching genes encoding *Leishmania* antigens for diagnosis and protection. *Scholarly Research Exchange* 2009;36:58-25

LISTA DE SECUENCIAS

SEQ. ID. N°1 H2A P1 MATPRSAKKAVRKSQSKSAK
 SEQ. ID. N°2 H2A P2 SKSAKCLIFPVGRVGGMMR
 SEQ. ID. N°3 H2A P3 GGMMRRGQYARRIGASGAVY
 5 SEQ. ID. N°4 H2A P4 SGAVYLAHVLEYLTAELLEL
 SEQ. ID. N°5 H2A P5 ELLELSVKAAAQSGKKRCRL
 SEQ. ID. N°6 H2A P6 KRCRLNPRTVMLAARHDDDI
 SEQ. ID. N°7 H2A P7 HDDDITLLKNVTLSHSGVV
 SEQ. ID. N°8 H2A P8 HSGVVPNISKAMAKKKGGKK
 10 **SEQ. ID. N°9 H2A P9 KGGKKGKATPSA**
 SEQ. ID. N°10 H2B P1 MASSRSAPRKASHAHKSHRK
 SEQ. ID. N° 11 H2B P2 ASHAHSHRKPKRSWNVYVG
 SEQ. ID. N°12 H2B P3 PKRSWNVYVGRSLKAINAQM
 SEQ. ID. N°13 H2B P4 RSLKAINAQMSMSHRTMSIV
 15 SEQ. ID. N°14 H2B P5 SMSHRTMSIVNSYVNDVMER
 SEQ. ID. N°15 H2B P6 NSYVNDVMERICMEAASIVR
 SEQ. ID. N°16 H2B P7 ICMEAASIVRANKKRTLGAR
 SEQ. ID. N°17 H2B P8 ANKKRTLGAREVQTAVRIVL
 SEQ. ID. N° 18 H2B P9 EVQTAVRIVLPAELAKHAMA
 20 SEQ. ID. N°19 H2B P10 PAELAKHAMAEGTKAVSSASA
 SEQ. ID. N°20 H3 P1 MSRTKETARAKRTITSKKS
 SEQ. ID. N°21 H3 P2 KRTITSKKS KAPSGASGVK
 SEQ. ID. N°22 H3 P3 KAPSGASGVKRSHRRWRPGT
 SEQ. ID. N°23 H3 P4 RSHRRWRPGTCAIREIRKFQ
 25 SEQ. ID. N°24 H3 P5 CAIREIRKFQKSTSLLIQCA
 SEQ. ID. N°25 H3 P6 KSTSLLIQCAPFQRLVRGVE
 SEQ. ID. N°26 H3 P7 PFQRLVRGVERQKEGLRFQS
 SEQ. ID. N°27 H3 P8 RQKEGLRFQSSAIMALQEAT
 SEQ. ID. N°28 H3 P9 SAIMALQEATEAYIVSLMAD
 30 SEQ. ID. N°29 H3 P10 EAYIVSLMADTNLACIHAKR
 SEQ. ID. N°30 H3 P11 TNLACIHAKRVTIQPKDIQL
 SEQ. ID. N°31 H3 P12 VTIQPKDIQLALRLRGERH
 SEQ. ID. N°32 H4 P1 MAKGKRSTDAKGSQRRQKQV
 SEQ. ID. N°33 H4 P2 KGSQRRQKQVLRDNIRGITR
 35 SEQ. ID. N°34 H4 P3 LRDNIRGITRGCVRRMARRG
 SEQ. ID. N°35 H4 P4 GCVRRMARRGGVKRISTEVY
 SEQ. ID. N°36 H4 P5 GVKRISTEVYEEVRRVLKAY
 SEQ. ID. N°37 H4 P6 EEVRRVLKAYVEDIVRCSTA
 SEQ. ID. N°38 H4 P7 VEDIVRCSTAYTEYARKKTV
 40 SEQ. ID. N°39 H4 P8 YTEYARKKTVTACDVVTALR
 SEQ. ID. N°40 H4 P9 TACDVVTALRKQGHILYGYA
 SEQ. ID. N°41 P0 P1 MPSITTAKREYEERLVDCLT
 SEQ. ID. N°42 P0 P2 VDCLTKYSCVLFVGMNDVRS
 SEQ. ID. N°43 P0 P3 DNVRSQQVHDVGRALRAKAE
 45 SEQ. ID. N°44 P0 P4 RAKAEFMMGKKTLLQKIVEK
 SEQ. ID. N°45 P0 P5 KIVEKRAQAKDASPEAKHFN
 SEQ. ID. N°46 P0 P6 AKHFNDQCEEYNLVRNTGL
 SEQ. ID. N°47 P0 P7 RNTGLIFTNNAVQEITSVLD
 SEQ. ID. N°48 P0 P8 TSVLDAHRVKRAARVGAISP
 50 SEQ. ID. N°49 P0 P9 GAISPCDVIVAAGSTGMEPT
 SEQ. ID. N°50 P0 P10 GMEPTQTSFFQALMIATKIA
 SEQ. ID. N°51 P0 P11 ATKIAKGMVEIVTEKKVLSV
 SEQ. ID. N°52 P0 P12 LLQKLNISPFYYQVNVLSVW
 SEQ. ID. N°53 P0 P13 VLSWDRGDLFTREDLMMTE
 55 SEQ. ID. N°54 P0 P14 LMMTEDMVEKMLMEGLSNVA
 SEQ. ID. N°55 P0 P15 LSNVAAMALGAGIPTSSTIG
 SEQ. ID. N°56 P0 P16 SSTIGPMLVDAFKNLLAVSV
 SEQ. ID. N°57 P0 P17 LAVSVATSYEFEEHNGKELR
 SEQ. ID. N°58 P0 P18 GKELREAAIMGLLAGSCSAA
 60 SEQ. ID. N°59 P0 P19 SCSAAAEPAAAAPAAPSAAA
 SEQ. ID. N°60 P0 P20 PSAAAKEEPEESEDDEDFGMG
 SEQ. ID. N°61 P0 P21 AAKEEPEESEDDEDFGMGLF
 SEQ. ID. N°62 P2a P1 MQYLAAYALVALSGKTPSKA
 SEQ. ID. N°63 P2a P2 TPSKADVQAVLKAAGVAVDA

SEQ. ID. N°64 P2a P3 VAVDASRVDAVFQEVEGKSF
 SEQ. ID. N°65 P2a P4 EGKSF DALVAEGRTKLVGSG
 SEQ. ID. N°66 P2a P5 LVGSGSAAPAGAVSTAGAGA
SEQ. ID. N°67 P2a P6 AGAGAGAVAEAKKEEPEEEEE
 5 SEQ. ID. N°68 P2a P7 PEEEEADDDMGFGLFD
 SEQ. ID. N°69 P2b P1 MSTKYLAAYALASLSKASPS
 SEQ. ID. N°70 P2b P2 KASPSQADVEAICKAVHIDV
 SEQ. ID. N°71 P2b P3 VHIDVDQATLAFVMESVTGR
 SEQ. ID. N°72 P2b P4 SVTGRDVATLIAEGAAKMSA
 10 SEQ. ID. N°73 P2b P5 AKMSAMPAASSGAAAGVTAS
 SEQ. ID. N°74 P2b P6 GVTASAAGDAAPAAAAAKKD
 SEQ. ID. N°75 P2b P7 AAKKDEPEEEADDDMGFGLFD

LISTA DE SECUENCIAS

15 <110> Institut de Recherche pour le Développement Universidad Peruana Cayetano Heredia

<120> Péptidos y métodos para la detección de la leishmaniasis

20 <130> CB/es - F785 15WO

<160> 75

<170> PatentIn versión 3.5

25

<210> 1

<211> 20

<212> PRT

<213> Leishmania infantum

30

<400> 1

Met Ala Thr Pro Arg Ser Ala Lys Lys Ala Val Arg Lys Ser Gly Ser
 1 5 10 15

Lys Ser Ala Lys
 20

<210> 2

35

<211> 20

<212> PRT

<213> Leishmania infantum

<400> 2

Ser Lys Ser Ala Lys Cys Gly Leu Ile Phe Pro Val Gly Arg Val Gly
 1 5 10 15

Gly Met Met Arg
 20

40

<210> 3

<211> 20

<212> PRT

45

<213> Leishmania infantum

<400> 3

Gly Gly Met Met Arg Arg Gly Gln Tyr Ala Arg Arg Ile Gly Ala Ser
 1 5 10 15

Gly Ala Val Tyr
 20

50

<210> 4

<211> 20

<212> PRT

ES 2 681 227 T3

<213> Leishmania infantum

<400> 4

Ser Gly Ala Val Tyr Leu Ala Ala Val Leu Glu Tyr Leu Thr Ala Glu
1 5 10 15

Leu Leu Glu Leu
20

5

<210> 5

<211> 20

<212> PRT

<213> Leishmania infantum

10

<400> 5

Glu Leu Leu Glu Leu Ser Val Lys Ala Ala Ala Gln Ser Gly Lys Lys
1 5 10 15

Arg Cys Arg Leu
20

15

<210> 6

<211> 20

<212> PRT

<213> Leishmania infantum

20

<400> 6

Lys Arg Cys Arg Leu Asn Pro Arg Thr Val Met Leu Ala Ala Arg His
1 5 10 15

Asp Asp Asp Ile
20

25

<210> 7

<211> 20

<212> PRT

<213> Leishmania infantum

<400> 7

His Asp Asp Asp Ile Gly Thr Leu Leu Lys Asn Val Thr Leu Ser His
1 5 10 15

Ser Gly Val Val
20

30

<210> 8

<211> 20

<212> PRT

<213> Leishmania infantum

35

<400> 8

His Ser Gly Val Val Pro Asn Ile Ser Lys Ala Met Ala Lys Lys Lys
1 5 10 15

Gly Gly Lys Lys
20

40

<210> 9

<211> 12

<212> PRT

ES 2 681 227 T3

<213> Leishmania infantum

<400> 9
 Lys Gly Gly Lys Lys Gly Lys Ala Thr Pro Ser Ala
 1 5 10

5 <210> 10
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Leishmania infantum

10 <400> 10
 Met Ala Ser Ser Arg Ser Ala Pro Arg Lys Ala Ser His Ala His Lys
 1 5 10 15

Ser His Arg Lys
 20

15 <210> 11
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Leishmania infantum

<400> 11
 Ala Ser His Ala His Lys Ser His Arg Lys Pro Lys Arg Ser Trp Asn
 1 5 10 15

20 Val Tyr Val Gly
 20

<210> 12
 <211> 20
 <212> PRT

25 <213> Leishmania infantum

<400> 12
 Pro Lys Arg Ser Trp Asn Val Tyr Val Gly Arg Ser Leu Lys Ala Ile
 1 5 10 15

Asn Ala Gln Met
 20

30 <210> 13
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Leishmania infantum

35 <400> 13
 Arg Ser Leu Lys Ala Ile Asn Ala Gln Met Ser Met Ser His Arg Thr
 1 5 10 15

Met Ser Ile Val
 20

40 <210> 14
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Leishmania infantum

<400> 14

ES 2 681 227 T3

Ser Met Ser His Arg Thr Met Ser Ile Val Asn Ser Tyr Val Asn Asp
 1 5 10 15

 Val Met Glu Arg
 20

 <210> 15
 <211> 20
 5 <212> PRT
 <213> Leishmania infantum

 <400> 15
 Asn Ser Tyr Val Asn Asp Val Met Glu Arg Ile Cys Met Glu Ala Ala
 1 5 10 15

 Ser Ile Val Arg
 20
 10
 <210> 16
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Leishmania infantum
 15
 <400> 16
 Ile Cys Met Glu Ala Ala Ser Ile Val Arg Ala Asn Lys Lys Arg Thr
 1 5 10 15

 Leu Gly Ala Arg
 20
 20
 <210> 17
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Leishmania infantum

 <400> 17
 Ala Asn Lys Lys Arg Thr Leu Gly Ala Arg Glu Val Gln Thr Ala Val
 1 5 10 15

 Arg Ile Val Leu
 20
 25
 <210> 18
 <211> 20
 <212> PRT
 30 <213> Leishmania infantum

 <400> 18
 Glu Val Gln Thr Ala Val Arg Ile Val Leu Pro Ala Glu Leu Ala Lys
 1 5 10 15

 His Ala Met Ala
 20
 35 <210> 19
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Leishmania infantum
 40 <400> 19

ES 2 681 227 T3

Pro Ala Glu Leu Ala Lys His Ala Met Ala Glu Gly Thr Lys Ala Val
 1 5 10 15

Ser Ser Ala Ser Ala
 20

<210> 20
 <211> 20
 5 <212> PRT
 <213> Leishmania infantum

<400> 20
 Met Ser Arg Thr Lys Glu Thr Ala Arg Ala Lys Arg Thr Ile Thr Ser
 1 5 10 15

Lys Lys Ser Lys
 20

10 <210> 21
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Leishmania infantum

15 <400> 21
 Lys Arg Thr Ile Thr Ser Lys Lys Ser Lys Lys Ala Pro Ser Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Gly Val Lys
 20

20 <210> 22
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Leishmania infantum

<400> 22
 Lys Ala Pro Ser Gly Ala Ser Gly Val Lys Arg Ser His Arg Arg Trp
 1 5 10 15

Arg Pro Gly Thr
 20

25 <210> 23
 <211> 20
 <212> PRT

30 <213> Leishmania infantum

<400> 23
 Arg Ser His Arg Arg Trp Arg Pro Gly Thr Cys Ala Ile Arg Glu Ile
 1 5 10 15

Arg Lys Phe Gln
 20

35 <210> 24
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Leishmania infantum

40 <400> 24

ES 2 681 227 T3

Cys Ala Ile Arg Glu Ile Arg Lys Phe Gln Lys Ser Thr Ser Leu Leu
 1 5 10 15

 Ile Gln Cys Ala
 20

 <210> 25
 <211> 20
 5 <212> PRT
 <213> Leishmania infantum

 <400> 25
 Lys Ser Thr Ser Leu Leu Ile Gln Cys Ala Pro Phe Gln Arg Leu Val
 1 5 10 15
 10 Arg Gly Val Glu
 20

 <210> 26
 <211> 20
 15 <212> PRT
 <213> Leishmania infantum

 <400> 26
 Pro Phe Gln Arg Leu Val Arg Gly Val Glu Arg Gln Lys Glu Gly Leu
 1 5 10 15

 Arg Phe Gln Ser
 20
 20 <210> 27
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Leishmania infantum
 25 <400> 27
 Arg Gln Lys Glu Gly Leu Arg Phe Gln Ser Ser Ala Ile Met Ala Leu
 1 5 10 15

 Gln Glu Ala Thr
 20

 <210> 28
 <211> 20
 30 <212> PRT
 <213> Leishmania infantum

 <400> 28
 Ser Ala Ile Met Ala Leu Gln Glu Ala Thr Glu Ala Tyr Ile Val Ser
 1 5 10 15

 Leu Met Ala Asp
 20
 35 <210> 29
 <211> 20
 <212> PRT
 40 <213> Leishmania infantum

 <400> 29

ES 2 681 227 T3

Glu Ala Tyr Ile Val Ser Leu Met Ala Asp Thr Asn Leu Ala Cys Ile
 1 5 10 15

His Ala Lys Arg

20

5 <210> 30
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Leishmania infantum

10 <400> 30
 Thr Asn Leu Ala Cys Ile His Ala Lys Arg Val Thr Ile Gln Pro Lys
 1 5 10 15

Asp Ile Gln Leu
 20

15 <210> 31
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Leishmania infantum

<400> 31
 Val Thr Ile Gln Pro Lys Asp Ile Gln Leu Ala Leu Arg Leu Arg Gly
 1 5 10 15

Glu Arg His

20 <210> 32
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Leishmania infantum

25 <400> 32
 Met Ala Lys Gly Lys Arg Ser Thr Asp Ala Lys Gly Ser Gln Arg Arg
 1 5 10 15

Gln Lys Lys Val
 20

30 <210> 33
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Leishmania infantum

<400> 33
 Lys Gly Ser Gln Arg Arg Gln Lys Lys Val Leu Arg Asp Asn Ile Arg
 1 5 10 15

Gly Ile Thr Arg
 20

35 <210> 34
 <211> 20
 <212> PRT
 40 <213> Leishmania infantum

<400> 34

ES 2 681 227 T3

Leu Arg Asp Asn Ile Arg Gly Ile Thr Arg Gly Cys Val Arg Arg Met
 1 5 10 15

 Ala Arg Arg Gly
 20

 <210> 35
 <211> 20
 5 <212> PRT
 <213> Leishmania infantum

 <400> 35
 Gly Cys Val Arg Arg Met Ala Arg Arg Gly Gly Val Lys Arg Ile Ser
 1 5 10 15

 Thr Glu Val Tyr
 20
 10
 <210> 36
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Leishmania infantum
 15
 <400> 36
 Gly Val Lys Arg Ile Ser Thr Glu Val Tyr Glu Glu Val Arg Arg Val
 1 5 10 15

 Leu Lys Ala Tyr
 20
 20
 <210> 37
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Leishmania infantum

 <400> 37
 Glu Glu Val Arg Arg Val Leu Lys Ala Tyr Val Glu Asp Ile Val Arg
 1 5 10 15

 Cys Ser Thr Ala
 20
 25
 <210> 38
 <211> 20
 <212> PRT
 30 <213> Leishmania infantum

 <400> 38
 Val Glu Asp Ile Val Arg Cys Ser Thr Ala Tyr Thr Glu Tyr Ala Arg
 1 5 10 15

 Lys Lys Thr Val
 20
 35 <210> 39
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Leishmania infantum
 40 <400> 39

ES 2 681 227 T3

Tyr Thr Glu Tyr Ala Arg Lys Lys Thr Val Thr Ala Cys Asp Val Val
 1 5 10 15

 Thr Ala Leu Arg
 20

 <210> 40
 <211> 20
 5 <212> PRT
 <213> Leishmania infantum

 <400> 40
 Thr Ala Cys Asp Val Val Thr Ala Leu Arg Lys Gln Gly His Ile Leu
 1 5 10 15

 Tyr Gly Tyr Ala
 20
 10
 <210> 41
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Leishmania infantum
 15
 <400> 41
 Met Pro Ser Ile Thr Thr Ala Lys Arg Glu Tyr Glu Glu Arg Leu Val
 1 5 10 15

 Asp Cys Leu Thr
 20
 20
 <210> 42
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Leishmania infantum

 <400> 42
 Val Asp Cys Leu Thr Lys Tyr Ser Cys Val Leu Phe Val Gly Met Asp
 1 5 10 15

 Asn Val Arg Ser
 20
 25
 <210> 43
 <211> 20
 <212> PRT
 30 <213> Leishmania infantum

 <400> 43
 Asp Asn Val Arg Ser Gln Gln Val His Asp Val Gly Arg Ala Leu Arg
 1 5 10 15

 Ala Lys Ala Glu
 20
 35 <210> 44
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Leishmania infantum
 40 <400> 44

ES 2 681 227 T3

Arg Ala Lys Ala Glu Phe Met Met Gly Lys Lys Thr Leu Gln Gly Lys
 1 5 10 15

Ile Val Glu Lys
 20

<210> 45
 <211> 20
 5 <212> PRT
 <213> Leishmania infantum

<400> 45
 Lys Ile Val Glu Lys Arg Ala Gln Ala Lys Asp Ala Ser Pro Glu Ala
 1 5 10 15

Lys His Phe Asn
 20

10 <210> 46
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Leishmania infantum

15 <400> 46
 Ala Lys His Phe Asn Asp Gln Cys Glu Glu Tyr Asn Leu Val Thr Arg
 1 5 10 15

Asn Thr Gly Leu
 20

20 <210> 47
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Leishmania infantum

25 <400> 47
 Arg Asn Thr Gly Leu Ile Phe Thr Asn Asn Ala Val Gln Glu Ile Thr
 1 5 10 15

Ser Val Leu Asp
 20

30 <210> 48
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Leishmania infantum

<400> 48
 Thr Ser Val Leu Asp Ala His Arg Val Lys Arg Ala Ala Arg Val Gly
 1 5 10 15

Ala Ile Ser Pro
 20

35 <210> 49
 <211> 20
 <212> PRT

40 <213> Leishmania infantum

<400> 49

ES 2 681 227 T3

Gly Ala Ile Ser Pro Cys Asp Val Ile Val Ala Ala Gly Ser Thr Gly
 1 5 10 15

Met Glu Pro Thr
 20

<210> 50
 <211> 20
 5 <212> PRT
 <213> Leishmania infantum

<400> 50
 Gly Met Glu Pro Thr Gln Thr Ser Phe Phe Gln Ala Leu Met Ile Ala
 1 5 10 15

Thr Lys Ile Ala
 10 20

<210> 51
 <211> 20
 15 <212> PRT
 <213> Leishmania infantum

<400> 51
 Ala Thr Lys Ile Ala Lys Gly Met Val Glu Ile Val Thr Glu Lys Lys
 1 5 10 15

Val Leu Ser Val
 20

20 <210> 52
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Leishmania infantum

25 <400> 52
 Leu Leu Gln Lys Leu Asn Ile Ser Pro Phe Tyr Tyr Gln Val Asn Val
 1 5 10 15

Leu Ser Val Trp
 20

30 <210> 53
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Leishmania infantum

<400> 53
 Val Leu Ser Val Trp Asp Arg Gly Asp Leu Phe Thr Arg Glu Asp Leu
 1 5 10 15

Met Met Thr Glu
 35 20

<210> 54
 <211> 20
 <212> PRT
 40 <213> Leishmania infantum

<400> 54

ES 2 681 227 T3

Leu Met Met Thr Glu Asp Met Val Glu Lys Met Leu Met Glu Gly Leu
 1 5 10 15

Ser Asn Val Ala
 20

<210> 55
 <211> 20
 5 <212> PRT
 <213> Leishmania infantum

<400> 55
 Leu Ser Asn Val Ala Ala Met Ala Leu Gly Ala Gly Ile Pro Thr Ser
 1 5 10 15

Ser Thr Ile Gly
 20

10 <210> 56
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Leishmania infantum

15 <400> 56
 Ser Ser Thr Ile Gly Pro Met Leu Val Asp Ala Phe Lys Asn Leu Leu
 1 5 10 15

Ala Val Ser Val
 20

20 <210> 57
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Leishmania infantum

<400> 57
 Leu Ala Val Ser Val Ala Thr Ser Tyr Glu Phe Glu Glu His Asn Gly
 1 5 10 15

Lys Glu Leu Arg
 20

25 <210> 58
 <211> 20
 <212> PRT

30 <213> Leishmania infantum

<400> 58
 Gly Lys Glu Leu Arg Glu Ala Ala Ile Met Gly Leu Leu Ala Gly Ser
 1 5 10 15

Cys Ser Ala Ala
 20

35 <210> 59
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Leishmania infantum

40 <400> 59

ES 2 681 227 T3

Ser Cys Ser Ala Ala Ala Glu Pro Ala Ala Ala Ala Pro Ala Ala Pro
 1 5 10 15

Ser Ala Ala Ala
 20

<210> 60

<211> 20

5 <212> PRT

<213> Leishmania infantum

<400> 60

Pro Ser Ala Ala Ala Lys Glu Glu Pro Glu Glu Ser Asp Glu Asp Asp
 1 5 10 15

Phe Gly Met Gly
 20

10

<210> 61

<211> 20

<212> PRT

<213> Leishmania infantum

15

<400> 61

Ala Ala Lys Glu Glu Pro Glu Glu Ser Asp Glu Asp Asp Phe Gly Met
 1 5 10 15

Gly Gly Leu Phe
 20

20

<210> 62

<211> 20

<212> PRT

<213> Leishmania infantum

<400> 62

Met Gln Tyr Leu Ala Ala Tyr Ala Leu Val Ala Leu Ser Gly Lys Thr
 1 5 10 15

Pro Ser Lys Ala
 20

25

<210> 63

<211> 20

<212> PRT

30 <213> Leishmania infantum

<400> 63

Thr Pro Ser Lys Ala Asp Val Gln Ala Val Leu Lys Ala Ala Gly Val
 1 5 10 15

Ala Val Asp Ala
 20

35

<210> 64

<211> 20

<212> PRT

<213> Leishmania infantum

40

<400> 64

ES 2 681 227 T3

Val Ala Val Asp Ala Ser Arg Val Asp Ala Val Phe Gln Glu Val Glu
 1 5 10 15

Gly Lys Ser Phe
 20

<210> 65
 <211> 20
 5 <212> PRT
 <213> Leishmania infantum

<400> 65
 Glu Gly Lys Ser Phe Asp Ala Leu Val Ala Glu Gly Arg Thr Lys Leu
 1 5 10 15

Val Gly Ser Gly
 20

10 <210> 66
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Leishmania infantum

15 <400> 66
 Leu Val Gly Ser Gly Ser Ala Ala Pro Ala Gly Ala Val Ser Thr Ala
 1 5 10 15

Gly Ala Gly Ala
 20

20 <210> 67
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Leishmania infantum

<400> 67
 Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Val Ala Glu Ala Lys Lys Glu Glu Pro
 25 1 5 10 15

Glu Glu Glu Glu
 20

30 <210> 68
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Leishmania infantum

<400> 68
 Pro Glu Glu Glu Glu Ala Asp Asp Asp Met Gly Phe Gly Leu Phe Asp
 35 1 5 10 15

<210> 69
 <211> 20
 <212> PRT
 40 <213> Leishmania infantum

<400> 69
 Met Ser Thr Lys Tyr Leu Ala Ala Tyr Ala Leu Ala Ser Leu Ser Lys
 1 5 10 15

Ala Ser Pro Ser
 20

<210> 70
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Leishmania infantum
 5
 <400> 70
 Lys Ala Ser Pro Ser Gln Ala Asp Val Glu Ala Ile Cys Lys Ala Val
 1 5 10 15

 His Ile Asp Val
 20

 <210> 71
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Leishmania infantum
 10
 <400> 71
 Val His Ile Asp Val Asp Gln Ala Thr Leu Ala Phe Val Met Glu Ser
 1 5 10 15

 Val Thr Gly Arg
 20
 15

 <210> 72
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Leishmania infantum
 20
 <400> 72
 Ser Val Thr Gly Arg Asp Val Ala Thr Leu Ile Ala Glu Gly Ala Ala
 1 5 10 15

 Lys Met Ser Ala
 20

 <210> 73
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Leishmania infantum
 25
 <400> 73
 Ala Lys Met Ser Ala Met Pro Ala Ala Ser Ser Gly Ala Ala Ala Gly
 1 5 10 15

 Val Thr Ala Ser
 20

 <210> 74
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Leishmania infantum
 35
 <400> 74
 Gly Val Thr Ala Ser Ala Ala Gly Asp Ala Ala Pro Ala Ala Ala Ala
 1 5 10 15

 Ala Lys Lys Asp
 20
 40
 <210> 75
 <211> 21
 <212> PRT

ES 2 681 227 T3

<213> Leishmania infantum

<400> 75

Ala Ala Lys Lys Asp Glu Pro Glu Glu Glu Ala Asp Asp Asp Met Gly
1 5 10 15

Phe Gly Leu Phe Asp
20

5

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Método de diagnóstico *in vitro* para la detección de la presencia o ausencia de anticuerpos indicativos de una cepa de *Leishmania* sudamericana responsable de la leishmaniasis tegumentaria americana, que comprende las etapas de:
- 10 a) poner en contacto los péptidos H2A-P9 que consiste en la secuencia SEQ. ID. N° 9 y P2a-P6 que consiste en la secuencia SEQ. ID. N° 67, separadamente o mezclados juntos, con una muestra biológica durante un tiempo y en condiciones suficientes para formar un complejo inmune, siendo capaz cada uno de dichos péptidos de formar un complejo inmune con anticuerpos indicativos de una cepa de *Leishmania* sudamericana responsable de la leishmaniasis tegumentaria americana; y
- b) detectar la presencia o ausencia del complejo inmune formado en a), donde la detección de la presencia del complejo inmune indica la presencia de anticuerpos indicativos de una cepa de *Leishmania* sudamericana responsable de la leishmaniasis tegumentaria americana.
- 15 2.- Método de diagnóstico *in vitro* según la reivindicación 1, en el que dicha cepa de *Leishmania* sudamericana se elige entre el grupo que consiste en *L. braziliensis*, *L. mexicana*, *L. major*, *L. amazonensis* o *L. infantum*.
- 3.- Método de diagnóstico *in vitro* según la reivindicación 1, en el que, si el resultado del método de diagnóstico *in vitro* es dudoso, dicho método comprende dos etapas adicionales c) y d), que consisten en:
- 20 c) poner en contacto dicha muestra biológica con el péptido H2A-P9 que consiste en la secuencia KGGKKGKATPSA (SEQ. ID. N° 9) durante un tiempo y en condiciones suficientes para formar un complejo inmune, y
- d) detectar la presencia o ausencia del complejo inmune formado en c).
- 25 4.- Kit de diagnóstico para detectar los anticuerpos anti-leishmania presentes en el suero de un paciente que padece leishmaniasis tegumentaria americana, que comprende dos péptidos, uno que consiste en la secuencia SEQ. ID. N° 9 y el otro que consiste en la secuencia SEQ. ID. N° 67.
- 30 5.- Kit de diagnóstico según la reivindicación 4 que comprende: dichos dos péptidos que consisten en las secuencias SEQ. ID. N° 9 y SEQ. ID. N° 67; reactivo(s) para detectar el complejo inmune polipéptido-anticuerpo; opcionalmente una muestra biológica de referencia sin anticuerpos que se enlacen inmunológicamente con dichos péptidos; y opcionalmente una muestra de comparación que comprende anticuerpos que se pueden enlazar específicamente con dichos péptidos; donde dichos péptidos, reactivo(s), muestra biológica de referencia y muestra de comparación están presentes en una cantidad suficiente para realizar dicha detección.
- 35 6.- Kit de diagnóstico según la reivindicación 5, que consiste en un kit de ELISA; comprendiendo dicho kit de ELISA el H2A-P9 que consiste en la secuencia SEQ. ID. N° 9 y el P2a-P6 que consiste en la secuencia SEQ. ID. N° 67, placas de ELISA pre-revestidas, control positivo, control negativo, diluyentes adecuados, anti-IgG humana conjugada con enzima, sustrato cromógeno, tampón de sustrato y una manual de instrucciones para usar el kit.

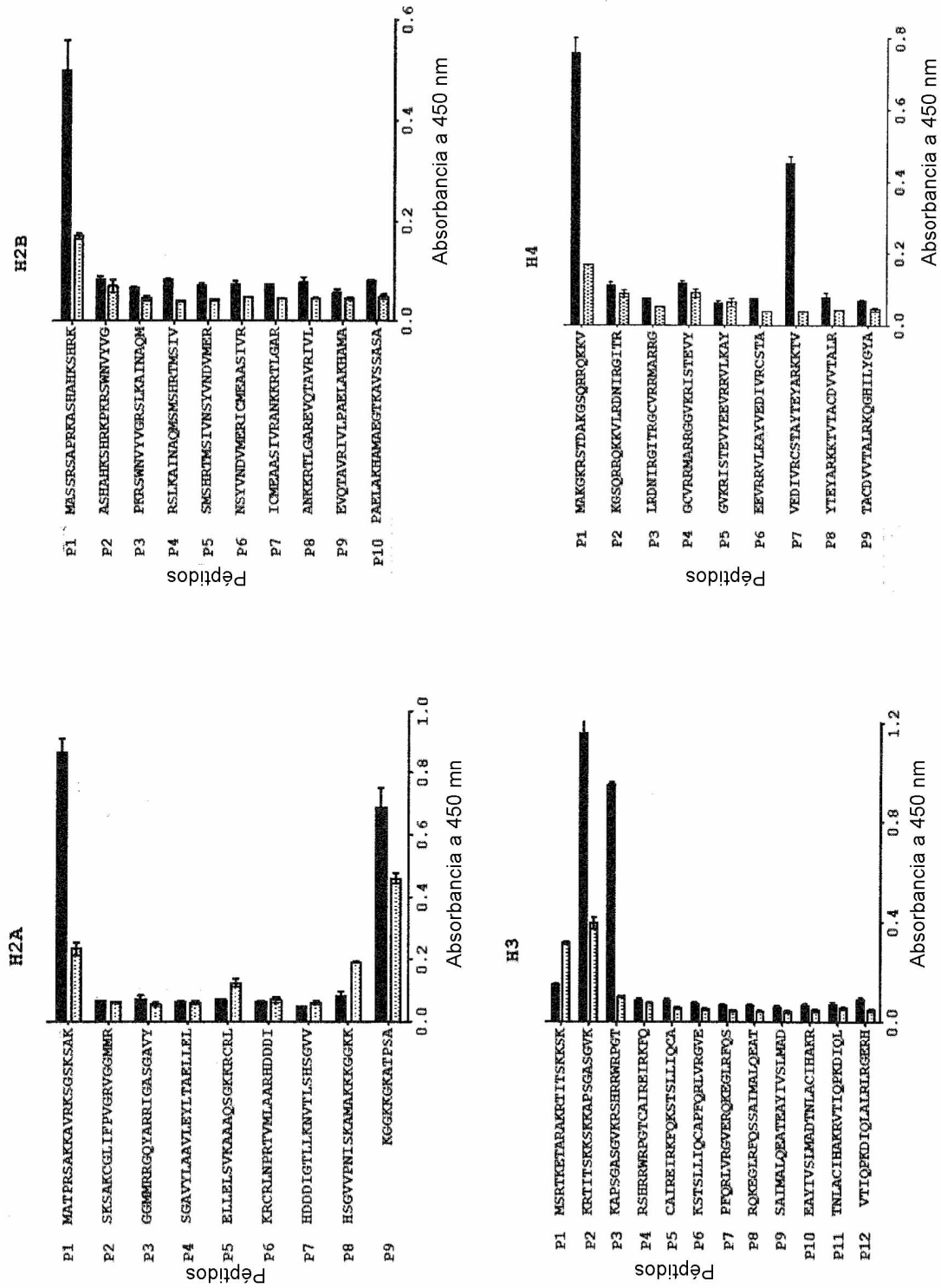
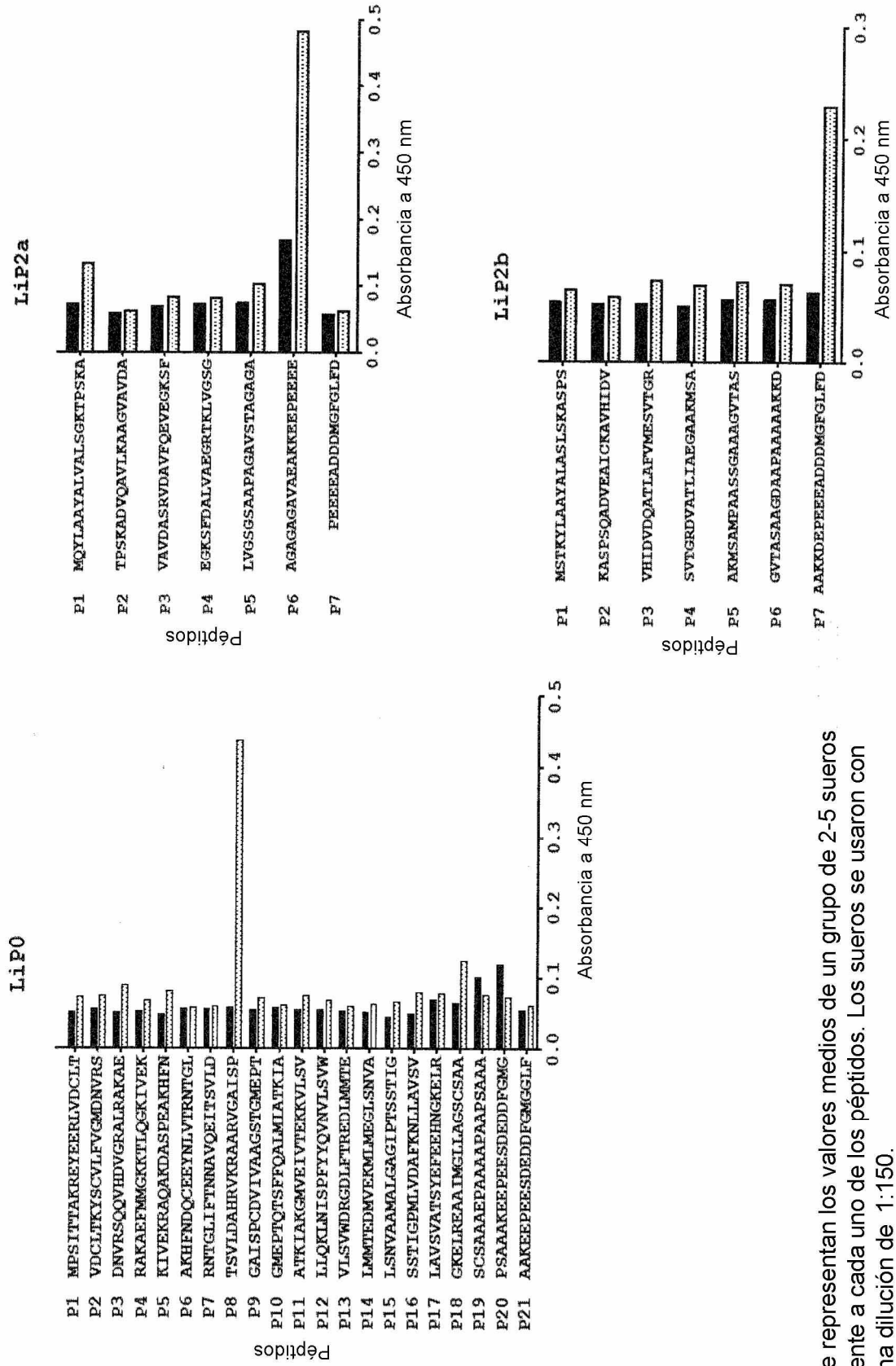


Figura 1



Se representan los valores medios de un grupo de 2-5 sueros frente a cada uno de los péptidos. Los sueros se usaron con una dilución de 1:150.

Figura 2