

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI 0712023-0 A2**

(22) Data de Depósito: 18/05/2007
(43) Data da Publicação: 27/12/2011
(RPI 2138)



(51) *Int.Cl.:*
G01N 33/569
C12Q 1/34

(54) Título: PROCESSO DE DETECÇÃO PARA VÍRUS DE INFLUENZA

(30) Prioridade Unionista: 18/05/2006 EP 06 114170.1, 23/08/2006 EP 06 119398.3, 23/08/2006 US 60/839,415

(73) Titular(es): Veterinärmedizinische Universität Wien

(72) Inventor(es): Irina Alexandrovna Lubavina, Nikolay Vladimirovich Bovin, Robert-Mathias Leiser

(74) Procurador(es): Dannemann, Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT EP2007054835 de 18/05/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/135099de 29/11/2007

(57) Resumo: PROCESSO DE DETECÇÃO PARA VÍRUS DE INFLUENZA. A presente invenção refere-se a um processo de detecção rápida de vírus da influenza e/ou de partículas de vírus que compreendem uma hemaglutinina e um componente neuraminidase, o dito processo compreendendo as etapas de: a) ligação do vírus e/ou das partículas de vírus a um suporte que contenha pelo menos um tipo de receptor de carboidrato selecionado do grupo que consiste em oligossacarídeo natural ou sintético, que esteja conjugado a ou situado na composição com glicoproteínas como glicoforina, glicoproteína de ácido al, a2-macroglobulina, ovomucóide e combinações dos mesmos cujo receptor de carboidrato se liga ao componente hemaglutinina dos vírus e/ou das partículas de vírus; b) reação do componente neuraminidase dos vírus ligados e/ou das partículas de vírus com o seu substrato enzima marcado, causando a geração de um sinal detectável e e) detecção do sinal gerado na etapa b).



PI0712023-0

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**PROCESSO DE DETECÇÃO PARA VÍRUS DE INFLUENZA**".

A presente invenção refere-se a um processo de detecção rápida para vírus de influenza e/ou de partículas de vírus que compreendem um
5 componente hemaglutinina e uma neuraminidase, o dito processo compreendendo a ligação dos vírus e/ou de partículas de vírus a um suporte por uma molécula de ligação específica, que se liga ao componente hemaglutinina dos vírus e/ou partículas de vírus que detectam os vírus ligados e/ou as
partículas de vírus por reação do componente neuraminidase com o seu
10 substrato de enzima resultando em um sinal detectável. A presente invenção refere ainda a um sistema de detecção para a detecção rápida de vírus de influenza e/ou de partículas de vírus que empregam o processo de acordo com a invenção e ao uso do sistema de detecção de acordo com a invenção.

Todos os vírus da influenza das aves (AI) são vírus da influenza
15 do tipo A na família dos vírus de *Orthomyxoviridae* e todas as cepas conhecidas de vírus da influenza A infectam aves. O vírus da influenza do tipo A é subdividido em subtipos baseados em espículas de proteínas de hemaglutinina (H) e neuraminidase (N) provenientes do núcleo central do vírus. Há 16 tipos de H e até 9 subtipos de N, que fornecem um potencial para 144 combinações diferentes de H e N.
20

A influenza aviária (também conhecida como gripe das aves, gripe aviária, gripe causada pelo vírus da influenza A, gripe do tipo A ou gripe do gênero A) é uma gripe causada por um tipo de vírus da influenza que ataca aves como hospedeiros, porém pode infectar diversas espécies de
25 mamíferos.

Uma gripe pandêmica é uma epidemia em grande escala, tal como a da gripe espanhola de 1918. A Organização Mundial de Saúde (WHO) adverte que há um risco substancial de uma gripe pandêmica dentro dos próximos anos. Um dos mais fortes candidatos é o subtipo A (H5N1) de
30 influenza aviária.

H5N1 é um tipo de vírus da influenza aviária (vírus da gripe das aves) que sofreu mutação através da derivação gênica em dúzias de varian-

tes altamente patogênicas, porém todas pertencendo atualmente ao genótipo Z do vírus da influenza aviária H5N1. O genótipo Z emergiu através da reclassificação em 2002 dos genótipos altamente patogênicos anteriores de H5N1 que surgiu primeiro na China em 1996 em aves e em Hong Kong em 1997 em seres humanos. Os vírus H5N1 provenientes de infecções humanas e os vírus aviários intimamente relacionados isolados em 2004 e 2005 pertencem a um único genótipo, freqüentemente citados como o genótipo Z.

Os subtipos da influenza aviária que foram confirmados em seres humanos, ordenados pelo número de mortes conhecidas em seres humanos, são: H1N1 que provocou a gripe espanhola, H2N2 que provocou a gripe asiática, H3N2 que provocou a gripe de Hong Kong, H5N1, H7N7, H9N2, H7N2, H7N3, H10N7.

Para que sejamos capazes de reagir rapidamente no caso de uma nova cepa de influenza que sofreu mutação e virulenta capaz de ser transmitida de ser humano para ser humano que se manifesta, requer um método teste rápido e confiável para determinar se um animal ou uma pessoa está infectado com o vírus. Os métodos de laboratório atuais para a detecção de vírus provenientes de amostras do ambiente, de animais e de pacientes são trabalhosos e consome muito tempo.

A US-B-6.503.745 descreve compostos ciclopentano e ciclopenteno fornecidos juntamente com o uso em um método para detectar o vírus da influenza. O vírus é capturado usando-se uma superfície revestida com fetuína e a detecção é realizada com um composto marcado que se liga à neuraminidase.

D.E. Noyola e outros descrevem no Journal of Clinical Microbiology, 2000, p. 1161 - 1165 com relação a contas revestidas com fetuína. A fetuína também age como um substrato para neuraminidase e a detecção é realizada usando-se aglutinação.

A US-A-2003/0129618 descreve processos e composições para a detecção de analitos que usam uma fluorescência que ocorre em material polímero em resposta à ligação de analitos aos materiais poliméricos. Em particular, a presente invenção permite a detecção pela fluorescência de re-

ações que modificam membranas e analitos responsáveis por tais modificações e para a seleção de inibidores de ação.

Todas as abordagens conhecidas e acessíveis rapidamente no local são baseadas no uso de anticorpos a epitopos virais ou em testes simples com neuraminidase (NA).

A principal desvantagem de abordagens com anticorpos baseadas em uma técnica de fluxo lateral ou outros tipos de ensaio é a instabilidade dos reagentes anticorpos. Além disso, a maioria dos ensaios imunológicos disponíveis até agora apresentam uma especificidade pela influenza A, porém não por H5N1. Adicionalmente, o uso de anticorpos inevitavelmente conduz a um aumento dos custos do ensaio.

A principal desvantagem dos testes com NA específicos para vírus da influenza consiste no substrato reagente oneroso necessário usado no estado da técnica, que devia ser parcialmente metilado.

A presente invenção resolve estes problemas providenciando um processo para a detecção rápida de vírus de influenza e/ou de partículas de vírus, um sistema de detecção que emprega o dito processo assim como o uso do dito sistema de detecção como definido nas reivindicações.

As abreviações a seguir serão usadas no relatório descritivo:
 3'SLN = Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4GlcNAc HA = hemaglutinina; HAR = reação de hemaglutinação; LOD = limite de detecção; NA = neuraminidase; TCID = dose infecciosa da cultura de tecido; tampão TN = tris-HCl 0,02 M (pH 7,2) com NaCl a 0,1 M.

De acordo com a invenção é empregado um processo de detecção rápida do vírus da influenza e/ou de partículas de vírus, o processo compreendendo as etapas de:

- a) a ligação dos vírus e/ou das partículas de vírus a um suporte que contém pelo menos um tipo de receptor de carboidrato selecionado do grupo que consiste em oligossacarídeo natural ou sintético, que é conjugado a, ou situado na composição com glicoproteínas como glicoforina, glicoproteína de ácido a1, a2-macroglobulina, ovomucóide e combinações dos mesmos cujo receptor de carboidrato se ligação compo-

nente hemaglutinina dos vírus e/ou das partículas de vírus;

- b) reação do componente neuraminidase dos vírus ligados e/ou das partículas de vírus com o seu substrato enzima marcado, causando a geração de um sinal detectável e
- 5 c) detecção do sinal gerado na etapa b).

Em particular, são detectados os vírus da influenza e/ou as partículas de vírus que compreendem todos os subtipos da influenza aviária (AI).

10 Em uma outra modalidade da invenção os vírus influenza e/ou as partículas de vírus compreendem um certo subtipo ou grupo de subtipos. O processo é adequado para detectar os vírus da influenza e/ou as partículas de vírus que compreendem uma variante altamente patogênica.

A invenção pode ser realizada em particular com um suporte que é um papel cromatográfico ou uma membrana. Tais materiais são bem-
15 conhecidos da pessoa versada na técnica. De acordo com a invenção é possível ligar covalentemente ou adsorver fisicamente o receptor de carboidrato, como citado aqui antes, ao suporte.

A invenção emprega em particular um receptor de carboidrato que contém o motivo $\alpha 2$ -3Gal. De acordo com uma modalidade da invenção
20 (abordagem "dot-blot") a ligação dos vírus e/ou das partículas de vírus é efetuada por carregamento de um vírus e/ou de amostra contendo partículas de vírus ao suporte como uma mancha. De acordo com a invenção a ligação dos vírus e/ou das partículas de vírus é efetuada por imersão de um vírus e/ou de uma amostra contendo partículas de vírus ao longo do dito suporte
25 na forma da chamada abordagem de fluxo lateral. Em uma outra modalidade da invenção um substrato de enzima marcado do componente neuraminidase é precipitado no local do vírus e/ou das partículas de vírus de ligação.

Em uma outra modalidade ainda da presente invenção o substrato da enzima é marcado com um grupo cromogênico e a reação com a
30 neuraminidase induz uma variação de cor do dito substrato da enzima. Como substratos de enzima podem ser empregados, entre outros, os seguintes derivados cromogênicos do ácido N-acetil neuramínico, em particular o 5-

bromo-4-cloro-3-indolil- α -N-acetil neuramínico. Alternativamente, a reação com a neuraminidase induz um sinal de fluorescência específico quando se empregam moléculas fluorescentes adequadas como uma marca.

O processo da invenção pode ser vantajosamente realizado com um sistema de detecção para a detecção rápida de vírus da influenza e/ou de partículas de vírus de acordo com a invenção. O sistema compreende um sistema de detecção para a detecção rápida do vírus da influenza e/ou das partículas de vírus usando-se o processo da invenção, o dito sistema compreendendo:

- a) um suporte contendo pelo menos um tipo de um receptor de carboidrato selecionado do grupo que consiste em oligossacarídeo natural ou sintético, que é conjugado a, ou situado em composição com glicoproteínas como glicoforina, glicoproteína de ácido α 1, α 2-macroglobulina, ovomucóide e combinações dos mesmos cujo receptor de carboidrato se liga ao componente hemaglutinina do vírus e/ou das partículas de vírus;
- b) um substrato de enzima marcado que reage com o componente neuraminidase, gerando desse modo um sinal detectável.

Em particular, o suporte está encerrado em uma alça de plástico com uma janela para leitura do resultado do teste com uma amostra e um controle positivo. O suporte compreende em particular pelo menos duas quantidades diferentes dos ditos aglutinantes específicos para uma estimativa semiquantitativa do teor de vírus na amostra. Em uma outra modalidade o suporte compreende pelo menos dois receptores específicos de subtipo de especificidade diferente para detecção simultânea de vírus pertencente a diferentes subtipos. O sistema de detecção da invenção serve como um recipiente para a mostra e uma unidade de transporte para testes confirmatórios como reação em cadeia com a polimerase de transcrição reversa depois de revelar a presença do vírus e/ou das partículas de vírus de especificidade procurada.

De acordo com a invenção também é reivindicado o uso de um sistema de detecção para a detecção do vírus da influenza e/ou das partículas

las de vírus em amostras de animais e/ou de seres humanos como em chu-
maços de algodão, fezes e sangue em amostras do ambiente e/ou como um
sistema de advertência precoce de surgimento de subtipos de vírus altamen-
te patogênicos.

5 A hemaglutinina (HA) e a neuraminidase (NA) estão presentes
na superfície de um vírus da influenza. A HA induz a ligação do vírus aos
receptores da célula que contém sialila, ao passo que a NA promove o aces-
so do vírus a células-alvo e facilita a liberação do vírus das células infecta-
das e dos inibidores naturais [Matrosovich, M.N., Matrosovich, T.Y., Gray, T.,
10 Roberts, N.A., Klenk, H.D. 2004: J. Virol.. 78(22) 12665-7], isto é, a HA é
agente de ligação de receptor ao passo que a NA é agente de destruição de
receptor. Uma condição importante para uma replicação eficiente do vírus é
a ação conjunta de HA e NA e para diferentes espécies a relação destas
duas atividades é diferente. O vírus da influenza isolado das aves apresenta
15 algumas características especiais. Todos os vírus da influenza aviária pos-
suem HA, que tem a maior afinidade pelas cadeias de carboidrato com ter-
minação Neu5Ac α 2-3Gal. Além disso, a sua atividade da NA é maior com-
parada aos vírus de outras origens.

 No método de detecção e no sistema de detecção de acordo
20 com a presente invenção, são usadas estas propriedades de ambos os
componentes do vírion, HA e NA, de vírus aviário. Um vírus da influenza se-
rá ligado a uma molécula de ligação específica, de preferência a uma subs-
tância que contém carboidratos sialilados e está acoplada a uma membrana,
seguido por reação com, de preferência digestão de um substrato neurami-
25 nidase que causa a formação de coloração da zona que contém o vírus so-
bre a membrana. O processo de detecção do vírus da gripe e o sistema de
acordo com a presente invenção apresentam uma variedade de vantagens
comparado aos sistemas do teste do estado da técnica: utilizando dois com-
ponentes, HA e NA, aumenta a especificidade do ensaio e permite a cons-
30 trução dos sistemas de detecção com especificidades escolhidas. Ao mesmo
tempo e em contraste com o sistemas de detecção baseados nos métodos
imunológicos, não há necessidade de uma enzima marcadora adicional para

revelar a detecção positiva, porque a própria neuraminidase viral é usada para esta finalidade.

As diferentes variantes dos tipos cuidadosamente escolhidos de moléculas receptoras de carboidrato irão coletar todos os vírus da influenza independentemente do tipo e do subtipo e são capazes de detecção específica simultânea de variantes altamente patogênicas como H5N1.

O resultado do método de detecção de acordo com a invenção pode ser obtido sem o uso de quaisquer dispositivos sofisticados.

O processo de acordo com a invenção permite a detecção do vírus da influenza dentro de 0,1 a 2 horas.

A invenção será explicada também por meio dos exemplos não limitativos a seguir.

Exemplos

Exemplo 1:

Síntese de um conjugado de poliacrilamida de 3'SLN trissacarídeo para a preparação do receptor específico de molécula de carboidrato

Uma solução de 1,7 mg (10 μ mol) de ácido poliacrílico completamente ativado com N-hidroxissuccinimida, pM ~ 1000 kDa, em 200 μ l de DMSO e 4 μ l de diisopropiletilamina foram adicionados a uma solução de 1,46 mg (2 μ mol) de 3'SLN-O(CH₂)₃NH₂ em 200 μ l de DMSO, a mistura foi mantida a 37°C durante 48 horas, 40 μ l de uma solução aquosa a 25% de amônia ou 40 μ l de etanolamina foram adicionados e a solução foi mantida durante 18 horas à temperatura ambiente seguida por cromatografia com permeação em gel em on sefarose LH, rendimento ~ 90%.

Exemplo 2:

Detecção de vírus da influenza em fluido alantóico por utilização do processo e do sistema de teste de acordo com a invenção

Exemplo-Kit:

1. Tira para teste
2. Tampão sonda tampão nº 1
3. Tampão de contraste Tampão nº 2
4. Tampão para lavagem

4. Tampão para lavagem A Tampão nº 3
5. Tampão para lavagem B Tampão nº 4
6. Tampão para Coloração Tampão nº 5
7. Tira dupla (2 fileiras com 8 cavidades) ou placa com 96 cavidades
- 5 8. Tesouras ou Bisturi
9. Pinças
10. Placa para lavagem da tira
11. Pequenos frascos de desenvolvimento
12. Termostato (ou seu substituto)
- 10 13. Câmera para procedimento de cromatografia (ou uma tampa, que é usada para cobertura da placa de 96 cavidades com tiras).

Materiais

Tiras: nitrocelulose, absorvente, bloco de amostra obtida da Whatman, USA.

- 15 1. Reagente específico (fetuína, Sigma) foi isolado de ovos de galinha frescos.
2. Tampão nº 1: tris-HCl a 0,2 M (pH 7,2) com NaCl a 3 M e 0,5% de Tween-20
3. Tampão nº 2: tris-HCl a 0,02 M (pH 7,2) com NaCl a 0,3 M e 0,05% de Tween-20
- 20 4. Tampão nº 3: tris-HCl a 0,02 M (pH 7,2) com NaCl a 0,1 M e 0,05% de Tween-20
5. Tampão nº 4: tris-HCl a 0,02 M (pH 7,2) com NaCl a 0,1 M (TN tampão)
6. Tampão nº 5: solução de Neu-X a 4 mM em tampão TN com CaCl_2 a 0,01 M

25 O tampão TN pode ser substituído por um tampão de adaptação, por exemplo, soro fisiológico ou solução salina tamponados com fosfato.

A tira (Figura 1) é dividida em três zonas: banho, zona de detecção e de absorção. Uma linha da molécula receptora de carboidrato (linha do teste) como poço como uma linha de controle está localizada na zona de detecção. As tiras estão reunidas da membrana, o absorvente e os blocos de amostra. A molécula receptora de carboidrato (1 microlitro de 1 mg/mL de solução) está carregada sobre a zona de detecção, depois que a tira for se-

ca e lavada. Então a tira é armazenada em um frasco hermeticamente fechado a 18 - 25°C.

Deteccção

1. Preparação da Amostra: 1/10 parte (volume/ volume) de tampão nº1 é
5 adicionado à sonda diretamente antes da análise e da cavidade agitado. Esta é a sonda nº1 (P nº1).

2. O Procedimento de deteção envolve diversos estágios (Tabela 1):

No primeiro estágio, o bloco de amostra da tira é colocado em 80-100 µl de P nº1. Pela ação de forças capilares o líquido proveniente da amostra, é absorvido e entra na zona de absorção pela zona de deteção na
10 qual as partículas de vírus se ligam à molécula receptora de carboidrato. A duração deste procedimento depende da viscosidade da amostra, porém não devia exceder 15 min. O Tampão nº 2 é adicionado ao mesmo poço da placa (alternativamente é possível transferir a tira para um outro poço cheio
15 com o tampão nº 2). Depois de 10 minutos a tira é retirada da cavidade.

No segundo estágio, a parte imersa da tira é cortada (com tesoura). Depois de cuidadosa remoção (por exemplo com ajuda de pinças) da zona de absorção da parte da tira, a zona de teste é lavada com tampão nº3 e então com tampão nº 4. Subseqüentemente a zona de absorção também é
20 cortada.

O terceiro estágio. O resto da zona de teste é colocado dentro do frasco com tampão nº5. O frasco é fechado firmemente e deixado em repouso no escuro a 37 - 40°C. A presença de um vírus da influenza na amostra é detectada como uma formação de coloração azul escuro da zona da molécula receptora de carboidrato. A duração desta etapa depende da
25 concentração do vírus na amostra e pode levar de 20 minutos até 60 minutos antes que um vírus possa ser detectado por reação com hemaglutinação (título de HAR aproximadamente 2). Como regra estas amostras têm um valor de TCID₅₀/ml de em torno de 10⁵. Para sondas com 10 e 100 vezes menos teor de vírus (10⁴-10³ TCID₅₀/ml), a formação de coloração pode aparecer
30 depois de várias horas. Depois deste procedimento a tira é retirada da solução seguida por avaliação visual do resultado da reação.

A linha de controle de neuraminidase na zona de detecção é usada para a avaliação da funcionalidade do ensaio. Deve ocorrer formação de coloração azul escura na zona de controle.

Os resultados são interpretados da seguinte maneira:

5 1) Se for observada uma linha colorida uniformemente, é considerado positivo, isto é, a sonda contém o vírus; a intensidade da cor devia ser comparável à intensidade da linha de controle.

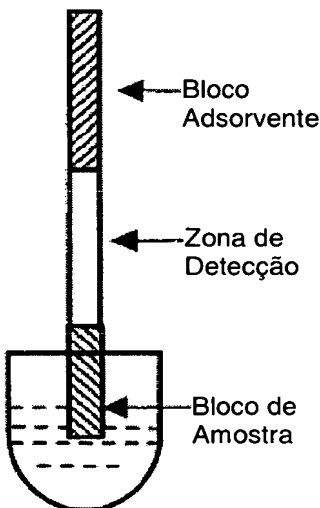
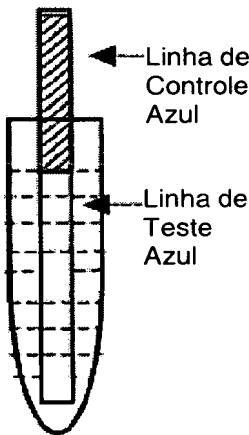
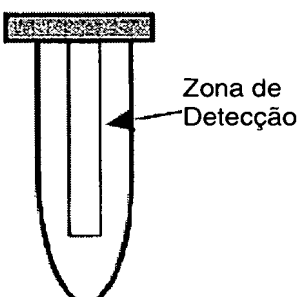
10 2) Se for observada uma linha fracamente colorida, a amostra contém o vírus em uma concentração que é insuficiente para uma detecção não-ambígua e a exposição da tira ao tampão nº5 devia ser prolongada durante toda a noite ou o teste pode ser repetido mais uma vez.

3) A ausência da linha colorida significa que não há vírus na amostra ou a sua concentração é menor do que o nível de detecção mínimo.

15 4) A ausência da linha colorida na linha de controle positivo significa que o experimento foi realizado incorretamente ou que a NA na linha de controle foi destruído; naquele caso é recomendado testar de novo o corpo de prova usando um novo kit para o teste.

Os dados sobre a sensibilidade do teste são fornecidos na tabela 2.

Tabela 1: esquema do método de detecção de acordo com a invenção

ETAPA	PROCEDIMENTO	FIGURA	CONDIÇÃO
1	Preparação pré-testagem		
2	Imersão/ cromatografia		O bloco de amostra da tira é colocado verticalmente ao recipiente da amostra durante 10 min à temperatura ambiente
3	Lavagem		Depois da remoção do bloco da amostra a parte restante da tira é colocada na solução de lavagem
4	Revelação no escuro		20 min - 2 h no escuro a 40°C em solução de substrato neuraminidase

ETAPA	PROCEDIMENTO	FIGURA	CONDIÇÃO
5	Interpretação dos resultados	 Positivo  Negativo  Inválido	Os resultados são avaliados visualmente. No caso do resultado positivo (a amostra contém vírus em conc. maior do que o limite de detecção) deviam ser observadas duas linhas. A intensidade de cor da linha teste devia ser comparável com aquela da linha de controle. No caso do resultado negativo somente a linha de controle é observada. É necessário repetir o teste quando a linha de controle não pode ser observada.

Exemplo 3:

Deteção de vírus da influenza em fezes de galinhas usando o sistema de deteção de acordo com a invenção

5 Neste exemplo foram usados os mesmos materiais e os métodos como no exemplo 2.

1. Foram realizadas diluições em série de sondas contendo vírus em suspensão de fezes de galinhas saudáveis (2 g de substância seca por 10 ml de tampão). Isto demonstrou que as fezes não afetam a sensibilidade e a especificidade de deteção do vírus da influenza com o teste.

10 2. A fezes de galinhas frescas foi adicionado 1/10 parte (volume/volume) de vírus A/pato/Alberta/76 (título HAR 1:10) e a mistura foi homogeneizada. Depois da adição do tampão nº2 ao homogenato (1:1 volume/volume), foi retirada uma alíquota da suspensão resultante para uso no ensaio. A formação de coloração azul escura na zona de teste apareceu depois de 2
15 horas. Não foi observada influência notável sobre os resultados do teste

quando foram adicionadas fezes de galinha às amostras da tabela 1 antes do início do procedimento do teste.

Exemplo 4:

Detecção de vírus da influenza em tecido do pulmão de galinhas mortas usando o sistema de detecção de acordo com a invenção

Neste exemplo foram usados os mesmos materiais e processos como no exemplo 2.

Tecido do pulmão de galinhas que morreram de infecção com vírus da influenza H5N1 foi extraído com tampão silin analisado (coletado: Criméia /Janeiro de 2006). Podia ser demonstrado que o vírus da influenza pode ser detectado confiavelmente no pulmão do corpo de galinha analisado.

Tabela 2: limite de detecção (LOD) de vírus de influenza aviária em amostras contendo vírus como sondadas com o sistema do teste de acordo com a invenção

№		LOD durante 2 h	
		TCID /ml	HAR-título/amostra
1	A/pato/Alberta/35/76 (H1N1)	10^5	4
2	A/pato/France/146/82 (H1N1)	2×10^4	10^{-2}
3	A/pintail/Primorie/695/76 (H2N3)	2×10^7	10
4	A/gaivota/Astrakhan/165/86 (H6N5)	10^3	10^{-1}
5	A/FPV/Rostock/34 (H7N1)	10^4	1
6	A/mallard/NT/12/02 (H7N3)	5×10^4	5×10^{-1}
7	A/mallard/Primorie/3/82 (H9N2)	10^6	10^{-1}
8	A/Hongkong/1073/99 (H9N2)	10^5	1
9	A/mallard/Guriev/244/82 (H14N6)	5×10^6	10^{-1}
10	A/pato mallard/PA/10218 (H5N2)	Não determinado	10^{-2}
11	A/pato/Postdam/1402/6/86 (H5N2)	5×10^2	5×10^{-1}
12	A/NIBRG-14 (H5N1) ^a	5×10^3	5

Nº		LOD durante 2 h	
		TCID /ml	HAR- título/amostra
13	A/galinha/Kurgan/5/2005 (H5N1) 2 passagens em MDCK	10^4	<1
14	A/pato/Kurgan/8/2005 (H5N1) 2 passagens em MDCK	10^6	10^{-1}

^a - Esta é cepa de vacina, que tem genes HA e NA do vírus patogênico A/Vietnam/1194/04 e todos os genes da proteína interna de A/Puerto Rico/2/34.

Os vírus foram obtidos do Institute of Poliomyelitis and Viral Encephalitis (Moscow Region) e do Institute of Influenza (St. Petersburg).

REIVINDICAÇÕES

1. Processo de detecção rápida do vírus da influenza e/ou das partículas de vírus que compreendem uma hemaglutinina e um componente neuraminidase, o dito processo compreendendo as etapas de:

- 5 a) ligação do vírus e/ou das partículas de vírus a um suporte que conte-
nha pelo menos um tipo de receptor de carboidrato selecionado do
grupo que consiste em oligossacarídeo natural ou sintético, que esteja
conjugado a ou situado na composição com glicoproteínas como glico-
forina, glicoproteína de ácido α 1, α 2-macroglobulina, ovomucóide e
10 combinações dos mesmos cujo receptor de carboidrato se liga ao com-
ponente hemaglutinina dos vírus e/ou das partículas de vírus;
- b) reação do componente neuraminidase dos vírus ligados e/ou das partí-
culas de vírus com o seu substrato de enzima marcado, causando a
geração de um sinal detectável e
- 15 c) detecção do sinal gerado na etapa b).

2. Processo de acordo com a reivindicação 1, em que o dito ví-
rus da influenza e/ou as partículas de vírus compreendem todos os subtipos
conhecidos da influenza aviária (AI).

3. Processo de acordo com a reivindicação 2, em que o dito ví-
rus da influenza e/ou as partículas de vírus compreendem um certo subtipo
20 ou um grupo de subtipos.

4. Processo de acordo com a reivindicação 2, em que o dito ví-
rus da influenza e/ou as partículas de vírus compreendem uma variante al-
tamente patogênica.

25 5. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações de
1 a 4, em que o suporte é um papel ou uma membrana para cromatografia.

6. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações de
1 a 5, em que o receptor de carboidrato está ligado covalentemente ou fisi-
camente adsorvido ao suporte.

30 7. Processo de acordo com a reivindicação 6, em que o receptor
de carboidrato contém o motivo α 2-3Gal.

8. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações de

1 a 7, em que a dita ligação do dito vírus e/ou das partículas de vírus é efetuada por carregamento de um vírus e/ou de amostra contendo partículas de vírus ao dito suporte como uma mancha (abordagem "dot-blot").

5 9. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 7, em que a dita ligação do dito vírus e/ou das partículas de vírus é efetuada por imersão de um vírus e/ou de uma amostra contendo partículas de vírus ao longo do dito suporte (abordagem de fluxo lateral).

10 10. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 9, em que o dito substrato da enzima marcado do dito componente neuraminidase é precipitado no local do vírus ligado e/ou das partículas de vírus.

15 11. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 10, em que o dito substrato da enzima é marcado com um grupo cromogênico e a reação com a neuraminidase induz uma variação de cor do dito substrato da enzima.

20 12. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 11, em que o dito substrato da enzima é um derivado cromogênico do ácido N-acetilneuramínico, em particular do ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil- α -N- acetilneuramínico.

25 13. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 12, em que a reação com a neuraminidase induz um sinal específico de fluorescência.

30 14. Sistema de detecção para a detecção rápida do vírus da influenza e/ou das partículas de vírus que usa um processo como definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 13, o dito sistema compreendendo:

a) um suporte contendo pelo menos um tipo de um receptor de carboidrato selecionado do grupo que consiste em oligossacarídeo natural ou sintético, que é conjugado a, ou situado na composição com glicoproteínas como glicoforina, glicoproteína de ácido α 1, α 2-macroglobulina, ovomucóide e combinações dos mesmos cujo receptor de carboidrato se liga ao componente hemaglutinina dos vírus e/ou das partículas de vírus;

b) um substrato enzima marcado que reage com o componente

neuraminidase, gerando desse modo um sinal detectável.

15. Sistema de detecção de acordo com a reivindicação 14, em que o dito suporte está encerrado em uma alça de plástico com uma janela para leitura do resultado do teste com uma amostra e um controle positivo.

5 16. Sistema de detecção de acordo com a reivindicação 14 e/ou 15, em que o dito suporte compreende pelo menos duas quantidades diferentes dos ditos aglutinantes específicos para uma estimativa semiquantitativa do teor de vírus na amostra.

10 17. Sistema de detecção de acordo com a reivindicação 14 e/ou 16, em que o dito suporte compreende pelo menos dois receptores específicos de especificidade de subtipo diferente para uma detecção simultânea de vírus pertencente a subtipos diferentes.

15 18. Sistema de detecção de acordo com qualquer uma das reivindicações de 16 a 17, em que o sistema depois de revelar a presença do vírus e/ou das partículas de vírus de especificidade procurada serve como recipiente para a amostra e como unidade de transporte para testes confirmatórios como reação em cadeia com a polimerase de transcrição reversa.

20 19. Uso do sistema de detecção de acordo com qualquer uma das reivindicações de 14 a 18 para detectar vírus da influenza e/ou partículas de vírus em amostras de animais e/ou de seres humanos como em chuços de algodão, fezes e sangue em amostras do ambiente e/ou como um sistema de advertência precoce de surgimento de subtipos de vírus altamente patogênicos.

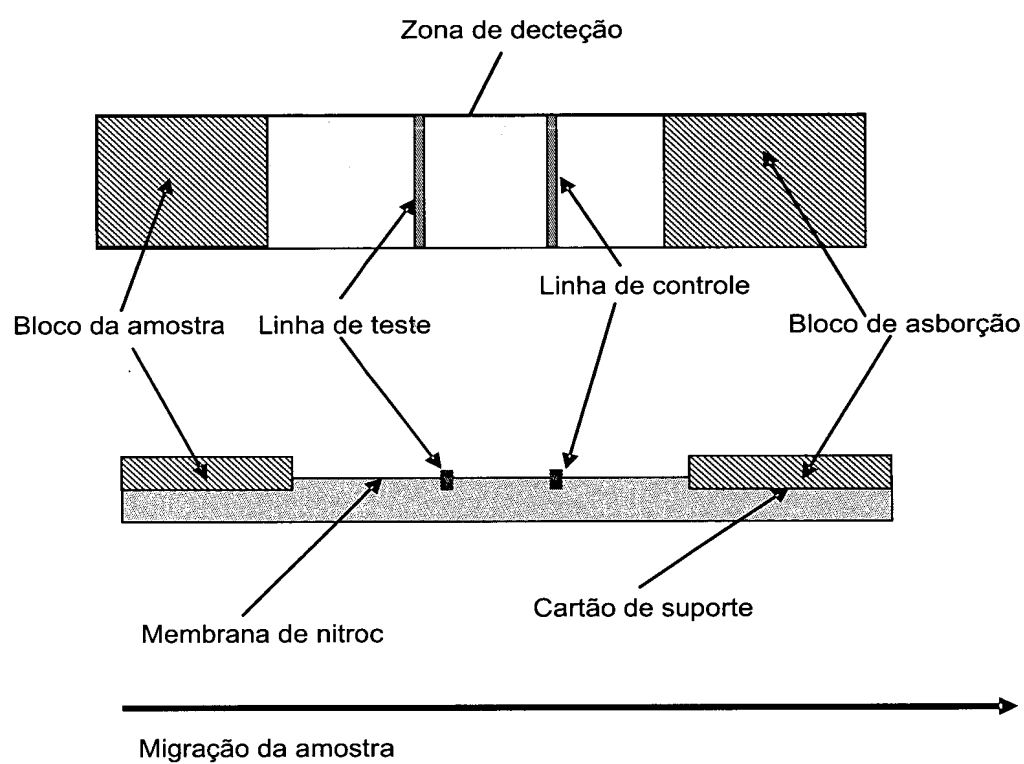


Fig.1: diagrama esquemático de uma tira para teste para um teste de fluxo lateral

RESUMO

Patente de Invenção: "PROCESSO DE DETECÇÃO PARA VÍRUS DE INFLUENZA".

5 A presente invenção refere-se a um processo de detecção rápida de vírus da influenza e/ou de partículas de vírus que compreendem uma hemaglutinina e um componente neuraminidase, o dito processo compreendendo as etapas de:

10 a) ligação do vírus e/ou das partículas de vírus a um suporte que contenha pelo menos um tipo de receptor de carboidrato selecionado do grupo que consiste em oligossacarídeo natural ou sintético, que esteja conjugado a ou situado na composição com glicoproteínas como glicoforina, glicoproteína de ácido a1, a2-macroglobulina, ovomucóide e combinações dos mesmos cujo receptor de carboidrato se liga ao componente hemaglutinina dos vírus e/ou das partículas de vírus;

15 b) reação do componente neuraminidase dos vírus ligados e/ou das partículas de vírus com o seu substrato enzima marcado, causando a geração de um sinal detectável e

c) detecção do sinal gerado na etapa b).