



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

(11) PI 0315340-1 B1

(22) Data do Depósito: 14/10/2003

(45) Data de Concessão: 15/03/2016
(RPI 2358)



(54) Título: PROCESSO PARA DETECTAR O VÍRUS DA DOENÇA DE MAREK (MDV) EM UMA AMOSTRA DERIVADA DE UMA OU MAIS PENAS DE AVE

(51) Int.Cl.: C12Q 1/68

(30) Prioridade Unionista: 15/10/2002 GB 02 23960.6, 29/05/2003 GB 03 12241.3

(73) Titular(es): ZOETIS W LLC

(72) Inventor(es): VENUGOPAL K. NAIR, SUSAN JEAN BAIGENT, RICHARD JOHN WILLIAM CURRIE

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"PROCESSO PARA DETECTAR O VÍRUS DA DOENÇA DE MAREK (MDV) EM UMA AMOSTRA DERIVADA DE UMA OU MAIS PENAS DE AVE"**.

A presente invenção refere-se a métodos de ensaio e, em particular, a métodos para a detecção da presença de um vírus, especialmente o vírus da doença de Marek (MDV) em uma amostra de tecido de ave.

Antecedentes

O vírus da doença de Marek (MDV) é um herpesvírus, que causa doença linfoproliferativa em frangos. Até mesmo após a introdução de vacinas contra MDV, a infecção ainda causa perdas consideráveis na indústria de carne de frango. O MDV é dividido em três sorotipos, dos quais todos estabelecem infecções latentes. O sorotipo 1 inclui vírus oncogênicos, o sorotipo 2 vírus não-oncogênicos e o sorotipo 3 inclui o herpesvírus do peru (HVT) (Bülow e outros (1976) *Zentralblatt für Veterinarmedizin*, 23B, 391-402).

O diagnóstico tradicional da doença de Marek é baseado nos sinais clínicos e nas alterações patológicas. No entanto, seriam desejáveis métodos mais específicos para a vigilância da prevalência de MDV. A detecção de antígeno viral no epitélio do folículo da pena pelo teste de precipitação em gel de ágar foi descrita por Haider e outros (1970) *Poultry Science*, 49, 1654-1657. Os diferentes sorotipos podem ser diferenciados pelo teste de precipitação em gel de ágar (Lee e outros (1983) *Journal of Immunology*, 130, 1003-1006), porém a sensibilidade daquele teste é inferior ao do ensaio imunoabsorvente ligado a enzima (ELISA) e hibridização do DNA (Davidson e outros (1986) Em: Current research on Marek's Disease. *Proceedings of the 5th International Symposium on Marek's Disease* (pp. 311-316). Tallahassee: Rose Printing Company, Inc.).

As amostras preferidas para isolamento de vírus são células com revestimento castanho, que podem ser co-cultivadas com culturas de célula primária suscetíveis. Ensaio imunofluorescente (Kitamoto e outros (1979). *Biken Journal*, 4, 137-142) ou ELISA (Cheng e outros (1984) *Avian Diseases*, 4, 900-911), podem ser usados para identificação subsequente do

sorotipo MDV. Alternativamente, o sorotipo pode ser identificado por análise de endonuclease de restrição (Ross e outros (1983). *Journal of General Virology*, 64, 2785-2790) ou reação em cadeia com a polimerase (PCR) (Wang e outros (1993) *Molecular and Cellular Probes*, 7, 127-131. Hibridização in situ
 5 foi usada para detecção de genoma MDV em tecido infectado (Endoh e outros (1996) *Journal of Veterinary Medical Science*, 58, 969-976; Ross e outros (1997) *Journal of General Virology*, 78, 2191-2198), porém esta técnica é provavelmente demasiadamente trabalhosa para diagnósticos de rotina. (Davidson e outros (1995) *Avian Pathology*, 24, 69-94 e Davidson e outros
 10 (1996) Em: Current research on Marek's disease. *Proceedings of the 5th International Symposium on Marek's Disease* (pp. 311-316). Tallahassee: Rose Printing Company, Inc.), aplicaram técnicas de PCR sorotipo 1-do MDV específicas a amostras de sangue integral e de tecido do tumor provenientes de bandos comerciais de galinhas e de perus, cuja maioria tinha doença neoplásica. Wang e outros (1993) *Molecular and Cellular Probes*, 7, 127-131;
 15 Young, P. & Gravel, J. (1996) Em Current research on Marek's disease. *Proceedings of the 5th International Symposium on Marek's Disease* (pp. 308-310). Tallahassee: Rose Printing Company, Inc. e Silva, R. F. & Witter R. L. (1996) Em Current research on Marek's disease. *Proceedings of the 5th International Symposium on Marek's Disease* (pp. 302-307). Tallahassee: Rose
 20 Printing Company, Inc. aplicaram um protocolo de PCR sorotipo 1 do MDV específico a vários tecidos de galinhas experimentalmente inoculados com a cepa JM/102.

Handberg e outros (2001) *Avian Pathology* 30: 243-249 descrevem o uso de PCR sorotipo 1-e sorotipo 3-específica para a detecção de
 25 MDV em galinhas. As amostras de tecido foram retiradas de sangue (células com revestimento castanho), de baço, de fígado, de pele, de pontas de penas e de ovários.

Descrição da Invenção

30 A presente invenção fornece outros métodos para a detecção de um vírus, especialmente de MDV, em amostras de tecidos de aves.

Em um primeiro aspecto a invenção fornece um método de de-

tecção de um vírus em uma amostra de tecido de ave que compreende: a extração de material genético de uma amostra de tecido de ave e testagem do material genético extraído para detectar algum material genético proveniente do vírus; caracterizado pelo fato de que a amostra de tecido de ave é derivada de uma ou mais penas do trato axilar.

Utilizando-se amostras de penas pode ser realizado o teste em animais vivos. A amostragem das penas é simples, rápida e prática sob condições no campo. As amostras de penas podem ser colocadas em um recipiente adequado e testadas imediatamente ou armazenadas para testagem futura, como desejado. Em contraste, a amostragem do sangue requer muito cuidado para evitar a formação de coágulos de sangue, inclusive transporte do sangue sob condições de resfriamento controladas. A coagulação do sangue leva a resultados negativos do teste. As amostras de órgãos internos, tais como amostras de baço e de tumor, devem ser transportadas em gelo úmido, o que é impraticável em condições no campo.

Por seleção de penas do trato axilar das quais derive uma amostra de tecido, a invenção fornece vantagens significativas em relação a métodos conhecidos que retiram amostras de tecido de diferentes partes da ave.

Surpreendentemente, foi verificado que o vírus pode ser detectado em penas do trato axilar a níveis mais altos do que em outras penas e portanto o vírus pode ser detectado em penas do trato axilar de acordo com a invenção quando não puder ser detectado em outras amostras de tecido, inclusive em outras penas. Conseqüentemente, os métodos da invenção são particularmente adequados para monitorar a extensão até a qual um bando de aves foi imunizado eficazmente com vacina MDV, detectando-se a presença da cepa da vacina em amostras de tecido de penas do trato axilar.

Por "aves" inclui-se qualquer ave, porém de preferência aves que são produzidas comercialmente, especialmente galináceos tais como galinhas, perus, patos etc.

Por "penas do trato axilar" incluem-se as penas localizadas na região de uma ave marcada "axilar" no diagrama de penas anexo (figura 1).

Preferencialmente, a pena do trato axilar selecionada é uma "pena pino", isto é, uma pena imatura que está crescendo. O termo "pena em crescimento" será familiar aos versados na técnica. Por exemplo, van Tyne J & Berger AJ (1959) *Fundamentals of Ornithology*, John Wiley, New York refere-se a uma

5 pena pino como "uma pena nova, em crescimento, ainda incompletamente desprotegida". Lucas AM & Stettenheim PR (1972) *Avian Anatomy*, Integument Part 1, US Government Printing Office, Washington, pp 199-200 ressalta "A nova pena está rigidamente enrolada dentro de uma bainha enquanto se forma. Enquanto ela aparece acima da pele, ela tem um formato cônico

10 comprido com uma ponta rombuda e uma superfície levemente úmida. Uma pena neste estágio em qualquer geração é freqüentemente chamada pena pino". (Ver também a figura 1 (a), que é extraída de Lucas & Stettenheim (1972)).

Preferencialmente, as penas do trato axilar são retiradas de pin-

15 tos que tenham vantajosamente menos de um mês de idade.

Em uma modalidade preferida, o método é realizado em amostras retiradas de pintos em ou antes de 13 dias após a imunização, de preferência entre 8 dias e 12 dias após a imunização, mais preferivelmente entre 9 e 11 dias após a imunização, isto é, nos dias 9, 10 ou 11 após a imuniza-

20 ção.

Preferivelmente, o método fornece informação quantitativa sobre a quantidade de vírus, especialmente MDV, na amostra.

Preferivelmente, o método é específico para o sorotipo 1 do MDV e mais preferivelmente o método é específico para o MDV-1 Rispens

25 cepa CVI 988. Esta última cepa é uma cepa de vacina comercial produzida por Fort Dodge, IA, USA que é disponível pela American Type Culture Collection (ATCC), Mannassas, VA, USA.

Vantajosamente, o método envolve o uso de uma reação de PCR. Preferencialmente, antes de ser realizada a dita reação de PCR, o ma-

30 terial genético extraído a ser testado é tratado com um agente para evitar o efeito inibidor de qualquer fator de tecido de pena que possa estar presente. Este efeito inibidor parece estar associado com a melanina e pode portanto

ser um problema em particular quando forem amostradas penas provenientes de aves de cor marrom. Preferencialmente, o agente é selecionado entre uma ou mais de albumina do soro bovino, albumina porcina (de porco) e albumina ovina (de ovelha).

5 Os versados na técnica estarão cientes de uma faixa de métodos de detecção para detectar material genético viral, especialmente MDV que pudesse ser usado nos métodos da invenção, tais como os métodos de Handberg e outros (2001) acima. Um método particularmente preferido para detectar MDV-1 cepa CVI 988 é como a seguir:

10 (i) o fornecimento de iniciadores para adiante e reversos para uma ácido nucléico polimerase, cujos iniciadores são selecionados entre a seqüência de nucleotídeo que flanqueia a seqüência de nucleotídeo de repetição de 132 pb de MDV;

(ii) a amplificação das seqüências de ácido nucléico entre os ini-
15 ciadores;

(iii) a detecção do número de seqüências de repetição de 132 pb nas seqüências de ácido nucléico amplificadas e

(iv) a relação do número de seqüências de repetição de 132 pb à
20 identidade do ácido nucléico viral e desse modo identificando o tipo de MDV na amostra de tecido, múltiplas cópias da seqüência de repetição de 132 pb sendo indicadoras de MDV-1 cepa CVI 988.

Um método quantitativo preferido para uso na detecção de MDV de acordo com a presente invenção compreende:

(a) o fornecimento de uma seqüência de polinucleotídeo que se-
25 ja capaz de se ligar especificamente a um polinucleotídeo alvo MDV-específico;

(b) o contato do material genético extraído com uma sonda sendo que a sonda se liga especificamente ao seu polinucleotídeo alvo de MDV;

(c) a determinação se a sonda se ligou ao seu polinucleotídeo
30 alvo de MDV e

(d) a determinação se a amostra contém

MDV na base de que a presença do polinucleotídeo alvo indica a

presença de MDV na amostra.

A etapa (d) de preferência fornece uma determinação quantitativa da quantidade de vírus na amostra.

Vantajosamente a etapa de determinar se a sonda se ligou a um
5 polinucleotídeo alvo compreende a amplificação de uma região do polinucleotídeo alvo, cuja região compreende o sítio de ligação da sonda.

Preferencialmente a sonda tem a seqüência 5' AGA CCC TGA TGA TCC GCA TTG CGA CT 3' (SEQ ID N°. 1).

Preferencialmente, a amplificação é iniciada pelos seguintes iniciadores:
10

O iniciador para adiante (GGT CTG GTG GTT TCC AGG TGA - SEQ ID N°. 2) que está localizado nas posições NT 1341-1361 na seqüência de gene Meq cepa GA.

A cepa GA (Geórgia) era um isolado 1964 de Geórgia, de um
15 tumor ovariano. Referência: C. S. Eidson & S. C. Schmittle (1968). Estudos sobre a doença aguda de Marek. I. Características do isolado GA em galinhas. Avian Diseases 12; 467-476.

O iniciador reverso (GCA TAG ACG ATG TGC TGC TGA - SEQ ID N°. 3) está localizado nas posições NT 1413-1393.

Vantajosamente, a sonda é marcada fluorescentemente e a etapa de determinar se a sonda se ligou a um polinucleotídeo alvo compreende
20 determinar as emissões fluorescentes da sonda.

Os corantes fluorescentes são trazidos para proximidade física por conjugação direta nos terminais opostos de uma oligo sonda curta (5' repórter fluorocromo, habitualmente 6-FAM e 3' extintor fluorocromo, habitualmente TAMRA). Quando o fluoróforo de alta energia (FAM) está excitado a 488 nm, em vez da emissão de fluorescência esperada a 520 nm a energia capturada é transferida para o fluoróforo de energia mais baixa (TAMRA) e é emitida a 580 nm (ocorreu transferência de energia de ressonância de fluorescência, FRET). Usando-se a combinação de fluoresceína / rodamina repórter / extintor, FRET irá ocorrer eficazmente até mesmo quando os grupos
25 30 estiverem separados por 25-30 bases de DNA. durante o curso de um en-

saio TaqMan® os dois fluoróforos são fisicamente destacados um do outro pela ação da 5' nuclease de Taq DNA polimerase – após o que a estimulação a 488 nm resulta em emissão visível de FAM a 520 nm.

As sondas marcadas em duplo habitualmente têm um corante 5'-repórter, tais como FAM, TET, HEX, JOE ou VIC e um grupo 3'-extintor, tal como TAMRA ou Dabcil (um extintor universal).

As marcações fluorescentes adequadas estão dentro do conhecimento comum geral de pessoas versadas na técnica. Os reagentes a seguir são disponíveis pela Sigma-Aldrich, UK: HEX representa a hexacloro-fluoresceína; TET representa a tetracoloro-fluoresceína; Joe é a 6-carbóxi-4',5'-dicloro-2',7'-dimetoxifluoresceína; ROX é a 5-carbóxi-Rodamina; dabcil é o ácido 4-((4-(dimetilamino) fenil) azo) benzóico.

As estruturas e informação adicional sobre todos estes estão disponíveis na página de sonda molecular www.probes.com. O corante VIC está disponível pela Applied Biosystems.

6-FAM = 6-carboxifluoresceína; (uma fosforamidita); corante amarelo-esverdeado; máximo de absorbância = 494 nm, máximo de emissão = 525 nm

HEX = uma fosforamidita; corante cor-de-rosa; máximo de absorbância = 535 nm, máximo de emissão = 556

TET = uma fosforamidita; corante cor-de-laranja; máximo de absorbância = 521 nm, máximo de emissão = 536

VIC = máximo de absorbância = 538 nm, máximo de emissão = 554

JOE = máximo de absorbância = 521 nm, máximo de emissão = 547

TAMRA = 6-carbóxi-tetrametil-rodamina; = máximo de absorbância = 555 nm, máximo de emissão = 580

Dabcyl = = máximo de absorbância = 453 nm, sem máximo de emissão (extintor universal)

Pela descrição anterior será evidente que um aspecto importante dos métodos da invenção é o uso de amostras de tecido de aves que são

mais convenientes e úteis do que as amostras de tecido de aves usadas anteriormente para detectar infecção viral, especialmente MDV. Conseqüentemente, outros aspectos da invenção referem-se à provisão de amostras de tecido de aves.

- 5 Em um segundo aspecto a invenção fornece uma amostra de tecido de aves isolada de uma ou mais penas do trato axilar.

 Por "isolado" inclui-se o significado de que a amostra de tecido é isenta de uma quantidade substancial do material com o qual ela está normalmente associada na natureza. Por exemplo, a amostra de tecido pode
10 ser armazenada em um recipiente ou ser derivada da pena do trato axilar original por uma variedade de métodos de isolamento; extração e/ou purificação.

 Preferencialmente a amostra de tecido isolada consiste da parte próxima (a parte não-farpada que está presa à pele e que contém a polpa –
15 ver as figuras anexas). Conseqüentemente é preferível que a parte próxima da pena do trato axilar seja isolada da parte distal (farpada) da pena. Isto é facilmente conseguido simplesmente por corte da parte próxima da pena com uma tesoura e descartando-se a parte distal.

 Em um terceiro aspecto a invenção fornece um extrato que contém material genético proveniente de uma amostra de tecido de aves em
20 que o extrato é retirado de uma amostra de tecido como descrito em relação ao segundo aspecto da invenção.

 Será considerado que as amostras de acordo com os segundo e terceiro aspectos da invenção podem ser coletadas e/ou preparadas no
25 campo ou transportadas para uma localização separada, tal como um laboratório, para a preparação e a testagem. Portanto, outros aspectos da invenção referem-se a amostras de acordo com o segundo e/ou o terceiro aspectos da invenção armazenados em uma forma adequada para transporte para uma localização separada.

30 As penas podiam ser armazenadas completas (por exemplo em tubos de plástico universal Sterilin de 20 ml) ou após o corte da parte próxima necessário para a preparação de DNA (por exemplo, em tubos de Ep-

pendorf de 1 ml com tampa de pressão ou com tampa aparafusada). Alternativamente, as penas podiam ser armazenadas em sacos de plástico selados ou fechados a quente. Para armazenagem em curto termo (por exemplo, 1 semana), as penas podiam ser armazenadas a 4 °C, porém, durante períodos de armazenagem mais longos, elas deviam ser armazenadas congeladas a -20 °C.

O DNA devia ser armazenado a -20 °C em tubos de Eppendorf de 0,5 ml ou de 1,5 ml com tampa aparafusada ou com tampa de pressão, em solução tamponadora Tris-EDTA ou, se o DNA precisa ser usado em análise Taqman, em água pois o EDTA irá inibir a reação de Taqman.

Vantajosamente, os resultados dos métodos são fornecidos em um formato inteligível. Preferivelmente, os resultados são registrados ou armazenados em um veículo de informação. No entanto, a etapa de fornecimento dos resultados podia ser por comunicação dos resultados oralmente.

Por "veículo de informação," inclui-se qualquer meio de armazenagem de informação, tais como papel, um disco de computador, um sistema de transferência de informação à base de Internet, tal como um e-mail ou uma página da Internet ou arquivo eletrônico etc. Evidentemente, também se pretende que um "formato inteligente" abranja informação criptografada que pode ser decifrada com um código aproximado.

Exemplos de incorporação de certos aspectos da invenção serão agora descritos com referência às figuras a seguir em que:

A figura 1(a) apresenta o desenvolvimento de penas acima da pele, durante as primeiras quatro gerações. Um círculo indica uma pena que está ainda em crescimento; um ponto, uma pena que está completamente crescida.

A figura 1(b) é um diagrama do padrão de penas em galinhas que apresenta o trato axilar.

Os tratos axilares se encontram no lado de dentro do pinto e se estendem, em cada lado, do pescoço inferior até o abdômen superior, abaixo das asas e ao longo do osso do peito. A figura 1 é tirada do livro 'Bird Structure: An approach through evolution development and function in the

fowl'. D.A. Ede, Publisher: Hutchinson Educational, 1964. O padrão de penas é o mesmo em todas as aves.

As figuras 2(a) a 2(d) são fotografias das penas do trato axilar e vistas de perto de penas individuais apresentando as partes que são retidas para fornecer amostras de tecido de acordo com a invenção. As figuras 2(a) e 2(b) demonstram as penas do trato axilar. As figuras 2(c) e 2(d) demonstram a parte da pena retirada para análise.

Figura 3:

Apresenta uma dose resposta do sorotipo da vacina CVI 988 como detectado por iniciadores *Meq* (produto de 78 pb) com técnica Taqman. A vacina CVI 988 foi colhida de um vetor de cromossomo bacteriano artificial (BAC).

Este experimento foi realizado para testar / otimizar o uso do conjunto iniciador *Meq* Taqman / sonda. Foi usado BAC10 DNA como o DNA alvo pois era sabido que ele contém muitas cópias do genoma viral.

O ensaio Taqman foi usado para detectar o gene *Meq* em DNA derivado de genoma do vírus Rispens clonado em um Cromossomo Bacteriano Artificial (BAC10). O DNA foi usado em diluições de dez vezes. Durante cada ciclo de PCR em tempo real, o repórter fluorocromo FAM é liberado e é capaz de fluorescer. Portanto, com cada ciclo aumenta a intensidade da fluorescência. O valor de Ct (o ciclo no qual a fluorescência passa de um limite fixo) é uma média do número de cópia inicial da sequência alvo. Quanto menor o valor de Ct, maior o número de cópia inicial da sequência alvo. Um valor de Ct de 40 indica que nenhuma sequência alvo ou uma quantidade não detectável de sequência alvo está presente. Esta figura mostra que as diluições desta preparação de DNA entre 1:10 e 1:10000 forneceram uma quantidade detectável de produto *Meq* PCR. O valor de Ct aumenta linearmente com o DNA cada vez mais diluído.

Figura 4:

Dose resposta de vacina CVI 988 em fibroblastos de embrião de galinha (CEF) e em cromossomos bacterianos artificiais (BAC). Este experimento foi realizado para testar / otimizar o uso do conjunto iniciador de *Meq*

Taqman / sonda no DNA derivado de células infectadas com Rispens-MDV.

Foi usado o ensaio de Taqman para detectar o gene *Meq* em DNA derivado de BAC10 e em DNA derivado de células de fibroblasto (CEF) de embrião de pinto infectadas com Rispens-MDV. O DNA foi usado em diluições de dez vezes. Esta figura mostra que tanto para o DNA de BAC10 como para o DNA de CEF infectado com Rispens, o valor de Ct aumenta linearmente com o DNA cada vez mais diluído.

Figura 5:

Dose resposta de vacina CVI 988 em baço e CEF de galinha. Este experimento foi realizado para testar / otimizar o uso do conjunto iniciador de *Meq* Taqman / sonda no DNA derivado de amostras de tecido provenientes de galinhas infectadas com Rispens-MDV.

Foi usado o ensaio de Taqman para detectar o gene *Meq* em DNA de um baço de um pinto inoculado com Rispens (11 dpi) e de um pinto não inoculado com a idade combinada. Foi usado como um controle positivo o DNA derivado de células CEF infectadas com Rispens. O DNA foi usado em diluições de dez vezes de estoques de 1 mg/ml e foi usado 1 µl por reação. Embora os valores de Ct para o DNA de baço não inoculado fossem menores do que 40, eles claramente não aumentaram com o aumento das concentrações de DNA. No entanto, a detecção de *Meq* no DNA de baço inoculado aumentou significativamente acima desta linha de base quando o DNA foi usado puro ou à diluição de 1:10. Foi estabelecido assim que, para análise de Taqman de DNA retirado de amostras de tecido de pintos inoculados com MDV, seria usado 1 µl de DNA de um estoque de 1 mg/ml (isto é, 1 µg) de DNA por reação.

Figura 6:

Tempo-Curso de replicação de vacina CVI 988 em penas de galinha demonstrando pico de replicação 15-20 dias após a infecção. Este experimento foi realizado para seguir o tempo-curso de infecção Rispens MDV em tratos axilares de pena de pintos inoculados por ensaio de Taqman.

Foi usado o ensaio de Taqman para detectar o gene *Meq* em DNA preparado partindo de pontas de penas de pintos a 0 (não inoculado),

10, 15, 20 e 28 dpi pós-inoculação com Rispens. Um grupo de cinco pintos foi amostrado em cada ponto do tempo (quatro pintos a 0 dpi). Foi usado 1 µg de DNA no ensaio de Taqman. São comparados graficamente os valores médios de Ct para cada grupo. Os valores de Ct diminuem desde 0 – 15 dpi, então aumentam de novo desde 20 – 28 dpi, apresentando um pico de infecção de 15 – 20 dpi.

Figura 7:

Este experimento foi realizado para seguir o tempo-curso de infecção Rispens MDV em tratos axilares de pena de pintos inoculados por PCR de repetição de 132 pb.

Foi preparado o DNA partindo de pontas de pena de pintos inoculados com Rispens a 0 (não inoculado), 10, 15, 20 e 28 dpi. Um grupo de cinco pintos foi amostrado em cada ponto do tempo (quatro pintos a 0 dpi). Foi usado 1 µg de DNA em PCR (inclusive 10 µg de BSA por reação) e as amostras processadas em um gel de agarose a 1 % que contém brometo de etídio.

(M) = marcadores de tamanho molecular lambda, (-) = água (controle negativo), (+) = DNA de BAC10 de Rispens (controle positivo). Os dias após a infecção estão indicados abaixo dos géis.

(a) Para confirmar a qualidade de PCR e a quantidade de cada amostra de DNA, foi realizada PCR para detectar uma sequência endógena de retrovírus presente em todas as células de galinha. O produto endógeno de retrovírus de 360 pb foi detectado em todas as amostra de pena confirmando a qualidade de PCR de cada amostra.

(b) Foi realizada PCR de repetição de 132 pb. A pista marcada (+) apresenta os produtos de PCR em escada de repetição de 132 pb obtidos com Rispens BAC10 – seis cópias são claramente distinguidas. O controle negativo não apresenta produto PCR, como três dos quatro pintos não inoculados. O quarto pinto não inoculado apresenta uma faixa quase apagada de produto equivalente a 3 cópias da repetição, indicando que o pinto foi infectado por contato pelos pintos inoculados abrigados no mesmo ambiente. Todos os pintos inoculados foram positivos de repetição de 132 bp a 11,

15, 20 e 28 dpi. O produto de PCR que representa um certo número de cópia de repetição predominou em muitos casos e o número de cópias representado por este produto predominante variou entre as amostras. Isto indica que os subclones do vírus do inóculo, com um número ajustado de repetições, vêm predominar em diferentes pintos.

Figura 8:

Gráfico que apresenta uma curva padrão para a reação de gene *Meq* que usa o DNA de BAC10 de Rispons

Figura 9:

Gráfico que apresenta uma comparação de carga de vírus de Rispons em vários tratos de pena de pintos individuais a (A) 8, (B) 13, (C) 19 e (D) 26 dias após a vacinação.

Figura 10:

Gráfico que apresenta a carga de vírus de Rispons em vários tratos de pena determinados por PCR em tempo real para gene de *Meq* comparado graficamente como (A) em uma escala logarítmica e (B) em uma escala linear. Valores médios (+SEM) para os quatro pintos vacinados.

Exemplo 1: Ensaio quantitativo de PCR para MDV-1

A PCR quantitativa Taqman[®] é uma técnica estabelecida usada para avaliar quantitativamente a quantidade de alvo de PCR de origem por determinação do número de ciclos de PCR necessários para atingir um limite de fluorescência (definido matematicamente pelo valor de Ct). Um número maior de cópias de sequência alvo na amostra requer menos ciclos de PCR para se atingir o limite de Ct.

Os iniciadores de Taqman e a sonda foram projetados partindo da sequência de gene de *Meq* do MDV cepa GA (ver adiante). Esta sequência está publicada em: Jones D, Lee L, Liu JL, Kung HJ, Tillotson JK. O vírus da doença de Marek codifica um gene zipper básico de leucina que se parece com os oncogenes fos/jun o que é altamente expresso em tumores linfoblásticos. Proc. Natl Acad Sci U S A. Maio de 1992 1; 89 (9): 4042-6. O N°. de Acesso da Sequência é: M89471 (SEQ ID N°. 9). O software Applied Biosystems 'Primer Express' foi usado para selecionar as seqüências ótimas

de iniciador / sonda provenientes da sequência de Meq.

Os iniciadores específicos usados nesta análise multiplicam uma sequência de 73 pb no gene meq do vírus sorotipo 1 de MDV. Esta região é comum tanto para as cepas de vacina como para isolados no campo.

- 5 Os experimentos descritos usam a vacina CVI 988 como um exemplo do vírus da doença de Marek sorotipo 1. Os resultados podem ser aplicados a todos os vírus da doença de Marek sorotipo 1 porque a área da sequência contra a qual estão dirigidos os iniciadores é conservada nos vírus da doença de Marek sorotipo 1.

10 Protocolo para análise de PCR de Taqman® Meq gene em amostras de ponta de pena

1. Materiais necessários:

Reagentes:

- A solução tamponadora TNE (armazenar à temperatura ambiente) contém Tris (20 mM), NaCl (150 mM), EDTA (1 mM) e o pH é ajustado até pH 7,5 usando-se HCl
- Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) solução a 10 % (armazenar à temperatura ambiente)
- Proteinase K (pó liofilizado da Sigma # P-6556 e completar um estoque de 20 mg/ml em água, armazenada a -20 °C)
- Fenol pH 7,9 obtido de Sigma (nº. do catálogo P-4557) armazenado a 4 °C)
- Clorofórmio (armazenado a -20 °C)
- Acetato de sódio 3 M pH 5,2 (armazenado à temperatura ambiente)
- Etanol puro filtrado (armazenado à temperatura ambiente)
- Etanol gelado a 70 % filtrado (armazenado a 4 °C)
- Água de qualidade para PCR
- Água de qualidade para PCR contendo 800 µg / ml de Albumina de Soro Bovino (BSA), filtrada
- Gelo
- Reagentes de núcleo Taqman® PCR – solução tamponadora

Taqman[®], MgCl₂, dNTPs, Taq polimerase, Uracil N-Glicosilase (Perkin Elmer Biosystems)

Iniciador para adiante Meq 5' GGT CTG GTG GTT TCC AGG
TGA 3' (SEQ ID N°. 2) (MWG Biotech)

5 Iniciador reverso Meq 5' GCA TAG ACG ATG TGC TGC TGA 3'
(SEQ ID N°. 3) (MWG Biotech)

Sonda Meq 5' FAM AGA CCC TGA TGA TCC GCA TTG CGA
CT 3' (SEQ ID N°. 1). TAMRA
(Sigma-Genosys Ltd)

10 (FAM & TAMRA são as pontas fluorescentes)

6-FAM = 6-carboxifluoresceína; (uma fosforamidita); corante
amarelo-esverdeado; máximo de absorbância = 494 nm, máximo de emis-
são = 525 nm

TAMRA = 6-carbóxi-tetrametil-rodamina; = máximo de absor-
15 bância = 555 nm, máximo de emissão = 580

5'FAM-3'TAMRA sondas marcadas são disponíveis por: Sigma-
Genosys Ltd. (London Road, Pampisford, Cambridgeshire, CB2, 4EF, UK.
Tel. 01223 839200)

5'VIC-3'TAMRA sondas marcadas são disponíveis por: Applied
20 Biosystems Ltd. (Kelvin Close, Birchwood Science Park North, Warrington,
Cheshire, WA3 7PB)

Outros fornecedores são:

- Integrated DNA Technologies (IDT) 1710 Commercial Park,
Coralville IA, 52241, USA
- 25 - Oswell Research Products Ltd.: Lab 5005, Medical and Biologi-
cal Sciences Building, University of Southampton, Boldrewood, Bassett
Crescent East, Southampton, SO16 7PX, Tel: 02380 592984

Equipamento

- Tubos universais de plástico de 20 ml Sterilin
- 30 - Tesouras e pinças limpas
- Banho-maria ajustado a 50 °C
- Microcentrífuga

- Tubos de Eppendorf com tampa de pressão (autoclavados) de 1,5 ml
- Tubos de Eppendorf com tampa rosqueada (autoclavados) de 1,5 ml
- 5 - Tubos de Eppendorf com tampa de pressão (autoclavados) de 0,5 ml
- Vácuo / secador-congelador (não é essencial)
- Espectrofotômetro
- Gabinete dedicado para PCR, pipetas e pontas autoclavadas
- 10 - Placa para PCR com 96 cavidades Thermo-fast e tampas (Perkin Elmer / Applied Biosystems)
- ABI Prism 7700 Sequence Detector (Perkin Elmer/Applied Biosystems)
- 2. Coletando as penas:
- 15 - Arrancar 8 – 10 pontas de penas (penas curtas, recém-crescidas com muita polpa) do trato braquial de pena de cada galinha (ver figuras)
- Colocar as penas em um tubo de plástico 'universal' para transporte de volta para o laboratório.
- 20 3. Preparação de DNA das pontas de pena:
- Recortar e conservar 1 cm próximo da pena (isto é, a parte não-farpada que está presa à pele e que contém a polpa – ver fotografias). Descartar a parte farpada distal da pena.
- Para cada galinha, colocar as 8 – 10 extremidades da pena
- 25 conservadas em um tubo de Eppendorf com tampa de pressão de 1,5 ml.
- Adicionar 500 µl de solução tamponadora amostra proteinase K (solução tamponadora TNE contendo 0,5 % de SDS) contendo 100 µg de proteinase K (adicionar a proteinase K um instante antes de usar).
- Incubar a 50 °C em um banho-maria durante 1,5 – 2 horas.
- 30 - Microcentrifugar os tubos (6000 rpm, 10 minutos) para 'peletizar' as pontas e os restos da pena.
- Transferir o sobrenadante para um novo tubo com tampa de

pressão (se as penas forem provenientes de aves de cor marrom, os sobrenadantes serão de cor marrom em consequência da presença de melanina).

- Adicionar um volume igual (500 μ l) de fenol ao sobrenadante novamente.

- 5
- Submeter a vórtice
 - Centrifugar a 13000 rpm, 2 minutos.
 - Transferir a fase superior (aquosa) para um novo tubo com tampa de pressão

10

- Adicionar um volume igual (500 μ l) de fenol ao sobrenadante novamente.

- Submeter a vórtice
- Centrifugar a 13000 rpm, 2 minutos.
- Transferir a fase superior (aquosa) para um novo tubo com tampa de pressão

- 15
- Adicionar um volume igual (500 μ l) de clorofórmio gelado.
 - Submeter a vórtice
 - Centrifugar a 13000 rpm, 2 minutos.
 - Transferir a fase superior (aquosa) para um tubo com tampa rosqueada de 1,5 ml

- 20
- Adicionar 1 ml de etanol a 100 % filtrado.
 - Adicionar 50 μ l de Acetato de Sódio 3 M.
 - Misturar cuidadosamente por inversão do tubo e deixar à temperatura ambiente durante 20 minutos (o DNA se torna visível enquanto precipita).

- 25
- Centrifugar a 13000 rpm, 2 minutos, para peletizar o DNA (se forem usadas galinhas brancas, o pélete será branco; se forem usadas galinhas de cor marrom, pélete marrom).

- Descartar o sobrenadante;

- 30
- Enxaguar o pélete duas vezes com 500 μ l de etanol a 70 % gelado, fazendo escorrer cuidadosamente o etanol pela parede do tubo, então despejando para fora (tomar cuidado para não desalojar o pélete de DNA).

- Tampar o topo do tubo com Parafilm e fazer vários orifícios no Parafilm utilizando uma agulha.

- Colocar os tubos em uma secadora a vácuo durante aproximadamente 5 minutos para secar o pélete (alternativamente secar ao ar).

- 5 Ressuspender o pélete em 50 µl de água de qualidade para PCR por aplicação branda de vórtice.

Determinar a concentração da preparação de DNA usando-se um espectrofotômetro.

Ajustar a concentração até 1 mg / ml em água.

- 10 Armazenar a – 20 °C.

4. Ensaio quantitativo PCR de TaqMan® (Perkin Elmer Biosystems)

- Ajustar as reações em um gabinete dedicado para PCR, usando-se pipetas dedicadas para PCR e pontas autoclavadas

- Trabalhar com gelo

- 15 - Preparar mistura mestra contendo os reagentes a seguir para o número apropriado de amostras - estabelecer reações em duplicata para cada amostra (volumes fornecidos por reação):

Componente	Volume por 25 µl de reação	Concentração Final
Solução tamponadora de Taqman	2,5 µl	
MgCl ₂ (5 mM)	5,0 µl	1,0 mM
dATP (10 mM)	0,5 µl	0,2 mM
dCTP (10 mM)	0,5 µl	0,2 mM
dGTP (10 mM)	0,5 µl	0,2 mM
dUTP (10 mM)	0,5 µl	0,2 mM
Água contendo 800 µg / ml de BSA	11,6 µl	~10 µg de BSA / reação
Sonda Meq (10 mM)	0,5 µl	0,2 µM
Iniciador para adiante Meq (10 mM)	1,0 µl	0,4 µM
Iniciador reverso Meq (10 mM)	1,0 µl	0,4 µM

Componente	Volume por 25 µl de reação	Concentração Final
Taq Gold NDA pol (5 U/µl)	0,13 µl	26 U/ml
Uracil N-glicosilase (1 U/µl)	0,25	10 U/ml

- Aplicação de vórtice para garantir mistura completa
- Colocar uma placa de PCR thermo-fast em um suporte para placa sobre gelo e adicionar 24 µl de mistura mestra a cada cavidade a ser usada
- 5 - Adicionar 1 µl de água autoclavada a cavidades de controle sem matriz (NTC) e tampar estas cavidades antes de abrir quaisquer amostras de DNA
 - Adicionar 1 µl de DNA de controle positivo (= 1 µl de preparação de 1 mg/ml), por exemplo, DNA proveniente de CEF infectados com
- 10 Rispens à cavidades apropriadas e tampar estes poços.
 - Adicionar 1 µg de amostra de DNA (aproximadamente 1 µl de preparação com 1 mg/ml) aos poços apropriados e tampar
 - Pulsar rapidamente a placa em centrífuga
 - Colocar a placa em ABI Prism 7700 Sequence Detector (Applied Biosystems) e ajustar o computador para fazer a leitura de fluorescência FAM (sonda Meq), processar as amostras
- 15 - Parâmetros de termociclagem
 - 50 °C 2 minutos
 - 95 °C 10 minutos
 - 20 94 °C 15 segundos) x 40
 - 60 °C 1 minuto)
 - Analisar os dados usando-se Microsoft Excel – para cada amostra haverá um valor de Ct (o ciclo de PCR no qual a quantidade de produto fluorescente é primeiro detectado acima do nível da linha base); calcular o valor médio de Ct para duplicatas para cada amostra de DNA.
- 25 Os resultados do experimento acima são apresentados na figura

Notas

O iniciador para adiante (GGT CTG GTG GTT TCC AGG TGA - SEQ ID N°. 2) está localizado nas posições NT 1341-1361 na sequência de gene Meq cepa GA. O iniciador reverso (GCA TAG ACG ATG TGC TGC TGA - SEQ ID N°. 3) está localizado nas posições NT 1413-1393. A sonda foi projetada para se anelar especificamente entre os dois iniciadores na sequência alvo Meq (ver Figura 8).

Durante a PCR, a sonda fluorogênica se liga entre os dois iniciadores e, durante cada ciclo de extensão, a atividade da 5' nuclease da Taq polimerase cliva a sonda, liberando o fluorocromo repórter FAM que é então capaz de apresentar fluorescência. Portanto, com cada ciclo, aumenta a intensidade da fluorescência. O valor de Ct (o ciclo em que a fluorescência passa de um limite fixo) é uma medida do número de cópia inicial da sequência alvo: quanto mais alto o número de cópia inicial, menor o valor de Ct.

Uso de Albumina de Soro Bovino durante a PCR: tecidos de penas (especialmente aqueles provenientes de galinhas marrons) contêm melamina, que se demonstrou ser inibidora de PCR. O uso de BSA na reação evita esta inibição induzida pela melanina. Foram realizados experimentos em galinhas marrons. A adição de BSA seguiu o método de Giambernardi e outros (1998) *Biotechniques* 25: 564-6.

Exemplo 2: Método para detectar cepa específica de MDV-1 (vacina CVI 988)

Este exemplo da invenção refere-se ao uso de uma versão especialmente modificada do teste da reação em cadeia com a polimerase (PCR) de repetição de 132 pares de base (pb) para detectar a presença de vacina CVI 988 de Marek em penas de galinha.

A sequência genética de repetição de 132 pares de base está localizada no segmento longo de repetição interno (IR) do genoma do vírus da doença de Marek (sorotipo 1). A sequência genômica completa de MDV 1 é descrita em Tulman e outros (Setembro de 2000) *J. Virol.* Vol. 74 N°. 17, p 7980-7988 e foi depositada no GenBank sob o nº. de acesso AF 243438. Isolados de CVI 988 (cepas de vacina) da doença de Marek (sorotipo 1) têm

múltiplas cópias deste segmento de repetição, enquanto as cepas de campo têm cópias únicas (Silva e outros (1992) *Avian Dis* 36: 521-528 e Becker e outros (1993) *Virus Genes* 7: 277-287). A medida do número de cópias fornece a possibilidade de diferenciar as cepas de vacina das cepas do campo.

- 5 (Becker e outros (1992) *J Virol Methods* 40: 307-322 e Kopacek e outros (1993) *Acta Virol* 37: 191-195).

As penas são amostradas de acordo com as figuras anexas, sendo usadas as pontas próximas das penas do trato axilar. A análise de PCR (ver adiante) demonstrou múltiplas cópias do segmento de 132 pb em
10 animais entre 11 e 28 dias após a vacinação. A vacinação foi realizada em aves com um dia de idade.

Uma variação aceitável do teste é usar penas em aves de qualquer idade seja retiradas como amostras frescas ou armazenadas para testagem em uma data posterior para determinar a presença da vacina
15 CVI1988.

Protocolo para PCR de repetição de 132 pb em amostras de ponta de pena

1. Materiais necessários:

Reagentes:

- A solução tamponadora TNE (armazenar à temperatura ambiente) contém Tris (10 mM), NaCl (150 mM), EDTA (1 mM) e o pH é ajustado até pH 7,5 usando-se HCl
20
- Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) solução a 10 % (armazenar à temperatura ambiente)
- Proteinase K (pó liofilizado da Sigma # P-6556 e completar um estoque de 20 mg/ml em água, armazenada a -20 °C)
25
- Fenol pH 7,9 obtido de Sigma (nº. do catálogo P-4557) armazenado a 4 °C)
- Clorofórmio (armazenado a -20 °C)
- Acetato de sódio 3 M pH 5,2 (armazenado à temperatura ambiente)
30
- Etanol puro filtrado (armazenado à temperatura ambiente)
- Etanol gelado a 70 % filtrado (armazenado a 4 °C)

- Água de qualidade para PCR
- Água de qualidade para PCR contendo 800 µg / ml de Albumina de Soro Bovino (BSA), filtrada
- Taq Gold DNA polimerase (5 U/µl), solução tamponadora Taq,
- 5 MgCl₂ (25 mM) de Bio/Gene Ltd., Kimbolton, Cambridgeshire, Inglaterra
 - dATP, dTTP, dCTP, dGTP (estoques de 100 mM) obtidos de Promega (EUA); prepara-se uma mistura contendo todos os quatro a 10 mM cada, armazenados a -20 °C
- marcadores de tamanho molecular de DNA
- 10 - Agarose e solução tamponadora TBE
- Sequências iniciadoras:
 - MD-132 FOR; 5' TACTTCCTATATAGATTGAGACGT-3' (SEQ ID Nº 4)
 - MD-132 REV; 5' GAGATCCTCGTAAGGTGTAATATA-3' (SEQ ID Nº 5)
- em que
- 15 Equipamento:
 - Tubos universais de plástico de 20 ml Sterilin
 - Tesouras e pinças limpas
 - Banho-maria ajustado a 50 °C
 - Microcentrífuga
 - 20 - Tubos de Eppendorf com tampa de pressão (autoclavados) de 1,5 ml
 - Tubos de Eppendorf com tampa rosqueada (autoclavados) de 1,5 ml
 - Tubos de Eppendorf com tampa de pressão (autoclavados) de 25 0,5 ml
 - Vácuo / secador-congelador (não é essencial)
 - Espectrofotômetro
 - Gabinete dedicado para PCR, pipetas e pontas autoclavadas
 - Ciclador térmico
 - 30 - aparelho com gel de agarose

2. Coletando as penas:

- Arrancar 8 – 10 pontas de penas (penas curtas, recém-

crescidas com muita polpa) do trato axilar de pena de cada galinha (ver a figura)

- Colocar as penas em um tubo de plástico 'universal' para transporte de volta para o laboratório.

5 3. Preparação de DNA das pontas de pena:

- Recortar e conservar 1 cm próximo da pena (isto é, a parte não farpada que está presa à pele e que contém a polpa – ver fotografias). Descartar a parte farpada distal da pena.

10 - Para cada galinha, colocar as 8 – 10 extremidades da pena conservadas em um tubo de Eppendorf com tampa de pressão de 1,5 ml.

- Adicionar 500 µl de solução tamponadora amostra proteinase K (solução tamponadora TNE contendo 0,5 % de SDS) contendo 100 µg de proteinase K (adicionar a proteinase K um instante antes de usar).

- Incubar a 50 °C em um banho-maria durante 1,5 – 2 horas.

15 - Microcentrifugar os tubos (6000 rpm, 10 minutos) para 'pelizar' as pontas e os restos da pena.

- Transferir o sobrenadante para um novo tubo com tampa de pressão (se as penas forem provenientes de aves de cor marrom, os sobrenadantes serão de cor marrom em consequência da presença de melanina).

20 - Adicionar um volume igual (500 µl) de fenol ao sobrenadante novamente.

- Submeter a vórtice

- Centrifugar a 13000 rpm, 2 minutos.

25 - Transferir a fase superior (aquosa) para um novo tubo com tampa de pressão

- Adicionar um volume igual (500 µl) de fenol ao sobrenadante novamente.

- Submeter a vórtice

- Centrifugar a 13000 rpm, 2 minutos.

30 - Transferir a fase superior (aquosa) para um novo tubo com tampa de pressão

- Adicionar um volume igual (500 µl) de clorofórmio gelado.

- Submeter a vórtice
- Centrifugar a 13000 rpm, 2 minutos.
- Transferir a fase superior (aquosa) para um tubo com tampa rosqueada de 1,5 ml
- 5 - Adicionar 1 ml de etanol a 100 % filtrado.
- Adicionar 50 µl de Acetato de Sódio 3 M.
- Misturar cuidadosamente por inversão do tubo e deixar à temperatura ambiente durante 20 minutos (o DNA se torna visível enquanto precipita).
- 10 - Centrifugar a 13000 rpm, 2 minutos, para peletizar o DNA (se forem usadas galinhas brancas, o pélete será branco; se forem usadas galinhas de cor marrom, pélete marrom).
- Descartar o sobrenadante;
- Enxaguar o pélete duas vezes com 500 µl de etanol a 70 %
- 15 gelado, fazendo escorrer cuidadosamente o etanol pela parede do tubo, então despejando para fora (tomar cuidado para não desalojar o pélete de DNA).
- Tampar o topo do tubo com Parafilm e fazer vários orifícios no Parafilm utilizando uma agulha.
- 20 - Colocar os tubos em uma secadora a vácuo durante aproximadamente 5 minutos para secar o pélete (alternativamente secar ao ar).
- Ressuspender o pélete em 50 µl de água de qualidade para PCR por aplicação branda de vórtice.
- Determinar a concentração da preparação de DNA usando-se
- 25 um espectrofotômetro.
- Ajustar a concentração até 1 mg / ml em água.
- Armazenar a – 20 °C.

4. PCR de repetição de 132 pb:

- Ajustar as reações sobre gelo, em tubos de Eppendorf de 0,5
- 30 ml, em um gabinete dedicado para PCR, usando-se pipetas dedicadas para PCR e pontas autoclavadas
- Preparar uma 'mistura mestra' que contém os reagentes a se-

guir para o número apropriado de amostras (volumes fornecidos por reação):

Componente	Volume por 20 µl de reação	Concentração Final
Iniciador para adiante (10 µM)	1,0 µl	0,5 µM
Iniciador reverso (10 µM)	1,0 µl	0,5 µM
Solução tamponadora de Taq 10 x	2,0 µl	
MgCl ₂ (25 mM)	1,6 µl	2 mM
Mistura DNTP (10 mM)	0,5 µl	0,25 mM
Taq Gold NDA polimerase	0,1 µl	25 unidades/ml
Água contendo 800 µg / ml de BSA*	12,8 µl	~10 µg de BSA / reação

- Aplicação de vórtice para garantir mistura completa

- Aliquotar 19 µl de 'mistura mestra' em tubos de Eppendorf de 0,5 ml com tampa de pressão.

5 - Adicionar 1 µg de DNA (= 1 µl de preparação de 1 mg/ml, de volume maior se a preparação de DNA for menos concentrada).

- Aplicação de vórtice para garantir mistura completa

- (Esse ciclador térmico tem uma tampa aquecida, assim não se precisa usar as reações com óleo mineral).

10 - Processar em um ciclador térmico usando-se os seguintes parâmetros de ciclagem

95 °C 2 minutos 1 ciclo

95 °C 1 minuto

50 °C 30 segundos) x 40 ciclos

15 72 °C 1 minuto)

72 °C 1 minuto) 1 ciclo

- Analisar os produtos da reação em um gel de agarose.

Os resultados do experimento acima são apresentados na figura

7.

Notas

O iniciador sentido está localizado 65 pb a montante da repetição e o iniciador antissentido está localizado 105 pb a jusante da repetição. O tamanho esperado da faixa é portanto 302 pb para uma repetição simples (isto é, $65 + 132 + 105$), 434 pb para uma repetição dupla ($302 + 132$) e 566 pb para uma repetição tripla ($434 + 132$) etc. A cepa da vacina Rispens produz muitas repetições em série.

Exemplo 3 – Detecção de genoma do vírus Rispens em DNA de ponta de pene usando PCR: comparação de amostras provenientes de diferentes tra-

10 tos de pena.

Métodos

Amostragem de pena proveniente de pintos vacinados com Rispens

Pintos Vermelhos de Rhode Island com duas semanas de idade foram inoculados com vírus da vacina Rispens de Fort Dodge de 1000 pfu pela via intra-peritoneal. Pintos da mesma idade, não vacinados foram abrigados em um ambiente separado. Todos os pintos foram marcados em ambas as asas, para permitir a identificação dos pintos individuais durante todo o experimento. A 8. 13. 19 e 26 dias após a vacinação, foram amostrados cinco pintos vacinados (#921, #923, #924, #925) e um pinto não vacinado (#946). Aproximadamente seis penas foram arrancadas de cada um dos tra-

15 tos Cervical, Humeral, Espinal, Axilar e Femoral. Os restantes cinco tratos de pena não foram usados ou porque o número de penas era demasiadamente pequeno para permitir a amostragem em quatro ocasiões ou porque era considerado não ético arrancar das regiões delicadas da pele dos pintos vi-

20 vos.

O DNA foi preparado partindo das pontas de pena e sujeito a PCR em tempo real para detectar o gene *Meq* do vírus, como resumido a seguir.

Preparação de DNA partindo de amostras de ponta de pena

30 O DNA foi preparado partindo das pontas de pena como descrito acima. Em resumo, as pontas de pena foram incubadas a 50 °C durante 2 horas em 500 µl de solução tamponadora TNE-SDS contendo 100 µg de

proteínase K. O sobrenadante foi extraído com fenol, então com clorofórmio gelado. O DNA foi precipitado, usando-se etanol / acetato de sódio, peletizado, seco a vácuo, então ressuspensão a uma concentração de 200 µg / ml em água.

5 Ensaio de PCR em Tempo real (TaqMan) para detectar o gene Meq

25 µl de reações duplex foram ajustadas como descrito acima, usando-se Taq Gold DNA polimerase e iniciadores para amplificar o gene Meq viral e o gene Ovotransferrin (Ovo) do hospedeiro (tabela 1) de 200 ng de DNA da ponta de pena. O BSA estava presente a uma concentração de 10 µg por reação. A cinética da reação foi seguida por inclusão de uma sonda Meq marcada com FAM-fluorescente e uma sonda Ovo marcada com VIC fluorescente (tabela 1). Houve reações em duplicata para cada amostra. Os parâmetros de termociclagem foram: 1 ciclo de 50 °C (2 minutos), 1 ciclo de 95 °C (10 minutos), seguido por 40 ciclos de 94 °C (15 segundos) e 60 °C (1 minuto). Além das amostras de pena sob teste, a placa da reação também incluiu diluições de dez vezes de DNA BAC10 de Rispens (genoma do vírus Rispens clonado em um Cromossomo Bacteriano Artificial), que contém um número calculado de cópias do genoma de Rispens.

Os dados foram analisados usando-se Microsoft Excel. Para cada reação, o valor de Ct (o ciclo de PCR em que a quantidade de produto fluorescente é primeiro detectada acima no nível de linha base) e portanto foi obtido o valor de 40-Ct. Um valor de Ct de 40 indica que não estava presente sequência alvo. Os valores são apresentados como '40 - Ct' de modo que um valor mais alto iguale a mais cópias do genoma viral.

Para as amostras de Rispens BAC10, o valor 40-Ct foi comparado graficamente contra o número de cópias do genoma do vírus (escala log), para produzir uma curva padrão. Foi determinada a equação para a parte linear do gráfico. Para as amostras de pena em teste, os valores de 40-Ct foram 'normalizados' de acordo com o valor de 40-Ct para Ovo (um 'gene doméstico' presente em todas as células de galinha), para corrigir as ligeiras diferenças na quantidade de DNA usada para cada amostra. O valor de 40-Ct médio, normalizado para reações em duplicata foi então determinado e foi

convertido no número de cópia do genoma de *Risipens* usando-se a curva padrão.

Tabela 1: Iniciadores e sondas usadas em PCR convencional e em tempo real

Seqüência Alvo	Nome do Iniciador	Seqüência de Iniciador	Localização do Iniciador	Tamanho do Amplicon
MDV-1 Gene <i>Meq</i> (baseado na seqüência de GA)	Meq para adiante	GGTCTGGTGGTTTCCA GGTGA (SEQ ID N° 2)	13141-1361	73bp
	Meq reverso	GCATAGACGATGTGCT GCTGA (SEQ ID N° 3)	1413-1393	
	Sonda Meq	AGACCCTGATGATCCG CATTGCGACT (Marca 5' FAM, marca 3' TAMRA) (SEQ ID N° 1)	1366-1391	

5

Gene de Ovotransferin (Ovo)	Ovo para adiante	CACTGCCACTGGGCTC TGT (SEQ ID N° 6)	4517-4535	62 bp
	Ovo reverso	GCAATGGCAATAAAC CTCAA (SEQ ID N° 7)	4567-4587	
	Sonda Ovo	AGTCTGGAGAAGTCT GTGCAGCCTCCA (Marca 5' VIC, marca 3' TAMRA) (SEQ ID N° 8)	4537-44564	

Resultados

Amostragem de Penas e preparação de DNA

- Embora fosse inicialmente planejado amostrar cada um dos dez tratos de pena, foi praticável apenas usar os tratos Cervical, Humeral, Espinal, Axilar e Femoral. Os restantes cinco tratos de pena não podiam ser usados ou porque o número de penas era demasiadamente pequeno para permitir a amostragem em quatro ocasiões ou porque era considerado não ético arrancar das regiões delicadas da pele dos pintos vivos. Foram obtidos penas iniciais suficientes de cada trato a 8, 13 e 19 dias após a vacinação.
- Em torno de 26 dias (quando os pintos tinham quase 6 semanas de idade) as penas iniciais estavam começando a ser substituídas por penas maduras,

mais duras. Foi obtido suficiente DNA de todas as amostras, sem diferenças acentuadas entre a quantidade de DNA obtida do mesmo número de penas de diferentes tratos. Para que os valores de Ct de *Meq* e de *Ovo* ficassem na faixa linear de detecção para PCR em valor real, foi descoberto que era necessário diluir os DNAs até uma concentração de 200 ng/μl e usar 1 μg deste estoque para as reações de PCR em tempo real.

Para permitir uma comparação precisa da carga de vírus a diferentes pontos do tempo, em diferentes tratos de pena e em diferentes pintos, foi realizada PCR quantitativa em tempo real.

Para cada reação, foi calculado o valor de 40-Ct. Para as amostras de BAC10 de Rispens, o valor de 40-Ct foi comparado graficamente contra o número de cópias do genoma do vírus (escala log), para produzir uma curva padrão (figura 8). O limite inferior de detecção precisa era de 50 cópias assim, quaisquer amostras com um valor de 40-Ct de 0 contêm menos de 50 cópias do genoma de Rispens por 200 ng de DNA de ponta de pena.

A equação para a parte linear do gráfico era: $y = 1,8102 \ln(X) - 6,796$. Para cada uma das amostras de pena submetida a teste, os valores médios, normalizados de 40-Ct foram convertidos ao número de cópia do genoma de Rispens usando-se esta equação (ver tabelas 2A, B, C e D; figura 9 A, B, C e D). Como esperado houve variação considerável entre os pintos individuais em qualquer dado ponto do tempo. No entanto, os níveis de vírus detectados nos cinco diferentes tratos de pena de um dado indivíduo era similar. Em cada pinto, dos quatro pontos do tempo testados, a carga de vírus era a maior a 13 dias, diminuindo a 19 e 26 dias.

Tabela 2A: número de cópia de MDV de Rispens (8 dias)

8 dias após a vacinação					
# do pinto e trato da pena	Cópias de genoma de MDV de Rispens / 200 ng de DNA da pena				
	Humeral	Espinal	Femoral	Cervica	Axilar
#921	673	537	2630	442	778
#923	1504	4890	5127	5921	6101
#924	112910	61242	258345	31425	62444

8 dias após a vacinação					
# do pinto e trato da pena	Cópias de genoma de MDV de Rispens / 200 ng de DNA da pena				
	Humeral	Espinal	Femoral	Cervica	Axilar
#925	2603	1265	2010	1883	1583
Média	29422	16983	67028	9918	17726
SDev	55664	29567	127552	14524	29904
Média SE	27832	14784	63776	7262	14952

Tabela 2B: número de cópia de MDV de Rispens (13 dias)

13 dias após a vacinação					
# do pinto e trato da pena	Cópias de genoma de MDV de Rispens / 200 ng de DNA da pena				
	Humeral	Espinal	Femoral	Cervica	Axilar
#921	2133045	2564484	2432204	1224616	2511886
#923	3814060	4374639	5998652	3561896	38349161
#924	24768376	876646	4241591	24073508	24711780
#925	866276	4478465	1557400	1856729	485447
Média	7895439	3073559	3557462	7679187	16514568
SDev	11313237	1708035	1974326	10974035	18229569
Média SE	5656619	854018	987163	5487018	9114785

Tabela 2C: número de cópia de MDV de Rispens (19 dias)

19 dias após a vacinação					
# do pinto e trato da pena	Cópias de genoma de MDV de Rispens / 200 ng de DNA da pena				
	Humeral	Espinal	Femoral	Cervica	Axilar
#921	353997	613762	1158777	736207	439542
#923	1040917	1427067	1061134	1029830	1335442
#924	3108135	891103	256243	1584386	391420
#925	2958332	9800358	1469708	3373701	1705109
Média	1865345	3183073	986466	1681031	967878
SDev	1378768	4424421	517048	1181980	655758
Média SE	689384	2212211	258524	590990	327879

Tabela 2D: número de cópia de MDV de Rispens (26 dias)

26 dias após a vacinação					
# do pinto e trato da pena	Cópias de genoma de MDV de Rispens / 200 ng de DNA da pena				
	Humeral	Espinal	Femoral	Cervica	Axilar
#921	295801	193642	167109	74645	95940
#923	921896	694141	541176	976157	569305
#924	771634	615826	349598	343195	104585
#925	353768	926750	511690	251692	236766
Média	585775	607590	392393	411422	251649
SDev	308455	305928	172194	392646	221359
Média SE	154228	152964	86097	196323	110680

Para os quatro pintos vacinados, o número médio de cópia de genoma (por 200 ng de DNA da pena) foi determinado para cada trato de pena em cada ponto no tempo e comparado graficamente após a vacinação usando-se ou uma escala logarítmica (figura 5) ou uma escala linear (Figura 10B). A 8 dias, o número médio de cópia estava entre 10^4 e 10^5 cópias por 200 ng de DNA. A 13 dias, o número médio de cópia estava entre 5×10^6 e 5×10^7 ; a 19 dias, entre 10^6 e 10^7 e a 26 dias, entre 10^5 e 10^6 .

O gráfico logarítmico (figura 10A) indicou cinética similar de replicação de vírus em cada um dos cinco tratos de pena. No entanto, foram enfatizadas diferenças no gráfico linear (figura 10B). Este gráfico demonstra que, a 13 dias, a carga média de vírus para quatro pintos é até quatro vezes maior nos tratos axilares do que nos outro quatro tratos. Neste ponto do tempo, as cargas de vírus nos tratos humeral e cervical estavam muito intimamente relacionadas em cada ponto do tempo e eram maiores do que a carga de vírus nos tratos femoral e espinal. Estas diferenças entre os tratos de penas não eram aparentes a 8, 19 ou 26 dias.

Para o pinto de controle não vacinado (# 946) a maioria das amostras forneceu valores de 40-Ct de 0, como seria de se esperar na ausência de DNA de MDV.

No entanto, para algumas das amostras, os valores de 40-Ct eram até 3 (dados não apresentados). É frequentemente o caso em PCR em

tempo real que amostras 'negativas' fornecessem um valor de 40-Ct acima de 0 e valores menores do que 4 são considerados 'não confiáveis'. Desse modo, embora um valor de 40-Ct de 3 seja igual a aproximadamente 200 cópias de genoma de Rispens, este valor é 100 vezes mais baixo do que
 5 quaisquer valores obtidas para amostras provenientes de pintos vacinados e pode ser considerado negativo. Como observado na figura 5B, o número médio de cópia para os cinco tratos de pena do pinto não vacinado não se eleva acima da linha base.

Sumário da análise de PCR em tempo real

10 - A carga de vírus em cada um dos tratos de pena foi suficiente para poder ser detectada por PCR em tempo real a 8, 13, 19 e 26 dias após a vacinação.

 - A carga de vírus foi a mais alta em todos os tratos de pena testados a 13 dias após a vacinação, comparada com 8, 19 e 26 dias após a
 15 vacinação.

 A 13 dias após a vacinação, a carga de vírus era mais alta no trato axilar do que nos tratos humeral e cervical (duas vezes maior) ou nos tratos espinhal e femoral (quatro vezes maior).

REIVINDICAÇÕES

1. Processo para detectar o vírus da doença de Marek (MDV) em uma amostra derivada de uma ou mais penas de ave que compreende a extração de material genético da amostra e testagem do material genético
5 extraído para detectar algum material genético proveniente do vírus, caracterizado pelo fato de a amostra de penas ser do trato axilar da ave.

2. Processo para detectar um vírus de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o processo fornece informação quantitativa sobre a quantidade do vírus na amostra.

10 3. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o processo é específico para o sorotipo 1 do MDV.

4. Processo de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que o processo é específico para o MDV-1 Rispens cepa CVI 988.

15 5. Processo de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que o processo compreende:

(i) fornecer iniciadores para adiante e reverso para uma ácido nucléico polimerase, cujos iniciadores são selecionados dentre a sequência de nucleotídeo que flanqueia a sequência de nucleotídeo de repetição de 132 pb de MDV;

20 (ii) amplificar as seqüências de ácido nucléico entre os iniciadores;

(iii) detectar o número de seqüências de repetição de 132 pb nas seqüências de ácido nucléico amplificadas e

25 (iv) relacionar o número de seqüências de repetição de 132 pb à identidade do ácido nucléico viral e desse modo identificar o tipo de MDV na amostra de tecido.

6. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que compreende:

30 (a) fornecer uma seqüência de polinucleotídeo que seja capaz de se ligar especificamente a um polinucleotídeo alvo vírus-específico;

(b) contactar o material genético extraído com uma sonda, sendo que a sonda se liga especificamente ao seu polinucleotídeo alvo viral;

(c) determinar se a sonda se ligou ao seu polinucleotídeo alvo viral e

(d) determinar se a amostra contém o vírus, sendo que a presença do polinucleotídeo alvo indica a presença do vírus na amostra.

5 7. Processo de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que a etapa (c) de determinar se a sonda se ligou a um polinucleotídeo alvo compreende amplificação de uma região do polinucleotídeo alvo, cuja região compreende o sítio de ligação da sonda.

10 8. Processo de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que a amplificação é iniciada pelos seguintes iniciadores:

Iniciador para adiante (GGT CTG GTG GTT TCC AGG TGA)

Iniciador reverso (GCA TAG ACG ATG TGC TGC TGA).

15 9. Processo de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que a sonda tem a seqüência 5' AGA CCC TGA TGA TCC GCA TTG CGA CT 3'.

10 10. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 6 a 9, caracterizado pelo fato de que a sonda é marcada fluorescentemente e a etapa de determinar se a sonda se ligou a um polinucleotídeo alvo compreende determinar as emissões fluorescentes da sonda.

20 11. Processo para detectar um vírus de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, caracterizado pelo fato de que o processo envolve o uso de uma reação de PCR.

25 12. Processo de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que, antes de ser realizada a dita reação de PCR, o material genético extraído a ser testado é tratado com um agente para evitar o efeito inibidor de qualquer fator de tecido de pena que possa estar presente.

30 13. Processo para detectar um vírus de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que o agente é selecionado dentre uma ou mais de albumina do soro bovino, albumina porcina (de porco) e albumina ovina (de ovelha).

14. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 13, caracterizado pelo fato de que compreende a etapa de fornecer os re-

sultados do processo em um formato inteligível.

15. Processo de acordo com reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que os resultados são fornecidos gravando ou armazenando os resultados do processo em um veículo de informação.

Fig.1(a)

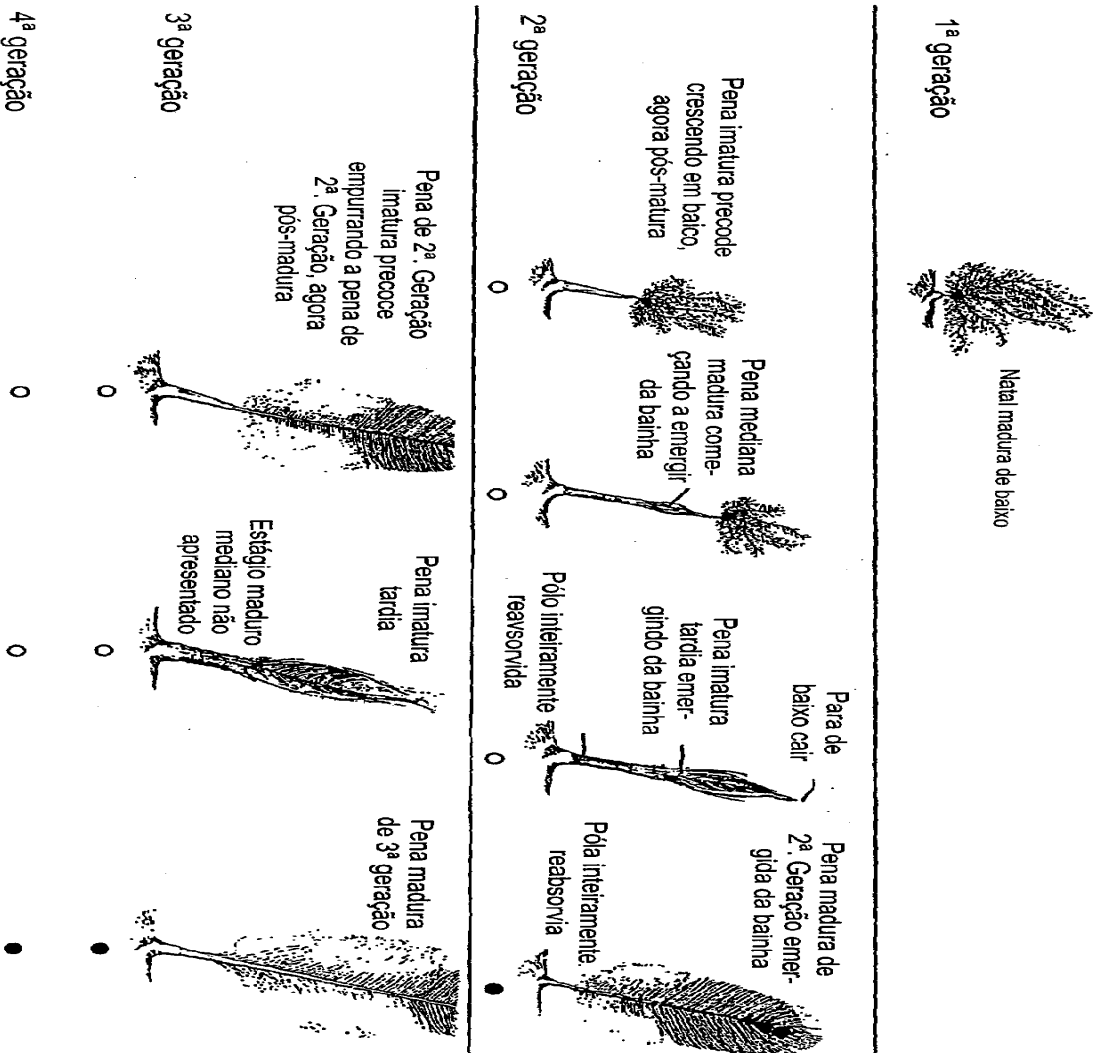


Fig.1(b)

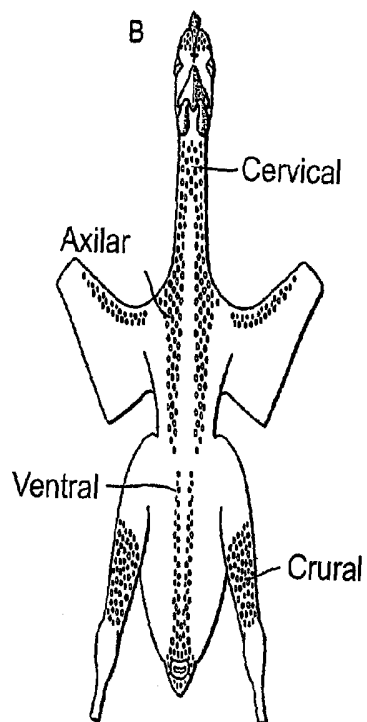
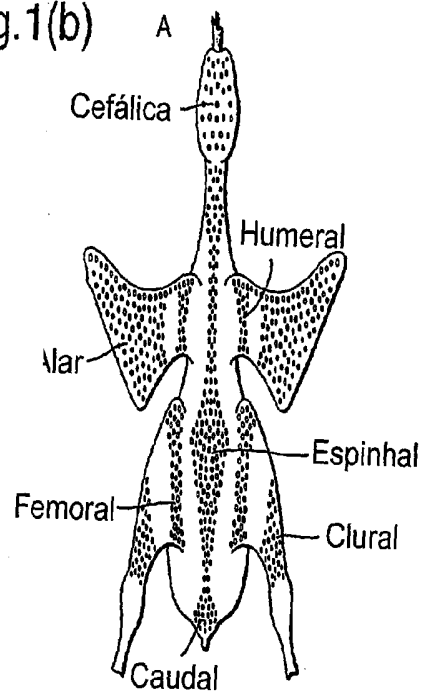


Fig.2(a)

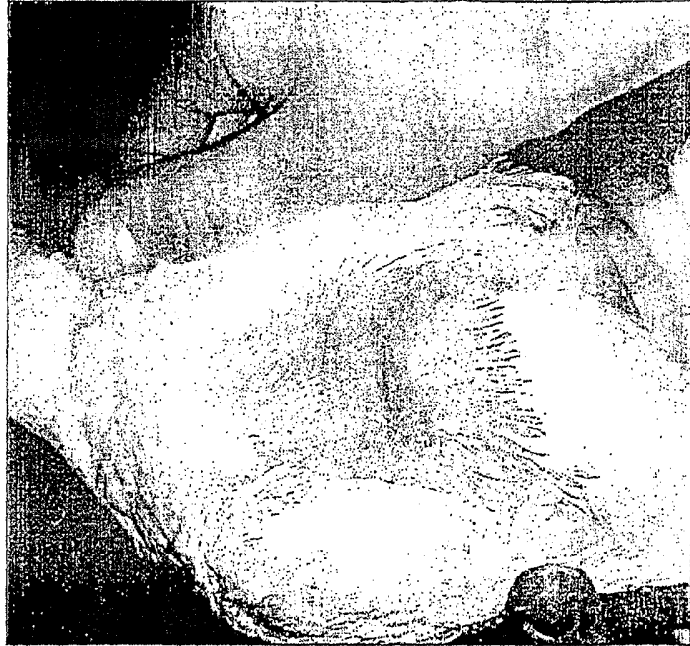


Fig.2(b)



Fig.2(c)

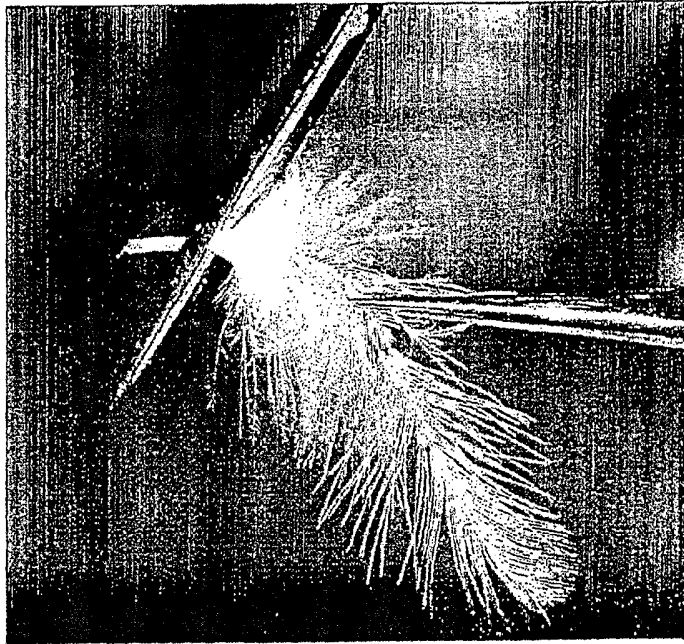


Fig.2(d)

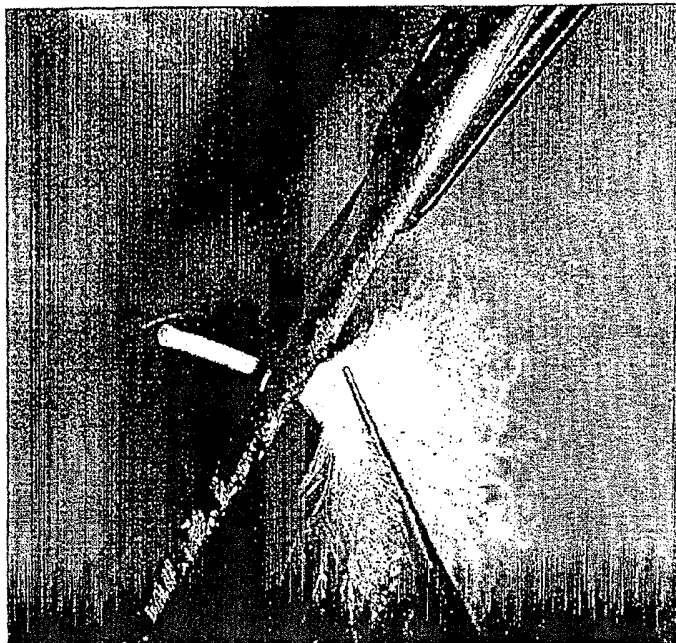


Fig. 3

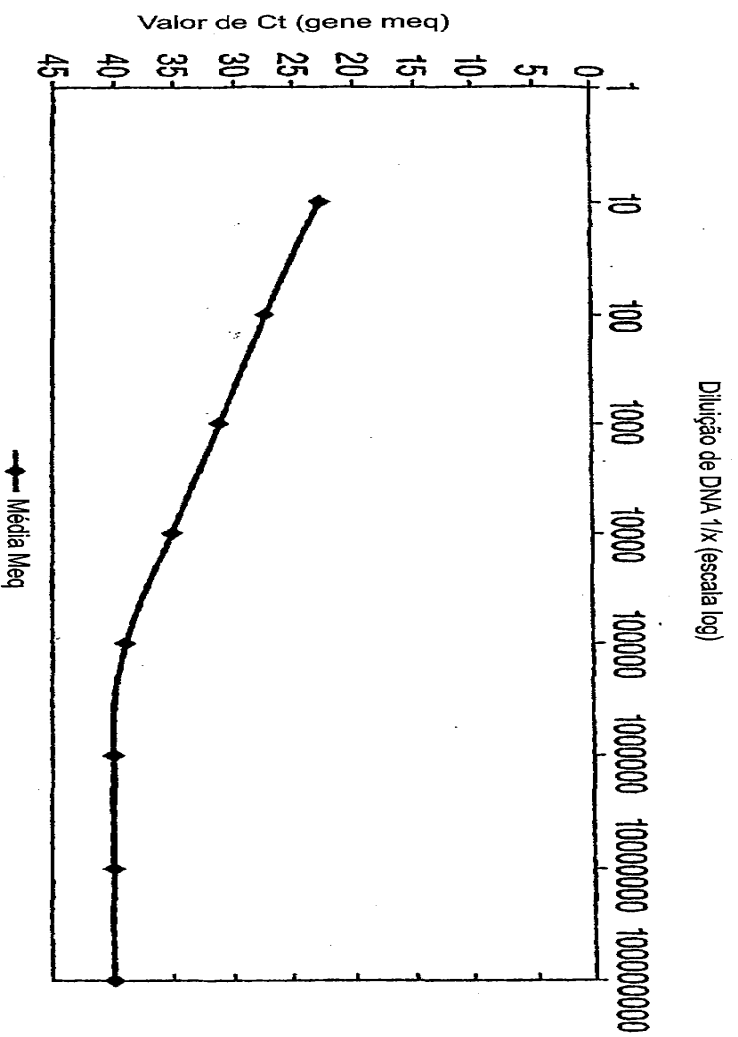


Fig.4.

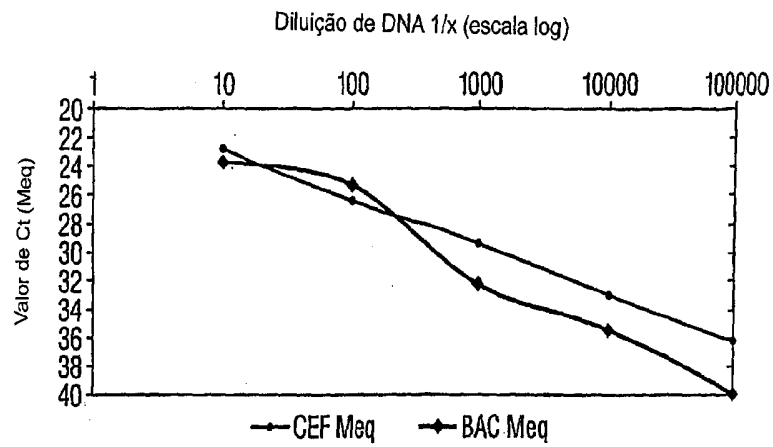


Fig.5.

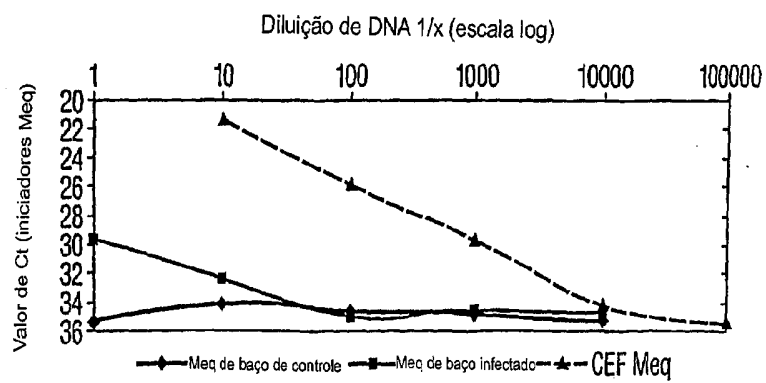


Fig.6.

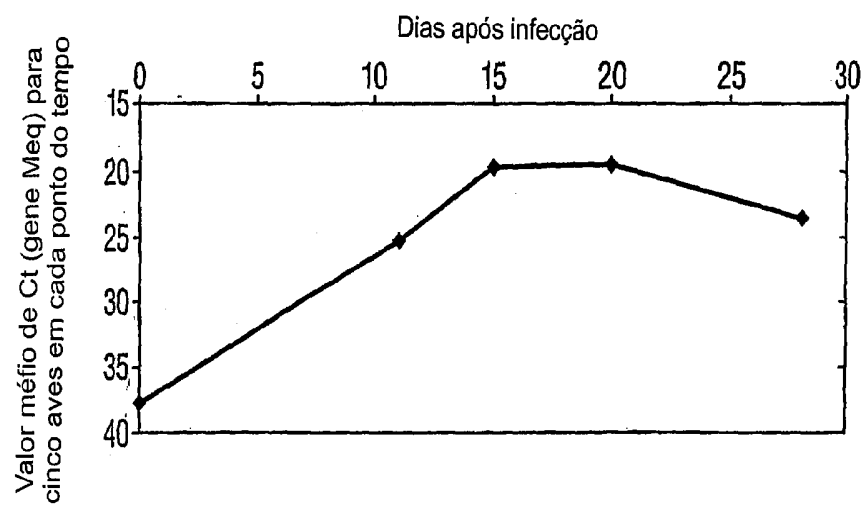


Fig.7(a)

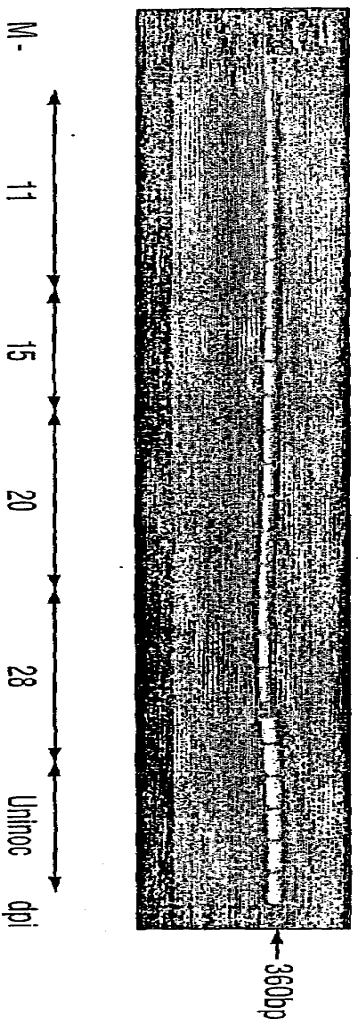


Fig.7(b)

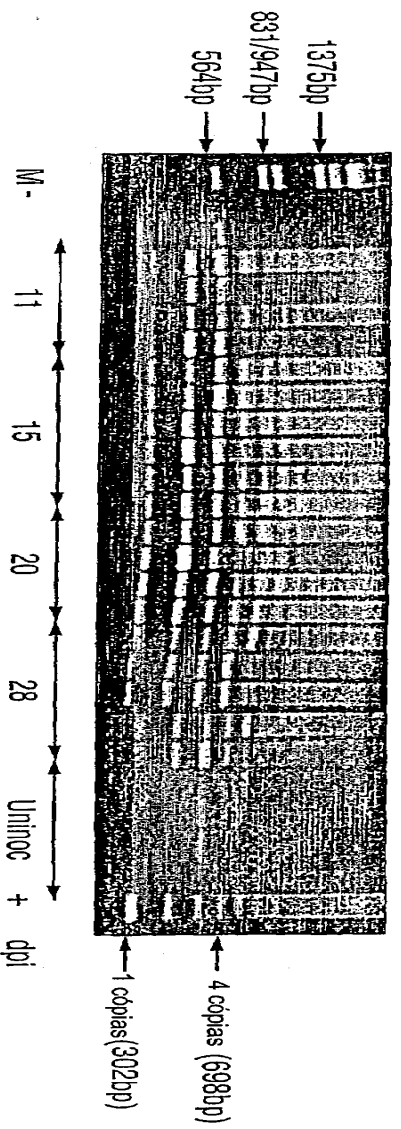


Fig.8.

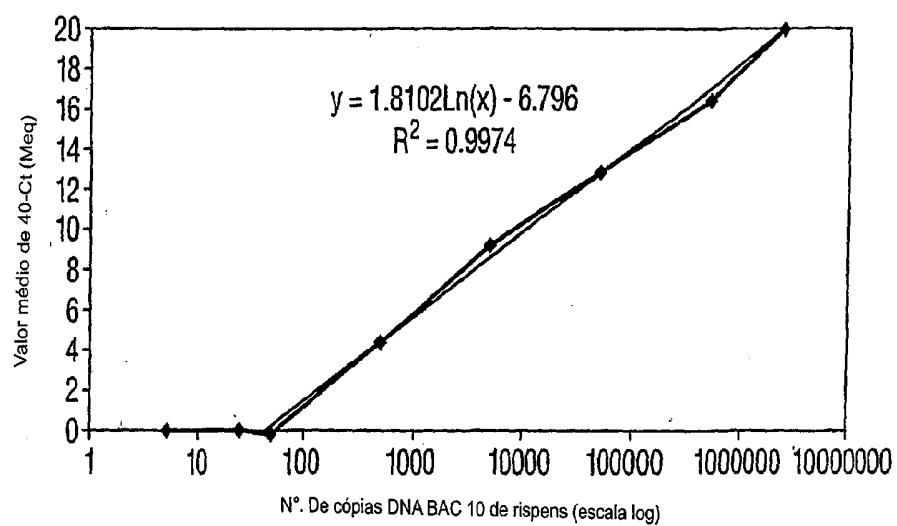


Fig.9(a)

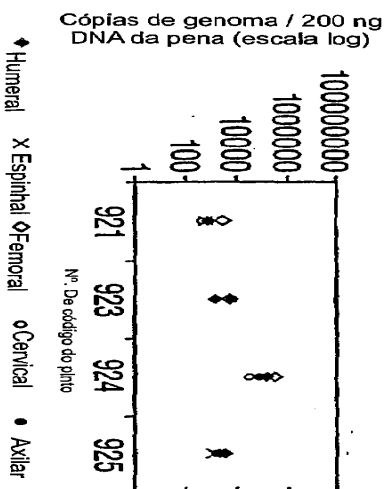


Fig.9(b)

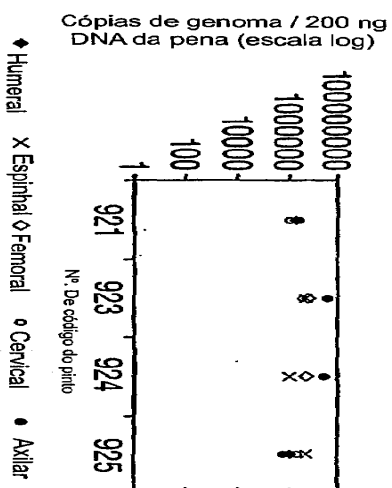


Fig.9(c)

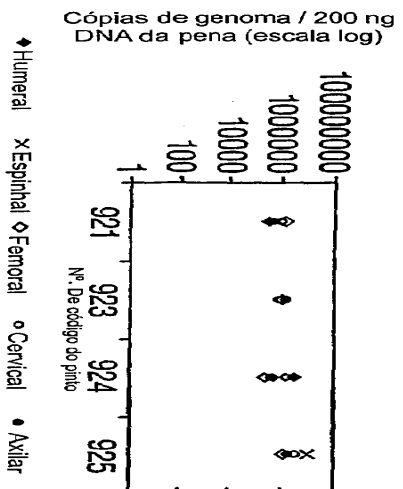


Fig.9(d)

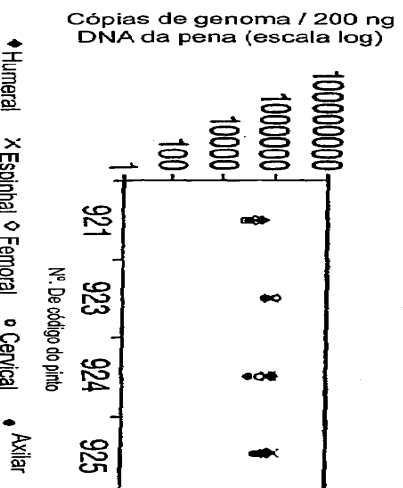


Fig.10(a)

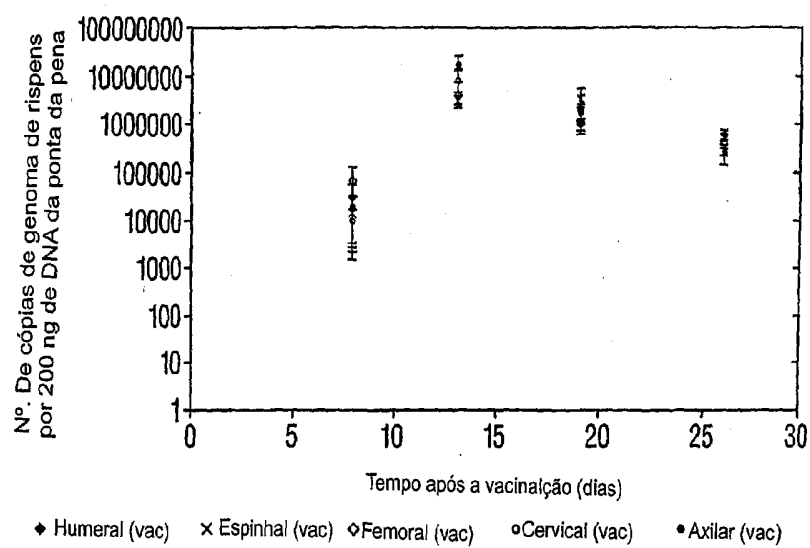
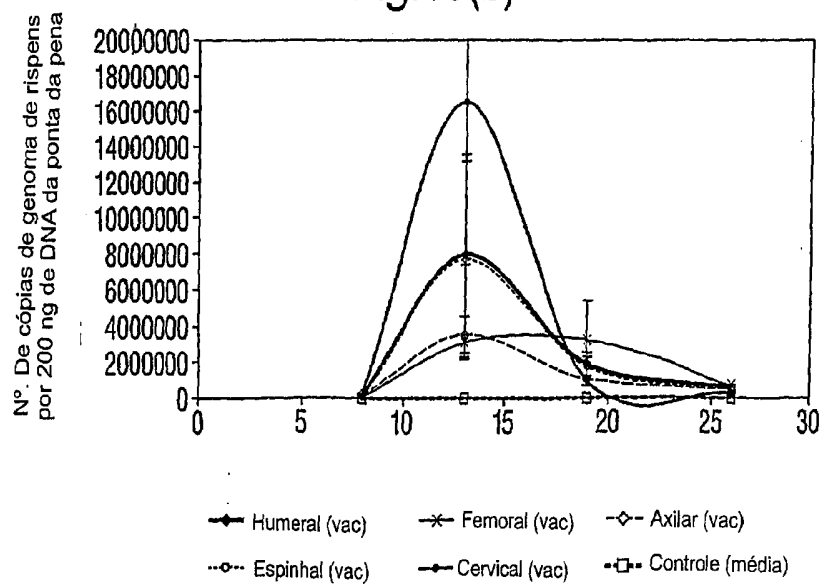


Fig.10(b)



RESUMO

Patente de Invenção: **"PROCESSO PARA DETECTAR O VÍRUS DA DOENÇA DE MAREK (MDV) EM UMA AMOSTRA DERIVADA DE UMA OU MAIS PENAS DE AVE"**.

- 5 A presente invenção refere-se a métodos de detectar um vírus em uma amostra de tecido de ave em que o material genético derivado das penas é testado para a presença de material genético proveniente do vírus.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Wyeth

<120> PROCESSO PARA DETECTAR O VÍRUS DA DOENÇA DE MAREK (MDV) EM UMA AMOSTRA DERIVADA DE UMA OU MAIS PENAS DE AVE

<130> P131572

<140> PI0315340-1

<141> 14.10.2003

<150> GB 03 12241.3

<151> 29.05.2003

<150> GB 02 23960.6

<151> 15.10.2002

<160> 9

<170> PatentIn versão 3.1

<210> 1

<211> 26

<212> DNA

<213> Sonda de DNA

<400> 1

agaccctgat gatccgcatt gcgact

26

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Iniciador de DNA Sintético

<400> 2

ggtctggtgg tttccaggtg a

21

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Sonda de DNA

<400> 3

gcatagacga tgtgctgctg a

21

<210> 4
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Sonda de DNA
 <400> 4
 tacttcctat atagattgag acgt 24

<210> 5
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Sonda de DNA
 <400> 5
 gagatcctcg taagggtgtaa tata 24

<210> 6
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Sonda de DNA
 <400> 6
 cactgccact gggctctgt 19

<210> 7
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Sonda de DNA
 <400> 7
 gcaatggcaa taaacctcca a 21

<210> 8
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Iniciador de DNA Sintético
 <400> 8
 agtctggaga agtctgtgca gcctcca 27

<210> 9
 <211> 2466
 <212> DNA

<213> DNA

<400> 9

gaattcgggtg atataaagac gatagtcattg catgacgtgg ggggctggat cgactgatat	60
ctaattggttc gggagtgata cggagacggg gggggggggg aaatgatcga tttataccta	120
cctctttaat aaactattgc tcctttataa aatgacaggt gaattgtgac cgttcgcgaa	180
cgtgtaattc ttcaataactt tcgggtctgt ggggtgttgc tttttaatta ttattttggt	240
tcggggaggt tgggtgctga atgttaagaa taaattcgc acactgattc ctaggcaggc	300
gtctcttgca ggtgtatacc agggagaagg cgggcacggg acaggtgtaa agagatgtct	360
caggagccag agccgggagc tatgccctac agtcccgctg acgatccgac cccctcgat	420
ctttctctcg ggtcgacttc gagacggaaa aaaaggaaaa gtcacgacat cccaacagc	480
ccctccaaac accccttccc tgacggccta tctgaggagg agaaacagaa gctggaaagg	540
aggagaaaaa ggaatcgtga cgccgctcgg agaagacgca ggaagcagac ggactatgta	600
gacaaactcc atgaagcatg tgaagagctg cagagggcca atgaacacct acgtaaggaa	660
attcgagatc taaggactga gtgcacgtcc ctgcgtgtac agttggcttg tcatgagcca	720
gtttgcccta tggcgttacc cctaacggtg acccttggac tgcttaccac cccgcacgat	780
cccgttcctg aacctcccat ttgcactcct ccacctccct caccggatga acctaacgct	840
ccacattgct ccggttccca acctcctatc tgtaccccc ctcctcccga tacggaggaa	900
ctttgcgccc agctctgctc gacccccacca cctcccatct ctactcccca tattatctac	960
gctccggggc cttccccctt ccaacctcct atctgtaccc cccctcctcc cgatgcggag	1020
gagctttgctg ccagctctg ctgcacccca ccacctccca tctgtactcc ccattccctc	1080
ttctgccctc ccagcctcc atctccggag ggaatcttcc ctgcattgtg tcctgttacc	1140
gagccgtgta cccctccatc gccggggaag gtttacgctc agctttgtcc tgttggccag	1200
gctccccctt ttaccccatc tccccacat ccggtccgg agccggagag gctttatgct	1260
cgtcttaccg aggatcccga acaggattcc ttgtattcgg gccagattta tattcagttt	1320

ccctcggata	ctcagtcctac	ggtctggtgg	tttccagggtg	acgggagacc	ctgatgatcc	1380
gcattgcgac	tctcagcagc	acatcgtcta	tgccccatgt	ttctttctccc	ctagttatat	1440
ataatagttt	tcatagtttc	gggaagatca	acataaagga	aagggttaaa	ggcattattt	1500
atcgatttac	tgacataaaa	aaatcctctg	gggtaacaaa	ttttccctta	ccgtgtagct	1560
tagactcggg	agaactattt	taagttacat	ggtcaaaaga	tttgttggct	ccaggagttc	1620
cgaagtatga	gataaactta	gctatgtgga	aaactttctgg	ggcaacatct	ctcggcccca	1680
gactgcttaa	atgggcaaatt	ctcgttctat	acagaacggt	tggggaaggg	gggggggggg	1740
gtatatggag	tattattcgg	gatatggctt	ctatgaagct	gcggtaagtt	ttccaggctc	1800
aaaaactatg	cctggctggt	ttttttttta	gaagggatat	ggacatcgca	cattaaggaa	1860
tattaaagat	aacaggatgg	acattcggat	gtaaaaggaa	taagcgaaac	ctttagcaga	1920
tgtgagttaa	tgagtcctcg	tataattcgg	tggtgctgat	taggttatcg	taaggaacaa	1980
cacgattgat	ctctcatccg	cgtcccagca	atcaggccta	tgtccctctc	ctgtggccag	2040
ctcactggct	gtgcactgtg	cgattctaag	tgctacagtc	gtgagcagat	caatggatcg	2100
gggctcgcgc	aacactactg	taattaaata	ttcgtttatg	aattatgcaa	atatgcacag	2160
ataatatata	cagggatgca	cagacatact	cctatgcacc	gatacacagg	cacataggca	2220
gatgtcgaca	ttaacgaata	tacaggcacg	gacctccagg	aacatatgga	aaatacctca	2280
tcgcagagac	gcttatgcag	gagtaatctg	cgtaaagtcg	ttactggatt	gtaacggcta	2340
tccggagact	ctcttcccct	tttgcttggt	cactgtgcgg	cattattaca	tttacaccgg	2400
taatgctgcg	catgaaagag	cgaacggaac	gaggctcgta	cgacattaca	agaatagttt	2460
gaattc						2466

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas de que trata a Resolução INPI 228 de 11/11/2009:

Código de Controle

Campo 1



275FA22B63DAB560

Campo 2



8DD9BE27B66721E9

Outras Informações:

- Nome do Arquivo: p131572 24837882_1.txt
- Data de Geração do Código: 01-06-2015
- Hora de Geração do Código: 13:13:38
- Código de Controle:
 - Campo 1: 275FA22B63DAB560
 - Campo 2: 8DD9BE27B66721E9