República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0404861-0 B1

BRPI0404861B1

(22) Data do Depósito: 05/11/2004

(45) Data de Concessão: 27/02/2020

(54) Título: MÉTODO DE EXTRAÇÃO DA IMUNOGLOBULINA A SECRETÓRIA (SIGA) A PARTIR DO LEITE MATERNO E COLOSTRO HUMANO E SEU USO CLÍNICO POR VIA ORAL

(51) Int.Cl.: C07K 16/04; A61K 39/395; A61P 37/04; A61K 35/20.

(73) Titular(es): UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - USP; FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO - FAPESP.

(72) Inventor(es): MAGDA MARIA SALES CARNEIRO SAMPAIO; SOLANGE BARROS CARBONARE; CRISTIANE BARROS CARBONARE.

(57) Resumo: "MÉTODO DE EXTRAÇÃO DA IMUNOGLOBULINA A SECRETÓRIA (SIGA) A PARTIR DO LEITE MATERNO E COLOSTRO HUMANO E SEU USO CLÍNICO POR VIA ORAL". A presente invenção refere-se a obtenção da Imunoglobulina A secretória (SIgA) extraída à partir do leite materno humano e do colostro humano, para administração via oral com indicações clínicas para casos de imunodeficiência primárias ou secundárias, imunossupressão, intoxicações, infecções por microorganismos toxigênicos ou patogênicos, além de prematuros e recém-natos com peso muito baixo visando conferir a imunização passiva a estes indivíduos; métodos de extração da SIgA de um 'pool' de leite materno humano e de colostro armazenados em Banco de Leite Humano (BLH); testes de reatividade da SIgA obtida de um 'pool' de leite materno humano e de colostro armazenados em Banco de Leite Humano (BLH).

MÉTODO DE EXTRAÇÃO DA IMUNOGLOBULINA A SECRETÓRIA (SIGA) A PARTIR DO LEITE MATERNO E COLOSTRO HUMANO E SEU USO CLÍNICO POR VIA ORAL

CAMPO DA INVENÇÃO

[001] A presente invenção tem como objetivo a obtenção da Imunoglobulina A secretória (SIgA) extraída a partir do leite materno humano e do colostro humano, para administração via oral com indicações clínicas para casos de imunodeficiência primárias ou secundárias, imunossupressão, intoxicações, infecções por microorganismos toxigênicos ou patogênicos, além de prematuros e recém-natos com peso muito baixo visando conferir a imunização passiva a estes indivíduos; métodos de extração da SIgA de um "pool" de leite materno humano e de colostro armazenados em Banco de Leite Humano (BLH); testes de reatividade da SIgA obtida de um "pool" de leite materno humano e de colostro armazenados em Banco de Leite Humano (BLH).

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[002] O colostro e leite materno produzem uma imunização passiva local ao recém-nascido, uma vez que os anticorpos presentes no colostro e leite não são absorvidos pelo intestino e sim conferem uma proteção de contato nas superfícies mucosas através da neutralização de vírus ou fatores de virulência e inibem a aderência de bactérias e outros patógenos microbianos (Goldman e col., 1985)

[003] A imunoglobulina presente em maiores concentrações no colostro e leite humano é a IgA secretória, SIgA (Hanson, 1985). O leite humano contém anticorpos SIgA para uma série de bactérias patogênicas, vírus, fungos, parasitas e antígenos provenientes dos alimentos (Goldman e col., 1985;

Rahman e col., 1987). Estes anticorpos, em adição com outros componentes do leite como lactoferrina e lisozima, contribuem para a defesa do lactente (Goldblum & Goldman, 1994; Hanson, 1985). Além disso, o leite humano estimula precocemente a produção de SIgA nos tratos urinário e gastrointestinal do lactente, acelerando o desenvolvimento da atividade local de defesa (Koutras & Vigorita, 1989; Prentice, 1987).

[004] A SIgA apresenta uma estrutura adaptada à sua função no ambiente em que atua. É produzida por plasmócitos da lâmina própria das mucosas como um dímero, cujas subunidades são interligadas pela porção Fc à cadeia polipeptídica J (de "joining"). Na sua passagem pela célula epitelial, liga-se a um receptor que é secretado juntamente com a imunoglobulina na superfície mucosa, o componente secretor (CS), que aumenta sua resistência à digestão por enzimas proteolíticas e a alterações de pH (Underdown & Schiff, 1986).

[005] A ação principal dos anticorpos SIgA é se ligar a macromoléculas e microrganismos, impedindo sua aderência às superfícies mucosas, prevenindo assim o contato de patógenos com o epitélio (Mazanec e col., 1993). A SIgA promove a aglutinação de microrganismos, facilitando sua eliminação pelos mecanismos inespecíficos de proteção das mucosas como ligação ao muco, movimentos ciliar e peristáltico (Williams & Gibbons, 1972). SIgA pode se ligar a microrganismos tanto pela porção Fab, pelo sítio de combinação com o antígeno, como também pelas cadeias laterais de oligossacarídeos, ricas em manose, que apresentam afinidade com adesinas bacterianas como fímbria tipo I de *Escherichia coli* (Wold e col., 1990).

[006] Além de agir nas superfícies externas das mucosas, a SIgA pode também neutralizar antígenos, partículas virais e outros microrganismos intracelulares que conseguiram penetrar nas células epiteliais e na lâmina própria, promovendo sua eliminação durante sua absorção (Mazanec e col.,1993).

[007] Existem diferentes situações patológicas em que os pacientes necessitam da administração passiva de anticorpos, como por exemplo, nos casos de imunodeficiências primárias ou secundárias, em portadores do vírus da imunodeficiência adquirida (AIDS); em indivíduos imunossuprimidos, como o caso de transplantados, nos casos de acidentes com toxinas ou infecções por microrganismos toxigênicos e em alguns casos de infecções agudas, tanto por causa bacteriana como viral.

[008] Na maioria destas situações já existem procedimentos consagrados pela prática clínica como apropriados, que é a administração de preparações de imunoglobulinas séricas ou soros hiperimunes por via parenteral, provendo assim ao paciente uma imunização passiva sistêmica. No entanto, este procedimento não é bem sucedido nos casos em que seria necessária uma melhor proteção das superfícies mucosas, uma vez que, no homem, a administração parenteral de imunoglobulinas não possibilita a transferência em quantidades significativas de anticorpos séricos para as superfícies mucosas (Renegar e col., 1999).

[009] Na literatura, existem muitos estudos da transferência passiva de imunidade com a finalidade de proteger as superfícies mucosas, seja em modelos animais ou na espécie humana, que podem ser classificados em duas categorias. No primeiro, estudos em que os anticorpos são introduzidos por

via mucosa, combinados com o patógeno ou antes de um desafio do hospedeiro com o mesmo patógeno. No segundo, estudos da administração sistêmica de IgA polimérica a qual deverá ser transportada fisiologicamente até o sítio de atividade através do mecanismo mediado pelo componente secretor (Renegar e col., 1999).

[010] A utilização de imunoglobulinas de colostro ou leite hiperimune, obtidas de vacas, é muito estudada e a eficácia de sua utilização está sendo comprovada para o tratamento de diversas patologias. Nestes estudos, os autores imunizam vacas grávidas com diferentes patógenos, desafiam animais com estes e administram as imunoglobulinas obtidas do colostro ou leite hiperimune nos animais, verificando assim a proteção aos respectivos microorganismos. A utilização deste material é vantajosa, no sentido de poder ser obtido com facilidade e em grandes quantidades, entretanto, no caso dos bovinos, a imunoglobulina predominante no colostro e leite é IgG, diferentemente do colostro humano, rico em IgA.

[011] Imunoglobulinas humanas estão sendo usadas na terapêutica de diversas doenças, com administração sistêmica ou até mesmo oral, entretanto estas imunoglobulinas são de origem sérica.

[012] A possibilidade de terapia através da administração passiva de anticorpos IgA por via parenteral é questionada por dois motivos principais: o baixo transporte da IgA do soro para as superfícies mucosas e as possíveis consequências da administração sistêmica de IgA polimérica. Com relação ao primeiro ponto, sabe-se que na espécie humana as imunoglobulinas secretórias têm sua origem principal na produção local por plasmócitos localizados na lâmina própria

e transportadas via receptor pela imunoglobulina polimérica (pIgR) através das células epiteliais atingindo a luz da mucosa, sendo que é praticamente desprezível a passagem de imunoglobulinas séricas para a superfícies mucosas (Renegar e col., 1999). Com relação aos efeitos adversos da administração intravenosa de anticorpos IgA, existem indicações de que a administração de IgA sérica parece estar associada com o decréscimo da ativação do complemento e da lise imune e que a administração sistêmica de IgA polimérica também suprime tanto a resposta humoral específica como a celular. Portanto, é preciso que o papel da IgA em nível sistêmico seja melhor compreendido para que possa ser usada e aceita como terapia de transferência intravenosa de imunidade passiva em humanos. Entretanto, a aplicação oral ou respiratória direta de anticorpos em superfícies mucosas é praticada e aceitável (Renegar e col., 1999).

[013] A utilização de SIgA é adequada na imunização passiva por via mucosa, uma vez que esta é totalmente adaptada para exercer sua função neste ambiente. A SIgA possui uma ação antiinfecciosa não indutora de reação inflamatória, é mais resistente que outras imunoglobulinas à ação de enzimas e a alterações de pH (Underdown & Schiff, 1986). Sua estrutura permite atuar nas superfícies externas das mucosas, promovendo a exclusão antigênica (Goldman, 1993; Mazanec e col., 1993).

[014] Na literatura já foi relatado o uso de colostro e leite humanos na imunização passiva para uso humano ou em modelos animais, bem como o uso de colostro e leite animais na profilaxia e terapêutica em modelos animais, e em veterinária. Entretanto, não é relatada na literatura a

utilização de IgA secretória de colostro e leite humano para a administração por via oral em humanos, o que seria o ideal para a imunização passiva dos indivíduos que necessitam deste tipo de terapia.

[015] Existem relatos da utilização do colostro e leite humano como terapêutica, entretanto a obtenção destes materiais é restrita aos bancos de leite. A quantidade de colostro coletado nestes locais é limitada e em geral são administrados a recém-nascidos de alto risco. A manutenção do colostro e do leite coletados exige cuidados especiais como pasteurização e resfriamento adequado, sendo necessário um controle de qualidade rígido para avaliar a eventual contaminação com vírus e bactérias.

[016] A obtenção de imunoglobulinas purificadas do colostro e leite possibilita a utilização de um material onde estariam controladas as concentrações, a atividade de anticorpos destas imunoglobulinas bem como a ausência de contaminantes microbianos.

[017] Também são encontrados na literatura vários métodos descritos para o isolamento de imunoglobulinas séricas, mas são poucos os relatos de isolamento de imunoglobulinas do colostro e leite humano.

[018] Um dos métodos mais antigos de isolamento de fatores do soro, incluindo as imunoglobulinas séricas é o fracionamento de Cohn que se baseia na precipitação alcoólica (Cohn e col., 1946). As gamaglobulinas comumente usadas na clínica são ainda hoje isoladas do soro através desta técnica.

[019] Stelos, 1967; Vassilev & Veleva, em 1996 desenvolveram um método de precipitação de proteínas que utiliza o sulfato

de amônio, sendo muito difundido e apresenta variações, podendo o sulfato de amônio ser empregado na forma de sal ou em solução saturada. É um método de precipitação seletiva de proteínas onde se trabalha com a concentração de sulfato de amônio adicionado ao produto o qual quer se precipitar uma dada proteína.

[020] Mais recentemente são descritos alguns métodos para isolamento de IgA utilizando, cromatografia de troca iônica, de afinidade e através de filtração em gel tiofílico (T-gel) (Hutchens e col., 1989) que se baseiam na passagem do produto do qual se quer isolar a imunoglobulina e posterior eluição da mesma da coluna.

[021] Os procedimentos de preparação de imunoglobulinas por si só já propiciam a inativação de muitos microorganismos. A pasteurização também inativa contaminantes bacterianos. Existem vários procedimentos indicados para a eliminação de contaminantes virais: através de filtração em membranas de baixa porosidade, por tratamentos com detergentes e outros produtos químicos, por luz ultravioleta ou calor.

[022] Relatos literários com o intuito de prevenir infecções agudas e enterite necrotizante a utilização de colostro fresco e leite humanos na imunização passiva para uso humano (Svirsky-Gross, 1958; Coello-Ramirez e col., 1977; Jasso-Gutierrez & Olivos Fernandez, 1980; Saha e col., 1990) ou em modelos animais (Maxson e col., 1996; Czinn e col., 1993). Entretanto, não estão disponíveis na literatura relatos da utilização de SIgA isoladas de colostro ou leite humano para a administração via oral em humanos, o que seria o mais indicado para a imunização passiva de indivíduos que necessitam deste tipo de terapia.

[023] Outros trabalhos que utilizaram imunoglobulinas humanas isoladas se tratam de preparações obtidas de plasma sanguíneo como a IgAbulim (100mg proteína/mL, Immuno, Viena) que contém cerca de 73% de IgA e 26% de IgG (IgA-IgG) (Eibl e col., 1988; Hammarström e col., 1993; Tjellström e col., 1993).

[024] Situação semelhante ocorre em relação à reposição de IgG em portadores de imunodeficiências primárias. A elevação de níveis séricos a 400-500mg% e o controle da sintomatologia são suficientes para indicar que a dosagem administrada está sendo adequada. Não se pretende alcançar níveis de IgG "normais", ou seja entre 800-1200mg%.

[025] A quantidade de preparação e a frequência com que deve ser administrada requer estudos adicionais. Um ponto de partida para estes estudos poderia ser a dosagem utilizada por Jasso-Gutierrez & Olivos Fernandez (1980) que obtiveram bons resultados na prevenção de diarréias infecciosas e enterocolite necrotizante em berçários utilizando 5mL de colostro/kg/dia podemos inferir que foi dado em torno de 50 a 60 mg de IgA/Kg/dia para as crianças.

[026] O uso da preparação de IgA seria indicado a pacientes imunodeficientes nos casos de agamaglobulinemia, hipogamaglobulinemia e AIDS, com infecções intestinais, sendo que a preparação poderia ser administrada durante a fase mais crítica da doença infecciosa, sempre associada com a terapia específica.

[027] O pedido de patente US2002/0182243 publicado em 05/12/2002 referente a um método para produção de produtos nutricionais à partir do leite humano e composições relacionadas, reivindica uma bebida feita à partir do leite

materno humano enriquecido com nutrientes resistentes ao calor; não mencionando nada a respeito de técnicas de isolamento, extração ou obtenção da SIgA obtida à partir do leite materno e colostro humano, conforme um dos objetivos desta invenção.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[028] Figura 1: Fluxograma do processamento dos "pools" de leite materno e colostro humano para a retirada dos componentes não desejados do leite materno e do colostro humano.

[029] Figura 2: Fluxograma da precipitação salina dos "pools" de leite materno e colostro humano para isolamento das preparações contendo SIgA.

[030] Figura 3: Fluxograma da precipitação alcoólica dos "pools" de leite materno e colostro humano para isolamento das preparações contendo SIgA.

[031] Figura 4: Fluxograma da preparação da coluna de afinidade.

[032] Figura 5: Fluxograma para isolamento das preparações contendo SIgA dos "pools" de leite materno e colostro humano através de gel-tiofílico.

[033] Figura 6: Esquema de placa do ensaio TObi-test para detecção de anticorpos antidiftérico nas preparações de leite materno e colostro humano.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[034] Um desenvolvimento da presente invenção é um método de extração da Imunoglobulina A secretória (SIgA) a partir de leite materno e colostro humanos para uso clinico via oral em pacientes apresentando diferentes situações patológicas em que necessitem a administração passiva de

anticorpos, como por exemplo, nos casos de imunodeficiências primárias ou secundárias, em portadores do vírus da imunodeficiência adquirida (AIDS); em indivíduos imunossuprimidos, como o caso de transplantados, nos casos de acidentes com toxinas ou infecções por microrganismos toxigênicos e em alguns casos de infecções agudas, tanto por causa bacteriana como viral.

[035] Um método para testar a atividade da SIgA obtida de acordo com os demais desenvolvimentos da presente invenção, com microorganismos toxigênicos e/ou patogênicos é também um desenvolvimento desta invenção.

[036] Atualmente existem no mercado inúmeras preparações de gamaglobulinas à base de IgG, para uso endovenoso, intramuscular ou subcutânea, que são indicadas fundamentalmente para a reposição de anticorpos séricos em portadores de imunodeficiências primárias e secundárias e também em certos casos de doenças de caráter auto-imune. Entretanto, para determinadas manifestações clínicas, sobretudo ligadas ao trato gastrointestinal, a administração parenteral de IgG não traz benefícios significativos, dado que a transudação de imunoglobulinas séricas para as mucosas é limitada e que a IgG, por suas próprias características biológicas, não está adaptada para agir em ambientes de mucosas. Desta maneira, o desenvolvimento de preparações à base de IgA secretora representa uma necessidade clínica neste momento, em que cada vez mais se identificam novos casos de imunodeficiências e em que existem grandes esforços no sentido de garantir a viabilidade de prematuros de muito baixo peso.

[037] Para atingir nosso objetivo, foram desenvolvidos "pools" de leite materno e de colostro humano, de onde extraímos as imunoglobulinas através de diferentes métodos. A análise dos resultados desta etapa de padronização permitiu a escolha do método de extração que apresentava o melhor rendimento, maior pureza das imunoglobulinas cujas características biológicas de anticorpo foram preservadas.

[038] Todos os métodos de obtenção de SIgA a partir de "pools" de colostro ou leite produziram preparações que apresentaram algum grau de perda no conteúdo de IgA, entretanto os teste imunológicos revelaram a alta reatividade de IgA para várias bactérias em todas as preparações bem como altos níveis de anticorpos anti-EPEC e atividade neutralizante para toxinas tetânica e diftérica. Apesar das reduções observadas tanto nas dosagens de IgA, como nos títulos de anticorpos anti-EPEC, através dos testes de "immunoblotting" foi verificada a manutenção da capacidade de reconhecimento antigênico de EPEC (*E. coli*) e EIEC (*E. coli* enterotoxigênica). Os testes de inibição da adesão de EPEC a células humanas mostraram que a capacidade da SIgA em bloquear a adesão se manteve inalterada em praticamente todas as amostras, nos mesmos níveis observados nas amostras sem tratamento, bem como com relação aos pools originais.

[039] As amostras de colostro e leite materno humano poderão ser obtidas de puérperas clinicamente sadias através de Bancos de Leite Humano (BLH). Os critérios para a escolha das doadoras são: idade da mãe entre 20 a 35 anos, ausência de doenças sistêmicas como diabetes ou hipertensão, reações sorológicas negativas para hepatite, HIV e sífilis, idade gestacional entre 38 a 42 semanas, recém-nascido com peso

acima de 2500g e sem anormalidades clínicas.

[040] As mães são consultadas sobre a disposição em doar uma amostra do colostro ou leite materno humano. A coleta pode ser feita por ordenha manual, no intervalo entre duas mamadas. Somente são coletadas amostras de mães que estejam amamentando seus bebês exclusivamente ao peito, com bom ganho pondero-estatural, priorizando-se assim o bem estar da criança.

[041] As amostras de leite materno e colostro humano podem ser aquelas rejeitadas pelo BLH devido ao baixo índice de crematócrito e, portanto com baixo teor de gordura e conteúdo energético ou então aquelas que estão a mais de 6 meses estocadas a temperaturas entre -4 a -20°C que já não são próprias para a utilização através do BLH, entretanto em condições de isolamento da SIgA.

[042] As amostras de leite materno e colostro humano são misturadas para formação de "pools" e segue-se com as etapas de iniciais e preparatórias do método de obtenção da imunoglobulina, onde são retirados componentes indesejados do "pool" de leite materno e colostro humano, taís como, lipídeos e algumas proteínas lácteas.

[043] Os "pools" de leite e colostro devem ser centrifugados entre 1.800 a 3.000g durante um intervalo de tempo nunca inferior a 15 minutos ou superior a 50 minutos numa temperatura de 1 a 20°C seguido da separação cuidadosa das fases líquidas com o auxílio de um pipeta Pasteur, conforme a figura 1.

[044] A remoção dos componentes indesejados do "pool" de leite materno e colostro humano é realizada através da acidificação das fases líquidas obtidas pela adição de ácido

orgânico, tal como: ácido cítrico, ácido acético, ácido lático, dentre outros, conforme figura 1. A acidificação deve ser realizada simultaneamente a uma constante homogeneização do material. O pH deve ser monitorado até atingir um limite entre 3,0 a 6,0. Posteriormente os "pools" devem ser mantidos em repouso entre 0,5 a 4 horas sob refrigeração.

[045] Após o repouso, os "pools" devem ser centrifugados entre 10.000g a 20.000g durante por um período máximo de 60 minutos sob refrigeração. Os soros de colostro e leite materno humano assim obtido são então submetidos a uma etapa de filtração das fases líquidas em um dentre os seguintes métodos de filtração: filtração por papel de filtro, filtração por membrana filtrante, filtração por carvão ativado. A etapa de filtração pode ainda ser realizada sob ação da gravidade ou pressão, e o pH deve ser ajustado entre 5,0 a 9,0. Após filtração os soros de colostro e leite materno humano assim obtidos, devem ser armazenados a uma temperatura entre -10 a -80°C.

[046] Após as etapas acima descritas, a SIgA foi obtida por diferentes métodos, dentre os quais: precipitação sulfato de amônio, precipitação alcoólica, métodos cromatográficos dentre outros; posteriormente devem ser empregados procedimentos para a analise da reatividade e atividade das preparações obtidas, a fim de verificar a manutenção das características biológicas de anticorpo dirigidas a antígenos bacterianos ou virais.

[047] O sulfato de amônio pode ser utilizado na forma de uma solução líquida saturada ou na forma de um sal sólido, e os álcoois empregados podem ser álcoois alifáticas de cadeia

curta, podendo apresentar ramificação lateral ou não com saturação ou insaturação entre os átomos de carbono.

[048] Após a obtenção de "pools" de colostro e leite materno humano, os mesmos são processados para remoção de substâncias não desejadas do colostro e do leite materno humano. Dentre as substâncias não desejadas encontram-se lipídeos e proteínas láticas como a caseína, e obtenção de soro do "pool" de colostro e leite materno humano. Os soros dos "pools" de leite materno e colostro humano são submetidos a duas precipitações por supersaturação de sal. A precipitação de imunoglobulinas do leite e colostro no qual a concentração de sulfato de amônio a ser adicionada ao colostro ou leite materno humano foi estabelecida de acordo com a proteína em questão. Podendo ser empregado sulfato de amônio na forma de sais sólidos ou em solução, sendo a precipitação equivalente em sua metodologia, diferenciando apenas no estado líquido ou sólido do material, vide figura 2.

[049] A precipitação procede-se com a adição de quantidades crescentes de sulfato de amônio até ser atingida uma concentração final de 30 a 70% da saturação realizada com homogeneização constante da mistura de soro e sal.

[050] Após a precipitação, as misturas devem ser deixadas em repouso por longos períodos entre 12 a 36 horas a uma temperatura compreendida entre 0 a 20°C, e em seguida, cada material deve ser submetido a centrifugação entre 5.000 a 9.000g durante um período compreendido entre 30 a 60 minutos a uma temperatura compreendida entre 0 a 20°C. São obtidos desta forma precipitados contendo SIgA, e os sobrenadantes contendo outras proteínas lácteas.

[051] Os precipitados contendo SIgA são posteriormente

ressuspendidos utilizando-se para isso tampão fosfato salino entre 0,1 a 1,5% de sal, para posterior diálise por um período nunca menor que 24 horas ou maior que 5 dias em solução dializadora (solução de salina sódica de concentração entre 0,1 a 1,5%) a uma temperatura entre 0 a 20°C, com trocas periódicas da solução salina dializadora. Os materiais dialisados, são as preparações contendo SIgA e devem ser guardados a temperatura baixíssima entre -10 a -80°C para análises posteriores.

[052] Uma outra metodologia de obtenção da SIgA desenvolvida foi a precipitação alcoólica, pela adição de álcoois alifáticos simples de cadeia curta podendo apresentar cadeias saturadas ou insaturadas, ramificadas ou não; adaptada da metodologia descrita por Cohn e col. (1946) que se baseia na precipitação gradual das proteínas pela adição de álcool, conforme figura 3.

[053] Inicialmente é feita uma diluição entre 1:1 a 1:8 do material a ser precipitado em água destilada ou água deionizada. O pH deve ser mantido entre 7,0 e 9,0 e as misturas resfriadas a uma temperatura de mínima de -4 e máxima de 10°C. Em seguida deve-se adicionar o álcool numa concentração entre 10 a 70%, à temperatura entre -4 a -80°C, até a obtenção de uma concentração final, nas misturas, entre 10 a 50% de saturação alcoólica. A adição do álcool deve ser realizada vagarosamente com agitação vigorosa. Todos os procedimentos devem ser realizados em ambientes em que a temperatura das misturas permanecesse entre -5 e -6°C. Após a completa adição do álcool, procede-se uma centrifugação entre 3.000 a 10.000g durante no máximo 60 minutos a uma temperatura entre -4 a -80°C da qual se obtém

o precipitado contendo SIgA e o sobrenadante contendo outras proteínas lácteas.

[054] O precipitado contendo SIgA obtido é então ressuspendido em solução salina entre 0,1 e 1,5%, deve ser colocados em diálise por um período nunca menor que 24 horas ou maior que 5 dias em solução dializadora (solução de salina sódica entre 0,1 e 1,5%) a uma temperatura entre 0 a 20°C com trocas periódicas da solução salina dializadora. O material dialisado, é a preparação final de SIgA e deve ser guardado a uma temperatura entre -4 e -80°C para análises posteriores.

[055] Técnicas cromatográficas tais como, cromatografia de troca-iônica, cromatografia de afinidade, cromatografia por gel filtração podem ser empregadas no isolamento da SIgA. Uma adaptação da metodologia descrita por Hutchens e col. (1989), é mais um dos desenvolvimentos obtidos, e se baseia na purificação imunoglobulinas, preferencialmente, por afinidade a uma coluna de gel tiofílico com a posterior eluição das mesmas com tampão apropriado.

[056] A coluna de afinidade é preparada com gel tiofílico, lavado com tampão apropriado que contém carbonato de sódio, em pH moderadamente básico e posteriormente pesada, considerando o peso úmido. O gel tiofílico é então ressuspendido em tampão carbonato de sódio, em pH moderadamente básico e divinil sulfona, sendo posteriormente incubado durante um período mínimo de 12 e máximo de 36 horas a temperatura entre 10 e 35oC sob agitação. Decorrido este procedimento, o gel é lavado com água destilada e, seco através de técnicas dentre as: filtração por sucção, ou por troca de calor, e posteriormente ressuspendido em tampão

contendo bicarbonato de sódio em pH básico com a adição de β-mercaptoetanol. Seguido de outra incubação do gel durante um período mínimo de 12 e máximo de 36 horas a temperatura entre 10 e 35oC sob agitação. No dia seguinte lavar o gel com água destilada, ou deionizada para a retirada do excesso de β-mercaptoetanol e então armazenado semi-seco a temperatura baixa entre 0 e 10oC até o uso.

[057] Os soros de colostro e leite maternos humano, obtidos através dos processos de remoção de componentes indesejados do leite materno ou colostro humano, foram preparados para a passagem pela coluna de afinidade através da adição de sulfato de amônio contendo entre 5 e 25% peso/volume e tampão cloreto de sódio com o pH da mistura ajustado entre pH 7,0 e 14, conforme figura 5.

[058] A coluna de afinidade de gel tiofílico foi equilibrado com tampão de equilíbrio (HEPES entre 5 a 50mM, pH levemente básico adicionado de sulfato de amônio entre 5 a 50% e cloreto de sódio entre 0,1 e 1,5M), seguida de posterior aplicação da amostra contendo soro de colostro ou leite materno humano. A partir da colocação da amostra coluna é lavada e as amostras são coletadas em pequenas frações uma a uma em tubos, que a partir deste momento serão denominadas simplesmente de tubos, e a presença de proteínas nos tubos é então monitorada por densidade óptica (DO), através de leitura em luz U.V. em comprimento de onda conhecido do estado da técnica, durante todo o procedimento. A coluna é lavada com tampão de equilíbrio e, após a estabilização da DO em patamar próximo a zero, colocar o tampão HEPES entre 5 a 50mM, pH levemente básico, adicionado de cloreto de sódio entre 0,1 e 1,5M para eluir as proteínas absorvidas devido

à remoção do sulfato de amônio. Após o equilíbrio das leituras de D.O., lavar a coluna com tampão etileno glicol (entre 20 e 70%) em HEPES entre 5 a 50mM, pH levemente básico para a remoção total das proteínas da coluna. A analise dos tubos é realizada por imunodifusão dupla contra anticorpo anti-IgA, para detecção de IgA.

[059] Através da análise dos gráficos das leituras de D.O., juntar os tubos contendo as amostras correspondentes a SIgA, nas diferentes frações. Todas as frações devem ser concentradas e posteriormente dialisadas em solução dializadora (salina sódica entre 0,1 e 1,5%) durante o período entre 24 horas e 5 dias com trocas diárias da solução dializadora, a uma temperatura entre 0 e 20oC e dividida em alíquotas para análises posteriores.

[060] As preparações contendo SIgA, obtidas com os diferentes métodos desenvolvidos, são submetidas a análise da avaliação do rendimento, pureza e presença de contaminantes. Seguido de testes para a avaliação da reatividade dos anticorpos isolados para vários microrganismos bem como a avaliação da atividade biológica dos mesmos. Foram também realizados testes para a descontaminação microbiana das preparações, através de técnicas não limitadas a pasteurizações, filtração e esterilização por luz U.V., e posterior verificação da contaminação das preparações por microorganismos patogênicos, tais como bactérias e vírus HIV-1 e HCV.

[061] Os produtos intermediários e finais são submetidos à quantificação de proteínas totais por métodos descritos no estado da arte, para detecção das frações protéicas presentes e imunodifusão radial através de técnicas descritas no estado

da arte para determinação da concentração de IgA.

[062] As diferentes preparações foram submetidas a testes de imunodifusão radial quantitativa realizados por adaptações à técnica descrita por Mancini e col. (1965). Uma padronização prévia da concentração de anti-SIgA incorporada na agarose foi realizada, sendo as amostras com baixa concentração de IgA aplicadas em "placa Low" contendo agarose entre 0,2 e 2% de concentração.

[063] Após a fusão de agarose entre 0,2 e 2% de concentração, a temperatura era estabilizada para a realização de banho-maria entre 42 e 65°C, onde foram adicionados anti-IgA. Subsequentemente a agarose é espalhada em placas de vidro e mantidas em temperaturas entre 0 a 8°C. Após a solidificação, são perfurados os poços para a aplicação das amostras em diluição apropriada e de IgA padrão de uma concentração conhecida, em diluições diferentes para obtenção de curva padrão. Em todas as placas foi colocado um "pool" de soro humano com concentração de IgA conhecida que foi anteriormente utilizado como controle.

[064] As placas são incubadas em câmara úmida, à temperatura ambiente, por um período entre 12 e 96 horas, com períodos diferenciados para ambas as placas, com sucessiva leitura dos diâmetros dos halos de precipitação obtidos.

[065] Extratos das amostras foram preparadas de acordo com a concentração protéica total determinada para a realização de uma eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). As amostras são então diluídas em tampão de amostra contendo de 1 a 10% de SDS suficiente para que a concentração final de proteína fique em torno de 0,1 e 5µg de proteína por µL de tampão de amostra. Foi adicionado à

mistura β-mercaptoetanol e azul de bromofenol, e a mistura é fervida durante um período entre 3 e 60 minutos.

[066] Para a realização do SDS-PAGE em gel não redutor, as amostras foram preparadas com tampão de amostra sem a adição de β-mercaptoetanol e a mistura é aquecida numa temperatura entre 45 e 80°C durante um período entre 3 e 60 minutos.

[067] O SDS-PAGE foi realizado em gel de acrilamida 3 a 15%, sendo utilizado como padrão de massa molar um padrão comercialmente disponível, ou produzido em pelo próprio laboratório, contendo massas molares conhecidas.

[068] As eletroforeses são realizadas com voltagem constante entre 60 e 220V e corrente variável por um mínimo de 30 e um máximo de 120 minutos, até a linha de frente do corante azul de bromofenol chegar ao final do gel. Para a análise das proteínas ou de antígenos, os géis são corados com nitrato de prata, azul brilhante de Coomassie ou corante schiff-ácido periódico, ou qualquer outro método descrito pelo estado da técnica. Os géis, não corados, são utilizados para a avaliação da reatividade dos anticorpos.

[069] A avaliação da reatividade dos anticorpos obtidos foi verificada através de testes de "immunoblotting" (IB) com preparações antigênicas totais (extratos brutos) de diferentes linhagens bacterianas; e da técnica de ELISA para determinação de IgA específica para EPEC.

[070] Nas avaliações da reatividade são utilizadas diferentes linhagens bacterianas dentre as quais, mas não limitadas as linhagens de: E. coli 0111:H-, eae+, eaf+ e bfp+ (EPEC); E. coli produtora de Shiga toxina, O111ac:H- produtora de Stx1 (STEC); E. coli enterotoxigênica (ETEC); E. coli enteroinvasora O28ac:H- (EIEC); Salmonella typhimurium;

Streptococus pneumoniae; Haemophilus influenzae, com o objetivo de identificar a presença de reatividade das imunoglobulinas isoladas contra os microorganismos testados.

[071] As preparações antigênicas das linhagens utilizadas neste trabalho foram feitas a partir de culturas crescidas durante de 12 a 20 horas em meio de cultura adequado, descritos no estado da técnica, dentre os quais podemos citar TSB, LB, SOB e SOC. As culturas são centrifugadas entre 1.000 a 4.000g por um período entre 5 a 40 minutos, e ressuspendidas em tampão fosfato salino (PBS), ou água destilada ou água deionizada, para se obter a quantificação do número de bactérias presentes no meio de cultura, por leitura óptica realizada em espectrofotômetro. O comprimento de onda ideal para a realização da leitura e, a quantidade ideal de bactérias/ml de cultura é conhecida do estado da técnica. As suspensões bacterianas são então distribuídas em tubos plástico de 1,5ml e, centrifugadas entre 10.000 e 40.000g entre 2 a 15 minutos em centrífugas adequadas. Os sobrenadantes são descartados e as bactérias ressuspendidas em volume adequado de tampão de amostra contendo entre 1 e 10% de SDS , e β-mercaptoetanol (1 a 10% do v/v) e de azul de bromofenol (entre 1 a 10% v/v), e as misturas são aquecidas entre 60 e 150°C por 5 a 50 minutos.

[072] Adaptações à técnica de “immunoblotting” (IB) descrita por Carbonare e colaboradores em 2003 foram realizadas, sendo os testes de reatividade realizados deste modo, conforme descrição à seguir. Onde, a partir de um gel de SDS-PAGE é preparado um "sanduíche" contendo papéis de filtro, gel não corado e uma folha de uma membrana de nitrocelulose embebidos em tampão adequado. A transferência em sistema semi-seco

fixando em voltagem entre 10 e 25 volts pelo período máximo de 90 minutos.

[073] Após a transferência, a membrana de nitrocelulose é então corada com corante específico para proteínas, tal como, mas não limitado ao vermelho Ponceau S e cortada em tiras ou deixadas inteiras, dependendo do teste a ser realizado e, bloqueadas com leite desnatado, as amostras são então adicionadas na diluição apropriada, de acordo com as dosagens de IgA obtidas conforme anteriormente descrito. A incubação é realizada durante 12 - 24 horas à temperatura ambiente, sob agitação constante.

[074] Após a incubação, uma lavagem com tampão contendo tris, tampão fosfato salino (0,01mM a 1M) e tween (0,5 a 5%), o conjugado anti-IgA, marcado com peroxidase foi adicionado na diluição apropriada. Após incubação entre 1 a 5 horas a temperatura ambiente, a nitrocelulose é lavada, com posterior adição do substrato com diaminobenzidina entre 5 a 100 mg % em tampão tris (0,01M a 1M, pH entre 6,5 e 8,5) e peróxido de hidrogênio.

[075] Foram realizados ensaios de IB utilizando as preparações antigênicas das linhagens bacterianas descritas anteriormente neste relatório.

[076] Os ensaios imunoenzimáticos foram realizados na presença de anticorpos IgA dirigidos contra a EPEC, nos "pools" de leite materno e colostro humano nas preparações contendo SigA, através de ensaio imunoenzimático realizado de acordo com adaptações a metodologia empregada por Carbonare e col., 1995, conforme será descrito abaixo.

[077] Placas de microtitulação são sensibilizadas com suspensão de bactérias em tampão carbonato-bicarbonato pH

básico em uma D.O. padronizada de entre 0,2 e 1 com a leitura realizada a 420nm e incubadas entre 12 e 24 horas em câmara fria úmida entre 0 e 10°C. As placas são bloqueadas entre 30 a 90 minutos com tampão fosfato salino (pH 7,0 a 8,0) e leite em pó desnatado (entre 0,5 a 2%) a temperatura ambiente. As placas são lavadas múltiplas vezes com tampão de lavagem (tampão fosfato salino pH 7,0 a 8,0 adicionado de detergente a 0,01 a 1%).

[078] Os "pools" de leite materno e colostro humano e as preparações contendo SIgA, diluídas em tampão (tampão fosfato salino,NaCl, detergente acrescido de leite em pó desnatado), e adicionados às placas, em diluições seriadas variando de 1:5 a 1:45.000, de acordo com a dosagem de IgA.

[079] As placas foram incubadas entre 1 e 12 horas a temperatura entre 10 a 45°C em câmara úmida e lavadas múltiplas vezes com o tampão de lavagem. O conjugado anti-IgA humano, marcado com peroxidase, foi diluído entre 1:5 e 1:10.000 em tampão fosfato salino acrescido de NaCl, detergente contendo leite em pó desnatado e distribuído em cada orifício e as placas incubadas entre 10 e 45°C durante 1 a 12 horas em câmara úmida. Após este período, as placas foram lavadas múltiplas vezes com tampão de lavagem. O substrato, peróxido de hidrogênio entre 0,001 e 1% em solução de OPD 0,4 mg/mL em tampão citrato-fosfato pH levemente ácido, e preparado ao abrigo da luz, distribuído em pequenas alíquotas em cada orifício e as placas mantidas ao abrigo da luz durante 5 a 90 minutos para o desenvolvimento de cor. A reação é interrompida e a leitura feita em leitor de ELISA, com filtro de 492nm.

[080] Os resultados foram expressos em níveis de anticorpos

obtidos através da curva de regressão linear do log2 da D.O. em função do log2 da diluição. Definimos como nível à recíproca da diluição correspondente a D.O. empregada.

[081] A atividade biológica das preparações contendo SIgA foi verificada através dos ensaios de inibição da adesão de EPEC a células humanas tais como: fibroblastos, linfócitos, células de tumores tais como adenocarcinoma, fibrosarcoma, leucemia, melanoma, adrenocarcinoma, dentre outras, e ensaios de neutralização de shiga toxinas (STx1 e STx2) de STEC.

[082] A cultura de células humanas foi realizada, e os ensaios de adesão foram realizados empregando-se células, provenientes de carcinoma de laringe humano. A cultura de células humana foi realizada em garrafas plásticas próprias para cultura de tecidos, em meio apropriado, tais como: DMEM, MEM ou RPMI, contendo entre 2 a 25% de soro fetal bovino, 0,5 a 10% de um antibiótico ou solução de antibiótico e aminoácido, em incubadora contendo atmosfera de CO2 entre 2 a 8% a temperatura entre 27 40°C. Os repiques são realizados periodicamente conforme descrito no estado da técnica. As células, quando atingiam a confluência ideal eram descoladas da placa plástica através de um dos métodos descritos no estado da técnica, dentre eles: tripsina, solução de tripsnia/EDTA, ATV, mas não limitados a esses; e preparadas em uma suspensão contendo um número ideal de células entre 1,5x104 a 10x104 células/mL no meio de cultura utilizado.

[083] As células humanas são empregadas então em um ensaio de inibição da adesão da EPEC. Sendo os ensaios realizados em placas de cultura de células contendo múltiplos orifícios com lamínulas de vidro redondas. As lamínulas de vidro são

colocadas nos orifícios das placas de cultura. As lamínulas são previamente lavadas durante 10 a 24 horas em uma solução de álcool entre 1 a 90% e enxaguadas em água destilada, ou deionizada, sendo aquecidas lentamente a temperaturas não superiores a 200°C, durante 5 a 60 minutos e, novamente enxaguadas múltiplas vezes com água destilada ou deionizada, sendo posteriormente colocadas sobre papel absorvente ou de filtro em estufa em temperatura entre 20 a 60oC até estarem completamente secas e esterilizadas. O álcool utilizado nesta etapa pode ser qualquer álcool alifático de pequena cadeia, podendo apresentar cadeia saturada ou insaturada, ramificada ou não.

[084] A suspensão de células foi distribuída em placas de cultura de células com múltiplos orifícios, sendo as placas incubadas por um período entre 24 a 72 horas, até a formação de uma monocamada de células sobre as lamínulas.

[085] Um inóculo de EPEC, em meio de cultura adequado foi incubado em estufa a em uma temperatura entre 20 e 42°C durante 10 a 24 horas. Após este período, uma pequena fração deste inoculo foi semeado em um tubo estéril contendo o mesmo meio e incubado em banho-maria entre a 25 a 60°C com agitação. O crescimento bacteriano é monitorado por leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda de 540nm até atingir uma densidade óptica desejada entre 0,5 e 2,0 (fase logarítmica de crescimento da bactéria).

[086] No momento do ensaio de adesão, as placas de cultura contendo as lamínulas redondas com células são tratadas da seguinte forma: o meio de cultura é desprezado, as células são lavadas múltiplas vezes com tampão fosfato salino glicosado, e foi adicionado novo meio preparado previamente

em frascos estéreis como uma mistura de reação de acordo com a tabela 1.

[087] Os ensaios, determinam as quantidades a serem colocadas nas misturas de reação de acordo com a dosagem de IgA obtida. Os controles de adesão de bactérias e os ensaios de inibição apresentam e a mesma concentração de bactérias, ou seja, em todos os orifícios de inibição são colocados os mesmo volumes de suspensão de bactérias e volume de meio para ensaio de adesão e amostra a ser testada, suficiente para cada orifício. Em cada placa são adicionados dois controles.

[088] Após este procedimento, as placas são incubadas em estufa entre 20 e 60°C por um período compreendido entre 10 a 90minutos. As células são lavadas com tampão fosfato salino glicosado múltiplas vezes e mais meio para ensaio é posteriormente adicionado em todos os orifícios. A placa é incubada por 1 a 10 horas em estufa a entre 20 e 60°C.

[089] Após este período as placas são lavadas múltiplas vezes com tampão fosfato salino glicosado, fixadas com álcool por 5 a 60 minutos e coradas com May-Grunwald e Giemsa por 1 a 30 minutos e 5 a 60 minutos, respectivamente. As lamínulas são retiradas dos orifícios das placas, secadas e montadas sobre lâminas de vidro e Entellan.

[090] As lâminas são observadas em microscópio óptico comum com aumento apropriado entre 100 e 2000 vezes, realizando-se uma contagem de células, somente sendo consideradas com adesão as células que possuíam em sua superfície um número não menor que 6 bactérias. O resultado é expresso em porcentagem de células com bactérias em relação ao número total de células contadas (% de adesão).

[091] O detergente empregado nas etapas acima descritas é

preferencialmente o Tween20 e, os antibióticos empregados podem ser gentamicina, penicilina, ampicilina, estreptomicina, mas não limitado a esses, e os aminoácidos empregados podem ser todos os L-aminoácidos essenciais e não essenciais, ou uma combinação de antibiótico e L-aminoácido.

[092] Também foram realizados os ensaios de inibição de inibição da invasão de células humanas pela EIEC, nestes ensaios a suspensão de células humana foi distribuída em placas de cultura de células com múltiplos orifícios, e as placas incubadas entre 24 a 72 horas, até a formação da monocamada de células.

[093] Um inóculo de Escherichia coli enteroinvasora - (EIEC) é feito em meio de cultura bacteriana posteriormente incubado em estufa entre 28 a 42°C durante 12 a 24 horas. Após este período, a cultura foi centrifugada entre 1.000 a 4.000g durante 5 a 50 minutos e ressuspendidas em igual volume de meio de cultura, dentre os quais podemos citar DMEM, MEM e RPMI.

[094] O ensaio de adesão é realizado em placas de cultura contendo as lamínulas redondas com células tratadas. O tratamento consiste na remoção do meio de cultura, seguido de múltiplas lavagens das células com tampão fosfato salino glicosado, seguido da adição de meio de cultura fresco preparado em frascos estéreis como uma mistura de reação de acordo com a tabela 2. A quantidade de IgA a ser adicionada na mistura é determinada após dosagem realizada conforme anteriormente descrito neste relatório.

[095] A mesma concentração de bactérias é adicionada aos controles de invasão de bactérias e aos ensaios de inibição, portanto, aos orifícios de cultivo presentes nas placas de

poços múltiplos, são acrescentados igual volume da suspensão de bactérias e meio para ensaio de invasão e amostra a ser testada.

[096] As placas são posteriormente incubadas em estufa com temperatura regulada entre 20 a 42°C por um período compreendido entre 0,5 a 5 horas. As células são lavadas múltiplas vezes com tampão fosfato salino glicosado e meio de cultura adequado enriquecido com um antibiótico, que é adicionado em todos os orifícios das placas de múltiplos orifícios; que são incubadas entre 20 a 42°C por um período compreendido entre 0,5 e 5 horas.

[097] Após incubação segue-se a lavagem múltipla da placa com tampão fosfato salino glicosado e sequente fixação com álcool por um período máximo de 40 minutos e coradas com corantes por dois períodos de tempo variáveis e compreendidos entre 1 a 60 minutos. As lamínulas são retiradas dos orifícios das placas, secas e, montadas sobre lâminas de vidro e Entellan. As lâminas encaminhadas para observação em microscópio óptico comum com aumento de até 2000 vezes, sendo contadas um número suficiente de células, somente sendo consideradas como invadidas as células que possuíam em sua superfície um número mínimo de bactérias não inferior a seis. O resultado é expresso em porcentagem de células com bactérias em relação ao número total de células contadas (% de invasão).

[098] O álcool empregado na fixação da placa pode ser qualquer álcool alifático de cadeia curta contendo ou não ramificações ou insaturações, e os corantes empregados não se limitam somente a May-Grunwald e Giemsa.

[099] O teste para verificação da neutralização das toxinas tipo shiga foi realizado após obtenção das toxinas a partir

de linhagens de E.coli produtoras da toxina shiga (STEC) cultivadas em meio apropriado em condições adequadas e, linhagens de bactérias E.coli não produtoras da toxina shiga, também cultivadas em meio de cultura apropriado, em condições adequadas. As linhagens de E.coli não toxigênicas (EPEC) são empregadas como controle negativo dos testes de citotoxicidade.

[100] Após um período de crescimento as bactérias STEC são centrifugadas entre 1.000 a 4.000g por um período não inferior a 5 ou superior a 60 minutos para obtenção de um sedimento contendo as bactérias que é tratado por um período não inferior a 5 ou superior a 60 minutos entre 20 a 42oC adequadamente com tampão fosfato salino e polimixina B (0,01 a 1mg/mL) para a liberação da toxina Stx1 que fica inserida no espaço periplásmico bacteriano. A seguir, as bactérias são centrifugadas entre 1.000 a 4.000g por um período não inferior a 5 ou superior a 60 minutos a sob refrigeração e o sobrenadante é colhido tratado por métodos compreendido no estado da técnica. A liberação da toxina Stx2 dispensa o tratamento com polimixina B, pois as linhagens bacterianas produtoras desta toxina a produzem em grande quantidade, liberando no sobrenadante da cultura celular.

[101] Os sobrenadantes assim obtidos são filtrados, aliquotados e congelados entre -4 a -80oC para posterior uso em testes de neutralização do efeito citopático destas toxinas sobre células de mamíferos.

[102] As linhagens bacterianas utilizadas nesta etapa são as linhagens bacterianas relacionadas anteriormente neste relatório descritivo.

[103] Os testes de neutralização das toxinas Stx1 e Stx2 são

realizados pelo “pools” de leite materno e colostro humano e as preparações contendo SIgA foram realizados com preparações das toxinas Stx1 e Stx2, e o sobrenadante de EPEC utilizado como controle negativo, em um desafio à linhagens de células de mamíferos, dentre as quais podemos citar: MRC5, VERO, RAT, BALB, COS, MPK, PK dentre outras.

[104] As células de mamíferos são cultivadas em meio adequado de cultura enriquecido com soro fetal bovino, ou soro de cavalo, ou soro de cabra e uma solução de antibiótico e L-aminoácidos essenciais e não essenciais, e mantidas em estufa contendo entre 2 a 20% de CO2 numa temperatura entre 28 a 42°C. As culturas celulares são periodicamente repicadas. Após formação da monocamada, as células são descoladas da placa de cultura com tripsina, tripsina/EDTA ou ATV.

[105] As preparações das toxinas foram tituladas em teste com células de mamífero, de modo a se determinar uma diluição capaz de provocar 50% de efeito citotóxico (CD50 - 50% cytotoxic dose). É preparada uma diluição de cada toxina em meio de cultura, que são incubados por um período compreendido entre 5 e 60 minutos a temperatura entre 28 e 38oC, onde é adicionada diluições seriadas do “pool” e suas amostras variando de 1:1 a 1:1.000, para neutralização. A mistura é então colocada nos orifício em placas de cultura de múltiplos orifícios, juntamente com uma suspensão de células de mamífero resultando em uma concentração de 1x105 a 9x105 células/mL e uma diluição final das toxinas equivalentes ao CD50, e diluições do “pool” e amostras testadas de 1:1 a 1:400, ou mais, quando necessário. As placas são incubadas conforme descrito acima e observadas diariamente em microscópio, para verificar o efeito

citotóxico. Os controles positivos e negativos também são incubados e observados ao microscópio. Durante primeira semana de incubação é realizada a observação final com o sobrenadante contendo células mortas sendo desprezado, e as células aderidas restantes incubadas por 1 a 10 horas, em estufa a 28 a 42oC com 4 a 10% de CO2, com solução aquosa de vermelho neutro diluída em meio de cultura apropriado. Segue-se a lavagem das placas com tampão fosfato salino glicosado e os orifícios eluídos com a solução descorante por no máximo 40 minutos sob agitação. A leitura é realizada em leitor de ELISA em comprimento de onda de 550nm.

[106] O nível neutralizante foi definido como a diluição da amostra capaz de neutralizar a toxina de modo a fornecer uma D.O. equivalente ao controle da amostra com as células, na ausência da toxina.

[107] Os testes para detecção de anticorpos antitetânicos e antidiftéricos são realizados conforme a metodologia descrita por Hendriksen e col. (1988). O "ToBI-test" baseia-se na inibição da ligação entre a toxina tetânica que recobre a microplaca, por anticorpos da amostra a ser testada pré-incubada com a toxina. Este teste é capaz de detectar baixos níveis de anticorpos e pode ser aplicada tanto para a detecção de anticorpos antitetânicos como para anticorpos antidiftéricos, conforme será exemplificado neste relatório descritivo.

[108] A presença de contaminantes nas preparações contendo SIgA e também nos "pools" de colostro e leite materno humano são realizados através de três métodos de descontaminação descritos nos estado da técnica: Pasteurização a 62,5o C durante 30 minutos; pasteurização a 60o C durante 10 horas;

filtração em filtro contendo membrana filtrante de porosidade conhecida.

[109] Os três métodos de descontaminação são realizados em alíquotas de cada um dos "pools" e cada uma das preparações obtidas. As pasteurizações são realizadas em banho com temperatura previamente controlada, sendo que a contagem do tempo foi iniciada após o líquido de dentro do tubo ter atingido a temperatura desejada. A filtração é realizada preferencialmente filtro contendo membrana filtrante de 0,22µm descartável, acoplado a uma seringa também descartável.

[110] Os "pools" de leite e colostro e as preparações contendo SIgA são testados para verificação do crescimento de bactérias, sendo para isso plaqueados em meios de cultura sólidos com o intuito de verificar se estavam contaminados com bactérias. Os meios utilizados podem ser: Agar sangue; Mac conkey, LB Agar dentre outros.

[111] As placas são divididas em quatro, formando quadrantes e, então é aplicada uma gota do "pool" de leite, "pool" de colostro e suas respectivas preparações contendo SIgA em cada um dos quadrantes. Cada gota de amostra é espalhada em um respectivo quadrante com o auxilio de uma alça de platina. As placas são incubadas entre 28 a 42oC durante 10 a 48 horas. Após o período de incubação as placas são observadas para verificar o crescimento de colônias.

[112] Os testes para detecção da presença de vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1) e da hepatite C (HCV) nos "pools" de leite e colostro e as preparações contendo SIgA são realizados através de kits de diagnóstico comercialmente disponíveis.

[113] A presente invenção tem como objetivo o uso médico da Imunoglobulina A secretória (SIgA) extraída à partir do leite materno humano e do colostro humano, para administração via oral com indicações clínicas para casos de imunodeficiência primárias ou secundárias, imunossupressão, intoxicações, infecções por microorganismos toxigênicos ou patogênicos, além de prematuros e recém-natos com peso muito baixo visando conferir a imunização passiva a estes indivíduos; métodos de obtenção da SIgA de um "pool" de leite materno humano e de colostro armazenados em Banco de Leite Humano (BLH); testes de reatividade da SIgA obtida de um "pool" de leite materno humano e de colostro armazenados em Banco de Leite Humano (BLH).

[114] Os exemplos apresentados não limitam o escopo da invenção, servindo somente para fornecer maiores detalhes dos testes e demais procedimentos realizados.

EXEMPLOS

Exemplo 1: Remoção dos componentes não desejados dos "pools" de leite materno e colostro humano.

[115] Para a remoção da fração lipídica, os "pools" de leite e colostro devem ser centrifugados a 2.100g durante 30 minutos a uma temperatura de 4oC e em seguida deve ser feita a separação das fases líquidas com pipeta Pasteur, tomando-se cuidado para não serem retiradas às células depositadas nos precipitados.

[116] A remoção da caseína é realizada através da acidificação das fases líquidas obtidas conforme acima, com a adição de ácido acético. A acidificação deve ser realizada lentamente e com homogeneização constante do material. O pH deve ser monitorado até 4,3. Os "pools" devem ser mantidos

em repouso durante 1 hora a 4oC. Após o repouso, os “pools” devem ser centrifugados a 12.000g durante 45 minutos a uma temperatura de 4oC. Os soros de colostro e leite são obtidos após a filtração das fases líquidas em papel de filtro e ajuste do pH para 7,0. O estoque dos soros deve ser feito -20oC.

Exemplo 2: obtenção da SIgA pela precipitação com sulfato de amônio.

[117] A precipitação procede-se com a adição vagarosa do sulfato de amônio aos soros obtidos do “pool” de leite materno e colostro humano até uma concentração final de 50% de saturação e homogeneização constante da mistura.

[118] Após a precipitação, as misturas devem ser deixadas em repouso por 18 horas a 4oC, e em seguida, cada material deve ser centrifugado a 7.600g durante 45 minutos a uma temperatura de 4oC. São obtidos os precipitados contendo SIgA, e os sobrenadantes contendo outras proteínas. Os precipitados contendo SIgA (ressuspendidos em solução salina) obtidos devem ser colocados em diálise durante 3 dias em solução salina a uma temperatura de 4oC com várias trocas. Os materiais dialisados, são as preparações finais de SIgA e devem ser guardados a uma temperatura de -20oC para análises posteriores.

Exemplo 3: obtenção da SIgA pela precipitação alcoólica.

[119] Inicialmente é feita uma diluição de 1:3 do soro em água destilada. O pH é ajustado para 7,7 e as misturas resfriadas a uma temperatura de 0oC. Segue-se com a adição de Etanol 50% (à temperatura de -20oC), até obter-se uma concentração final, nas misturas, com 20% de saturação de etanol. A adição do etanol deve ser realizada vagarosamente

com agitação vigorosa. Todos os procedimentos devem ser realizados em banho de gelo, ou câmara fria, para que a temperatura das misturas permanecesse entre -5 e -6oC. Após a completa adição do etanol, procede-se uma centrifugação a 5.491g durante 45 minutos a uma temperatura de -5oC, da qual se o precipitado contendo SIgA e o sobrenadante contendo outras proteínas.

[120] O precipitado contendo SIgA (ressuspendido em solução salina) obtido devem ser colocados em diálise durante 3 dias em solução salina a uma temperatura de 4oC com várias trocas. O material dialisado, é a preparação final de SIgA e deve ser guardado a uma temperatura de -20oC para análises posteriores.

Exemplo 4: preparação da coluna de cromatografia por afinidade.

[121] Tomaremos com exemplo o preparo de 100g de gel. O gel tiofílico é preparado da seguinte forma (Figura 4): A Sepharose 6B (Pharmacia) é lavada com tampão carbonato de sódio 0,5M (pH 11,0) e posteriormente pesada, 100g de peso úmido. A Sepharose é então ressuspendida em 100 mL de tampão carbonato de sódio 0,5M (pH 11,0) e 5 mL de divinil sulfona. Incubar o gel durante 20 horas a 21oC em banho com agitação. Decorrido este procedimento, lavar o gel com água destilada, secar através de filtração por sucção, ressuspender em 100 mL de tampão Bicarbonato de sódio 0,1M (pH 9,0) e adicionar 10 mL de β-mercaptoetanol. Incubar gel durante 18 horas a temperatura ambiente em agitação. No dia seguinte lavar o gel com água destilada para a retirada do excesso de β-mercaptoetanol e guarda-lo semi-seco a temperatura de 4oC até o uso.

Exemplo 5: Esquema de preparo das misturas de reação utilizadas nos ensaios de adesão. Obs.: As quantidades de X1 e X2 variaram de acordo com a concentração de IgA obtida através da dosagem de IgA dos materiais, de modo que X1 + X2 = 1100µL.

Controle de células	1200 µL de meio DMEM contendo 2% de Soro Fetal Bovino e 1% de D-manose
Controle de adesão	1100 µL de meio DMEM contendo 2% de Soro Fetal Bovino e 1% de D-manose 100 µL de suspensão de bactérias
Ensaio de Inibição	X1 µL de meio DMEM contendo 2% de Soro Fetal Bovino e 1% de D-manose 100 µL de suspensão de bactérias X2 µL de "pool" original ou preparação contendo SIgA.

Exemplo 6: Esquema de preparo das misturas de reação utilizadas nos ensaios de invasão. Obs.: As quantidades de X1 e X2 variaram de acordo com a concentração de IgA obtida através da dosagem de IgA dos materiais, de modo que X1 + X2 = 1100µL.

Controle de células	1200 µL de meio DMEM contendo 2% de Soro Fetal Bovino e 1% de D-manose
Controle de adesão	1100 µL de meio DMEM contendo 2% de Soro Fetal Bovino e 1% de D-manose 150 µL de suspensão de bactérias
Ensaio de Inibição	X1 µL de meio DMEM contendo 2% de Soro Fetal Bovino e 1% de D-manose

	150 µL de suspensão de bactérias X2 µL de "pool" original ou preparação contendo SIgA.

Exemplo 7: Ensaio de adesão utilizando células Hep-2.

[122] Os ensaios com células HEp-2 foram realizados em placas de cultura de células de 24 orifícios com lamínulas de vidro redondas. As lamínulas de vidro que foram colocadas nos orifícios das placas de cultura foram previamente lavadas durante 18 horas em álcool 10% e enxaguadas pelo menos 2 vezes em água destilada, fervidas em fogo brando durante 10 minutos, enxaguadas 8 vezes com água destilada, colocadas sobre papel de filtro em estufa 37oC até estarem completamente secas e esterilizadas em forno.

[123] A suspensão de células foi distribuída em placas de cultura de células com 24 orifícios (Nunc), sendo 1200µL por alvéolo, e as placas foram incubadas por 48 horas, até a formação da monocamada de células sobre as lamínulas.

[124] Foi feito um inóculo de EPEC, em caldo TSB e a cultura foi incubada em estufa a 37°C durante 18 horas. Após este período, um inóculo de 0,5 mL desta cultura foi semeado em um tubo estéril contendo o mesmo meio e incubado em banho a 37°C com agitação. O crescimento bacteriano foi monitorado por leitura em espectrofotômetro Micronal em comprimento de onda de 540nm até atingir uma densidade óptica de 1,2 (fase logarítmica de crescimento da bactéria).

[125] No momento do ensaio de adesão, as placas de cultura contendo as lamínulas redondas com células foram tratadas da seguinte forma: o meio de cultura foi desprezado, as células lavadas 6 vezes com PBS glicosado, e foi adicionado novo meio preparado previamente em frascos estéreis como uma

mistura de reação de acordo com a tabela 1.

[126] Em nossos ensaios, determinamos as quantidades a serem colocadas nas misturas de reação de acordo com a dosagem de IgA obtida pelo teste de Mancini e o esquema utilizado estará descrito no item de resultados.

[127] Os controles de adesão de bactérias e os ensaios de inibição devem apresentar sempre a mesma concentração de bactérias, ou seja, em todos os orifícios de inibição foram colocados 100 µL de suspensão de bactérias e volume de meio para ensaio de adesão e amostra a ser testa, suficientes para completar um total de 1200 µL por orifício. Em cada placa foram adicionados dois controles.

[128] Após este procedimento, as placas foram incubadas em estufa 37°C por 30 minutos. As células foram lavadas com PBS glicosado por 6 vezes e 1200µL de meio para ensaio foi adicionado em todos os orifícios. A placa foi então incubada por 3 horas em estufa a 37°C.

[129] Após este período as placas foram lavadas 4 vezes com PBS glicosado, fixadas com metanol por 10 minutos e coradas com May-Grunwald e Giemsa por 5 e 20 minutos, respectivamente. As lamínulas foram retiradas dos orifícios das placas Depois de secas, foram montadas sobre lâminas de vidro e Entellan (Merck).

[130] As lâminas foram observadas em microscópio óptico comum com aumento de 1000 vezes, sendo contadas 300 células, somente sendo consideradas com adesão as células que possuíam em sua superfície mais de 6 bactérias. O resultado foi expresso em porcentagem de células com bactérias em relação ao número total de células contadas (% de adesão).

Exemplo 8: Ensaio de invasão utilizando-se células Hep-2.

[131] A suspensão de células foi distribuída em placas de cultura de células com 24 orifícios (Nunc), sendo 1200µL por alvéolo, e as placas foram incubadas por 48 horas, até a formação da monocamada de células.

[132] Foi feito um inóculo de Escherichia coli enteroinvasora O28ac:H- (EIEC), em caldo TSB e a cultura foi incubada em estufa a 37°C durante 18 horas. Após este período, a cultura foi centrifugada 2.100g (Sorvall modelo RT6000B, rotor H-1000B) durante 15 minutos e ressuspendidas em igual volume de DMEM.

[133] No momento do ensaio de adesão, as placas de cultura contendo as lamínulas redondas com células foram tratadas da seguinte forma: o meio, de culturas foi desprezado, as células lavadas 4 vezes com PBS glicosado, e foi adicionado novo meio preparado previamente em frascos estéreis como uma mistura de reação de acordo com a tabela 2.

[134] Em nossos ensaios, determinamos as quantidades a serem colocadas nas misturas de reação de acordo com a dosagem de IgA obtida pelo teste de Mancini e o esquema utilizado estará descrito no item de resultados.

[135] Os controles de invasão de bactérias e os ensaios de inibição devem apresentar sempre a mesma concentração de bactérias, ou seja, em todos os orifícios de inibição foram colocados 150 µL de suspensão de bactérias e volume de meio para ensaio de invasão e amostra a ser testada, suficientes para completar um total de 1200 µL por orifício. Em cada placa foram adicionados dois controles.

[136] Após este procedimento, as placas foram incubadas em estufa 37°C por 2 horas. As células foram lavadas com PBS glicosado por 6 vezes e 1200µL de DMEM contendo 0,2mg/mL de

gentamicina foi adicionado em todos os orifícios. As placas foram então incubadas por 3 horas em estufa a 37°C.

[137] Após este período as placas foram lavadas 4 vezes com PBS glicosado, fixadas com metanol (Merck) por 10 minutos e coradas com May-Grunwald (Merck) e Giemsa (Merck) por 5 e 20 minutos, respectivamente. As lamínulas foram retiradas dos orifícios das placas e depois de secas, foram montadas sobre lâminas de vidro e Entellan (Merck).

[138] As lâminas foram observadas em microscópio óptico comum com aumento de 1000 vezes, sendo contadas 300 células, somente sendo consideradas com invasão as células que possuíam em sua superfície mais de 6 bactérias. O resultado foi expresso em porcentagem de células com bactérias em relação ao número total de células contadas (% de invasão).

Exemplo 9: Preparação das toxinas.

[139] Para a obtenção das toxinas Stx1 e Stx2, as bactérias STEC O111ac:H- e O157:H7 respectivamente foram cultivadas em 300mL de meio Penassay (Difco) a 37oC durante 18 horas. A bactéria EPEC O111:H- também foi cultivada nas mesmas condições, para ser utilizada como controle negativo nos ensaios de citotoxicidade, uma vez que não produz toxinas. Após 18 horas, a suspensão de STEC 172 (produtora de Stx1) foi centrifugada a 2.100g (Sorvall modelo RT6000B, rotor H-1000B) durante 30 minutos, e o sedimento contendo as bactérias foi tratado durante 30 minutos a 37oC com 100μL de polimixina B na concentração de 0,1mg/mL em PBS com o intuito de romper a membrana externa e liberar a toxina Stx1 que fica inserida no espaço periplásmico bacteriano. A seguir, as bactérias foram novamente centrifugadas a 2.100g (Sorvall modelo RT6000B, rotor H-1000B) durante 30 minutos a 4oC e o

sobrenadante foi colhido e filtrado em filtro Millipore 0,22μm (Donohue-Rolfe & Keusch, 1983).

[140] As bactérias STEC O157:H7 e EPEC O111:H- foram processadas do mesmo modo que para STEC 172, com exceção do tratamento com polimixina B, pois a toxina Stx2 da STEC 14 é liberada em grande quantidade no sobrenadante da cultura, independente do rompimento da membrana externa.

[141] Após a filtração dos sobrenadantes das três bactérias, estes foram aliquotados e congelados a -20oC para posterior uso em testes de neutralização do efeito citopático destas toxinas sobre células Vero.

Exemplo 10: ToBI-test para anticorpo antitetânico

[142] Os ensaios para detecção de anticorpos antitetânicos foram realizados de acordo com a metodologia descrita por Hendriksen e col. (1988). O "ToBI-test" baseia-se na inibição da ligação entre a toxina tetânica que recobre a microplaca, por anticorpos da amostra a ser testada pré-incubada com a toxina. Este teste é capaz de detectar baixos níveis de anticorpos e pode ser aplicada tanto para a detecção de anticorpos antitetânicos como para anticorpos antidiftéricos.

[143] O ensaio para detecção de anticorpos antitoxina tetânica foi realizado em duas etapas. A primeira etapa consistiu em bloquear uma placa de microtitulação com PBS pH 7,2 0.05% Tween 80 (T80) e 1% de BSA durante 90 minutos a uma temperatura de 37°C. Após este período a placa foi lavada com PBS 0.05% T80. Foram adicionadas as amostras em diferentes diluições e a anatoxina 0.5 Lf/mL (diluída em PBS e 1% de peptona proteose). A placa foi agitada e deixada durante 60 minutos a temperatura de 37°C e durante 18 horas

a 4oC. O soro padrão foi diluído a partir de uma diluição inicial contendo 2.5 UI/mL. Nos orifícios para a leitura da absorbância total (Abs.T), foram colocados PBS com anatoxina (antígeno).

[144] Na segunda fase, uma segunda placa foi sensibilizada com antitoxina (8µg/mL) diluída em tampão carbonato/bicarbonato 0.05M pH 9,6 e deixada a uma temperatura de 4°C durante 18 horas. Após este período de incubação a placa foi lavada com PBS 0.05% T80, bloqueada com PBS pH 7,2 0.05% T80 e 1% BSA e deixada incubando durante 90 minutos a uma temperatura de 37°C.

[145] Foi feita a transferência de 100µl do conteúdo da placa 1 para a placa 2 e feita uma nova incubação por 90 minutos a uma temperatura de 37°C. A placa com a mistura de ração foi lavada com PBS 0.05% T80. Foi adicionada antitoxina marcada com peroxidase (10µg/mL em PBS) e uma nova incubação de 90 minutos a 37°C. Após nova lavagem, finalizou-se com a revelação da reação com a adição do substrato contendo 10 mg OPD em 25 mL de tampão citrato/fosfato 0.15M pH 5.0 e 5µl de H2O2 30%. Após 15 min a reação foi bloqueada com 50µl/orifício de H2SO4 4N. A leitura foi feita em leitor de ELISA em 492nm.

Exemplo 11: ToBI-test para anticorpo antidifitérico.

[146] O ToBI-test para anticorpos antidiftéricos foi realizado de acordo com a seguinte metodologia, realizada em duas etapas:

[147] Uma microplaca de poliestireno de fundo redondo foi bloqueada com leite Molico® 10% diluído em PBS (figura 1). A placa foi incubada a uma temperatura de 37oC durante 90 minutos. Após este período foram adicionadas as amostras em

diluição apropriada. A diluição foi realizada em série, a partir da diluição 1:2 até a diluição de 1:256 e feitas em duplicata (colunas de 1 a 8). Foi colocada a antitoxina de referência em PBS (diluição em série), com uma concentração final por orifício variando de 5 a 0,002 UI/mL (colunas 11 e 12). Em toda a placa, exceto na coluna do branco (coluna 10), foi adicionada a anatoxina diluída em PBS na concentração de 0,1 Lf/mL. A microplaca foi incuba a uma temperatura de 37oC durante 60 minutos, e posteriormente a uma temperatura de 4oC durante 18 horas. As colunas que constituem 9 e 10 são os controles positivo e negativo respectivamente.

[148] Uma microplaca de imunoensaio (cloreto polivinil ou poliestireno) foi revestida com antitoxina na diluição de 20 µg/mL em tampão carbonato pH 9,6. A microplaca foi incubada a uma temperatura de 4oC durante 18 horas. Após duas lavagens com PBS Tween 0,05% foi feito o bloqueio da microplaca com Molico® 10% diluído em PBS e uma nova incubação durante 90 minutos a uma temperatura de 37oC. A placa foi novamente lavada como descrito anteriormente e feita a transferência de 100 µL da mistura de cada poço da microplaca da fase 1 para os respectivos poços da placa de ELISA. Após uma incubação de 90 minutos a uma temperatura de 37oC a placa foi lavada como descrito anteriormente. Prosseguiu-se com a adição do conjugado antitoxina marcado com peroxidase na diluição de 1:1000 em PBS com 1% de Molico® e 0,05% de Tween, e a placa foi incubada à temperatura ambiente e ao abrigo da luz por 2 horas. Após este período a placa foi lavada como descrito anteriormente. A revelação da reação foi feita com a adição de substrato (tampão acetato 0,022M com 1,67% de

TMB 0,025M em etanol, e 0,3% de água oxigenada 3%) e após uma nova incubação da placa à temperatura ambiente e ao abrigo da luz por 10 minutos, a reação foi interrompida com a adição de H2SO4 2M. A leitura foi feita medindo-se a absorbância em leitor de ELISA em comprimento de onda de 450nm.

Exemplo 12: verificação da contaminação por HIV e HCV.

[149] Os ensaios para detecção da presença de vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1) e da hepatite C (HCV) nos "pools" de leite e colostro e as preparações contendo SIgA foram realizados através do "kit" diagnóstico Chiron® (desenvolvido e manufaturado por Gen-Probe Incorporated e distribuído por Chiron Blood Testing Distributor Limited). O ensaio Chiron TMA HIV-1/HCV é um sistema de ensaios qualitativos in vitro que utiliza a tecnologia de amplificação do alvo por sondas de ácido nucléicos para a detecção do HIV-1 e/ou HCV em plasma e sangue de doadores. A técnica foi adaptada para a utilização das amostras de leite e colostro e como controle positivo foi realizada a "infecção" de uma amostra de 500µL de colostro com 5µL de plasma positivo contendo 600.000 copias de HIV/mL ficando o colostro com uma concentração final de 6.000 cópias de HIV/mL. O ensaio envolve três passos principais sendo: a preparação da amostra; a amplificação dos alvos de RNA de HIV-1 e HCV por Amplificação Mediada por Transcrição (TMA), e detecção dos produtos de amplificação pelo Ensaio de Proteção da Hibridação (HPA).

[150] Durante a preparação da amostra, o RNA é isolado a partir de amostras de plasma através da utilização da captura do alvo. O plasma é tratado com um detergente para

solubilizar o invólucro viral, desnaturar as proteínas e liberar o RNA genômico viral. Os oligonucleotídeos (oligonucleotídeos de captura) que são homólogos a regiões altamente conservadas do HIV-1 e HCV são hibridados aos alvos de RNA de HIV-1 ou HCV, se presentes, na amostra de estudo. O alvo hibridado é então capturado em micropartículas magnéticas que são separadas do plasma num campo magnético. Os passos de lavagem são utilizados para remover do tubo de reação os componentes do plasma restantes. A separação magnética e os passos de lavagem são executados no Sistema de Captura de Alvo.

[151] A amplificação do alvo via TMA, que é um método de amplificação de ácidos nucléicos baseado na transcrição que utiliza duas enzimas, transcriptase reversa MMLV e a polimerase de RNAT7: a transcriptase reversa é utilizada para gerar uma cópia de DNA (contendo uma sequência promotora para a polimerase de RNA T7) da sequência alvo de RNA. A polimerase RNA T7 produz múltiplas cópias do amplificado do RNA a partir da cópia matriz de DNA. O ensaio Chiron TMA HIV-1/HCV utiliza o método TMA para amplificar regiões do RNA do HIV-1 e do RNA do HCV.

[152] A detecção é alcançada por HPA utilizando sondas de ácidos nucléicos de cadeia simples com marcações quimioluminescentes que são complementares do amplificado. As sondas marcadas de ácidos nucléicos hibridam-se especificamente ao amplificado. O Reagente de Seleção diferencia entre as sondas hibridadas e não-hibridadas, desativando a marcação nas sondas não hibridadas. Durante o passo de detecção, o sinal quimioluminescente produzido pela sonda hibridada é medido num luminómetro e é apresentado em

Unidades Relativas de Liminescência (URLs).

[153] As amostras que forem reativas no ensaio Chiron TMA HIV-1/HCV serão então ensaiadas nos Ensaios Discriminatórios do HIV-1 e do HCV para determinar se são reativas para HIV-1, HCV ou ambos. Os Ensaios Discriminatórios seguem os mesmos passos do ensaio Chiron TMA HIV-1/HCV com a diferença de que os reagentes de sonda são específicos para o HIV-1 ou para o HCV. A sensibilidade do teste é de 100 cópias de vírus/mL (Baseado nas informações do fabricante – Gen-Probe Incorporated).

REIVINDICAÇÕES

1. Método de extração da imunoglobulina A secretória (SIgA) a partir de um "pool" de leite materno e/ou colostro humano, **caracterizado** por ser consistido pelas seguintes etapas:

a. Remover os componentes indesejados do "pool" de leite materno e colostro, conforme as subetapas:

a1. Retirada da fase lipídica de um "pool" de leite materno e colostro humano, segundo as subetapas:

a1.1. Centrifugar o material obtido na subetapa a1 entre 1800 a 300g durante um intervalo de tempo mínimo de 15 minutos e máximo de 50 minutos;

a1.2. Coletar a fase líquida do pool e desprezar o precipitado;

a2. Retirar a caseína da fase líquida obtida na subetapa a1.2, conforme as subetapas:

a2.1. Adicionar sob agitação à fase líquida obtida na subetapa a1.2, um ácido orgânico para ajustar o pH a 4,3;

a2.2. Manter a solução acidificada em repouso por de 0,5 a 4 horas sob refrigeração, em temperatura de 4°C;

b. Centrifugar a solução obtida na subetapa a2.2 entre 10000g a 20000g, por período máximo de 60 minutos sob refrigeração;

b1. Coletar o soro do leite ou colostro humano obtido e mantê-lo sob refrigeração;

c. Filtrar o soro obtido na etapa b1. em papel de filtro, membrana filtrante ou carvão ativado;

d. Ajustar o pH dos soros de colostro e leite materno humano obtido na etapa anterior para entre 5,0 e 9,0 com o emprego de uma base e armazenar em temperatura entre -10 e -80°C;

e. Obtenção da SIgA contida nos soros e colostro de leite materno humano da etapa d pelo emprego de ao menos um dos seguintes métodos de separação: precipitação com sulfato de amônio, precipitação alcóolica ou cromatografia.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** por ser realizada na etapa a1.1, a centrifugação 2.100g durante 25 minutos.

3. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** por se adicionar um ácido orgânico, tal como ácido cítrico, ácido acético, ácido lático, dentre outros para a acidificação das fases líquidas obtidas na subetapa a2.1.

4. Método, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizado** por se empregar preferivelmente o ácido acético.

5. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** por ser a solução acidificada da etapa a2.2 mantida em repouso pelo período de 1 hora a uma temperatura de 4°C.

6. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** por ser a solução obtida na subetapa a2.2 centrifugada a 12.100g durante 1 hora a 4°C.

7. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** por se empregar a filtração do soro obtido na etapa b1. preferivelmente, por papel de filtro.

8. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** por na etapa d, ser ajustado o pH a 7,0 com o emprego de NaOH.

9. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de na etapa e, a obtenção da SIgA por precipitação com sulfato de amônio consistir nas seguintes subetapas:

9.e1 Adicionar vagarosamente sulfato de amônio ao soro obtido na etapa d, sob homogeneização constante da mistura de soro e sal, até a concentração final de 30% a 70% de saturação;

9.e2 Manter a solução obtida na etapa anterior em repouso por de 12 a 36 horas, em temperatura de entre 0 e 20°C;

9.e3 Centrifugar a solução obtida na subetapa 9.e2 entre 5000g a 9000g, por período de entre 30 a 60 minutos, em temperatura entre 0 e 20°C;

9.e4 Desprezar o sobrenadante obtido;

9.e5 Dialisar o precipitado com tampão fosfato salino entre 0,1 a 1,5% durante um período de 1 a 5 dias, em temperatura entre 0 e 20°C, com trocas periódicas da solução salina dializadora para obtenção da SIgA isolada.

9.e6 Manter as preparações contendo SIgA entre -10 a -80 °C.

10. Método, de acordo com a reivindicação 9, **caracterizado** pelo fato de na etapa 9e.1 ser empregado um sal de sulfato de amônio ou uma solução saturada de sulfato

de amônio.

11. Método, de acordo com a reivindicação 9, **caracterizado** pelo fato de o sulfato de amônio ser adicionado até uma concentração de 50% de saturação.

12. Método, de acordo com a reivindicação 9, **caracterizado** pelo fato de na subetapa 9e.2 a solução ser mantida em repouso por 18 horas a 4°C.

13. Método, de acordo com a reivindicação 9, **caracterizado** pelo fato de na subetapa 9e.3 a solução ser centrifugada a 7.600g durante 45 minutos a 4°C.

14. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de na etapa e, a obtenção da SIgA por precipitação alcóolica consistir nas seguintes subetapas:

14.e1 Diluir o material obtido na etapa d, a uma razão entre 1:1 a 1:8, manter o pH entre 7,0 e 9,0, mantendo resfriado de -4 e máxima de 10°C;

14.e2 Adicionar lentamente com agitação vigorosa, álcool utilizado sobre o material obtido na etapa anterior, mantendo o ambiente entre - 5 e -6 °C;

14.e3 Centrifugar o material obtido na etapa 14.e2 entre 3.000 a 10.000g durante no máximo 60 minutos a uma temperatura entre -4 a -80°C;

14.e4 Desprezar o sobrenadante obtido após a centrifugação;

14.e5 Ressuspender o precipitado com água destilada, ou água deionizada ou solução salina entre 0,1 e 1,5%;

14.e6 Dialisar por um período de 1 a 5 dias a uma temperatura entre 0 a 20°C, com trocas periódicas

da solução salina dializadora;

14.e7 Ressuspender o precipitado em solução salina para obtenção da SIgA.

15. Método, de acordo com a reivindicação 14, **caracterizado** pelo fato de ser empregada na diluição da amostra água destilada ou deionizada;

16. Método, de acordo com a reivindicação 14, **caracterizado** pelo fato de serem empregados álcoois alifáticos simples de cadeia curta podendo apresentar cadeias saturadas ou insaturadas, ramificadas ou não; diluídos ou P.A.

17. Método, de acordo com a reivindicação 15, **caracterizado** pelo fato de preferencialmente se utilizar água destilada na proporção de 1:3 em pH 7,7 e temperatura de 0°C.

18. Método de extração da imunoglobulina A secretória (SIgA), de acordo com a reivindicação 14, **caracterizado** pelo fato de preferencialmente ser empregado etanol a temperatura de -20°C.

19. Método, de acordo com a reivindicação 14, **caracterizado** por preferencialmente se empregar etanol 50% até a concentração final de 20% de saturação.

20. Método, de acordo com a reivindicação 14, **caracterizado** por preferencialmente se centrifugar a 5491g na temperatura de -5°C por 45 minutos.

21. Método, de acordo com a reivindicação 14, **caracterizado** por preferencialmente se dialisar por um período de 3 dias a 4°C.

22. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de na etapa e, a obtenção da SIgA

por cromatografia de afinidade consistir nas seguintes subetapas:

22e.1 Preparar a coluna com o gel tiofílico;

22e.2 preparar os soros de leite materno e colostro humano, obtidos na etapa d, com adição de sulfato de amônio contendo entre 5 e 25% peso/volume e tampão cloreto de sódio 0,1 a 10M e o pH da mistura ajustado entre pH 7,0 e 14;

22e.3 Preparar tampão de equilíbrio composto de HEPES entre 5 a 50mM, pH levemente básico adicionado de sulfato de amônio entre 5 a 50% e cloreto de sódio entre 0,1 e 1,5M;

22e.4 Colocar a amostra de soro preparada na etapa 22e.2 na coluna e, em seguida, lavar com tampão de equilíbrio obtido na etapa 4e.3;

22e.5 Eluir a coluna com tampão HEPES entre 5 a 50mM, pH levemente básico, adicionado de cloreto de sódio entre 0,1 e 1,5M para remoção das proteínas indesejadas;

22e.6 Eluir a coluna com tampão etileno glicol entre 20 e 70% em HEPES entre 5 a 50mM, pH levemente básico para a remoção total das proteínas da coluna;

22e.7 Verificar a presença da SIgA nas frações eluídas por espectrofotometria;

22e.8 Concentrar e dialisar (salina sódica entre 0,1 e 1,5%) durante o período de 1 a 5 dias com temperatura entre 0 a 20°C, com trocas periódicas da solução salina dializadora, divididas em alíquotas para análises posteriores.

23. Método, de acordo com a reivindicação 22,

caracterizado por se adicionar tampão cloreto de sódio 0,5 M.

24. Método, de acordo com a reivindicação 22, **caracterizado** por se ajustar o pH a 8,0.

25. Método, de acordo com a reivindicação 22, **caracterizado** por se empregar tampão de equilíbrio composto de HEPES 20mM pH 8,0 e sulfato de amônio 10 ou 12% e cloreto de sódio 0,5M.

26. Método, de acordo com a reivindicação 25, **caracterizado** por eluir a coluna com tampão HEPES 20mM e cloreto de sódio 0,5M pH 8.0.

27. Método, de acordo com a reivindicação 22, **caracterizado** por eluir a coluna com tampão etileno glicol 50% em HEPES 20mM pH 8,0.

RETIRADA DE LIPÍDEOS E CASEÍNA

71

Retirada de Lipídeos:

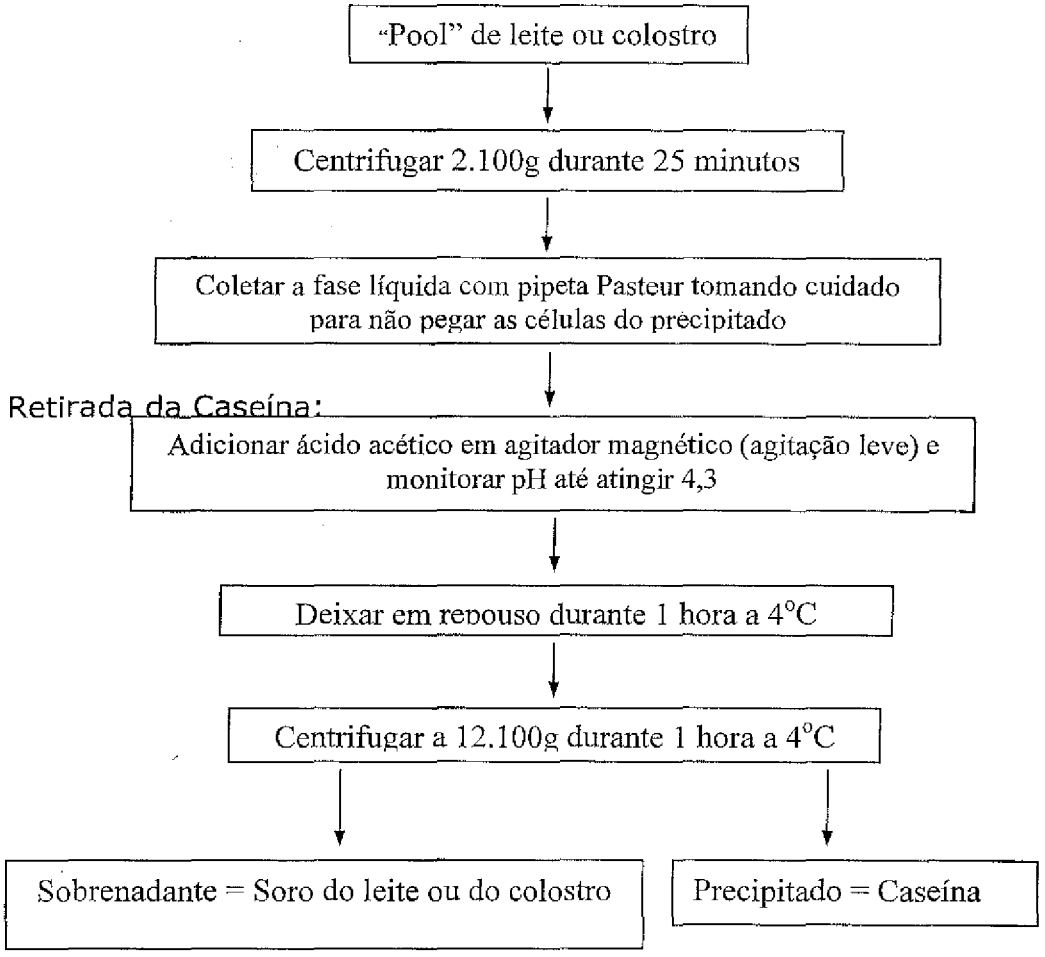


FIGURA 1

PRECIPITAÇÃO COM SULFATO DE AMÔNIO:

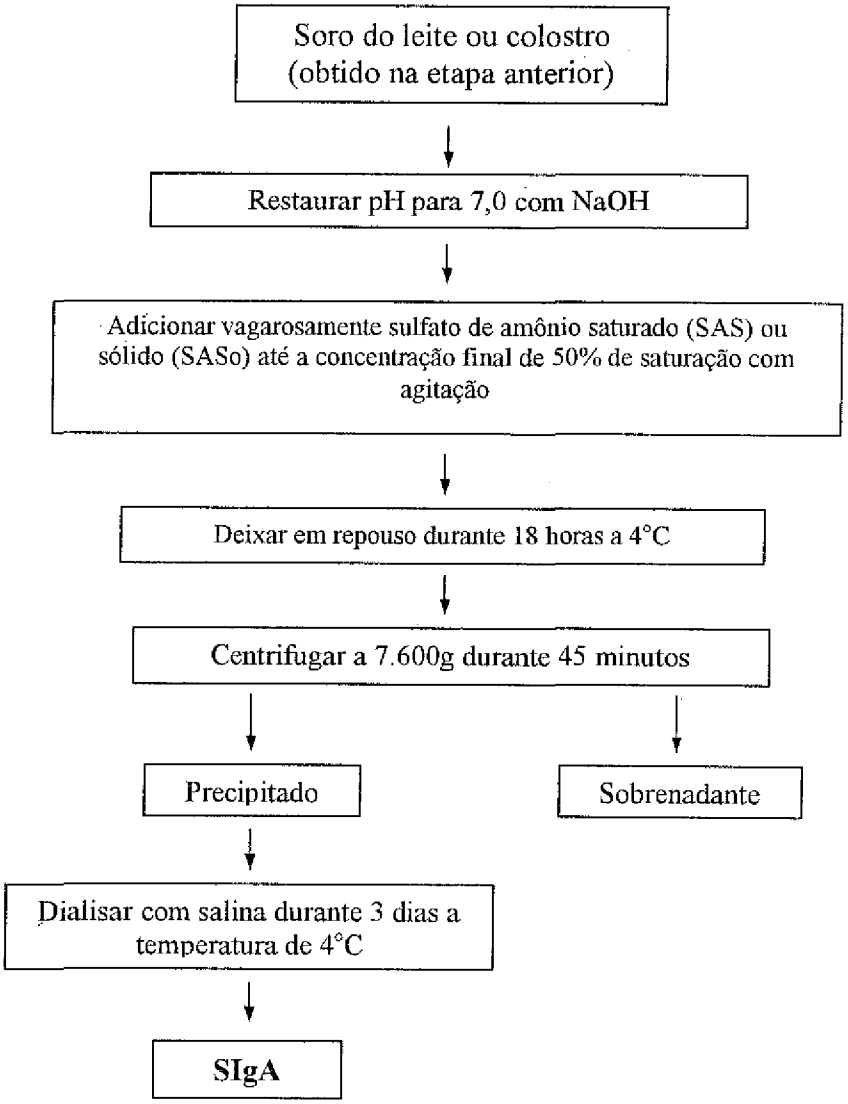


FIGURA 2

PRECIPITAÇÃO ALCOÓLICA

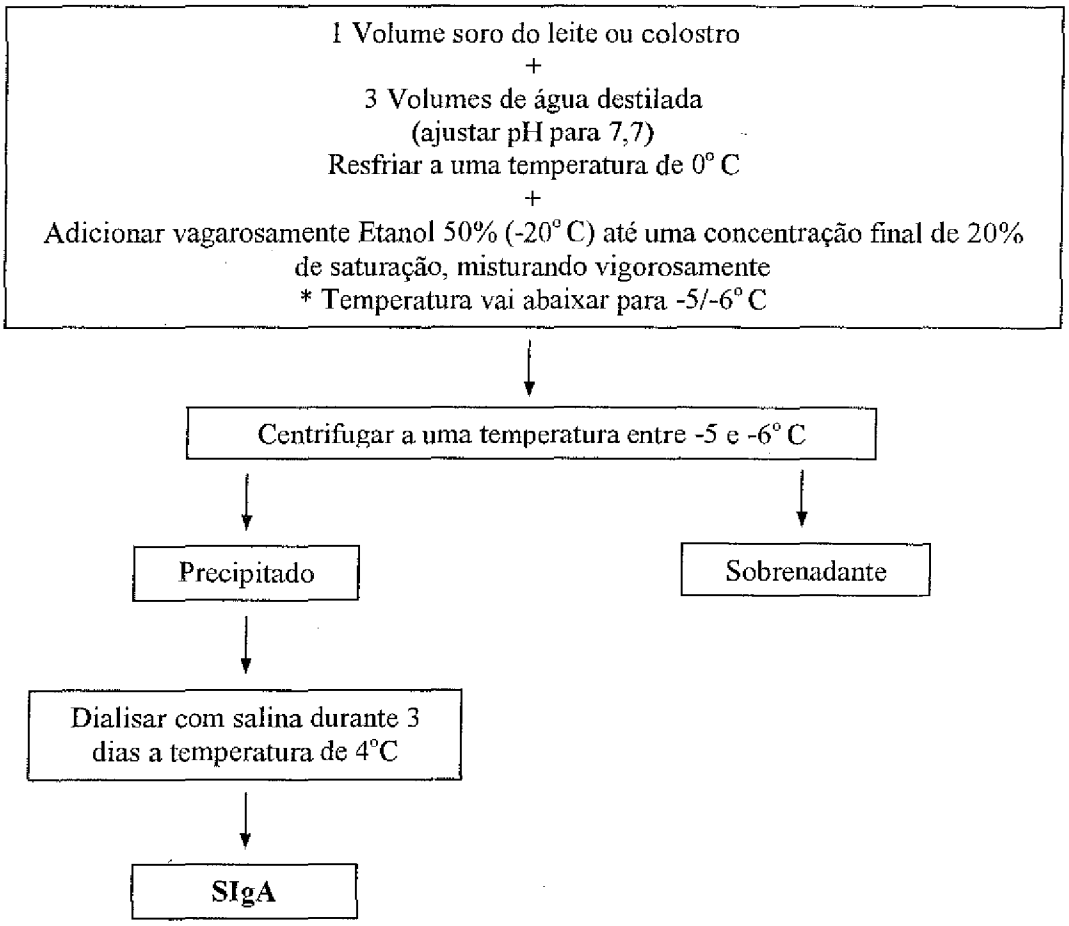


FIGURA 3

T-GEL

Preparação do Gel Tiofílico:

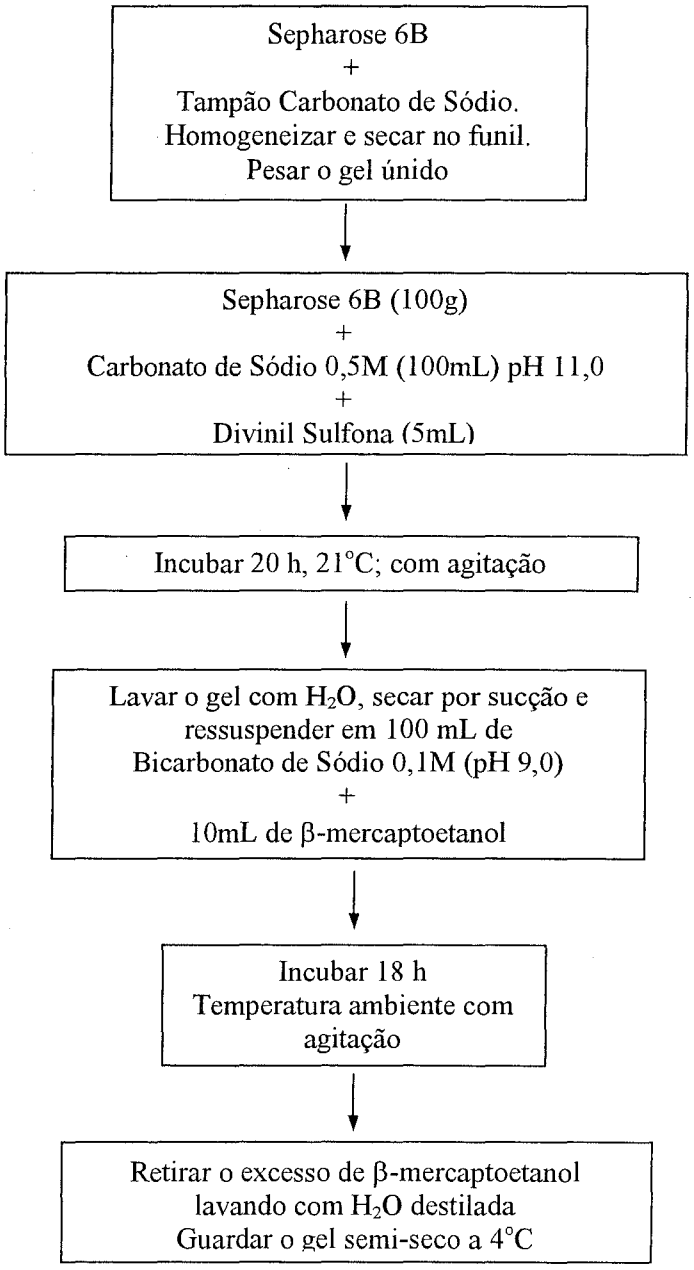


FIGURA 4

ABSORÇÃO DAS IMUNOGLOBULINAS NO GEL-TIOFÍLICO

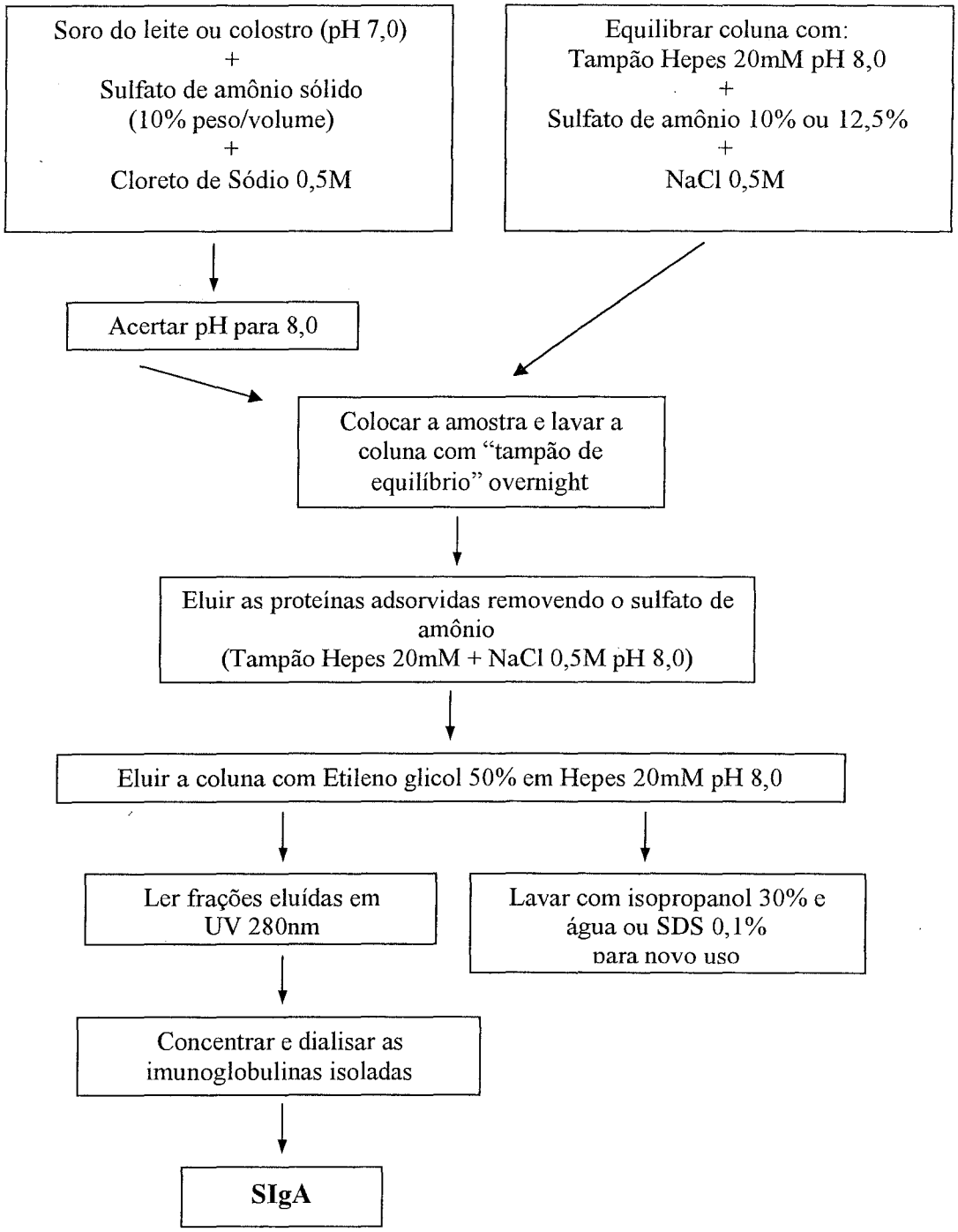


FIGURA 5

46

		Amostras								Controle +	Controle -	Soro Referência (UI/mL)	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Diluições de 1:2 até 1:256	A									Anatoxina	Branco	0,50	
	B											0,25	
	C											0,13	
	D											0,06	
	E											0,03	
	F											0,02	
	G											0,01	
	H											0,00	

FIGURA 6