



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL



Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

CARTA PATENTE N.º PI 9709475-7

Patente de Invenção

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

(21) Número do Depósito : PI 9709475-7

(22) Data do Depósito : 18/12/1997

(43) Data da Publicação do Pedido : 27/06/2000

(51) Classificação Internacional : C07K 14/155; C12Q 1/68; G01N 33/52; G01N 33/569; G01N 33/68

(66) Prioridade Interna : PI 9606272-0 18/12/1996

(54) Título : PROCESSO PARA O TESTE IMUNOENZIMÁTICO COM PROTEÍNA GP90 RECOMBINANTE DO ENVELOPE VIRAL NO DIAGNÓSTICO DA ANEMIA INFECCIOSA EQUINA

(73) Titular : Universidade Federal de Minas Gerais, CGC/CPF: 17217985000104. Endereço: Av. Antonio Carlos, 6627., Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil (BR/MG), CEP: 31270-901.

(72) Inventor : Paulo Cesar Peregrino Ferreira, Prof. Universitário(a), CGC/CPF: 09168940610. Endereço: Almeida dos Jacarandás, 23 ap. 201, São Luiz, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, CEP: 31275-060. Cidadania: Brasileira.; Erna Geessien Kroon, CGC/CPF: 29032067915. Endereço: Av. Xangri-lá 75, Braúnas, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, CEP: 31365-640.; Isabella Bias Fortes Ferraz, CGC/CPF: 51233681672. Endereço: Rua Athos Moreira Silva, 50, Velvedere, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, CEP: 30320-480. Cidadania: Brasileira.; Rômulo Cerqueira Leite, CGC/CPF: 07649800172. Endereço: Rua Tenerife, 245, Serrano, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, CEP: 31550-220. Cidadania: Brasileira.; Jenner Karlisson Pimenta dos Reis, CGC/CPF: 57031622620. Endereço: Rua Nair Pentágua Guimarães, 165 ap. 101, Heliópolis, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, CEP: 31760-100. Cidadania: Brasileira.

Prazo de Validade : 10 (dez) anos contados a partir de 24/12/2013, observadas as condições legais.

Expedida em : 24 de Dezembro de 2013.

Assinado digitalmente por
Júlio César Castelo Branco Reis Moreira
Diretor de Patentes



Relatório Descritivo da Patente de Invenção "**PROCESSO PARA O TESTE IMUNOENZIMÁTICO COM PROTEÍNA GP90 RECOMBINANTE DO ENVELOPE VIRAL NO DIAGNÓSTICO DA ANEMIA INFECCIOSA EQUINA**"

A presente invenção refere-se ao campo geral de produção de
5 testes imunodiagnósticos para detecção de anticorpos contra agentes infecciosos.

A anemia infecciosa equina (AIE) é uma das doenças mais antigas causadas por vírus, tendo sido descrita pela primeira vez na França por LIGNEE, **Rec. Med. Vet.**, 20:30, 1843, e reconhecida como doença viral
10 por VALLEE and CARRE. **Acad. Sci.**,139:331-333,1904. Ela afeta exclusivamente os membros da família **Equidae** apresentando uma distribuição mundial e grande importância econômica.

No Brasil a AIE foi descrita pela primeira vez por DUPONT et al. In: Congresso Brasileiro de Veterinária & Congresso Fluminense de Medicina
15 veterinária. **Anais** p.160-161,1968; por SILVA et al. In: Congresso Brasileiro de Veterinária & Congresso Fluminense de Medicina Veterinária, **Anais** p.173-82, 1968 e por GUERREIRO et al. **Bol. Inst. Pesq. Vet. Desidério Finamor** 1/2: 3-4. 1968 nos estados da Guanabara, Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul. Atualmente a prevalência da doença é bastante alta no centro oeste, estima-se
20 que mais de 50% dos animais estejam infectados principalmente no Pantanal Matogrossense , Roraima, norte de Minas Gerais e sul da Bahia. Dados não oficiais. têm mostrado um aumento da incidência da doença em outras regiões, mostrando desta forma que a doença está em expansão no território brasileiro.

O vírus da AIE (V-AIE) é classificado como um lentivírus
25 pertencente a família **Retroviridae** (CHARMAN et al. **J. Virol.** 19(2):1073-1076.1976), é genética e antigenicamente relacionado a outros lentivírus que se caracterizam por causar infecção persistente . Assim sendo, a AIE tem assumido papel especialmente importante em virologia comparativa e nos estudos recentes sobre a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS).
30 Além de identidade morfológica, ambos os vírus possuem homologia em

seqüências de nucleotídeos que codificam proteínas estruturais, suas células primárias alvo são monócitos/macrófagos. Estes vírus apresentam variantes genéticos/antigênicos durante infecções persistentes, o que está associado ao mecanismo de escape ao sistema imunológico MONTAGNIER et al. **Ann. Virol.**, 135:119-134, 1984, MONTELARO et al. **J. Biol. Chem.**, 259:10539-10544, 1984, RUSHLOW et al. **Virology**, 155:309-321, 1986, STREICHER et al. **J. Am. Med. Assoc.** 256:2390-2391, 1986, STOLER et al. **J. Am. Med. Assoc.** 256:2360-2364, 1986 e HAHN et al. **Science**, 232:1548-1553, 1986.

A transmissão da AIE ocorre principalmente por artrópodes (tabanídeos) que sugam sangue de animais que apresentam a forma aguda da doença (transmissão mecânica) justificando a alta prevalência da AIE em áreas pantanosas e quentes propícias ao ciclo de vida destes vetores ISSEL et al. **Vet. Microbiol.** 17:251-286, 1988. A AIE também pode ser transmitida pela placenta e colostro de éguas com altos títulos de vírus, e por agulhas e instrumentos cirúrgicos contaminados com sangue COGGINS **Comparative diagnosis of viral diseases**, NY, 4:646-658, 1981.

A AIE pode apresentar-se nas formas aguda, subaguda, crônica e principalmente inaparente ou assintomática ISSEL & COGGINS, **J. Am. Vet. Med. Assoc.** 174(7):727-33, 1979, sendo que os sinais mais proeminentes são episódios febris recorrentes, anemia hemolítica, anorexia, rápida perda de peso e edema ventral.

Considerando a alta prevalência de portadores assintomáticos, o diagnóstico clínico não conclusivo e a possibilidade de confundir com outras doenças como as tripanosomíases, piroplasmose, leptospirose, hepatites e endoparasitoses o diagnóstico laboratorial assume papel decisivo no controle e prevenção da AIE.

A técnica para o diagnóstico mais utilizada em todos os países, inclusive no Brasil como teste oficial, é a imunodifusão em gel de ágar (IDGA), uma prova de precipitação OUCHTERLONY, **Imunochemistry**, 3º ed.:106-7 1968, adaptada por COGGINS & NORCROSS **Cornell. Vet.** 60(2):330-5, 1970,

utilizando antígeno produzido a partir de baço de cavalos infectados e NAKAJIMA & USHIMI **Infect. Immun.** 3(3):373-7, 1971, utilizando antígeno preparado em cultura de leucócitos de cavalo.

- Dentre os testes imunoenzimáticos, a técnica de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) tem sido muito utilizada para detectar e quantificar anticorpos contra vários agentes biológicos como vírus, bactérias e parasitas SCHUURS et al. **Clin. Chim. Acta.**, 81:1-40, 1977, TODD et al. **Vet. Rec.** 107:124-126, 1980. Esta técnica apresenta a vantagem de ser simples, rápida, específica e sensível. Vários laboratórios tem desenvolvido reações de ELISA baseadas na extração de proteínas (antígenos) do capsídio de virions cultivados em células de linhagem contínua MIA et al. **Am. Assoc. Vet. Lab. Diagn.**, 25:159-166, 1982, SHANE et al. **J. Clin. Microbiol.**, 19, 351-355, 1984. SHEN et al. **Am. J. Vet. Res.**, 45:1542-1543, 1984, SUGIURA et al. **Bull. Equine Res. Inst.**, 23:42-48, 1986 e SUZUKI et al. **Vet. Microbiol.**, 7:307-315, 1982. Estas preparações antigênicas são parcialmente purificadas e contêm outras proteínas virais, bem como proteínas celulares e do soro fetal bovino utilizado no meio de cultura. O principal componente destas preparações é portanto uma proteína do capsídio viral cujo peso molecular é 26 KDa, (denominada p26). Esta é a proteína mais abundante da partícula viral PAREKH et al. **Virology**, 107:520-525, 1980, GELDERBLON, **AIDS** 5:617-638, 1991. é altamente conservada dentre as amostras variantes dos vírus isolados HUSSAIN et al. **J. Virol.** 61:2956-2961, 1987, SALINOVICH et al. **J. Virol.** 57:71-80, 1986. e é alvo da resposta imune (cavalos infectados apresentam anticorpos específicos anti-p26). Entretanto tem sido demonstrado que anticorpos específicos contra a glicoproteína de superfície gp90 são 10^2 - 10^3 vezes mais abundantes do que os anticorpos específicos contra proteína p26 MONTELARO et al. **Virology** 136:368, 1984; RWAMBO et al. **Arch. Virol.** 111:199, 1990; ISSEL et al. **Equine Infectious diseases, (KY)**, 5:196-200, 1988 além de serem os primeiros a serem detectados no sangue, podendo desta forma representar um importante marcador de fase aguda (fase pós-

infecção). Por isso o uso de mais esta proteína nos testes imunodiagnósticos deverá constituir uma ferramenta importante na detecção de animais recentemente infectados, que são transmissores em potencial e podem ser dados como negativos por testes que utilizam a proteína p26. A gp90 é uma

5 proteína glicosilada do envelope viral que representa 4% da massa protéica viral total. Esta proteína é responsável pela ligação do vírus ao receptor da célula hospedeira e por isso contra ela são produzidos os anticorpos com atividade neutralizante BALL et al. **J. Virol.** 66:732-742, 1992; HUSSAIN et al. **J. Virol.** 61:2956-2961, 1987. Outra técnica bastante utilizada na identificação

10 de anticorpos específicos é a de "Western blot". Nesta técnica os antígenos são fracionados em eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), transferidos eletroforeticamente para um papel de nitrocelulose onde se ligam irreversivelmente. No papel são feitas reações com soros a serem testados e seqüencialmente com conjugados (anticorpos ligados a enzimas). A reação é

15 revelada através da adição de substratos cromógenos com formação de bandas coradas. ROSSMANITH & HORVATH et al. **J. Vet. Med. B.**, 36:49-56, 1989. Uma variação desta técnica denominada "Dot-blot" também pode ser usada. Neste caso os antígenos não fracionados são adsorvidos passivamente no papel de nitrocelulose onde a reação é revelada mesma forma descrita

20 anteriormente para o "Western-blot".

O uso de proteína de envelope (gp90) recombinante em testes imunodiagnósticos, permite um resultado mais confiável, já que não estão presentes nesta preparação antigênica, as proteínas contaminantes provenientes de antígenos oriundos da multiplicação do vírus em cultivos

25 celulares e que são fontes de reações inespecíficas.

A metodologia usada para o teste imunoenzimático que utiliza proteína gp90 recombinante correspondente ao envelope viral, consiste em adsorver o antígeno recombinante em suportes sólidos (placas de microtécnica, tubos, esferas ou papeis de nitrocelulose ou nylon) e proceder a

30 análise dos soros (presença de anticorpos) de animais suspeitos de infecção

pelo vírus da anemia infecciosa eqüina. O processo poderá ser melhor compreendido através da seguinte descrição detalhada em consonância com a figura em anexo onde a adsorção do antígeno (proteína gp90 recombinante) ao suporte sólido (1), é feita pela sua diluição em tampão carbonato (Na_2CO_3 0,1-0,5 M; NaHCO_3 0,1-0,5 M, pH 8,0-9,6, adicionado nas concentrações de 0,01-1 μg e incubado a temperatura de 4-8°C por 18-24h em placas de microtécnica, tubos ou esferas; eletrotransferido ou transferido passivamente nas mesmas concentrações para papéis de nitrocelulose ou nylon. Após a adsorção do antígeno, o suporte foi lavado de 3 a 6 vezes com solução tampão (NaH_2PO_4 0,01-0,02 M, Na_2HPO_4 0,01-0,02 M, KCl 0,02-0,04 M, NaCl 0,85-0,9% pH 7,0-7,5), acrescida de tween 20 a 0,05-0,1% (Tampão-Tween). Em seguida para o bloqueio dos sítios inespecíficos de ligação (2) o suporte usado foi incubado com solução de bloqueio (leite em pó desnatado 1-5% ,albumina bovina 1-5% ou caseína 1-5% em tampão-Tween) por 30-60 min em temperatura de 23°C-37°C. Após nova lavagem do suporte com tampão-Tween, como descrito anteriormente, prosseguiu-se a etapa de reação com soros controles (positivo e negativo) e soros testes, onde os anticorpos presentes nos soros positivos se ligam ao antígeno da fase sólida (3). Os soros controle positivo, negativo e soros testes foram diluídos em tampão-tween e incubados a temperatura de 23°C-37°C. Após nova lavagem do suporte com tampão-tween foi feita a reação com conjugado, onde a anti-imunoglobulina eqüina se liga aos anticorpos que estão ligados aos antígenos (4). O conjugado pode ser uma anti-imunoglobulina eqüina conjugado a enzima peroxidase ou qualquer outra enzima como acetilcolinesterase, lactato desidrogenase, β -galactosidase, glicose oxidase, fosfatase alcalina, e outras. Este conjugado foi diluído em tampão-Tween de acordo com seu título e adicionado ao suporte com incubação a 23°C-37°C por 30-60 min. Foi feita nova lavagem do suporte com tampão-Tween e seguiu-se a revelação da reação (5) onde a enzima do conjugado transforma o substrato de incolor para um produto corado. A solução reveladora é composta do substrato da enzima

utilizada no conjugado que no caso da peroxidase por exemplo é o ortofenilenodiamino diluído em tampão fosfato ou citrato 0,1-0,2 M, pH 5,0-8,0. Após o desenvolvimento de cor, que é proporcional a concentração de anticorpos específicos em cada amostra, foi acrescentado solução de ácido

5 fixo (ácido sulfúrico) para paralisação da reação (6), onde o ácido interrompe a reação anterior. Para o resultado final foi feita a leitura (7) da intensidade de cor formada em cada reação (amostra). Esta leitura foi feita visualmente (a olho nu) ou em espectrofotômetro, em absorbância, com um filtro específico para cor formada pela solução reveladora.

REIVINDICAÇÕES

1. "ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO PARA DIAGNÓSTICO DA ANEMIA INFECCIOSA EQUINA" caracterizado por utilizar como antígeno a proteína gp90 recombinante do envelope do vírus da anemia infecciosa eqüina, compreendendo as seguintes etapas:
 - a) Adsorção do antígeno gp90 recombinante do vírus da Anemia Infecciosa Equina ao suporte sólido;
 - b) Bloqueio dos sítios inespecíficos de ligação;
 - c) Reação com soros controles e soros testes, onde os anticorpos presentes nos soros positivos se ligam ao antígeno gp90 recombinante do vírus da Anemia Infecciosa Equina da fase sólida;
 - d) Reação com conjugado, onde a anti-imunoglobulina equina se liga aos anticorpos que estão ligados ao antígeno gp90 recombinante do vírus da Anemia Infecciosa Eqüina;
 - e) Revelação da reação, onde a enzima do conjugado transforma o substrato de incolor para um produto corado;
 - f) Paralisação da reação, onde o ácido interrompe a reação anterior;
 - g) Leitura da intensidade de cor formada em cada reação (amostra).
2. "ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO PARA DIAGNÓSTICO DA ANEMIA INFECCIOSA EQUINA", de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela adsorção do antígeno gp90 recombinante do vírus da Anemia Infecciosa Equina ao suporte sólido (a) ser feita, principalmente, passivamente por incubação ou eletrotransferência em placas de microtécnica, tubos, *beads*, papeis de nitrocelulose ou nylon, de modo a permitir a separação da fase reagente (adsorvida) da fase não reagente (meio).
3. "ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO PARA DIAGNÓSTICO DA ANEMIA INFECCIOSA EQUINA", de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo bloqueio dos sítios inespecíficos de ligação (b) ser feito, principalmente, com solução de leite em pó desnatado (caseína), que

não interfere na reação antígeno anticorpo.

4. "ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO PARA DIAGNÓSTICO DA ANEMIA INFECCIOSA EQUINA", de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela com soros controles e soros testes, onde os anticorpos presentes nos soros positivos se ligam ao antígeno da fase sólida (c) ser feita em diluição única ou diluição seriada podendo ser usado, principalmente, tampão fosfato-Tween.
5. "ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO PARA DIAGNÓSTICO DA ANEMIA INFECCIOSA EQUINA", de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela reação com o conjugado, onde a anti-imunoglobulina equina se liga aos anticorpos que estão ligados aos antígenos (d) ser feita com conjugado anti-imunoglobulina equina-enzima peroxidase ou outro conjugado que tenha especificidade por imunoglobulina equina e use outra enzima como: acetilcolinesterase, lactato desidrogenase, p-galactosidase, glicose oxidase.
6. "ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO PARA DIAGNÓSTICO DA ANEMIA INFECCIOSA EQUINA", de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela revelação da reação, onde a enzima do conjugado transforma o substrato de incolor para um produto corado (e) ser feita, principalmente, com substrato ortofenilenodiamino.
7. "ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO PARA DIAGNÓSTICO DA ANEMIA INFECCIOSA EQUINA", de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela paralisação da reação, onde o ácido interrompe a reação anterior (f) ser feita, principalmente, com solução de ácido sulfúrico. .
8. "ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO PARA DIAGNÓSTICO DA ANEMIA INFECCIOSA EQUINA", de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela leitura da intensidade de cor formada em cada reação (g) ser feita, principalmente, a olho nú, em espectrofotômetro.

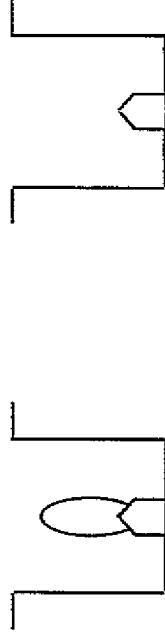
Figura 1

Positivo Negativo

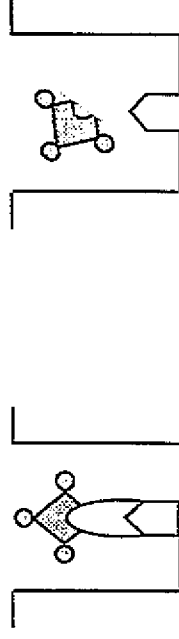


Antígeno (1)

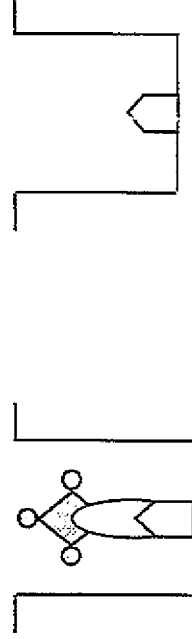
Bloqueio (2)



Soro teste (3)



Conjugado (4)



Substrato (5)

Paralização (6) (7) leitura

Figura 2

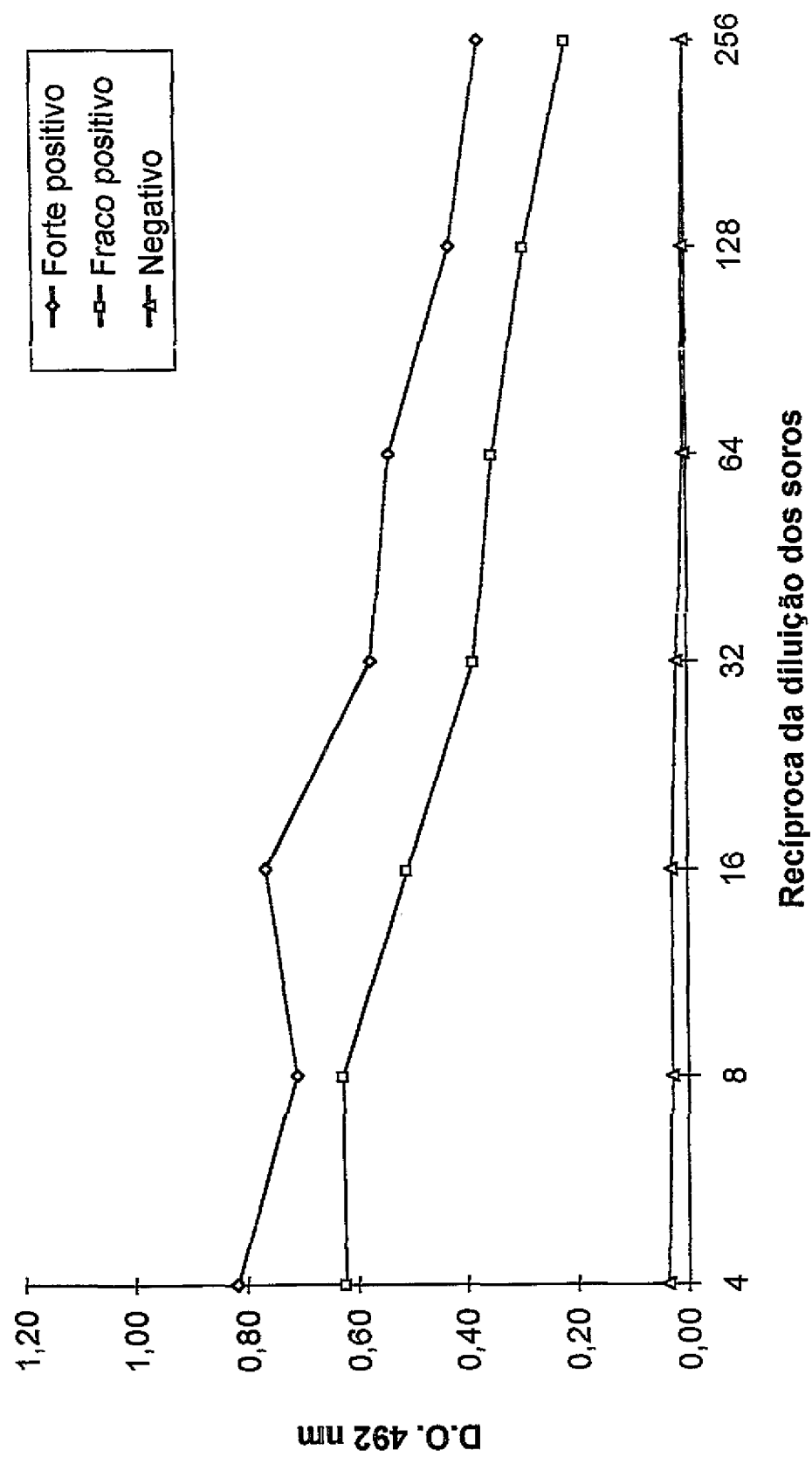


Figura 3

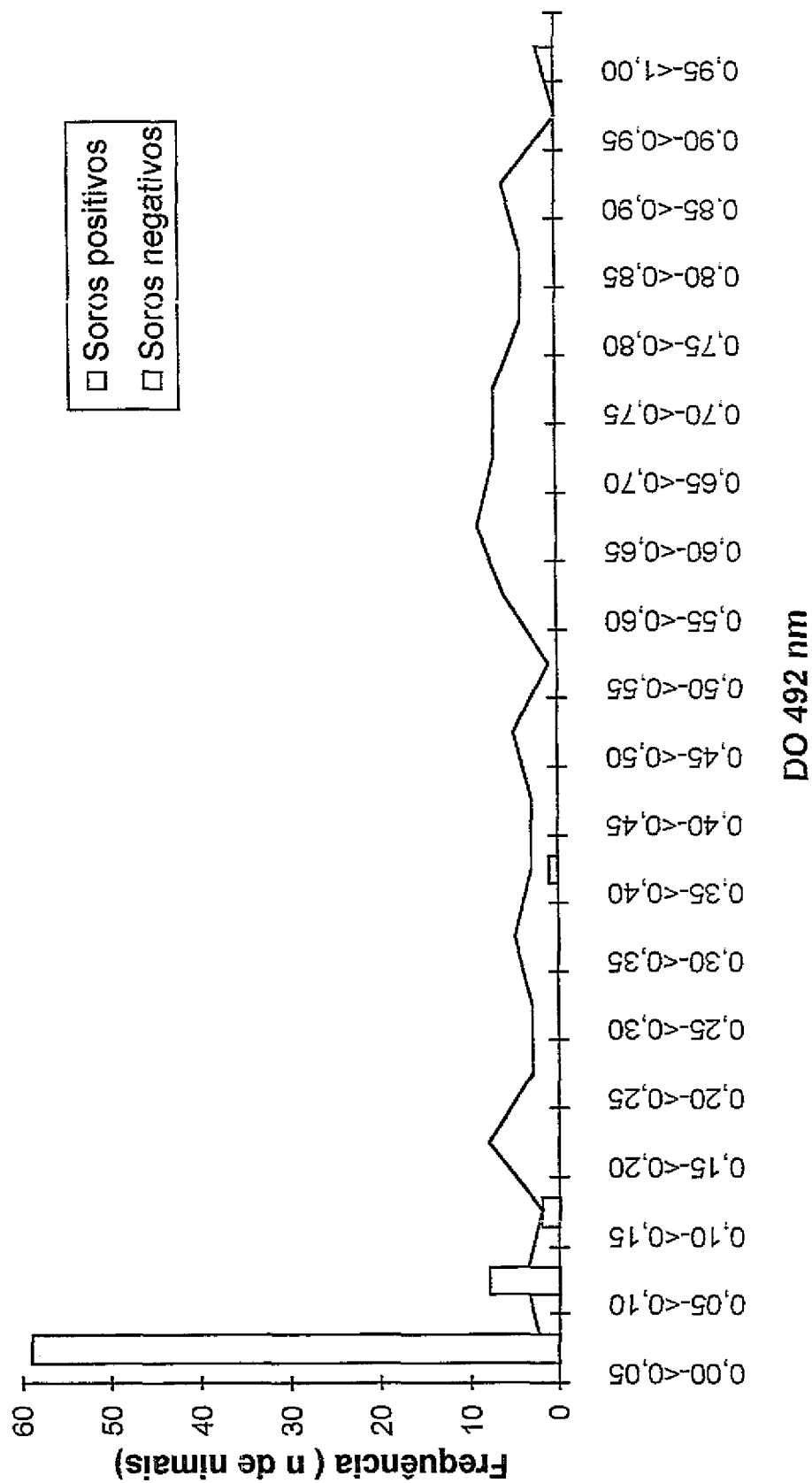
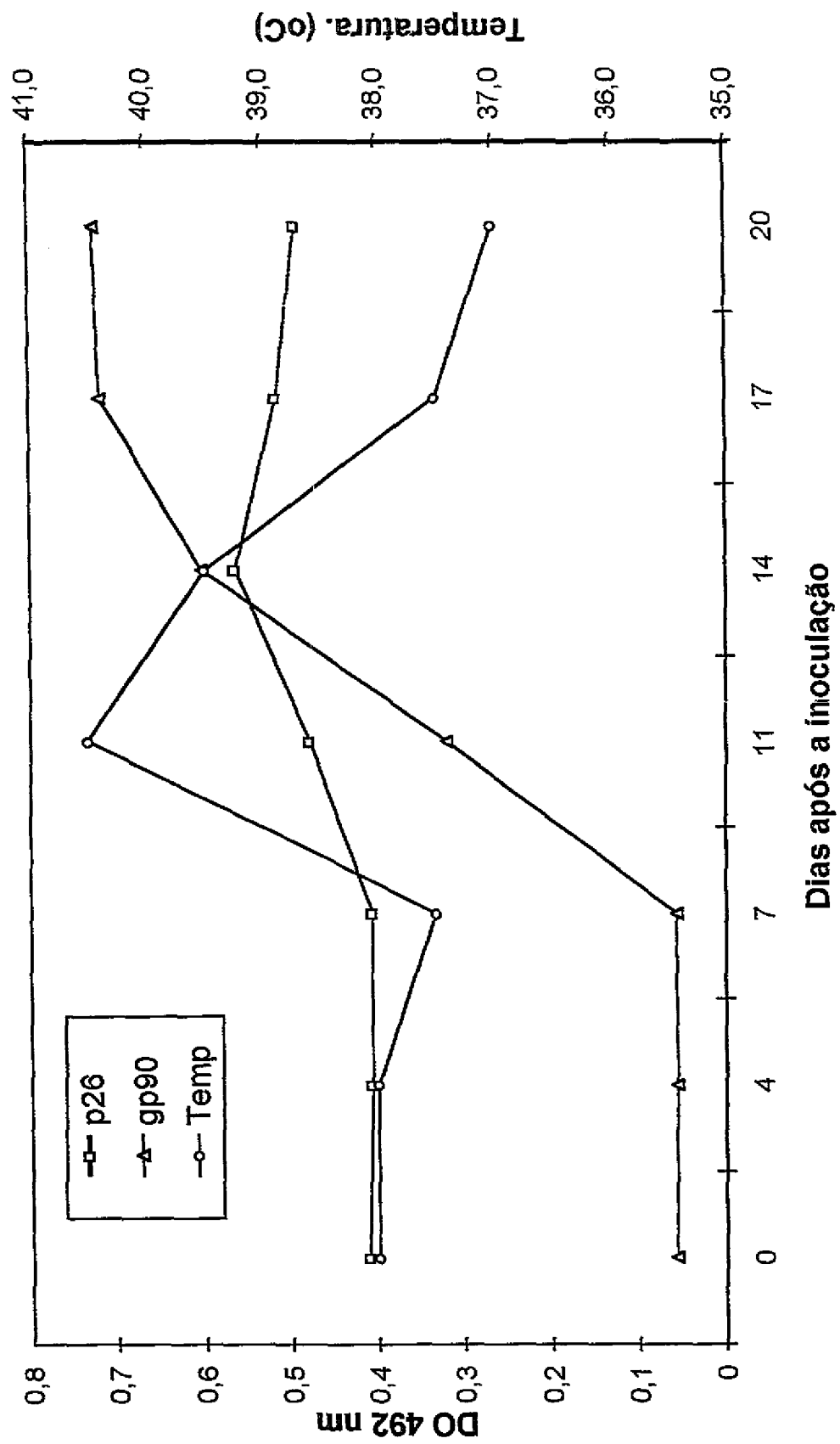


Figura 4



RESUMO

Patente de invenção **"PROCESSO PARA O TESTE IMUNOENZIMÁTICO COM PROTEÍNA GP90 RECOMBINANTE DO ENVELOPE VIRAL NO DIAGNÓSTICO DA ANEMIA INFECCIOSA EQUINA"**

5 A presente invenção diz respeito ao teste imunoenzimático com antígeno viral gp90 recombinante para ser usado no diagnóstico da anemia infecciosa equina. O teste denominado indireto, detecta anticorpos anti-proteína gp90 do vírus da anemia infecciosa equina em soros de animais infectados. O antígeno foi adsorvido em suportes sólidos (placas de
10 microtécnica, tubos, beads ou papeis de nitrocelulose ou nylon) e colocado a reagir (incubado) com os soros testes. Após incubação com conjugado (Anti-imunoglobulina equina-enzima) a reação foi revelada com solução composta do substrato da enzima usada no conjugado (cromógeno). Após desenvolvimento da reação (formação de cor) a mesma foi paralisada com
15 solução ácida lida visualmente (a olho nu) ou em espectrofotômetro com um filtro específico para a cor formada.