



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

**(11) PI 0610503-3 B1**



\* B R P I 0 6 1 0 5 0 3 B 1 \*

**(22) Data do Depósito: 21/04/2006**

**(45) Data de Concessão: 31/05/2022**

**(54) Título:** COMPOSIÇÕES COMPREENDENDO VÍRUS INFLUENZA, POLINUCLEOTÍDEO ISOLADO, POLIPEPTÍDEO OU VÍRUS REAGRUPADO, BEM COMO CONSTRUÇÃO DE EXPRESSÃO DE POLINUCLEOTÍDEO, OLIGONUCLEOTÍDEO, MICRO-ORGANISMO TRANSGÉNICO, E MÉTODOS PARA A DETECÇÃO DE UM VÍRUS INFLUENZA QUE É CAPAZ DE INFECTAR UM ANIMAL CANÍDEO

**(51) Int.Cl.:** C12N 15/44; C07K 14/11; A61K 39/145.

**(30) Prioridade Unionista:** 21/04/2005 US 60/673,443.

**(73) Titular(es):** UNIVERSITY OF FLORIDA RESEARCH FOUNDATION; THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF AMERICA, AS REPRESENTED BY, THE SECRETARY OF THE DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION TECHNOLOGY; CORNELL RESEARCH FOUNDATION INC..

**(72) Inventor(es):** PATTI C. CRAWFORD; PAUL J. GIBBS; EDWARD J. DUBOVI; RUBEN O. DONIS; JACQUELINE KATZ; ALEXANDER I. KLIMOV; NANCY J. COX; WILLIAM L. CASTLEMAN.

**(86) Pedido PCT:** PCT US2006015090 de 21/04/2006

**(87) Publicação PCT:** WO 2006/116082 de 02/11/2006

**(85) Data do Início da Fase Nacional:** 22/10/2007

**(57) Resumo:** MATERIAIS E MÉTODOS PARA O CONTROLE DE DOENÇA RESPIRATÓRIA EM CANINOS. A presente invenção refere-se ao vírus influenza isolado que é capaz de infectar os canídeos e causar doença respiratória no canídeo. A presente invenção também refere-se às composições e aos métodos para induzir uma resposta imune contra um vírus influenza da presente invenção. A invenção também refere-se às composições e aos métodos para identificar um vírus da invenção e diagnosticar a infecção de um animal com um vírus da invenção.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para  
**"COMPOSIÇÕES COMPREENDENDO VÍRUS INFLUENZA, POLINUCLEOTÍDEO ISOLADO, POLIPEPTÍDEO OU VÍRUS REAGRUPADO, BEM COMO CONSTRUÇÃO DE EXPRESSÃO DE POLINUCLEOTÍDEO, OLIGONUCLEOTÍDEO, MICRO-ORGANISMO TRANSGÊNICO, E MÉTODOS PARA A DETECÇÃO DE UM VÍRUS INFLUENZA QUE É CAPAZ DE INFECTAR UM ANIMAL CANÍDEO".**

**REFERÊNCIA CRUZADA A PEDIDO RELACIONADO**

[0001] Este pedido reivindica o benefício do Pedido Provisório U.S. Nº de Série 60/673.443, depositado em 21 de abril de 2005, que é, pelo presente, incorporado por referência neste documento em sua totalidade, incluindo quaisquer figuras, tabelas, seqüências de ácidos nucléicos, seqüências de aminoácidos, e desenhos.

**ANTECEDENTES DA INVENÇÃO**

[0002] A "tosse canina" ou traqueobronquite infecciosa (ITB) é uma infecção respiratória contagiosa, aguda, em cães, caracterizada principalmente por tosse (Ford e outros, 1998). A ITB canina é considerada uma das doenças respiratórias infecciosas mais predominantes dos cães mundialmente, e os surtos podem atingir proporções epidêmicas quando os cães estiverem alojados em ambientes de populações de altas densidades, tais como os canis. A maior parte dos surtos é devido ao contato direto de cão com cão ou à aerossolização das secreções respiratórias (Ford e outros, 1998). Os sinais clínicos são causados por infecção com um ou uma combinação de agentes bacterianos e virais que colonizam o epitélio do trato respiratório superior e inferior. O vírus parainfluenza canino (CPiV) e as bactérias *Bordetella bronchiseptica* são os organismos mais comuns isolados dos cães afetados, porém diversos outros vírus, tais como o vírus da cinomose canino (CDV) e os adenovírus-1 e -2 caninos (CAV-1, CAV-2), juntamente com bactérias, tais como

*Streptococcus sp.*, *Pasteurella multicoda* e *Escherichia coli*, podem influenciar o curso e o resultado clínicos (Ford e outros, 1998). Embora os surtos ocorram de modo mais eficiente e rápido em populações de altas densidades, com alta morbidade, as infecções respiratórias complicadas e a morte são incomuns. Embora uma pneumonia bacteriana secundária, que pode causar morte, possa se desenvolver, a maioria dos casos de ITB é autolimitada e desaparece sem nenhum tratamento (Ford e outros, 1998).

[0003] Em julho de 1992, uma infecção respiratória presumida ser a "tosse canina" tornou-se epidêmica em diversas pistas de corridas de galgos em New England, Flórida, Virgínia Ocidental, Wisconsin, Kansas, Colorado, Oklahoma e Arizona. De acordo com os veterinários, a maior parte dos cães afetados teve uma tosse branda que desapareceu, porém mais do que uma dúzia de galgos desenvolveu uma pneumonia hemorrágica aguda, seguida por morte rápida (Greyhound Daily News, 1999).

[0004] No fim de 1998 até o início de 1999, diversos surtos de "tosse canina" ocorreram nos canis de galgos de corrida através do país, resultando em fechamento obrigatório das pistas de corridas e quarentena de todos os galgos de corrida nos U.S. por diversas semanas (Greyhound Daily News, 1999). Em uma pista de corridas na Flórida (Palm Beach Kennel Club), a tosse foi registrada em quase 40% da população de cães em um único dia (Comunicado particular do Dr. William Duggar). Similar ao surto em 1992, a tosse desapareceu na maioria dos galgos, porém 10 cães na Flórida morreram de uma síndrome de pneumonia hemorrágica não característica da "tosse canina" (Putnam, 1999).

[0005] Em março-abril de 2003, um outro surto de "tosse canina" ocorreu nas pistas de corridas de galgos nos U.S. do leste. O surto é acreditado ter se originado nos canis em quatro pistas na Flórida e

causou a suspensão da corrida e a quarentena dos cães por quase três semanas. Quase 25% dos cães na pista de corridas em West Palm Beach foram afetados, enquanto que quase 50% dos 1400 cães em Derby Lane, em St. Petersburg, desenvolveram a tosse. Novamente, a maioria dos cães se recuperou, porém diversos cães morreram da infecção respiratória. O impacto econômico estimado do surto respiratório na pista de Derby Lane foi \$2 milhões.

[0006] Não existe nenhum relatório publicado que documente a etiologia ou a clinicopatologia da epidemia de "tosse canina" nos canis de galgos de corrida em 1992, 1998-1999, ou 2003. A suposição tem sido que as infecções foram devido ao CPiV e/ou à *B. bronchiseptica*, as duas causas mais comuns de tosse canina. Comunicações não substanciadas, tais como os endereços de páginas eletrônicas da rede, têm atribuído as pneumonias hemorrágicas fatais descritas em alguns dos cães com tosse à infecção com *Streptococcus equi* subespécie *zooepidemicus* β-hemolítico, e referem-se à síndrome como "choque tóxico estreptocócico canino".

[0007] A transmissão do vírus de uma espécie hospedeira para outra é uma característica crucial da ecologia e da epidemiologia do vírus influenza (Webster, 1998). São possíveis dois mecanismos básicos de transmissão entre espécies do vírus influenza (Webster e outros, 1992; Lipatov e outros, 2004). Um é a transferência direta de um vírus essencialmente inalterado de uma espécie para outra. Os exemplos deste mecanismo incluem as infecções humanas recentes com o subtipo H5N1 do vírus da influenza aviária (Subbbarao e outros, 1998; Peiris e outros, 2004; Guan e outros, 2004) e possivelmente a pandemia de 1918, conhecida como gripe espanhola (Reid e outros, 2004). O segundo mecanismo é uma consequência da natureza segmentada do genoma de influenza. A co-infecção de um hospedeiro com vírus de diferentes espécies pode resultar no reagrupamento dos

genes virais segmentados e na geração de um recombinante com a capacidade de infectar outras espécies. Por exemplo, os novos vírus gerados por reagrupamento de genes entre os vírus influenza aviários e humanos resultaram na pandemia de influenza humana em 1957 e 1968 (Webster e outros, 1992; Lipatov e outros, 2004; Kawaoka e outros, 1989).

[0008] A maioria das transmissões diretas de vírus influenza inalterados a partir das espécies hospedeiras naturais para uma espécie diferente são ocorrências terminais, porque a transmissão ininterrupta entre indivíduos da nova espécie não consegue ocorrer. As interações múltiplas entre vírus-hospedeiro são necessárias para a replicação e a transmissão horizontal e proporcionam uma barreira formidável à perpetuação dos vírus influenza no novo hospedeiro (Webby e outros, 2004). Portanto, o estabelecimento de novas linhagens de vírus influenza específicas para os hospedeiros é incomum e somente ocorreu em aves domésticas, porcos, cavalos, e seres humanos (Webster e outros, 1992; Lipatov e outros, 2004).

[0009] Por causa da natureza séria da infecção por vírus influenza, permanece uma necessidade por métodos para diagnosticar, prevenir, e tratar infecção por vírus influenza.

#### BREVE SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[00010] A presente invenção refere-se ao vírus influenza isolado que é capaz de infectar os canídeos e causar doença respiratória no canídeo. A presente invenção também refere-se às composições e aos métodos para induzir uma resposta imune contra um vírus influenza da presente invenção. A presente invenção também refere-se às composições e aos métodos para identificar um vírus da invenção e diagnosticar a infecção de um animal com um vírus da invenção.

#### BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[00011] O arquivo da patente ou do pedido contém pelo menos um

desenho executado em cor. As cópias dessa patente ou publicação de pedido de patente com desenhos em cor serão proporcionadas pelo Escritório de Patentes com o pedido e o pagamento da taxa necessária.

[00012] As **figuras 1A-1B** mostram as relações filogenéticas entre os genes de hemaglutinina. A **figura 1A** mostra uma árvore de genes de HA a partir de isolados caninos, humanos, aviários, suíños, e eqüinos representativos, incluindo o A/Budgerigar/Hokkaido/1/77 (H4) como grupo hostil. A **figura 1B** mostra uma árvore dos genes de HA do vírus influenza canino com genes de HA eqüinos contemporâneos e mais antigos, usando A/Duck/Ukraine/63 (H3) como grupo hostil. As árvores filogenéticas foram deduzidas de seqüências de nucleotídeos pelo método de união do próximo e os valores da análise de partida  $\geq 90\%$  são mostrados. A barra significa o número de alterações de nucleotídeos por comprimento de unidade das ramificações horizontais das árvores.

[00013] As **figuras 2A-2B** mostram a detecção imunoistoquímica do antígeno H3 de influenza nos pulmões. As secções dos tecidos dos pulmões foram sondadas com um anticorpo monoclonal de camundongo para a hemaglutinina H3 e a ligação foi detectada por reação com a imunoperoxidase (precipitado marrom). A **figura 2A** mostra o epitélio bronquial de um galgo com doença espontânea. O antígeno H3 viral foi detectado no citoplasma de células epiteliais bronquiais e nos macrófagos nos lúmens das vias aéreas e nos espaços alveolares. A **figura 2B** mostra o epitélio bronquial de um cão 5 dias após inoculação com A/canino/Florida/ 43/04 (H3N8). O antígeno H3 viral foi detectado no citoplasma de células epiteliais bronquiais. Barra em escala, 66  $\mu\text{m}$ .

[00014] A **figura 3** mostra as alterações histológicas características nos brônquios de galgos que morreram de pneumonia hemorrágica

associada com a infecção pelo vírus influenza. Os tecidos estão tingidos com H&E. Painel superior: Brônquio normal com células epiteliais ciliadas, células mucosas, e células basais. Painel inferior: Brônquio de um galgo com influenza espontânea. Há necrose e erosão das células epiteliais ciliadas bronquiais. Barra em escala, 100  $\mu$ m.

[00015] As **figuras 4A-4B** mostram as relações filogenéticas entre os genes de hemaglutinina H3. A **Figura 4A** mostra uma árvore dos genes de HA do vírus influenza canino com genes de HA eqüinos contemporâneos e mais antigos. A **figura 4B** mostra uma árvore filogenética da proteína HA do vírus influenza canino com HA eqüina contemporânea e mais antiga. As árvores filogenéticas foram deduzidas de seqüências genéticas ou de aminoácidos pelo método de união do próximo e os valores da análise de partida  $\geq 80\%$  são mostrados. A barra significa o número de alterações de aminoácidos por comprimento de unidade das ramificações horizontais das árvores.

[00016] A **figura 5** mostra a proteína H3 do vírus influenza em células epiteliais de brônquios e glândulas bronquiais em pulmões de cães que morreram de pneumonia associada com infecção por vírus influenza. Painéis superiores: erosão das células epiteliais bronquiais ciliadas nos brônquios. Os tecidos foram tingidos com H&E. Painéis inferiores: proteína H3 do vírus influenza no citoplasma de células epiteliais bronquiais (esquerda) e das glândulas bronquiais (direita). Os tecidos foram tingidos com um anticorpo monoclonal para H3 de influenza detectada por reação com imunoperoxidase (precipitado marrom) e contratingidos com hematoxilina.

[00017] As **figuras 6A-6D** mostram os gráficos de amplificação dos genes de H3 e de Matriz (figura **6A** e **figura 6B**) obtidos a partir da amplificação de padrões de RNA transcritos *in vitro*, diluídos em série 10 vezes. Curvas-padrão dos genes de H3 e de Matriz (figura **6C** e **figura 6D**) construídas por representação em gráfico do log das

concentrações de RNA de partida contra o ciclo limiar (Ct) obtido a partir de cada diluição.

[00018] A **figura 7** mostra a sensibilidade do Directigen Flu A que foi testado com linhagens de vírus diluídas em série 10 vezes, incluindo A/Wyoming/3/2003 e A/canino/FL/242/2003. O triângulo roxo indica resultado positivo.

#### BREVE DESCRIÇÃO DAS SEQÜÊNCIAS

[00019] A **SEQ ID NO: 1** é uma seqüência de nucleotídeos de um vírus influenza canino (Florida/43/04) codificando uma proteína PB2 que pode ser usada de acordo com a presente invenção.

[00020] A **SEQ ID NO: 2** é a seqüência de aminoácidos codificada pela SEQ ID NO: 1.

[00021] A **SEQ ID NO: 3** é uma seqüência de nucleotídeos de um vírus influenza canino (Florida/43/04) codificando uma proteína PB1 que pode ser usada de acordo com a presente invenção.

[00022] A **SEQ ID NO: 4** é a seqüência de aminoácidos codificada pela SEQ ID NO: 3.

[00023] A **SEQ ID NO: 5** é uma seqüência de nucleotídeos de um vírus influenza canino (Florida/43/04) codificando uma proteína PA que pode ser usada de acordo com a presente invenção.

[00024] A **SEQ ID NO: 6** é a seqüência de aminoácidos codificada pela SEQ ID NO: 5.

[00025] A **SEQ ID NO: 7** é uma seqüência de nucleotídeos de um vírus influenza canino (Florida/43/04) codificando uma proteína NS que pode ser usada de acordo com a presente invenção.

[00026] A **SEQ ID NO: 8** é a seqüência de aminoácidos codificada pela SEQ ID NO: 7.

[00027] A **SEQ ID NO: 9** é uma seqüência de nucleotídeos de um vírus influenza canino (Florida/43/04) codificando uma proteína NP que pode ser usada de acordo com a presente invenção.

[00028] A **SEQ ID NO: 10** é a seqüência de aminoácidos codificada pela SEQ ID NO: 9.

[00029] A **SEQ ID NO: 11** é uma seqüência de nucleotídeos de um vírus influenza canino (Florida/43/04) codificando uma proteína NA que pode ser usada de acordo com a presente invenção.

[00030] A **SEQ ID NO: 12** é a seqüência de aminoácidos codificada pela SEQ ID NO: 11.

[00031] A **SEQ ID NO: 13** é uma seqüência de nucleotídeos de um vírus influenza canino (Florida/43/04) codificando uma proteína MA que pode ser usada de acordo com a presente invenção.

[00032] A **SEQ ID NO: 14** é a seqüência de aminoácidos codificada pela SEQ ID NO: 13.

[00033] A **SEQ ID NO: 15** é uma seqüência de nucleotídeos de um vírus influenza canino (Florida/43/04) codificando uma proteína HA que pode ser usada de acordo com a presente invenção.

[00034] A **SEQ ID NO: 16** é a seqüência de aminoácidos codificada pela SEQ ID NO: 15.

[00035] A **SEQ ID NO: 17** é uma seqüência de nucleotídeos de um vírus influenza canino (FL/242/03) codificando uma proteína PB2 que pode ser usada de acordo com a presente invenção.

[00036] A **SEQ ID NO: 18** é a seqüência de aminoácidos codificada pela SEQ ID NO: 17.

[00037] A **SEQ ID NO: 19** é uma seqüência de nucleotídeos de um vírus influenza canino (FL/242/03) codificando uma proteína PB1 que pode ser usada de acordo com a presente invenção.

[00038] A **SEQ ID NO: 20** é a seqüência de aminoácidos codificada pela SEQ ID NO: 19.

[00039] A **SEQ ID NO: 21** é uma seqüência de nucleotídeos de um vírus influenza canino (FL/242/03) codificando uma proteína PA que pode ser usada de acordo com a presente invenção.

[00040] A **SEQ ID NO: 22** é a seqüência de aminoácidos codificada pela SEQ ID NO: 21.

[00041] A **SEQ ID NO: 23** é uma seqüência de nucleotídeos de um vírus influenza canino (FL/242/03) codificando uma proteína NS que pode ser usada de acordo com a presente invenção.

[00042] A **SEQ ID NO: 24** é a seqüência de aminoácidos codificada pela SEQ ID NO: 23.

[00043] A **SEQ ID NO: 25** é uma seqüência de nucleotídeos de um vírus influenza canino (FL/242/03) codificando uma proteína NP que pode ser usada de acordo com a presente invenção.

[00044] A **SEQ ID NO: 26** é a seqüência de aminoácidos codificada pela SEQ ID NO: 25.

[00045] A **SEQ ID NO: 27** é uma seqüência de nucleotídeos de um vírus influenza canino (FL/242/03) codificando uma proteína NA que pode ser usada de acordo com a presente invenção.

[00046] A **SEQ ID NO: 28** é a seqüência de aminoácidos codificada pela SEQ ID NO: 27.

[00047] A **SEQ ID NO: 29** é uma seqüência de nucleotídeos de um vírus influenza canino (FL/242/03) codificando uma proteína MA que pode ser usada de acordo com a presente invenção.

[00048] A **SEQ ID NO: 30** é a seqüência de aminoácidos codificada pela SEQ ID NO: 29.

[00049] A **SEQ ID NO: 31** é uma seqüência de nucleotídeos de um vírus influenza canino (FL/242/03) codificando uma proteína HA que pode ser usada de acordo com a presente invenção.

[00050] A **SEQ ID NO: 32** é a seqüência de aminoácidos codificada pela SEQ ID NO: 31.

[00051] A **SEQ ID NO: 33** é a forma madura da proteína HA mostrada na SEQ ID NO: 16, em que a seqüência de sinal de 16 aminoácidos N terminal foi removida.

- [00052] A **SEQ ID NO: 34** é a forma madura da proteína HA mostrada na SEQ ID NO: 32, em que a seqüência de sinal de 16 aminoácidos N terminal foi removida.
- [00053] A **SEQ ID NO: 35** é um oligonucleotídeo que pode ser usado de acordo com a presente invenção.
- [00054] A **SEQ ID NO: 36** é um oligonucleotídeo que pode ser usado de acordo com a presente invenção.
- [00055] A **SEQ ID NO: 37** é um oligonucleotídeo que pode ser usado de acordo com a presente invenção.
- [00056] A **SEQ ID NO: 38** é um oligonucleotídeo que pode ser usado de acordo com a presente invenção.
- [00057] A **SEQ ID NO: 39** é um oligonucleotídeo que pode ser usado de acordo com a presente invenção.
- [00058] A **SEQ ID NO: 40** é um oligonucleotídeo que pode ser usado de acordo com a presente invenção.
- [00059] A **SEQ ID NO: 41** é um oligonucleotídeo que pode ser usado de acordo com a presente invenção.
- [00060] A **SEQ ID NO: 42** é um oligonucleotídeo que pode ser usado de acordo com a presente invenção.
- [00061] A **SEQ ID NO: 43** é um oligonucleotídeo que pode ser usado de acordo com a presente invenção.
- [00062] A **SEQ ID NO: 44** é um oligonucleotídeo que pode ser usado de acordo com a presente invenção.
- [00063] A **SEQ ID NO: 45** é um oligonucleotídeo que pode ser usado de acordo com a presente invenção.
- [00064] A **SEQ ID NO: 46** é um oligonucleotídeo que pode ser usado de acordo com a presente invenção.
- [00065] A **SEQ ID NO: 47** é uma seqüência de nucleotídeos de um vírus influenza canino (Miami/2005) codificando uma proteína PB2 que pode ser usada de acordo com a presente invenção.

[00066] A **SEQ ID NO: 48** é a seqüência de aminoácidos codificada pela SEQ ID NO: 47.

[00067] A **SEQ ID NO: 49** é uma seqüência de nucleotídeos de um vírus influenza canino (Miami/2005) codificando uma proteína PB1 que pode ser usada de acordo com a presente invenção.

[00068] A **SEQ ID NO: 50** é a seqüência de aminoácidos codificada pela SEQ ID NO: 49.

[00069] A **SEQ ID NO: 51** é uma seqüência de nucleotídeos de um vírus influenza canino (Miami/2005) codificando uma proteína PA que pode ser usada de acordo com a presente invenção.

[00070] A **SEQ ID NO: 52** é a seqüência de aminoácidos codificada pela SEQ ID NO: 51.

[00071] A **SEQ ID NO: 53** é uma seqüência de nucleotídeos de um vírus influenza canino (Miami/2005) codificando uma proteína NS que pode ser usada de acordo com a presente invenção.

[00072] A **SEQ ID NO: 54** é a seqüência de aminoácidos codificada pela SEQ ID NO: 53.

[00073] A **SEQ ID NO: 55** é uma seqüência de nucleotídeos de um vírus influenza canino (Miami/2005) codificando uma proteína NP que pode ser usada de acordo com a presente invenção.

[00074] A **SEQ ID NO: 56** é a seqüência de aminoácidos codificada pela SEQ ID NO: 55.

[00075] A **SEQ ID NO: 57** é uma seqüência de nucleotídeos de um vírus influenza canino (Miami/2005) codificando uma proteína NA que pode ser usada de acordo com a presente invenção.

[00076] A **SEQ ID NO: 58** é a seqüência de aminoácidos codificada pela SEQ ID NO: 57.

[00077] A **SEQ ID NO: 59** é uma seqüência de nucleotídeos de um vírus influenza canino (Miami/2005) codificando uma proteína MA que pode ser usada de acordo com a presente invenção.

[00078] A **SEQ ID NO: 60** é a seqüência de aminoácidos codificada pela SEQ ID NO: 59.

[00079] A **SEQ ID NO: 61** é uma seqüência de nucleotídeos de um vírus influenza canino (Miami/2005) codificando uma proteína HA que pode ser usada de acordo com a presente invenção.

[00080] A **SEQ ID NO: 62** é a seqüência de aminoácidos codificada pela SEQ ID NO: 61.

[00081] A **SEQ ID NO: 63** é uma seqüência de nucleotídeos de um vírus influenza canino (Jacksonville/2005) codificando uma proteína PB2 que pode ser usada de acordo com a presente invenção.

[00082] A **SEQ ID NO: 64** é a seqüência de aminoácidos codificada pela SEQ ID NO: 63.

[00083] A **SEQ ID NO: 65** é uma seqüência de nucleotídeos de um vírus influenza canino (Jacksonville/2005) codificando uma proteína PB1 que pode ser usada de acordo com a presente invenção.

[00084] A **SEQ ID NO: 66** é a seqüência de aminoácidos codificada pela SEQ ID NO: 65.

[00085] A **SEQ ID NO: 67** é uma seqüência de nucleotídeos de um vírus influenza canino (Jacksonville/2005) codificando uma proteína PA que pode ser usada de acordo com a presente invenção.

[00086] A **SEQ ID NO: 68** é a seqüência de aminoácidos codificada pela SEQ ID NO: 67.

[00087] A **SEQ ID NO: 69** é uma seqüência de nucleotídeos de um vírus influenza canino (Jacksonville/2005) codificando uma proteína NS que pode ser usada de acordo com a presente invenção.

[00088] A **SEQ ID NO: 70** é a seqüência de aminoácidos codificada pela SEQ ID NO: 69.

[00089] A **SEQ ID NO: 71** é uma seqüência de nucleotídeos de um vírus influenza canino (Jacksonville/2005) codificando uma proteína NP que pode ser usada de acordo com a presente invenção.

[00090] A **SEQ ID NO: 72** é a seqüência de aminoácidos codificada pela SEQ ID NO: 71.

[00091] A **SEQ ID NO: 73** é uma seqüência de nucleotídeos de um vírus influenza canino (Jacksonville/2005) codificando uma proteína NA que pode ser usada de acordo com a presente invenção.

[00092] A **SEQ ID NO: 74** é a seqüência de aminoácidos codificada pela SEQ ID NO: 73.

[00093] A **SEQ ID NO: 75** é uma seqüência de nucleotídeos de um vírus influenza canino (Jacksonville/2005) codificando uma proteína MA que pode ser usada de acordo com a presente invenção.

[00094] A **SEQ ID NO: 76** é a seqüência de aminoácidos codificada pela SEQ ID NO: 75.

[00095] A **SEQ ID NO: 77** é uma seqüência de nucleotídeos de um vírus influenza canino (Jacksonville/2005) codificando uma proteína HA que pode ser usada de acordo com a presente invenção.

[00096] A **SEQ ID NO: 78** é a seqüência de aminoácidos codificada pela SEQ ID NO: 77.

[00097] A **SEQ ID NO: 79** é um oligonucleotídeo que pode ser usado de acordo com a presente invenção.

[00098] A **SEQ ID NO: 80** é um oligonucleotídeo que pode ser usado de acordo com a presente invenção.

[00099] A **SEQ ID NO: 81** é um oligonucleotídeo que pode ser usado de acordo com a presente invenção.

[00100] A **SEQ ID NO: 82** é um oligonucleotídeo que pode ser usado de acordo com a presente invenção.

[00101] A **SEQ ID NO: 83** é um oligonucleotídeo que pode ser usado de acordo com a presente invenção.

[00102] A **SEQ ID NO: 84** é um oligonucleotídeo que pode ser usado de acordo com a presente invenção.

[00103] A **SEQ ID NO: 85** é um oligonucleotídeo que pode ser

usado de acordo com a presente invenção.

[000104] A **SEQ ID NO: 86** é um oligonucleotídeo que pode ser usado de acordo com a presente invenção.

[000105] A **SEQ ID NO: 87** é um oligonucleotídeo que pode ser usado de acordo com a presente invenção.

[000106] A **SEQ ID NO: 88** é um oligonucleotídeo que pode ser usado de acordo com a presente invenção.

#### DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[000107] A presente invenção refere-se ao vírus influenza isolado que é capaz de infectar canídeos e causar uma doença respiratória. Em uma modalidade, um vírus influenza da invenção compreende um polinucleotídeo que codifica uma proteína tendo a seqüência de aminoácidos mostrada em quaisquer das SEQ ID N<sup>o</sup>s: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 33, 34, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, ou 78, ou um seu fragmento ou variante funcional e/ou imunogênica. Em uma modalidade específica, o polinucleotídeo compreende a seqüência de nucleotídeos mostrada em quaisquer das SEQ ID Nos: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, ou 77, ou um seu fragmento ou variante. Em uma modalidade específica, um vírus influenza da presente invenção é um subtipo H3. O vírus pode ser isolado de cães infectados e cultivado em células ou óvulos, de acordo com os métodos descritos nesse documento. Em uma modalidade exemplificada, o vírus influenza é um vírus influenza A.

[000108] A presente invenção também refere-se aos polinucleotídeos que compreendem todo ou parte de um gene ou genes ou um segmento genômico de um vírus influenza da presente invenção. Em uma modalidade, um polinucleotídeo da invenção compreende um gene de hemaglutinina (HA) de influenza, gene de neuraminidase (NA),

gene de nucleoproteína (NP), gene de proteína de matriz (MA ou M), gene de proteína básica de polimerase (PB), gene de proteína ácida de polimerase (PA), gene de proteína não-estrutural (NS), ou um fragmento ou variante funcional de quaisquer desses genes. Em uma modalidade específica, um polinucleotídeo da invenção compreende o gene de hemaglutinina (HA), ou um seu fragmento ou variante funcional. Em uma modalidade adicional, o gene de HA codifica uma proteína hemaglutinina tendo uma ou mais das seguintes: uma serina na posição 83; uma leucina na posição 222; uma treonina na posição 328; e/ou uma treonina na posição 483, contra a seqüência de aminoácidos da seqüência de consenso de H3 eqüina. Em uma modalidade, o gene de HA codifica um polipeptídeo tendo uma seqüência de aminoácidos mostrada nas SEQ ID NOs: 16, 32, 62, ou 78, ou um seu fragmento ou variante funcional e/ou imunogênica. Em uma modalidade específica, o gene de HA compreende uma seqüência de nucleotídeos mostrada nas SEQ ID NOs: 15, 31, 61, ou 77.

[000109] Em uma modalidade, um polinucleotídeo da invenção codifica um polipeptídeo tendo a seqüência de aminoácidos mostrada em quaisquer das SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 33, 34, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, ou 78, ou um seu fragmento ou variante funcional e/ou imunogênica. Em uma modalidade específica, o polinucleotídeo codificando a seqüência de aminoácidos mostrada nas SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 33, 34, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, ou 78 compreende a seqüência de nucleotídeos mostrada nas SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, ou 77, respectivamente, ou uma seqüência codificando um fragmento ou variante funcional e/ou imunogênica de

quaisquer das SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 33, 34, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, ou 78. Assim, a presente invenção refere-se às seqüências de polinucleotídeos compreendendo a seqüência de nucleotídeos mostrada em quaisquer das SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, ou 77, ou um fragmento ou variante, incluindo uma variante degenerada, de quaisquer das SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, ou 77. Em uma modalidade específica adicional, um polinucleotídeo da invenção pode compreender: os nucleotídeos 1-2271 da SEQ ID NO: 3; os nucleotídeos 1-2148 da SEQ ID NO: 5; os nucleotídeos 1-657 da SEQ ID NO: 7; os nucleotídeos 1-1494 da SEQ ID NO: 9; os nucleotídeos 1-1410 da SEQ ID NO: 11; os nucleotídeos 1-756 da SEQ ID NO: 13; os nucleotídeos 1-1695 da SEQ ID NO: 15; os nucleotídeos 1-2271 da SEQ ID NO: 19; os nucleotídeos 1-2148 da SEQ ID NO: 21; os nucleotídeos 1-657 da SEQ ID NO: 23; os nucleotídeos 1-1494 da SEQ ID NO: 25; os nucleotídeos 1-756 da SEQ ID NO: 29; os nucleotídeos 1-1695 da SEQ ID NO: 31; os nucleotídeos 1-2277 da SEQ ID NO: 47; os nucleotídeos 1-2271 da SEQ ID NO: 49; os nucleotídeos 1-2148 da SEQ ID NO: 51; os nucleotídeos 1-690 da SEQ ID NO: 53; os nucleotídeos 1-1494 da SEQ ID NO: 55; os nucleotídeos 1-1410 da SEQ ID NO: 57; os nucleotídeos 1-756 da SEQ ID NO: 59; os nucleotídeos 1-1695 da SEQ ID NO: 61; os nucleotídeos 1-2277 da SEQ ID NO: 63; os nucleotídeos 1-2271 da SEQ ID NO: 65; os nucleotídeos 1-2148 da SEQ ID NO: 67; os nucleotídeos 1-690 da SEQ ID NO: 69; os nucleotídeos 1-1494 da SEQ ID NO: 71; os nucleotídeos 1-1410 da SEQ ID NO: 73; os nucleotídeos 1-756 da SEQ ID NO: 75; e os nucleotídeos 1-1695 da SEQ ID NO: 77. As seqüências de

nucleotídeos e de aminoácidos das seqüências de polinucleotídeos e de polipeptídeos virais contempladas dentro do escopo da presente invenção foram também depositadas com o Banco de Genes nos N<sup>os</sup> de acesso DQ124147 até DQ124161 e DQ124190, cuja descrição é incorporada nesse documento por referência.

[000110] A presente invenção também refere-se aos polipeptídeos codificados pelos polinucleotídeos de um vírus influenza da presente invenção. A presente invenção também refere-se aos fragmentos e às variantes funcionais e/ou imunogênicas dos polipeptídeos expostos. Os polipeptídeos contemplados incluem a proteína HA, a proteína NA, a proteína NS, a nucleoproteína, a proteína básica de polimerase, a proteína ácida de polimerase, e a proteína de matriz de um vírus influenza da invenção. Em uma modalidade exemplificada, um polipeptídeo da invenção tem uma seqüência de aminoácidos mostrada em quaisquer das SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 33, 34, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, ou 78, ou um seu fragmento ou variante funcional e/ou imunogênica.

[000111] A presente invenção também refere-se às construções de expressão de polinucleotídeos compreendendo uma seqüência de polinucleotídeos da presente invenção. Em uma modalidade, um constructo de expressão da invenção compreende uma seqüência de polinucleotídeos codificando um polipeptídeo que compreende uma seqüência de aminoácidos mostrada em quaisquer das SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 33, 34, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, ou 78, ou um seu fragmento ou variante funcional e/ou imunogênica. Em uma modalidade específica, o polinucleotídeo que codifica a seqüência de aminoácidos mostrada nas SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 33, 34, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66,

68, 70, 72, 74, 76, ou 78 compreende a seqüênciade nucleotídeos mostrada nas SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, ou 77, respectivamente, ou uma seqüênci.codificando um fragmento ou variante funcional e/ou imunogênica de quaisquer das SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 33, 34, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, ou 78. Assim, a presente invenção refere-se aos constructos de expressão compreendendo uma seqüênciade polinucleotídeos compreendendo a seqüênciade nucleotídeos mostrada em quaisquer das SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, ou 77, ou um fragmento ou variante, incluindo uma variante degenerada, de quaisquer das SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, ou 77. Em uma modalidade preferida, um constructo de expressão da presente invenção proporciona a superexpressão de um polinucleotídeo operavelmente ligado da invenção.

[000112] Os constructos de expressão da invenção geralmente incluem elementos reguladores que são funcionais na célula hospedeira pretendida, na qual o constructo de expressão é para ser expresso. Assim, uma pessoa versada na técnica pode selecionar os elementos reguladores para uso em, por exemplo, células hospedeiras humanas, células hospedeiras mamíferas, células hospedeiras de insetos, células hospedeiras de leveduras, células hospedeiras bacterianas, e células hospedeiras de plantas. Em uma modalidade, os elementos reguladores são os que são funcionais em células caninas. Os elementos reguladores incluem os promotores, as seqüências de terminação de transcrição, as seqüências de terminação de tradução, as seqüências intensificadoras, e os

elementos de poliadenilação. Conforme usado aqui, o termo "constructo de expressão" refere-se a uma combinação de seqüências de ácidos nucléicos que proporciona a transcrição de uma seqüência de ácidos nucléicos operavelmente ligada. Conforme usado aqui, o termo "operavelmente ligado(a)s" refere-se a uma justaposição dos componentes descritos, onde os componentes estão em uma relação que os permite funcionar em seu modo pretendido. Em geral, os componentes operavelmente ligados estão em relação contígua.

[000113] Um constructo de expressão da invenção pode compreender uma seqüência de promotores operavelmente ligada a uma seqüência de polinucleotídeos codificando um polipeptídeo da invenção. Os promotores podem ser incorporados em um polinucleotídeo usando práticas-padrão, conhecidas na técnica. As cópias múltiplas de promotores ou promotores múltiplos podem ser usadas em um constructo de expressão da invenção. Em uma modalidade preferida, um promotor pode estar posicionado aproximadamente à mesma distância do sítio de iniciação de transcrição no constructo de expressão que ele está do sítio de iniciação de transcrição em seu ambiente genético natural. Alguma variação nesta distância é permitida sem diminuição substancial na atividade de promotor. Um sítio de iniciação de transcrição é tipicamente incluído no constructo de expressão. De preferência, o promotor associado com um constructo de expressão da invenção proporciona a superexpressão de um polinucleotídeo operavelmente ligado da invenção.

[000114] Os promotores para uso com um constructo de expressão da invenção em células eucarióticas podem ser de origem viral ou celular. Os promotores virais incluem, porém não estão limitados aos, promotores de genes de citomegalovírus (CMV), promotores iniciais ou tardios de SV40, ou promotores de genes do vírus do sarcoma de

Rous (RSV). Os promotores de origem celular incluem, porém não estão limitados ao, promotor de gene de desmina e promotor de gene de actina. Os promotores adequados para uso com um constructo de expressão da invenção em células de leveduras incluem, porém não estão limitados ao, promotor de 3-fosfoglicerato cinase, promotor de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, promotor de metalotioneína, promotor de álcool desidrogenase-2, e promotor de hexocinase.

[000115] Se o constructo de expressão for para ser proporcionado ou introduzido em uma célula de planta, então os promotores virais de plantas, tais como, por exemplo, um promotor de vírus do mosaico da couve-flor (CaMV) 35S (incluindo o promotor do CaMV 35S reforçado (ver, por exemplo, a Patente U.S. Nº 5.106.739 e An, 1997)), ou um de CaMV 19S, podem ser usados. Os outros promotores que podem ser usados para os constructos de expressão em plantas incluem, por exemplo, o promotor de prolifera, o promotor de Ap3, os promotores do choque térmico, o 1'- ou 2'-promotor de T-DNA de *A. tumefaciens*, o promotor de poligalacturonase, o promotor de calcona sintase A (CHS-A) de petúnia, o promotor de PR-1a de tabaco, o promotor de ubiquitina, o promotor de actina, o promotor de gene de alcA, o promotor de pin2 (Xu e outros, 1993), o promotor de Wipl de milho, o promotor de gene de trpA de milho (Patente U.S. Nº 5.625.136), o promotor de gene de CDPK de milho, e o promotor de RUBISCO SSU (Patente U.S. Nº 5.034.322), que podem também ser usados. Os promotores específicos para raízes, tais como quaisquer das seqüências de promotores descritas na Patente U.S. Nº 6.455.760 ou na Patente U.S. Nº 6.696.623, ou nos pedidos de patente U.S. publicados Nºs 20040078841; 20040067506; 20040019934; 20030177536; 20030084486; ou 200401233349, podem ser usados com um constructo de expressão da invenção. Os promotores constitutivos (tais como o promotor de CaMV, ubiquitina, actina, ou

NOS), os promotores regulados evolutivamente, e os promotores induzíveis (tais como aqueles promotores que podem ser induzidos por calor, luz, hormônios, ou substâncias químicas) são também contemplados para uso com os constructos de expressão de polinucleotídeos da invenção. Os promotores específicos para tecidos, por exemplo, os promotores específicos para frutas, tais como o promotor de E8 de tomate (número de acesso: AF515784; Good e outros, (1994)) podem também ser usados. Os promotores específicos para sementes, tais como o promotor de um gene de  $\beta$ -faseolina (por exemplo, de feijão) ou um gene de glicinina (por exemplo, de soja), e outros, podem também ser usados.

[000116] Para a expressão em sistemas procarióticos, um constructo de expressão da invenção pode compreender promotores tais como, por exemplo, o promotor de fosfatase alcalina, o promotor de triptofano (trp), o promotor de lambda  $P_L$ , o promotor de  $\beta$ -lactamase, o promotor de lactose, o promotor de phoA, o promotor de T3, o promotor de T7, ou o promotor de tac (de Boer e outros, 1983).

[000117] Os constructos de expressão da invenção podem opcionalmente conter uma seqüência de terminação de transcrição, uma seqüência de terminação de tradução, uma seqüência codificando um peptídeo de sinal, e/ou elementos intensificadores. As regiões de terminação de transcrição podem tipicamente ser obtidas a partir da região não traduzida em 3' de uma seqüência de gene eucariótica ou viral. As seqüências de terminação de transcrição podem estar posicionadas a jusante de uma seqüência de codificação, para proporcionar uma terminação eficiente. Uma seqüência de peptídeos de sinal é uma seqüência de aminoácidos curta, tipicamente presente na extremidade de amino de uma proteína que é responsável pelo remanejamento de um polipeptídeo maduro operavelmente ligado para uma faixa ampla de destinações celulares pós-traducionais,

variando de um compartimento de organela específico até sítios de ação de proteína e o ambiente extracelular. O alvejamento de produtos de genes para uma destinação celular e/ou extracelular pretendida, através do uso de uma seqüência de peptídeos de sinal operavelmente ligada, é contemplado para uso com os polipeptídeos da invenção. Os intensificadores clássicos são elementos de atuação cis que aumentam a transcrição de gene e podem também ser incluídos no constructo de expressão. Os elementos intensificadores clássicos são conhecidos na técnica, e incluem, porém não estão limitados ao, elemento intensificador de CaMV 35S, elemento intensificador de promotor inicial de citomegalovírus (CMV), e ao elemento intensificador de SV40. Os elementos intensificadores mediados por intron, que reforçam a expressão de gene, são também conhecidos na técnica. Estes elementos devem estar presentes dentro da região transcrita e são dependentes de orientação.

[000118] As seqüências de DNA que orientam a poliadenilação do mRNA transcrito do constructo de expressão podem também ser incluídas no constructo de expressão, e incluem, porém não estão limitadas a, um sinal de octopina sintase ou nopalina sintase.

[000119] Os constructos de expressão podem também incluir um ou mais genes marcadores selecionáveis dominantes, incluindo, por exemplo, os genes codificando resistência a antibióticos e/ou resistência a herbicidas para selecionar células transformadas. Os genes de resistência a antibióticos podem proporcionar resistência a um ou mais dos seguintes antibióticos; higromicina, canamicina, bleomicina, G418, estreptomicina, paromomicina, neomicina, e espectinomicina. A resistência à canamicina pode ser proporcionada pela neomicina fosfotransferase (NPT II). Os genes de resistência a herbicidas podem proporcionar resistência à fosfinotricina acetiltransferase ou glifosato. Os outros marcadores usados para o

exame de transformação de células incluem, porém não estão limitados aos, genes codificando a  $\beta$ -glicuronidase (GUS), a  $\beta$ -galactosidase, a luciferase, a nopalina sintase, a cloranfenicol acetiltransferase (CAT), a proteína de fluorescência verde (GFP), ou a GFP reforçada (Yang e outros, 1996).

[000120] A presente invenção também refere-se aos vetores de polinucleotídeos compreendendo uma seqüência de polinucleotídeos da invenção que codifica um polipeptídeo da invenção. Sítios de enzimas de restrição únicos podem ser incluídos nas extremidades 5' e 3' de um constructo de expressão ou polinucleotídeo da invenção, para permitir a inserção em um vetor de polinucleotídeo. Conforme usado nesse documento, o termo "vetor" refere-se a qualquer elemento genético, incluindo, por exemplo, os plasmídios, os cosmídios, os cromossomos, o fago, o vírus, e similares, que seja capaz de replicação quando associado com elementos de controle adequados e que possa transferir seqüências de polinucleotídeos entre as células. Os vetores contêm uma seqüência de nucleotídeos que permite que o vetor replique em uma célula hospedeira selecionada. Diversos vetores estão disponíveis para a expressão e/ou a clonagem, e incluem, porém não estão limitados ao, pBR322, série pUC, série M13, série pGEM, e vetores pBLUESCRIPT (Stratagene, La Jolla, CA e Promega, Madison, WI).

[000121] A presente invenção também refere-se às sondas e aos iniciadores de oligonucleotídeos, tais como os iniciadores da reação em cadeia por polimerase (PCR), que podem hibridizar com uma seqüência de codificação ou de não-codificação de um polinucleotídeo da presente invenção. As sondas de oligonucleotídeos da invenção podem ser usadas em métodos para detectar as seqüências de ácidos nucléicos do vírus influenza. Os iniciadores de oligonucleotídeos da invenção podem ser usados em métodos de PCR e em outros

métodos que envolvam a amplificação de ácido nucléico. Em uma modalidade preferida, uma sonda ou iniciador da invenção pode hibridizar com um polinucleotídeo da invenção, sob condições severas. As sondas e os iniciadores da invenção podem opcionalmente compreender uma molécula de marca ou repórter detectável, tal como as moléculas fluorescentes, as enzimas, a porção radioativa, e similares. As sondas e os iniciadores da invenção podem ser de qualquer comprimento adequado para o método ou o ensaio no qual eles estão sendo empregados. Tipicamente, as sondas e os iniciadores da invenção serão 10 a 500 ou mais nucleotídeos de comprimento. As sondas e os iniciadores que são 10 a 20, 21 a 30, 31 a 40, 41 a 50, 51 a 60, 61 a 70, 71 a 80, 81 a 90, 91 a 100, ou 101 ou mais nucleotídeos de comprimento são contemplados dentro do escopo da invenção. Em uma modalidade, as sondas e os iniciadores são quaisquer de 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, ou 30 nucleotídeos de comprimento. As sondas e os iniciadores da invenção podem ter identidade de seqüência de nucleotídeos completa (100%) com a seqüência de polinucleotídeos, ou a identidade de seqüência pode ser menos do que 100%. Por exemplo, a identidade de seqüência entre uma sonda ou iniciador e uma seqüência pode ser 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 80%, 75%, 70% ou qualquer outra porcentagem de identidade de seqüência, desde que a sonda ou o iniciador possa hibridizar sob condições severas com uma seqüência de nucleotídeos de um polinucleotídeo da invenção. As sondas e os iniciadores exemplificados da invenção incluem aqueles tendo a seqüência de nucleotídeos mostrada em quaisquer de SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, e SEQ ID NO: 46, ou um fragmento ou variante

funcional de quaisquer das SEQ ID NOS: 35-46.

[000122] Conforme usados aqui, os termos "ácido nucléico", "polinucleotídeo" e "oligonucleotídeo" referem-se a um desoxirribonucleotídeo, ribonucleotídeo, ou um polímero misto de desoxirribonucleotídeo e ribonucleotídeo na forma de filamento simples ou duplo e, a não ser que de outro modo limitado, incluiriam os análogos conhecidos de nucleotídeos naturais que podem funcionar em um modo similar aos nucleotídeos de ocorrência natural. As seqüências de polinucleotídeos incluem a seqüência de filamento de DNA que pode ser transcrita em RNA e o filamento de RNA que pode ser traduzido na proteína. A seqüência complementar de qualquer ácido nucléico, polinucleotídeo, ou oligonucleotídeo da presente invenção é também contemplada dentro do escopo da invenção. As seqüências de polinucleotídeos também incluem as seqüências de tamanhos naturais, bem como as seqüências mais curtas derivadas das seqüências de tamanhos naturais. A presente invenção também inclui esses polinucleotídeos que são complementares na seqüência aos polinucleotídeos descritos neste documento. Os polinucleotídeos e os polipeptídeos da invenção podem ser proporcionados na forma purificada ou isolada.

[000123] Por causa da degeneração do código genético, uma variedade de seqüências de polinucleotídeos diferentes pode codificar um polipeptídeo da presente invenção. Uma tabela mostrando todos os códons de triplete possíveis (e em que U também significa T) e o aminoácido codificado por cada códon é descrito em Lewin (1985). Ademais, está bem dentro da habilidade de uma pessoa versada na técnica criar seqüências de polinucleotídeos alternativas codificando polipeptídeos iguais, ou essencialmente iguais, da presente invenção. Essas seqüências de polinucleotídeos variantes e alternativas degeneradas estão dentro do escopo da presente invenção. Conforme

usadas aqui, as referências à seqüência "essencialmente igual" referem-se às seqüências que codificam substituições, remoções, adições, ou inserções de aminoácidos, que não alteram materialmente a atividade funcional e/ou imunogênica do polipeptídeo codificado pelos polinucleotídeos da presente invenção.

[000124] A presente invenção também refere-se às variantes dos polinucleotídeos da presente invenção que codificam os polipeptídeos da invenção. As seqüências variantes incluem aquelas seqüências em que um ou mais nucleotídeos da seqüência foram substituídos, removidos, e/ou inseridos. Os nucleotídeos que podem substituir os nucleotídeos naturais de DNA têm uma porção de base que pode incluir, porém não está limitada à, inosina, 5-fluorouracila, 5-bromouracila, hipoxantina, 1-metilguanina, 5-metilcitosina, e bases trilitadas. A porção de açúcar do nucleotídeo em uma seqüência pode também ser modificada e inclui, porém não está limitada à, arabinose, xilulose, e hexose. Ademais, as bases adenina, citosina, guanina, timina, e uracila dos nucleotídeos podem ser modificadas com grupos acetila, metila, e/ou tio. As seqüências contendo as substituições, as remoções, e/ou as inserções de nucleotídeos podem ser preparadas e testadas usando práticas-padrão, conhecidas na técnica.

[000125] A substituição de aminoácidos, diferente daquelas especificamente exemplificadas ou naturalmente presentes em um polipeptídeo da invenção, é também contemplada dentro do escopo da presente invenção. Por exemplo, os aminoácidos não naturais podem substituir os aminoácidos de um polipeptídeo, desde que o polipeptídeo tendo os aminoácidos substituídos conserve substancialmente a mesma atividade funcional que o polipeptídeo no qual não foram substituídos aminoácidos. Os exemplos de aminoácidos não naturais incluem, porém não estão limitados à, ornitina, citrulina, hidroxipropila, homosserina, fenilglicina, taurina,

iodotirosina, ácido 2,4-diaminobutírico, ácido  $\alpha$ -amino isobutírico, ácido 4-aminobutírico, ácido 2-amino butírico, ácido  $\gamma$ -amino butírico, ácido  $\varepsilon$ -amino hexanóico, ácido 6-amino hexanóico, ácido 2-amino isobutírico, ácido 3-amino propiônico, norleucina, norvalina, sarcosina, homocitrulina, ácido cistéico,  $\tau$ -butilglicina,  $\tau$ -butilalanina, fenilglicina, cicloexilalanina,  $\beta$ -alanina, flúor-aminoácidos, aminoácidos projetados, tais como os  $\beta$ -metil aminoácidos, os C-metil aminoácidos, os N-metil aminoácidos, e os análogos de aminoácidos em geral. Os aminoácidos não naturais também incluem os aminoácidos tendo grupos laterais derivados. Além disso, quaisquer dos aminoácidos na proteína podem ser da forma D (dextrorrotatório) ou forma L (levorrotatório). As variantes alélicas de uma seqüência protéica de um polipeptídeo da presente invenção estão também incluídas dentro do escopo da invenção.

[000126] Os aminoácidos podem ser geralmente categorizados nas seguintes classes: apolares, polares não carregados, básicos, e ácidos. As substituições conservativas, pelas quais um polipeptídeo da presente invenção tendo um aminoácido de uma classe é substituído por um outro aminoácido da mesma classe, incidem no escopo da presente invenção, desde que o polipeptídeo tendo a substituição ainda conserve substancialmente a mesma atividade funcional que o polipeptídeo que não tem a substituição. Os polinucleotídeos codificando um polipeptídeo tendo uma ou mais substituições de aminoácidos na seqüência são contemplados dentro do escopo da presente invenção. A Tabela 11 abaixo proporciona uma listagem de exemplos de aminoácidos pertencentes a cada classe. As abreviações de aminoácidos de uma única letra são definidas na Tabela 12.

[000127] Os fragmentos e as variantes dos polipeptídeos do vírus influenza da presente invenção podem ser gerados usando métodos-padrão, conhecidos na técnica, e testados quanto à presença de

função ou imunogenicidade usando práticas-padrão, conhecidas na técnica. Por exemplo, para testar os fragmentos e/ou as variantes de um polipeptídeo de neuraminidase da invenção, a atividade enzimática pode ser analisada. Assim, um técnico comumente versado pode prontamente preparar e testar os fragmentos e as variantes de um polipeptídeo da invenção e determinar se o fragmento ou a variante conserva atividade em relação ao polipeptídeo de tamanho natural ou um não variante.

[000128] Os polinucleotídeos e os polipeptídeos contemplados dentro do escopo da presente invenção podem também ser definidos em termos de faixas mais particulares de identidade e/ou de similaridade com aquelas seqüências da invenção especificamente exemplificadas nesse documento. A identidade de seqüência tipicamente será maior do que 60%, preferivelmente maior do que 75%, mais preferivelmente maior do que 80%, ainda mais preferivelmente maior do que 90%, e pode ser maior do que 95%. A identidade e/ou a similaridade de uma seqüência pode ser 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, ou 99%, em comparação com uma seqüência exemplificada nesse documento. A não ser que de outro modo especificado, conforme usado aqui, a porcentagem de identidade e/ou similaridade de seqüência de duas seqüências pode ser determinada usando o algoritmo de Karlin e Altschul (1990), modificado como em Karlin e Altschul (1993). Tal algoritmo está incorporado nos programas NBLAST e XBLAST de Altschul e outros (1990). As buscas por BLAST podem ser efetuadas com o programa NBLAST, classificação = 100, comprimento de letra = 12, para obter seqüências com a porcentagem desejada de identidade de seqüência. Para obter os alinhamentos com fendas para propósitos de comparação, o Gapped BLAST pode ser

usado como descrito em Altschul e outros (1997). Quando utilizando os programas BLAST e Gapped BLAST, os parâmetros preestabelecidos dos respectivos programas (NBLAST e XBLAST) podem ser usados. Ver o endereço de página eletrônica da rede de NCBI/NIH.

[000129] A presente invenção também contempla aquelas moléculas de polinucleotídeos tendo seqüências que são suficientemente homólogas com as seqüências de polinucleotídeos exemplificadas aqui, de modo a permitir a hibridação com aquela seqüência sob condições severas padrão e métodos-padrão (Maniatis e outros, 1982). Conforme usadas aqui, as condições "severas" para a hibridação referem-se às condições em que a hibridação é tipicamente efetuada durante a noite, a 20-25 C abaixo da temperatura de fusão (Tm) do híbrido de DNA, em 6x SSPE, 5x solução de Denhardt, 0,1% de SDS, 0,1 mg/ml de DNA desnaturado. A temperatura de fusão, Tm, é descrita pela seguinte fórmula (Beltz e outros, 1983):

[000130]  $Tm = 81,5\text{ C} + 16,6 \cdot \text{Log}[\text{Na}^+] + 0,41(\%G+C) - 0,61(\% \text{ de formamida}) - 600/\text{comprimento do díplex em pares de bases.}$

[000131] As lavagens são tipicamente efetuadas como se segue:

(1) Duas vezes na temperatura ambiente por 15 minutos em 1x SSPE, 0,1% de SDS (lavagem de baixa severidade).

(2) Uma vez em  $Tm-20\text{ C}$  por 15 minutos em 0,2x SSPE, 0,1% de SDS (lavagem de severidade moderada).

[000132] A presente invenção também refere-se às proteínas e aos peptídeos virais codificados pelos genes de um vírus influenza da presente invenção. Em uma modalidade, a proteína viral é uma proteína HA madura. Em uma modalidade específica, a proteína HA madura compreende uma ou mais das seguintes: uma serina na posição 82; uma leucina na posição 221; uma treonina na posição 327; e/ou uma treonina na posição 482. Em uma modalidade exemplificada,

a proteína HA madura tem uma seqüência de aminoácidos mostrada em SEQ ID NO: 33 ou SEQ ID NO: 34, ou um fragmento ou variante funcional e/ou imunogênica de SEQ ID NO: 33 ou SEQ ID NO: 34. Em uma outra modalidade, a proteína viral é uma proteína NA, proteína NS, proteína PB, proteína PA, ou proteína MA. As proteínas e os peptídeos virais da invenção podem ser usados para gerar anticorpos que se ligam especificamente à proteína ou ao peptídeo. As proteínas e os peptídeos virais da presente invenção podem também ser usados como imunógenos e em composições de vacina.

[000133] A presente invenção também refere-se às composições e aos métodos para induzir uma resposta imune contra um vírus influenza que é capaz de infectar um animal hospedeiro suscetível e causar doença respiratória. A invenção pode ser usada para induzir uma resposta imune contra um vírus influenza de qualquer subtipo em um animal hospedeiro suscetível. Por exemplo, o vírus influenza pode ser um subtipo de HA de H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15, ou H16, e um subtipo de NA de N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7, N8, ou N9. Em uma modalidade, o subtipo de HA é H3 ou H5. Em uma modalidade adicional, o subtipo de NA é N7 ou N8. Em uma modalidade específica, uma resposta imune é induzida contra um vírus influenza do subtipo H3N8. Em uma modalidade, o animal hospedeiro é um canídeo. Os caninos incluem os caninos selvagens, de zoológico, e domésticos, tais como os lobos, os coiotes, e as raposas. Os caninos também incluem os cães, particularmente os cães domésticos, tais como, por exemplo, os cães de companhia de raça pura e/ou mestiços, os cães para shows, os cães para trabalho, os cães pastores, os cães de caça, os cães-de-guarda, os cães-polícia, os cães de corrida, e/ou os cães de laboratório. Em uma modalidade específica, o animal hospedeiro é um cão domesticado, tal como um galgo. Em uma modalidade, um animal é administrado com uma

quantidade efetiva de uma composição imunogênica da presente invenção, suficiente para induzir uma resposta imune contra um vírus influenza da invenção. A resposta imune pode ser uma resposta imune humoral e/ou celular. Em uma modalidade específica, a resposta imune é uma resposta imune protetora que é capaz de prevenir ou minimizar a infecção viral no animal hospedeiro imunizado por algum período de tempo subsequente à imunização. Assim, a presente invenção também refere-se às composições de vacinas e aos métodos que podem prover o animal vacinado com uma resposta imune protetora a um vírus da presente invenção.

[000134] Conforme descrito nesse documento, as composições de vacinas ou imunogênicas da presente invenção podem compreender vírus integrais sem células, incluindo os vírus atenuados ou inativos, ou porções dos vírus, incluindo as partículas de subvírion (incluindo a "vacina separada", em que um vírion é tratado para remover alguns ou todos os lipídios virais), proteínas vitais (incluindo as proteínas individuais e os complexos macromoleculares de proteínas múltiplas), polipeptídeos, e peptídeos, bem como as linhagens de células infectadas com vírus, ou uma combinação de quaisquer desses. As composições de vacinas ou imunogênicas compreendendo linhagens de células infectadas com vírus podem compreender linhagens de células múltiplas, cada uma infectada com uma cepa viral diferente.

[000135] As composições de vacinas ou imunogênicas da presente invenção também incluem os constructos à base de vetores virais recombinantes que podem compreender, por exemplo, genes codificando a proteína HA, a proteína NA, a nucleoproteína, a proteína básica de polimerase, a proteína ácida de polimerase, e/ou a proteína de matriz de um vírus influenza da presente invenção. Qualquer vetor viral adequado que possa ser usado para preparar um constructo de vetor recombinante/vírus é contemplado para uso com a presente

invenção. Por exemplo, os vetores virais derivados de adenovírus, avipox, herpesvírus, vacínia, varíola dos canários, entomopox, varíola suína, vírus do Nilo Ocidental e outros conhecidos na técnica podem ser usados com as composições e os métodos da presente invenção. Os vetores de polinucleotídeos recombinantes que codificam e expressam componentes podem ser construídos usando práticas-padrão de engenharia genética, conhecidas na técnica. Além disso, as diversas composições de vacinas descritas aqui podem ser usadas separadamente e em combinação uma com a outra. Por exemplo, as imunizações primárias de um animal podem usar constructos à base de vetores recombinantes, tendo componentes de cepas individuais ou múltiplas, seguidas por reforços secundários com composições de vacinas compreendendo vírus inativado ou linhagens celulares infectadas com vírus inativado. Os outros protocolos de imunização com as composições de vacinas da invenção são aparentes para as pessoas versadas na técnica e são contemplados dentro do escopo da presente invenção.

[000136] A presente invenção também refere-se ao vírus reagrupado compreendendo pelo menos um gene ou segmento genômico de um vírus influenza da presente invenção e o restante dos genes virais ou segmentos genômicos a partir de um vírus influenza diferente da invenção ou a partir de um vírus influenza diferente de um vírus da presente invenção. O vírus reagrupado pode ser produzido por reagrupamento genético do ácido nucléico de um vírus influenza doador da presente invenção com o ácido nucléico de um vírus influenza receptor e então seleção do vírus reagrupado que compreende o ácido nucléico do vírus doador. Os métodos para produzir e isolar o vírus reagrupado são bastante conhecidos na técnica (Fields e outros, 1996). Em uma modalidade, um vírus reagrupado da invenção compreende genes ou segmentos genômicos

de um vírus influenza humano, aviário, suíno, ou eqüino. Um vírus reagrupado da presente invenção pode incluir qualquer combinação de ácido nucléico do vírus influenza doador e receptor, desde que o vírus reagrupado compreenda pelo menos um gene ou segmento genômico de um vírus influenza doador da presente invenção. Em uma modalidade, um vírus influenza receptor pode ser um vírus influenza eqüino.

[000137] Os polipeptídeos naturais, recombinantes ou sintéticos de proteínas virais, e os seus fragmentos peptídicos, podem também ser usados como composições de vacinas de acordo com os métodos expostos. Em uma modalidade, os polipeptídeos virais derivados de cepas múltiplas podem ser combinados em uma composição de vacina e são usados para vacinar um animal hospedeiro. Por exemplo, os polipeptídeos baseados na proteína HA viral a partir de pelo menos duas cepas diferentes do vírus influenza da invenção podem ser combinados na vacina. Os polipeptídeos podem ser homólogos a uma cepa ou podem compreender polipeptídeos "híbridos" ou "quiméricos", cuja seqüência de aminoácidos é derivada da união ou da ligação dos polipeptídeos a partir de pelo menos duas cepas distintas. Os procedimentos para preparar os polipeptídeos virais são bastante conhecidos na técnica. Por exemplo, os polipeptídeos e os peptídeos virais podem ser sintetizados usando métodos de síntese em fase sólida (Merrifield, 1963). Os polipeptídeos e os peptídeos virais podem também ser produzidos usando técnicas de DNA recombinante, em que uma molécula de polinucleotídeo codificando uma proteína ou peptídeo viral é expressa em uma célula hospedeira, tal como bactérias, leveduras, ou linhagens celulares mamíferas, e a proteína expressa purificada usando práticas-padrão da técnica.

[000138] As composições de vacinas da presente invenção também incluem as composições de ácidos nucléicos simples. Em uma

modalidade, um ácido nucléico pode compreender uma seqüência de nucleotídeos codificando uma proteína HA e/ou uma proteína NA proteína de um vírus influenza da presente invenção. Os métodos para a vacinação com ácidos nucléicos são conhecidos na técnica e são descritos, por exemplo, nas Patentes U.S. N<sup>os</sup> 6.063.385 e 6.472.375. O ácido nucléico pode estar na forma de um plasmídio ou um cassete de expressão de gene. Em uma modalidade, o ácido nucléico é proporcionado encapsulado em um lipossomo, o qual é administrado a um animal.

[000139] As composições de vacinas e os imunógenos, tais como os polipeptídeos e os ácidos nucléicos, que podem ser usados de acordo com a presente invenção podem ser proporcionados com um veículo ou diluente farmaceuticamente aceitável. Os compostos e as composições úteis na presente invenção podem ser formulados de acordo com métodos conhecidos para a preparação de composições farmaceuticamente úteis. As formulações são descritas em detalhe em diversas fontes, as quais são bastante conhecidas e estão prontamente disponíveis para aqueles versados na técnica. Por exemplo, *Remington's Pharmaceutical Science*, por E.W. Martin, Easton Pennsylvania, Mack Publishing Company, 19<sup>a</sup> ed., 1995, descreve formulações que podem ser usadas em conexão com a presente invenção. Em geral, as composições da presente invenção serão formuladas de modo tal que uma quantidade efetiva de um imunógeno seja combinada com um veículo adequado, para facilitar a administração efetiva da composição. As composições usadas nos presentes métodos podem também estar em uma variedade de formas. Essas incluem, por exemplo, as formas sólidas, semi-sólidas, e líquidas, tais como os comprimidos, as pílulas, os pós, as soluções ou as suspensões líquidas, os supositórios, as soluções injetáveis e infusíveis, e os sprays. A forma preferida depende do modo pretendido

de administração e aplicação terapêutica. As composições também preferivelmente incluem os veículos e os diluentes farmaceuticamente aceitáveis convencionais, os quais são conhecidos para aqueles versados na técnica. Os exemplos de veículos ou diluentes para uso com os peptidomiméticos expostos incluem, porém não estão limitados à, água, solução salina, óleos, incluindo o óleo mineral, etanol, sulfóxido de dimetila, gelatina, ciclodextranos, estearato de magnésio, dextrose, celulose, açúcares, carbonato de cálcio, glicerol, alumina, amido, e veículos e diluentes equivalentes, ou misturas de quaisquer desses. As formulações de um imunógeno da invenção podem também compreender agentes de suspensão, protetores, lubrificantes, tampões, conservantes, e estabilizantes. Para proporcionar a administração de tais dosagens para o tratamento terapêutico desejado, as composições farmacêuticas da invenção vantajosamente compreenderão entre cerca de 0,1% e 45%, e especialmente, 1 e 15% em peso do imunógeno ou dos imunógenos, com base no peso da composição total, incluindo veículo ou diluente.

[000140] As composições de vacinas e imunogênicas da presente invenção podem ser preparadas por procedimentos bastante conhecidos na técnica. Por exemplo, a vacina ou os imunógenos são tipicamente preparados como soluções ou suspensões injetáveis, por exemplo, líquidas. A vacina ou os imunógenos são administrados em um modo que seja compatível com a formulação de dosagem, e em tal quantidade como será terapeuticamente efetiva e imunogênica no receptor. As dosagens ótimas e os padrões de administração para uma formulação particular de vacina ou de imunógenos podem ser prontamente determinados por uma pessoa versada na técnica.

[000141] Os peptídeos e/ou os polipeptídeos da presente invenção podem também ser proporcionados na forma de um constructo de peptídeo antigênico múltiplo (MAP). A preparação de constructos de

MAP foi descrita em Tam (1988). Os constructos de MAP utilizam uma matriz de núcleo de resíduos de lisina, sobre a qual são sintetizadas múltiplas cópias de um imunógeno (Posnett e outros, 1988). Os constructos de MAP múltiplos, cada um contendo imunógenos iguais ou diferentes, podem ser preparados e administrados em uma composição de vacina de acordo com os métodos da presente invenção. Em uma modalidade, um constructo de MAP é proporcionado e/ou administrado com um ou mais adjuvantes. Os polipeptídeos de influenza da invenção podem também ser produzidos e administrados como estruturas de proteínas macromoleculares compreendendo um ou mais polipeptídeos. O Pedido de Patente U.S. publicado US2005/0009008 descreve métodos para produzir partículas semelhantes a vírus como uma vacina para o vírus influenza.

[000142] De acordo com os métodos da presente invenção, as composições de vacina e imunogênicas descritas nesse documento são administradas a hospedeiros suscetíveis, tipicamente os canídeos, e mais tipicamente os cães domesticados, em uma quantidade e maneira efetivas para induzir uma imunidade protetora contra a provocação ou a infecção subseqüente do hospedeiro pelo vírus. Em uma modalidade, o animal hospedeiro é um canídeo. Os caninos incluem os caninos selvagens, de zoológico, e domésticos, tais como os lobos, os coiotes, e as raposas. Os caninos também incluem os cães, particularmente os cães domésticos, tais como, por exemplo, os cães de companhia de raça pura e/ou mestiços, os cães para shows, os cães para trabalho, os cães pastores, os cães de caça, os cães-de-guarda, os cães-polícia, os cães de corrida, e/ou os cães de laboratório. Em uma modalidade específica, o animal hospedeiro é um cão domesticado, tal como um galgo. As vacinas ou os imunógenos são tipicamente administrados parenteralmente, por injeção, por exemplo, de modo subcutâneo, intraperitoneal, ou intramuscular. Os

outros modos adequados de administração incluem a administração oral ou nasal. Normalmente, as vacinas ou os imunógenos são administrados a um animal pelo menos duas vezes, com um intervalo de uma ou mais semanas entre cada administração. Entretanto, outros regimes para as administrações iniciais e de reforço da vacina ou dos imunógenos são contemplados, e podem depender do julgamento do profissional e do animal hospedeiro particular que está sendo tratado.

[000143] O vírus e as células infectadas com vírus em uma formulação de vacina podem ser inativados ou atenuados usando métodos conhecidos na técnica. Por exemplo, o vírus integral e as células infectadas podem ser inativados ou atenuados por exposição ao paraformaldeído, formalina, fenol, luz UV, temperatura elevada e similar. A quantidade de vírus integral sem células em uma dose de vacina normalmente estará na faixa de cerca de 0,1 mg a cerca de 5 mg, e mais usualmente sendo de cerca de 0,2 mg a cerca de 2 mg. A dosagem para as formulações de vacinas compreendendo linhagens celulares infectadas com vírus normalmente contém de cerca de  $10^6$  a cerca de  $10^8$  células por dose, e mais normalmente de cerca de  $5 \times 10^6$  a cerca de  $7,5 \times 10^7$  células por dose. A quantidade de imunógeno de proteína ou peptídeo em uma dose para um animal pode variar de cerca de 0,1  $\mu$ g a 10000  $\mu$ g, ou cerca de 1  $\mu$ g a 5000  $\mu$ g, ou cerca de 10  $\mu$ g a 1000  $\mu$ g, ou cerca de 25  $\mu$ g a 750  $\mu$ g, ou cerca de 50  $\mu$ g a 500  $\mu$ g, ou 100  $\mu$ g a 250  $\mu$ g, dependendo do tamanho, idade, etc., do animal que está recebendo a dose.

[000144] Uma composição imunogênica ou de vacina da invenção, tal como vírus ou células infectadas com vírus ou proteínas ou peptídeos virais, pode ser combinada com um adjuvante, de modo típico exatamente antes da administração. Os adjuvantes contemplados para uso nas formulações de vacinas incluem o treonil muramil dipeptídeo (MDP) (Byars e outros, 1987), a saponina, o

*Corenebacterium parvum*, os adjuvantes completos de Freund e incompletos de Freund, o alumínio, ou uma mistura de quaisquer desses. Uma variedade de outros adjuvantes, adequados para uso com os métodos e as vacinas da presente invenção, tais como o alúmen, é bastante conhecida na técnica e é contemplada para uso com a presente invenção.

[000145] A presente invenção também refere-se aos anticorpos que se ligam especificamente a uma proteína ou um peptídeo da presente invenção. Os anticorpos da presente invenção incluem as composições de anticorpos monoclonais e policlonais. De preferência, os anticorpos da presente invenção são anticorpos monoclonais. Os anticorpos integrais e os seus fragmentos de ligação a抗ígenos são contemplados na presente invenção. Assim, por exemplo, os fragmentos de ligação a抗ígenos adequados incluem os fragmentos de anticorpos  $Fab_2$ ,  $Fab$  e  $Fv$ . Os anticorpos da invenção podem ser marcados com uma porção detectável, tal como uma molécula fluorescente (por exemplo, fluoresceína ou uma enzima).

[000146] A presente invenção também refere-se aos métodos e às composições para a detecção e a identificação de um vírus influenza da invenção e para a diagnose da infecção de um animal com um vírus influenza da presente invenção. Os métodos da invenção incluem a detecção da presença de influenza canina em uma amostra biológica de um animal. A detecção de influenza canina em uma amostra é útil para diagnosticar a influenza canina em um animal. Por sua vez, esta informação pode proporcionar a capacidade de determinar o prognóstico de um animal com base na diferenciação dos níveis de influenza canina presente com o tempo, e pode auxiliar na seleção de agentes e tratamentos terapêuticos para o animal, e auxiliar no monitoramento da terapia. O método também proporciona a capacidade de estabelecer a ausência de influenza canina em um

animal testado.

[000147] A capacidade de detectar a influenza canina em um animal permite a avaliação de surtos de influenza canina em diferentes posições geográficas. Essa informação também permite a detecção inicial de modo que os animais infectados possam ser isolados, para limitar o espalhamento da doença, e permite a intervenção inicial para as opções de tratamento. Além disso, tendo essa informação disponível pode proporcionar orientação para a equipe médica para a preparação, para tratar grandes números de animais doentes, incluindo a montagem de suprimentos médicos, e, se disponíveis, vacinas.

[000148] Em uma modalidade, um método da presente invenção envolve a coleta de uma amostra biológica a partir de um animal de teste, tal como um canino. A amostra biológica pode ser qualquer material biológico, incluindo as células, o tecido, o cabelo, o sangue integral, o soro, o plasma, o aspirado do mamilo, a lavagem do pulmão, o fluido cerebroespinhal, a saliva, o suor e as lágrimas.

[000149] A amostra de teste do animal pode vir de um animal suspeito de ter vírus influenza canino, quer o animal exiba sintomas da doença, quer não exiba. As amostras de controle podem também ser proporcionadas ou coletadas de animais sabidos estarem isentos de influenza canina. Podem ser proporcionados controles adicionais, por exemplo para reduzir os resultados falso positivos e falso negativos, e verificar que os reagentes no ensaio estão ativamente detectando o vírus influenza canino A.

[000150] Além de detectar a presença ou a ausência de influenza canina em uma amostra biológica, os métodos de detecção usados na invenção podem detectar mutações no vírus influenza canino, tais como alterações na seqüência de ácidos nucléicos, que podem resultar do ambiente, tratamento com fármaco, manipulações ou

mutações genéticas, lesão, mudança na dieta, envelhecimento, ou qualquer(quaisquer) outra(s) característica(s) de um animal. As mutações podem também fazer com que a influenza canina A torne-se resistente a um fármaco que era inicialmente efetivo, ou capacite o vírus de infectar e propagar em uma espécie diferente de animal, ou ser humano. Por exemplo, o vírus influenza aviário A mostrou infectar outros animais e os seres humanos.

[000151] Em uma modalidade para detectar um vírus influenza em um animal, a diagnose é facilitada pela coleta de espécimens de alta qualidade, pelo seu rápido transporte para uma instalação de teste, e pela armazenagem apropriada, antes do teste em laboratório. O vírus é mais bem detectado em espécimens contendo células infectadas e secreções. Em uma modalidade, os espécimens para a detecção direta de antígenos virais e/ou para ácidos nucléicos e/ou isolamento de vírus em culturas de células são retirados durante os primeiros 3 dias após o início dos sintomas clínicos. Diversos tipos de espécimens são adequados para diagnosticar as infecções por vírus do trato respiratório superior, incluindo, porém não limitados ao, swab nasal, swab nasofaríngeo, aspirado nasofaríngeo, lavagem nasal e swabs da garganta. Além dos swabs, podem ser retiradas amostras de tecido ou soro, e os procedimentos invasivos podem também ser efetuados.

[000152] Em uma modalidade, os espécimens respiratórios são coletados e transportados em 1-5 ml de meios de transporte de vírus. Diversos meios que são satisfatórios para a recuperação de uma ampla variedade de vírus estão disponíveis comercialmente. Os espécimens clínicos são adicionados ao meio de transporte. Os swabs nasais ou nasofaríngeos podem também ser transportados no meio de transporte de vírus. Um exemplo de um meio de transporte é 10 g de caldo de infusão de vitela e 2 g de fração de albumina bovina V, adicionados à água destilada estéril até 400 ml. Os antibióticos, tais

como 0,8 ml de solução de sulfato de gentamicina (50 mg/ml) e 3,2 ml de anfotericina B (250 µg/ml), podem também ser adicionados. O meio é preferivelmente esterilizado por filtração. As lavagens nasais, tais como a solução salina estéril (0,85% de NaCl), podem também ser usadas para coletar os espécimes de vírus respiratórios.

[000153] Em uma modalidade, o soro é coletado em uma quantidade de 1-5 ml de sangue integral a partir de um animal em fase aguda, logo após o início dos sintomas clínicos, e preferivelmente não posterior a 7 dias. Um espécime de soro em fase convalescente pode também ser coletado, por exemplo, em torno de 14 dias após o início dos sintomas. Os espécimes de soro podem ser úteis para detectar os anticorpos contra os vírus respiratórios em um teste de neutralização.

[000154] Em algumas situações, as amostras podem ser coletadas de animais individuais, durante um período de tempo (por exemplo, uma vez ao dia, uma vez por semana, uma vez por mês, bianualmente ou anualmente). A obtenção de diversas amostras de um animal individual, durante um período de tempo, pode ser usada para verificar os resultados de detecções anteriores, e/ou para identificar a resposta ou a resistência a um tratamento específico, por exemplo, um fármaco terapêutico selecionado.

[000155] Os métodos da presente invenção podem ser usados para detectar a presença de um ou mais agentes patológicos em uma amostra de teste de um animal, e o nível de cada agente patológico. Qualquer método para detectar o agente patológico pode ser usado, incluindo, porém não limitado aos, ensaios de anticorpos, incluindo os ensaios de imunoabsorção enzimática (ELISAs), os testes de anticorpos fluorescentes indiretos (IFA), os ensaios de hemaglutinação, e inibição da hemaglutinação (HI), e o Western Blot. Os métodos de cultura de células conhecidos podem também ser usados. As culturas

positivas podem ser adicionalmente identificadas usando imunofluorescência de culturas de células ou ensaio de HI do meio de cultura de células (sobrenadante).

[000156] Além disso, podem ser usados métodos para detectar o ácido nucléico (DNA ou RNA) ou a proteína. Tais métodos incluem, porém não estão limitados à reação em cadeia por polimerase (PCR), e a testes de transcriptase reversa (RT) PCR e a testes em tempo real, e a ensaios de proteção de nuclease quantitativos. Existem kits de teste à venda comercialmente, disponíveis para efetuar esses ensaios. Por exemplo, a QIAGEN (Valencia, CA) vende um kit de RT-PCR de uma etapa, e o kit de extração de RNA viral.

[000157] Em uma modalidade, o método utiliza um anticorpo específico para um vírus ou proteína viral da invenção. Em uma modalidade específica, um anticorpo específico para uma proteína HA de um vírus da invenção é utilizado. Em uma outra modalidade, um anticorpo específico para uma proteína NP de um vírus da invenção é utilizado. Uma amostra adequada, tal como da região nasal ou nasofaríngea, é obtida de um animal e o vírus ou a proteína viral é isolada dele. Os componentes virais são então examinados quanto à ligação de um anticorpo específico para uma proteína, tal como HA ou NP, de um vírus da invenção. Em uma outra modalidade, uma amostra de soro (ou outra amostra contendo anticorpo) é obtida de um animal e o soro examinado quanto à presença de anticorpo que se liga a uma proteína de um vírus da invenção. Por exemplo, um ensaio ELISA pode ser efetuado, em que as paredes da placa têm proteína HA e/ou NP, ou um fragmento de peptídeo dela, ligado à parede. A parede da placa é então contatada com o soro ou o anticorpo de um animal de teste. A presença de anticorpo no animal que se liga especificamente à proteína HA e/ou NP é indicativa que o animal de teste está infectado ou foi infectado com um vírus influenza da presente invenção.

[000158] Em uma modalidade, a presença de um agente patológico é detectada por determinação da presença ou da ausência de anticorpos contra o agente, em uma amostra biológica. Pode levar algum tempo (por exemplo, meses) após um animal ser infectado antes dos anticorpos poderem ser detectados em um teste de sangue. Assim que formados, os anticorpos normalmente persistem por muitos anos, mesmo após o tratamento bem-sucedido da doença. Encontrar anticorpos para a influenza canina A pode não indicar se a infecção era recente, ou foi outrora no passado.

[000159] O teste dos anticorpos pode também ser feito em fluido(s). Os ensaios de anticorpos incluem os ensaios imunológicos por ligação com enzimas (ELISAs), os ensaios de anticorpos fluorescentes indiretos (IFA), e o Western Blot. De preferência, o teste dos anticorpos é feito usando ensaios múltiplos, por exemplo, ELISA ou IFA seguido por Western Blot. Os ensaios dos anticorpos podem ser feitos em um processo de duas etapas, usando um ensaio ELISA ou IFA, seguido por um ensaio de Western Blot. O ELISA é considerado um ensaio mais confiável e preciso do que o IFA, porém o IFA pode ser usado se o ELISA não estiver disponível. O teste de Western Blot (que é um teste mais específico) pode também ser feito em todos os animais, particularmente aqueles que testaram positivos ou positivos duvidosos (equívocos) em um ensaio ELISA ou IFA.

[000160] Os outros testes à base de anticorpos que podem ser usados para a detecção do vírus influenza incluem os ensaios de inibição da hemaglutinação. A atividade de hemaglutinação pode ser detectada em uma amostra biológica de um animal, usando as células sanguíneas vermelhas de galinhas ou perus, conforme descrito (Burleson e outros, 1992 e Kendal e outros, 1982). Em uma modalidade, um influenza ou uma proteína ou peptídeo HA da invenção é contatado com uma amostra de teste contendo soro ou

anticorpo. As células sanguíneas vermelhas (RBC) de um animal, tal como uma ave, são então adicionadas. Se o anticorpo para HA estiver presente, então as RBC não se aglutinarão. Se o anticorpo para HA não estiver presente, as RBC se aglutinarão na presença de HA. As variações e as modificações para os ensaios de inibição da hemaglutinação padrão são conhecidas na técnica e contempladas dentro do escopo da presente invenção.

[000161] A infecção de um animal pode também ser determinada por isolamento do vírus de uma amostra, tal como um swab nasal ou nasofaríngeo. O isolamento viral pode ser efetuado usando métodos-padrão, incluindo a inoculação de culturas de células e ovos.

[000162] Em uma modalidade adicional, um ensaio à base de ácido nucléico pode ser usado para a detecção de um vírus da presente invenção. Em uma modalidade, uma amostra de ácido nucléico é obtida de um animal e o ácido nucléico submetido a PCR usando iniciadores que gerarão um produto de amplificação, se o ácido nucléico contiver uma seqüência específica para um vírus influenza da presente invenção. Em uma modalidade específica, a RT-PCR é usada em um ensaio para o vírus exposto. Em uma modalidade exemplificada, a RT-PCR em tempo real é usada para testar um vírus influenza da invenção. Os métodos de PCR, RT-PCR e PCR em tempo real são conhecidos na técnica e foram descritos nas Patentes U.S. N<sup>os</sup> 4.683.202; 4.683.195; 4.800.159; 4.965.188; 5.994.056; 6.814.934; e em Saiki e outros (1985); Sambrook e outros (1989); Lee e outros (1993); e Livak e outros (1995). Em uma modalidade, o ensaio de PCR utiliza oligonucleotídeos específicos para um gene de matriz (MA) e/ou gene de HA de influenza. O produto de amplificação pode também ser seqüenciado para determinar se o produto tem uma seqüência de um vírus influenza da presente invenção. Outros ensaios à base de ácidos nucléicos podem ser usados para a detecção e a

diagnose de infecção viral por um vírus da invenção e tais ensaios são contemplados dentro do escopo da presente invenção. Em uma modalidade, uma amostra contendo um ácido nucléico é submetida a uma amplificação à base de PCR usando os iniciadores *forward* e *reverso*, em que os iniciadores são específicos para uma seqüência de polinucleotídeos ou gene viral. Se o ácido nucléico na amostra for o RNA, então a RT-PCR pode ser efetuada. Para a PCR em tempo real, uma sonda detectável é utilizada com os iniciadores.

[000163] Os grupos de iniciadores específicos para o gene de hemaglutinina (HA) de muitos dos vírus influenza circulantes são conhecidos, e estão continuamente sendo desenvolvidos. O genoma do vírus influenza é um RNA de filamento simples, e a cópia de DNA (cDNA) deve ser feita usando uma polimerase transcriptase reversa (RT). A amplificação do genoma de RNA, por exemplo, usando RT-PCR, requer um par de iniciadores de oligonucleotídeos, tipicamente projetado de acordo com a seqüência de HA conhecida dos subtipos de influenza A e de neuraminadase (NM)-1. Os iniciadores podem ser selecionados de modo tal que eles especificamente amplificarão o RNA de somente um subtipo de vírus. Os DNAs gerados por utilização de iniciadores específicos para os subtipos podem ser adicionalmente analisados por técnicas genéticas moleculares, tais como o seqüenciamento. O teste é preferivelmente efetuado com um controle positivo, ou os produtos são confirmados por seqüenciamento e comparação com seqüências conhecidas. A ausência de produtos-alvo de PCR (isto é, um resultado "negativo") pode não excluir a presença do vírus. Os resultados podem então ser tornados disponíveis dentro de algumas horas a partir de swabs clínicos ou culturas de células infectadas. Os testes PCR e RT-PCR para o vírus influenza A são descritos por Fouchier e col, 2000 e Maertzdorf e outros, 2004.

[000164] A presente invenção também refere-se aos métodos para a

triajem por compostos ou fármacos que têm atividade antiviral contra um vírus da presente invenção. Em uma modalidade, as células infectadas com um vírus da invenção são contatadas com um composto ou fármaco de teste. A quantidade de vírus ou atividade viral após o contato é então determinada. Esses compostos ou fármacos que exibem atividade antiviral podem ser selecionados para avaliação adicional.

[000165] A presente invenção também refere-se às células isoladas, infectadas com um vírus influenza da presente invenção. Em uma modalidade, a célula é uma célula canina, tal como as células epiteliais dos rins caninos.

[000166] A presente invenção também refere-se às células transformadas com um polinucleotídeo da presente invenção que codifica um polipeptídeo da invenção. De preferência, a seqüência de polinucleotídeos é proporcionada em um constructo de expressão da invenção. Mais preferivelmente, o constructo de expressão proporciona a superexpressão na célula de um polinucleotídeo operavelmente ligado da invenção. Em uma modalidade, a célula é transformada com uma seqüência de polinucleotídeos compreendendo uma seqüência que codifica a seqüência de aminoácidos mostrada em quaisquer das SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 33, 34, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, ou 78, ou um fragmento ou variante funcional do mesmo. Em uma modalidade específica, a célula é transformada com um polinucleotídeo codificando a seqüência de aminoácidos mostrada nas SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 33, 34, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, ou 78 que compreende a seqüência de nucleotídeos mostrada nas SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, ou 77, respectivamente,

ou uma seqüência codificando um fragmento ou variante funcional de quaisquer das SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 33, 34, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, ou 78. Assim, a presente invenção refere-se às células transformadas com uma seqüência de polinucleotídeos compreendendo a seqüência de nucleotídeos mostrada em quaisquer das SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, ou 77, ou um fragmento ou variante, incluindo uma variante degenerada, de quaisquer das SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, ou 77.

[000167] A célula transformada pode ser uma célula eucariótica, por exemplo, uma célula de planta, incluindo os protoplastos, ou a célula transformada pode ser uma célula procariótica, por exemplo, uma célula bacteriana, tal como *E. coli* ou *B. subtilis*. As células animais incluem as células humanas, as células mamíferas, parcialmente as células caninas, as células aviárias, e as células de insetos. As células de plantas incluem, porém não estão limitadas às, células dicotiledôneas, monocotiledôneas, e de coníferas.

[000168] A presente invenção também refere-se às plantas, incluindo as plantas transgênicas que expressam e produzem uma proteína ou polipeptídeo viral da presente invenção. As plantas, os tecidos de plantas, e as células de plantas, transformados com, ou gerados para conter, um polinucleotídeo da invenção são contemplados pela presente invenção. De preferência, o polinucleotídeo da invenção é superexpresso na planta, no tecido da planta, ou na célula da planta. As plantas podem ser usadas para produzir as composições de vacinas de influenza da presente invenção e as vacinas podem ser administradas através do consumo da planta (ver, por exemplo, as

Patentes U.S. N<sup>os</sup> 5.484.719 e 6.136.320).

[000169] A presente invenção também refere-se aos kits para detectar um vírus ou diagnosticar uma infecção por um vírus da presente invenção. Em uma modalidade, um kit compreende um anticorpo da invenção que se liga especificamente a um vírus influenza da presente invenção, ou a uma porção antigênica dele. Em uma outra modalidade, um kit compreende um ou mais polipeptídeos ou peptídeos da presente invenção. Em uma modalidade específica, os polipeptídeos têm uma seqüência de aminoácidos mostrada em quaisquer das SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 33, 34, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, ou 78, ou um fragmento ou variante funcional e/ou imunogênica do mesmo. Em uma modalidade adicional, um kit compreende um ou mais polinucleotídeos ou oligonucleotídeos da presente invenção. Em uma modalidade específica, os polinucleotídeos têm uma seqüência de nucleotídeos mostrada em quaisquer das SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, ou 77, ou um fragmento ou variante do mesmo. Um kit pode opcionalmente compreender um ou mais anticorpo de controle, polipeptídeo ou peptídeo de controle, e/ou polinucleotídeo ou oligonucleotídeo de controle. O anticorpo, os polipeptídeos, os peptídeos, os polinucleotídeos, e/ou os oligonucleotídeos do kit podem ser proporcionados em um recipiente ou acondicionamento adequado.

[000170] O presente pedido também refere-se ao uso de cães mestiços como um modelo para a infecção e a patogênese de vírus influenza. Em uma modalidade, um cão mestiço é inoculado com um vírus influenza, tal como um vírus influenza canino da presente invenção. Opcionalmente, o cão pode ser administrado com agentes terapêuticos, subseqüente à inoculação. O cão pode também ter sido

administrado com uma composição para gerar uma resposta imune contra um vírus influenza, antes da inoculação com o vírus. As amostras de tecido, sangue, soro, e outras amostras biológicas podem ser obtidas antes e/ou depois da inoculação e examinadas quanto à presença de vírus e patogênese do tecido usando métodos conhecidos na técnica, incluindo, porém não limitados à, PCR, RT-PCR, seqüenciamento de ácido nucléico, e imunoistoquímica.

[000171] Qualquer elemento de qualquer modalidade descrita nesse documento pode ser combinado com qualquer outro elemento ou modalidade divulgada aqui e tais combinações são especificamente contempladas dentro do escopo da presente invenção.

[000172] Todas as patentes, pedidos de patentes, pedidos provisórios, e publicações referidos ou citados nesse documento são incorporados por referência em sua totalidade, incluindo todas as figuras e tabelas, na medida em que eles não estejam inconsistentes com os ensinamentos explícitos deste relatório descritivo.

#### MATERIAIS E MÉTODOS PARA OS EXEMPLOS 1-6

##### Coleta de Swabs de Sangue e Nasais de Galgos.

[000173] As amostras agudas e convalescentes de sangue foram coletadas por venopuntura jugular de galgos clinicamente doentes ou normais em canis de corrida experimentando surtos de doença respiratória. As amostras convalescentes foram coletadas 4 a 12 semanas após a amostra aguda. O soro foi coletado e armazenado a -80°C. Os swabs nasais foram coletados e colocados em meio de transporte Amies com carvão vegetal (Becton Dickinson Biosciences) aguardando o envio para o isolamento bacteriano.

##### Exame pós-morte de galgos.

[000174] Os exames completos pós-morte foram efetuados pelo Anatomic Pathology Service na University of Florida College of Veterinary Medicine (UF CVM) em 5 dos 8 galgos que morreram no

surto de janeiro de 2004 em uma pista da Flórida. O exame pós-morte de um outro cão foi efetuado em uma clínica veterinária particular, com o envio dos tecidos para a UF CVM para a diagnose histopatológica. Os tecidos foram fixados em 10% de formalina tamponada neutra, incrustada em parafina, e as secções de 5 µm foram tingidas com hematoxilina e eosina para a diagnose histopatológica ou processadas para a imunoistoquímica, conforme descrito abaixo. Os tecidos não fixados foram enviados para cultura bacteriana e também armazenados a -80°C.

Testes sorológicos para os patógenos respiratórios virais caninos.

[000175] As amostras agudas e convalescentes de soro em pares foram submetidas ao Animal Health Diagnostic Laboratory (AHDL) na Cornell University College of Veterinary Medicine, para os ensaios de neutralização do soro contra o vírus da cinomose canino, o adenovírus tipo 2, e o vírus parainfluenza. Os títulos de anticorpos foram expressos como a última diluição do soro que inibiu a infecção viral das culturas de células. A soroconversão, definida como um aumento  $\geq 4$  vezes no título de anticorpo entre a amostra aguda e convalescente, indicou a infecção viral. Não foi detectada nenhuma soroconversão para esses patógenos virais.

Testes microbianos para patógenos respiratórios bacterianos caninos.

[000176] Os swabs nasais e os tecidos pós-morte em pares foram enviados ao Diagnostic Clinical Microbiology/Parasitology/Serology Service na UF CVM para o isolamento e a identificação bacterianos. As amostras foram cultivadas em meios não seletivos, bem como em meios seletivos para a espécie *Bordetella* (Regan-Lowe; Remel) e a espécie *Mycoplasma* (Remel). Todas as culturas foram conservadas por 21 dias antes do relatório de nenhum crescimento. Os swabs nasais de alguns dos galgos foram também enviados ao Department of Diagnostic Medicine/Pathobiology no Kansas State University

College of Veterinary Medicine para a cultura bacteriana. Dos 70 cães clinicamente doentes, testados, a *Bordetella bronchiseptica* foi isolada da cavidade nasal de 1 cão, enquanto que as *Mycoplasma spp.* foram recuperadas da cavidade nasal de 33 cães. A *Pasteurella multocida* foi comumente recuperada da cavidade nasal de cães com secreções nasais purulentas. Dois dos cães que morreram no surto de janeiro de 2004 tiveram crescimento reduzido de *Escherichia coli* nos pulmões pós-morte, um cão teve crescimento reduzido de *E. coli* e *Streptococcus canis*, e um outro teve crescimento reduzido de *Pseudomonas aeruginosa* e uma levedura. Nem *Bordetella bronchiseptica*, nem *Mycoplasma* foi isolado das traquéias ou dos pulmões dos cães que morreram.

Isolamento do vírus de tecidos pós-morte.

[000177] Os tecidos congelados foram descongelados e homogeneizados em 10 volumes de meio essencial mínimo (MEM) suplementado com 0,5% de albumina de soro bovino (BSA) e antibióticos. Os fragmentos sólidos foram removidos por centrifugação e os sobrenadantes foram inoculados sobre células cultivadas ou em ovos de galinhas embrionados de 10 dias de idade. Os homogeneizados de tecido dos galgos que morreram foram inoculados em diversas culturas de células que suportaram a replicação de uma faixa ampla de patógenos virais. As culturas de células incluíram Vero (células epiteliais de rins de macacos verdes africanos, ATCC N° CCL-81), A-72 (fibroblastos de tumores caninos, CRL-1542), HRT-18 (células epiteliais retais humanas, CRL-11663), MDCK (células epiteliais de rins caninos, CCL-34), células primárias epiteliais de rins caninos (AHDL, Cornell University), células primárias epiteliais de pulmões caninos (AHDL), e células primárias testiculares bovinas (AHDL). As células MDCK e HRT foram cultivadas em MEM suplementado com 2,5 ug/mL de tripsina tratada com TPCK (Sigma);

as linhagens celulares restantes foram cultivadas em MEM suplementado com 10% de soro de bezerro fetal e antibióticos. As células foram desenvolvidas em frascos de 25 cm<sup>2</sup>, a 37°C, em uma atmosfera umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Uma cultura de controle foi inoculada com o MEM suplementado. As culturas foram observadas diariamente quanto a mudanças morfológicas e coletadas em 5 dias após a inoculação. Os fluidos e as células coletados foram clarificados por centrifugação e inoculados sobre células novas, conforme descrito para a inoculação inicial; duas passagens às cegas foram efetuadas. A atividade de hemaglutinação nos sobrenadantes clarificados foi determinada usando as células vermelhas sanguíneas de galinhas ou perus, conforme descrito (Burleson e outros, 1992; Kendal e outros, 1982). Para o isolamento do vírus em embriões de galinhas, 0,1 mL de homogeneizado de tecido foi inoculado no saco alantóico e incubado por 48 horas, a 35°C. Após duas passagens às cegas, a atividade de hemaglutinação nos fluidos alantóicos foi determinada conforme descrito (Burleson e outros, 1992; Kendal e outros, 1982).

RT-PCR, seqüenciamento de nucleotídeos, e análises filogenéticas.

[000178] O RNA total foi extraído do sobrenadante da cultura de tecido ou do fluido alantóico usando o kit RNeasy (Qiagen, Valencia, CA), de acordo com as instruções do fabricante. O RNA total (10 ng) foi transcrito invertido para cDNA usando o Kit de RT-PCR de uma etapa (Qiagen, Valencia, CA), de acordo com as instruções do fabricante. A amplificação por PCR da região de codificação dos 8 genes virais influenza no cDNA foi efetuada conforme anteriormente descrito (Klimov e outros, 1992a), usando grupos de iniciadores específicos para genes universais. Os amplicons de DNA resultantes foram usados como moldes para o seqüenciamento automatizado sobre um seqüenciador de DNA automatizado 3100 da Applied Biosystems, usando a química de terminador de corante de

seqüenciamento de ciclo (ABI). As seqüências de nucleotídeos foram analisadas usando o GCG Package<sup>®</sup>, Versão 10.0 (Accelyrs) (Womble, 2000). O Phylogeny Inference Package<sup>®</sup> Versão 3.5 foi usado para estimar as filogêneses e calcular os valores de partida a partir das seqüências de nucleotídeos (Felsenstein, 1989). As árvores filogenéticas foram comparadas àquelas geradas por análise de união do próximo com o modelo de Tamura-Nei gama implementado no programa MEGA<sup>®</sup> (Kumar e outros, 2004) e confirmadas pelo programa PAUP<sup>®</sup> 4.0 Beta (Sinauer Associates).

#### Inoculação experimental dos cães.

[000179] Foram usados quatro beagles sem patógenos, de 6 meses de idade [(2 machos e 2 fêmeas (Liberty Research)). O exame físico e os testes de sangue de linha de base, incluindo a contagem completa de células sanguíneas/diferencial, o painel de química do soro, e a urinálise, determinaram que os animais eram saudáveis. Eles foram alojados juntos em uma instalação duplamente reforçada BSL, autorizada pela Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care. As temperaturas retais de linha de base foram registradas duas vezes diariamente, por 7 dias. Os cães foram anestesiados por injeção intravenosa de propofol (Diprivan<sup>®</sup>, Zeneca Pharmaceuticals, 0,4 mg/kg de peso do corpo até o efeito) por intubação com tubos endotraqueais. Cada cão foi inoculado com uma dose total de  $10^{6.6}$  doses infecciosas de cultura de tecido médias (TCID<sub>50</sub>) de vírus A/Canino/Florida/43/2004 (Canino/FL/04) (H3N8), com metade da dose administrada na traquéia distal através do tubo endotraqueal e a outra metade administrada na passagem nasal profunda através de um cateter. Os exames físicos e os registros de temperaturas retais foram efetuados duas vezes ao dia, por 14 dias após a inoculação (p.i.). As amostras de sangue (4 mL) foram coletadas por venopuntura jugular nos dias 0, 3, 5, 7, 10, e 14 p.i. Os

espécimens nasais e orofaríngeos foram coletados com swabs de poliéster (Fisher Scientific) a partir de cada cão nos dias 0 a 5, 7, 10, e 14 p.i. Os swabs foram colocados em meio de transporte viral (Remel) e armazenados a -80°C. Dois cães (1 macho e 1 fêmea) sofreram eutanásia por inoculação intravenosa de solução de Beuthanasia-D® (1 mL/5 kg de peso do corpo; Schering-Plough Animal Health Corp) no dia 5 p.i. e os 2 cães restantes no dia 14 para exame pós-morte. Os tecidos para a análise histológica foram processados conforme descrito. Os tecidos para a cultura de vírus foram armazenados a -80°C. Esse estudo foi aprovado pelo University of Florida Institutional Animal Care and Use Committee.

Disseminação do vírus a partir de cães experimentalmente inoculados.

[000180] As diluições em série de homogeneizados do pulmão e extratos do swab, preparados por clarificação dos meios de transporte de swab por centrifugação, foram preparadas em MEM suplementado com 0,5% de BSA e antibióticos. Os ensaios em placas foram efetuados conforme descrito (Burleson e outros, 1992) usando monocamadas de células MDCK em placas de cultura de tecido de 6 cavidades. As monocamadas de células inoculadas foram cobertas com MEM suplementado contendo 0,8% de agarose e 1,5 ug/mL de tripsina com TPCK. As células foram cultivadas por 72 horas, a 37°C, em uma atmosfera umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub>, antes da fixação e do tingimento com violeta cristal. A concentração de vírus foi expressa como unidades formadoras de placas (PFU) por grama de tecido ou por swab.

Imunoistoquímica.

[000181] As secções de tecidos de pulmões de 5 µm, desparafinizadas e reidratadas, dos galgos e beagles, foram montadas sobre lâminas Bond-Rite® (Richard-Allan Scientific, Kalamazoo, MI) e subseqüentemente tratadas com proteinase K (DakoCytomation,

Carpenteria, CA), seguida por reagente de bloqueio de peroxidase (Kit de Peroxidase EnVision® da Dako®, Dako Corp.). As secções foram incubadas com diluições a 1:500 de anticorpos monoclonais para o vírus da cinomose canino (VMRD, Inc.), o adenovírus canino tipo 2 (VMRD, Inc.), o vírus parainfluenza canino (VMRD, Inc.), ou o influenza A H3 (Chemicon International, Inc.) por 2 horas, na temperatura ambiente. Os controles incluíram a incubação das mesmas secções com IgG de camundongo (1 mg/mL, Serotec, Inc.), e a incubação dos anticorpos monoclonais com secções de pulmões caninos normais. Após o tratamento com os anticorpos primários, as secções foram incubadas com os reagentes de substrato secundários de imunoperoxidase e peroxidase (Kit de Peroxidase EnVision® da Dako®, Dako Corp.), de acordo com as instruções do fabricante. As secções foram contratingidas com hematoxilina, tratadas com Reagente Clarifier nº 2 e Bluing (Richard-Allan Scientific, Kalamazoo, MI), desidratadas, e as lamínulas aplicadas com Permount (ProSciTech).

Ensaio de Inibição da hemaglutinação (HI).

[000182] As amostras de soro foram incubadas com a enzima destruidora de receptor (RDE, Denka) (1 parte de soro: 3 partes de RDE), por 16 horas, a 37°C, antes da inativação térmica por 60 minutos, a 56°C. O vírus influenza A/Canino/FL/04 (H3N8) foi desenvolvido em células MDCK por 36-48 h, a 37°C. Os sobrenadantes da cultura de vírus foram coletados, clarificados por centrifugação, e armazenados a -80°C. O ensaio de HI foi efetuado conforme descrito anteriormente (Kendal e outros, 1982). Resumidamente, 4 unidades de hemaglutinação do vírus em 25 µl foram adicionadas a um volume igual de soro diluído em série, em cavidades de microtípulo, e incubadas na temperatura ambiente por 30 minutos. Um volume igual de 0,5% v/v de eritrócitos de peru foi

adicionado e os títulos de hemaglutinação foram estimados visualmente após 30 minutos. O título de HI de ponto final foi definido como a última diluição de soro que inibiu completamente a hemaglutinação. A soroconversão foi definida como um aumento  $\geq 4$  vezes no título de HI entre as amostras agudas e convalescentes em pares. A soropositividade de uma única amostra foi definida como um título de HI de anticorpo  $\geq 1:32$ .

Ensaio de microneutralização (MN).

[000183] As respostas de anticorpos do soro de neutralização ao A/Canino/FL/04 (H3N8) foram detectadas por um ensaio de MN conforme descrito anteriormente (Rowe e outros, 1999), exceto que os soros caninos foram tratados com RDE, conforme descrito acima, antes do ensaio. O título de ponto final foi definido como a mais alta diluição do soro que deu 50% de neutralização de 100 TCID<sub>50</sub> do vírus. A soroconversão foi definida como um aumento de  $\geq 4$  vezes no título de MN entre as amostras agudas e convalescentes em pares. A soropositividade de uma única amostra foi definida como um título de MN  $\geq 1:80$ .

[000184] Os que seguem são exemplos que ilustram os procedimentos para praticar a invenção. Esses exemplos não devem ser interpretados como limitantes. Todas as porcentagens são em peso e todas as proporções de misturas de solventes são em volume, a não ser que de outro modo observado.

EXEMPLO 1

[000185] Em janeiro de 2004, um surto de doença respiratória ocorreu em 22 galgos de corrida alojados em 2 canis, em uma pista de corridas da Flórida e na fazenda local que fornecia os cães para estes canis. Havia aproximadamente 60 cães em cada prédio do canil e 300 cães na fazenda. O surto ocorreu durante um período de 6 dias, após o que nenhum caso novo foi identificado. Quatorze dos 22 cães

tiveram febre de 39,5 a 41,5°C, uma tosse leve que causava ânsia de vômito por 10 a 14 dias, recuperação final. Dos 8 cães restantes, 6 cães aparentemente saudáveis morreram inesperadamente com hemorragia da boca e do nariz. Dois outros cães sofreram eutanásia dentro de 24 horas do início da hemorragia da boca e do nariz devido à rápida deterioração. Ambos esses cães tiveram febre de 41°C. Quatro das 8 mortes ocorreram nos prédios dos canis e 4 ocorreram na fazenda. Cinquenta por cento das mortes ocorreram no dia 3 do surto. Os 22 cães variaram na idade de 17 meses a 4 anos, porém 73% eram 17 a 33 meses de idade.

[000186] Duas síndromes clínicas eram evidentes: uma doença mais branda, caracterizada por febre inicial e então tosse por 10-14 dias (14 cães), com recuperação subsequente, ou uma morte peraguda associada com hemorragia no trato respiratório (8 cães para uma taxa de mortalidade de 36%). Os exames pós-morte foram efetuados em 6 dos 8 casos fatais. Todos os cães tiveram hemorragia extensa nos pulmões, mediastino, e cavidade pleural. O exame histológico do trato respiratório revelou que, além da hemorragia pulmonar, todos os cães tiveram traqueíte, bronquite, bronquiolite, e broncopneumonia supurativa (figura 3). O revestimento epitelial e os lúmens das vias aéreas nesses tecidos foram infiltrados por neutrófilos e macrófagos. Os homogeneizados dos pulmões preparados a partir desses cães foram inoculados em uma variedade de linhagens celulares de macacos, humanas, bovinas, e caninas, para a cultura de vírus. O homogeneizado do pulmão de um cão causou efeitos citopáticos nas células epiteliais de rins caninas de Madin-Darby (MDCK), cultivadas na presença de tripsina, e o sobrenadante da cultura de células aglutinou as células sanguíneas vermelhas das galinhas. A evidência preliminar de um vírus influenza do tipo A foi proporcionada por um ELISA comercial para a detecção da nucleoproteína dos vírus

influenza A e B, e através de análise por PCR usando iniciadores específicos para o gene de matriz dos vírus influenza A. Ademais, a atividade de hemaglutinação foi inibida por anti-soros de referência para o subtipo de influenza A eqüino H3, porém não por anti-soros específicos para os subtipos de influenza A humanos H1-H11 e H13 (Tabela 3). Para caracterizar as propriedades moleculares do vírus, foram determinadas as seqüências de nucleotídeos dos 8 segmentos de RNA do genoma viral. As comparações de seqüências com os genes do vírus influenza conhecidos e as análises filogenéticas indicaram que os 8 genes do isolado canino eram mais similares àqueles dos vírus influenza A eqüinos contemporâneos (H3N8), com os quais eles compartilham  $\geq 96\text{-}97\%$  de identidade de seqüência (figura 1A, Tabela 4). Em contraste, os genes representativos de isolados de influenza A aviários, suínos, e humanos tiveram  $\leq 94\%$  de identidade com o isolado canino (Tabela 4). Esses dados identificaram o isolado canino A/Canino/Florida/43/04 (Canino/FL/04) como um vírus influenza A H3N8 intimamente relacionado às linhagens contemporâneas de vírus influenza eqüinos. Visto que todos os genes do isolado canino eram de origem de vírus influenza eqüino, foi concluído que o genoma inteiro de um vírus influenza eqüino tinha sido transmitido para o cão.

## EXEMPLO 2

[000187] Para investigar a função do vírus Canino/FL/04 nas observações clínicas e patológicas nos galgos, foi efetuada coloração imunoistoquímica (IHC) nos tecidos dos pulmões, usando um anticorpo monoclonal para influenza A H3. O antígeno viral H3 foi consistentemente detectado no citoplasma de células epiteliais bronquiais e bronquiolares, células epiteliais da glândula bronquial, e macrófagos nos lúmens das vias aéreas e nos espaços alveolares (figura 2A). Esses dados suportam um diagnóstico de infecção

pulmonar com o vírus influenza do subtipo H3 em múltiplos cães.

#### EXEMPLO 3

[000188] Para determinar o envolvimento de um vírus similar ao Canino/FL/04 na etiologia do surto de doença respiratória, foram analisados soros agudos e convalescentes em pares de 11 cães doentes e 16 contatos assintomáticos por inibição da hemaglutinação (HI) e microneutralização (MN). A soroconversão, definida como uma elevação  $\geq 4$  vezes no título de anticorpo para Canino/FL/04 a partir da fase aguda até a convalescente, ocorreu em 8 de 11 (73%) cães doentes em ambos os ensaios (Tabela 1). A soroconversão ocorreu em 6 de 16 (38%) contatos assintomáticos no ensaio de HI, enquanto 8 de 16 (50%) soroconverteram no ensaio de MN (Tabela 1). Os dados de soroconversão demonstraram a infecção dos cães com um vírus similar ao Canino/FL/04 que coincidiu temporariamente com o início da doença respiratória na maioria dos animais.

[000189] As amostras de soro individuais foram coletadas 3 meses após o surto de uns 46 cães assintomáticos adicionais, alojados com os cães doentes. Desses, 43 (93%) eram soropositivos em ambos os ensaios. Para a população total de 73 cães testados, 93% eram soropositivos em ambos os ensaios, incluindo 82% (9/11) dos cães doentes e 95% (59/62) dos contatos saudáveis. A alta soroprevalência nos cães sem nenhuma história de doença respiratória indica que a maioria das infecções com o vírus influenza canino era subclínica e sugere a disseminação eficiente do vírus entre os cães. Não se sabe se as infecções subclínicas contribuem para a disseminação do vírus.

#### EXEMPLO 4

[000190] Para melhor entender a capacidade do vírus Canino/FL/04 de infectar os cães, quatro beagles de 6 meses de idade, com o propósito de criação, foram, cada um, inoculados com  $10^{6.6}$  doses infecciosas de cultura de tecido médias (TCID<sub>50</sub>) pelas rotas

intratraqueal e intranasal. Todos os cães desenvolveram uma febre (temperatura retal  $\geq 39^{\circ}\text{C}$ ) pelos primeiros 2 dias após a inoculação (p.i.), porém nenhum exibiu sintomas respiratórios, tais como tosse ou secreção nasal durante um período de observação de 14 dias. A disseminação do vírus foi examinada por quantificação do vírus nos swabs nasais e orofaríngeos. Somente 2 dos 4 cães disseminaram quantidades detectáveis de vírus. Um cão disseminou o vírus nos dias 1 e 2 p.i. ( $1,0\text{-}2,5 \log_{10}$  PFU por swab), enquanto o outro cão disseminou o vírus por 4 dias consecutivos após a inoculação ( $1,4\text{-}4,5 \log_{10}$  PFU por swab). O exame pós-morte de 2 cães no dia 5 p.i. revelou traqueíte necrotizante e hiperplásica, bronquite, e bronquiolite similares àquela verificada na doença espontânea em galgos, porém não houve nenhuma hemorragia pulmonar ou broncopneumonia. O antígeno viral H3 foi detectado no citoplasma de células epiteliais dos brônquios, bronquíolos, e glândulas bronquiais por IHC (figura 2B). O vírus infeccioso foi recuperado do tecido do pulmão de um dos cães. O exame pós-morte dos 2 cães restantes no dia 14 p.i. mostrou alterações histológicas mínimas nos tecidos respiratórios, nenhum antígeno viral H3 por IHC, e nenhuma recuperação do vírus dos homogeneizados do pulmão. A soroconversão nestes 2 cães foi detectada em ensaios de MN pelo dia 7 p.i., com um aumento adicional de 2 a 3 vezes nos títulos de anticorpos pelo dia 14. Esses resultados estabeleceram a suscetibilidade dos cães à infecção com Canino/FL/04, conforme evidenciado pela resposta febril, presença de antígeno viral e vírus infeccioso no parênquima do pulmão, verificações histopatológicas típicas para a influenza, e soroconversão. O fracasso em reproduzir doença grave e morte nos beagles experimentalmente inoculados não é surpreendente, visto que uma grande proporção dos galgos naturalmente infectados era assintomática.

#### EXEMPLO 5

[000191] Para investigar se um vírus influenza similar ao Canino/FL/04 tinha circulado entre as populações de galgos na Flórida, antes do surto de janeiro de 2004, os soros arquivados de 65 galgos de corrida foram testados quanto à presença de anticorpos para Canino/FL/04, usando os ensaios de HI e MN. Não havia nenhum anticorpo detectável em 33 cães testados de 1996 a 1999. Dos 32 cães testados entre 2000 e 2003, 9 eram soropositivos em ambos os ensaios - 1 em 2000, 2 em 2002, e 6 em 2003 (Tabela 5). Os cães soropositivos estavam localizados nas pistas de corrida da Flórida, envolvidas nos surtos de doença respiratória de etiologia desconhecida de 1999 até 2003, sugerindo que um vírus similar ao Canino/FL/04 pode ter sido o agente causador desses surtos. Para investigar essa possibilidade adicionalmente, foram examinados os tecidos arquivados de galgos que morreram de broncopneumonia hemorrágica em março de 2003. Os homogeneizados do pulmão inoculados em células MDCK e embriões de galinhas a partir de um cão produziram o vírus influenza H3N8, chamado A/Canino/Florida/242/2003 (Canino/FL/03). A análise de seqüência do genoma completo do Canino/FL/03 revelou >99% de identidade com o Canino/FL/04 (Tabela 4), indicando que os vírus similares ao Canino/FL/04 tinham infectado os galgos antes de 2004.

#### EXEMPLO 6

[000192] De junho a agosto de 2004, ocorreram surtos de doença respiratória em milhares de galgos de corrida, em 14 pistas de corrida na Flórida, Texas, Alabama, Arkansas, West Virginia, e Kansas.

[000193] Os dirigentes em algumas destas pistas estimaram que pelo menos 80% de sua população de cães teve doença clínica. A maioria dos cães teve sinais clínicos de febre ( $\geq 39^{\circ}\text{C}$ ) e tosse similares aos cães no surto de janeiro de 2004, porém muitos cães também tiveram uma congestão nasal mucopurulenta. Foram descritas mortes

múltiplas, porém uma taxa de mortalidade acurada não pôde ser determinada.

[000194] Foram coletados soros agudos e convalescentes em pares de 94 cães localizados em 4 pistas da Flórida: 56% desses cães tiveram elevações  $\geq 4$  vezes nos títulos de anticorpos para Canino/FL/04, e 100% eram soropositivos (Tabela 6). Os soros convalescentes de 29 cães em West Virginia e Kansas também tinham anticorpos para Canino/FL/04. Foi isolados o vírus influenza A (H3N8) dos pulmões de um galgo que morreu de broncopneumonia hemorrágica em uma pista no Texas. A análise de seqüência do genoma inteiro desse isolado, chamado A/Canino/Texas/ 1/2004 (Canino/TX/04), revelou  $\geq 99\%$  de identidade com o Canino/FL/04 (Tabela 4). O isolamento de três vírus influenza intimamente relacionados a partir de casos fatais caninos, durante um período de 13 meses, e de diferentes posições geográficas, juntamente com a evidência sorológica substancial de infecção espalhada entre os galgos de corrida, sugeriu a circulação continuada de um vírus similar ao Canino/FL/04 na população de cães.

[000195] A análise filogenética dos genes de HA de Canino/FL/03, Canino/FL/04, e Canino/TX/04 mostrou que eles constituem um grupo monofilético com suporte de partida sólido que era claramente distinto dos genes de H3 contemporâneos dos vírus eqüinos isolados em 2002 e 2003 (figura 1B). A análise filogenética e as comparações de seqüências de nucleotídeos em pares dos outros 7 segmentos genômicos suportaram a segregação dos genes caninos como uma sublinhagem distinta, mais intimamente relacionada à linhagem de vírus eqüino (dados não mostrados, e Tabela 4). O agrupamento dos genes de influenza caninos como um grupo monofilético separado da influenza eqüina é também suportado pela presença de 4 alterações de aminoácidos de assinatura na HA (Tabela 2). Juntamente com os

resultados sorológicos de 2003 e 2004, esses dados estão consistentes com um único evento de transmissão de vírus de cavalos para cães, com disseminação subsequente horizontal do vírus na população de galgos. Entretanto, as introduções repetidas dessa linhagem única de vírus influenza a partir de uma espécie de reservatório não identificada não podem ser formalmente excluídas, improvável como ela possa ser.

[000196] A HA viral é um determinante crítico da especificidade do vírus influenza pela espécie hospedeira (Suzuki e outros, 2000). Para identificar os resíduos dentro da HA que possam estar associados com a adaptação ao hospedeiro canino, foi comparada a seqüência de aminoácidos deduzida das HAs caninas com aquelas dos vírus eqüinos contemporâneos. Quatro alterações de aminoácidos diferenciam as seqüências de aminoácidos de consenso das HAs maduras eqüinas e caninas: N83S, W222L, I328T, e N483T (ver a Tabela 2). Os vírus caninos têm uma remoção de aminoácido quando comparados às seqüências de Consenso Eqüinos. Portanto, a posição de aminoácido 7 na seqüência da HA eqüina é a posição 6 na seqüência da HA canina, a posição de aminoácido 29 na seqüência da HA eqüina é a posição 28 na seqüência da HA canina, a posição de aminoácido 83 na seqüência da HA eqüina é a posição 82 na seqüência da HA canina, etc. Assim, os quatro aminoácidos substituídos estão na posição 82, 221, 327, e 482 da seqüência de aminoácidos mostrada em SEQ ID NO: 33 e SEQ ID NO: 34. A substituição de asparagina por serina na posição 83 da seqüência de consenso é uma alteração de significado funcional desconhecido, visto que diversos resíduos polares são encontrados nas moléculas de H3 a partir de outras espécies. A isoleucina estritamente conservada na posição 328 da seqüência de consenso, próxima ao sítio de clivagem da HA H3, foi substituída por treonina. A função principal da clivagem

da HA por proteases hospedeiras na patogênese sugere que esta alteração merece estudo adicional. A substituição de triptofano por leucina na posição 222 da seqüência de consenso é bem notável, porque ela representa uma alteração não conservativa adjacente à bolsa de ligação de ácido siálico, que poderia modular a função do receptor (Weis e outros, 1988). De modo interessante, a leucina na posição 222 não é única para a HA H3 canina, visto que ela é tipicamente encontrada nos subtipos de HA H4, H8, H9, e H12 (Nobusawa e outros, 1991; Kovacova e outros, 2002). A substituição da leucina pode ser mais compatível com a especificidade do vírus por hospedeiros mamíferos, visto que foram descritas infecções do porco com os vírus do subtipo H4 (Karasin e outros, 2002) e de seres humanos e do porco com os do subtipo H9 (Peiris e outros, 1999). A substituição de asparagina por treonina na posição 483 da seqüência de consenso resultou na perda de um sítio de glicosilação na subunidade HA2 que é conservada em todos os subtipos de HA (Wagner e outros, 2002). Embora a importância dessas alterações de aminoácidos na HA para a adaptação de um vírus eqüino aos cães permaneça a ser determinada, foram observadas anteriormente alterações de aminoácidos similares em associação à transferência entre espécies (Vines e outros, 1998; Matrosovich e outros, 2000). As diferenças de aminoácidos entre outras proteínas virais de influenza da invenção e a seqüência de Consenso Eqüino são mostradas nas Tabelas 19 a 25.

[000197] A fonte do vírus influenza eqüino que inicialmente infectou os galgos de corrida permanece especulativa. Os canis nas pistas de corrida de galgos não estão localizados próximos a cavalos ou pistas de corrida de cavalos, sugerindo que o contato entre os galgos e os cavalos que disseminam não é uma explicação suficiente para os múltiplos surtos, em diferentes estados, em 2004. Uma fonte potencial

de exposição ao vírus eqüino é a alimentação de carne de cavalo aos galgos, cuja dieta é suplementada com carne crua fornecida por casas de embalagem que convertem em carcaças, incluindo os cavalos que poderiam carregar a influenza. Os precedentes para este modo de infecção incluem os relatórios de transmissão entre espécies do vírus influenza aviário H5N1 para porcos e felinos de zoológicos, alimentados com carcaças de galinhas infectadas (Webster, 1998; Keawcharoen e outros, 2004; Kuiken e outros, 2004). Embora essa seja uma rota plausível para a introdução inicial de influenza eqüino em cães, ela não explica os recentes surtos múltiplos de influenza em milhares de cães, em diferentes estados. O presente estudo de inoculação experimental demonstrou a presença de vírus nas passagens nasais e na orofaringe de cães, embora em títulos modestos. Contudo, esses resultados indicam que a disseminação é possível, e que a transmissão do vírus de cão para cão por grandes aerossóis em gotículas, fomitos, ou contato mucoso direto poderia desempenhar uma função na epizootiologia da doença.

[000198] A transferência entre espécies de um vírus influenza mamífero integral para uma espécie mamífera não relacionada é um evento raro. Os estudos anteriores proporcionaram evidência sorológica ou virológica limitada, porém não ambas, de infecção transiente de cães com os vírus influenza A humanos (H3N2) (Nikitin e outros, 1972, Kilbourne, e outros, 1975; Chang e outros, 1976; Houser e outros, 1980). Entretanto, não havia nenhuma evidência de circulação continuada no hospedeiro canino. Embora a transferência direta dos vírus influenza suínos de porcos para pessoas esteja bem documentada (Dacso e outros, 1984; Kimura e outros, 1998; Patriarca e outros, 1984; Top e outros, 1977), não há nenhuma evidência quanto à adaptação dos vírus suínos em hospedeiros humanos. Neste relatório, foi proporcionada evidência virológica, sorológica, e

molecular para a transmissão entre espécies de um vírus influenza A eqüino (H3N8) inteiro para uma outra espécie mamífera, o cão. As substituições únicas de aminoácidos na HA de vírus canino, acopladas à confirmação sorológica de infecção de cães em múltiplos estados nos U.S., sugerem a adaptação do vírus ao hospedeiro canino. Visto que os cães são os animais de companhia principais para os seres humanos, essas descobertas têm implicações para a saúde pública; os cães podem proporcionar uma nova fonte para a transmissão de novos vírus influenza A para os seres humanos.

<b>Tabela 1.</b> Resposta do anticorpo aoA/Canino/Florida/43/04 (H3N*).				
	Cães Doentes (11) <sup>a</sup>		Contatos Sadios (16) <sup>b</sup>	
Resposta	HI <sup>c</sup>	SN <sup>d</sup>	HI	SN
Soroconversão (%) <sup>e</sup>	73	73	38	50
Soropositivo	82	82	100	100
Título médio geométrico <sup>g</sup>	329	424	268	431

<sup>a</sup> Número de cães com sinais clínicos da doença.

<sup>b</sup> Número de cães assintomáticos alojados em contato com cães clinicamente doentes.

<sup>c</sup> Ensaio de inibição da hemaglutinação (HI) usando o vírus A/Canino/Florida/43/04.

<sup>d</sup> Ensaio de microneutralização (MN) usando o vírus A/Canino/Florida/43/04.

<sup>e</sup> Porcentagem de cães com pelo menos um aumento de 4 vezes no título de anticorpo em soros agudos e convalescentes em pares.

<sup>f</sup> Porcentagem de cães com um título de anticorpo positivo (título de HI  $\geq 32$ ; título de MN  $\geq 80$ ) nos soros convalescentes.

<sup>g</sup> Título de anticorpo médio geométrico para os soros convalescentes.

**Tabela 2.** Diferenças de aminoácidos entre as hemaglutininas H3 caninas e eqüinas.

Consenso de H3 equina	Can/FL/03	Can/FL/04	Can/TX/04	Significado funcional potencial
G7*	D	-†	-	D também encontrado na HA H3 de pato e humana
I29	-	M	M	I é conservada nas HAs H3 de todas as espécies
N83	S	S	S	Diversos aminoácidos polares presentes nesta posição nas HAs H3 de outras espécies
S92	-	N	-	N está presente em algumas HAs H3 de patos
L118	-	-	V	L é conservada em todas as HAs H3
W222	L	L	L	W é conservado na maioria das HAs H3 de todas as espécies; localizado próximo ao sítio de ligação ao receptor
A272	V	A	V	V está presente em alguns isolados eqüinos recentes

I328	T	T	T	T é estritamente conservada em todas as HAs H3 aviárias, suínas ou humanas
N483	T	T	T	N ocorre em todos os subtipos H3 e em outros subtipos de HA. A substituição resulta na perda de um sítio de glicosilação
K541	-	R	-	Alteração conservativa de aminoácidos básica

\* Resíduo de aminoácido (código de letra única) e posição na HA H3 madura. O código do aminoácido é: A = alanina, D = ácido aspártico, G = glicina, I = isoleucina, K = lisina, L = leucina, M = metionina, N = asparagina, R = arginina, S = serina, T = treonina, V = valina, W = triptofano.

† Significa nenhuma alteração das HAs H3 eqüinas de consenso.

**Tabela 3.** Inibição da hemaglutinação de um isolado de vírus por anti-soros de referência para diferentes subtipos de HA

Anti-soros de Referência	Especificidade pela HA	Título de HI <sup>a</sup>
Puerto Rico	H1	5
Swine/Iowa 15/30	H1	5
Singapore/01/57H2	5	5
Shanghai/11/87	H3 <sup>B</sup>	5
Equine/Miami/1/63	H3	160
Duck/CzechoslovakiaH4	H5	
Tern/South Africa/61	H5	5
Turkey/Massachusetts/65	H6	5
Fowl Plague/Rostock	H7	5
Equine/Prague/1/56	H7	5

Turkey/Ontario/6118/68	H8	5
Quai/Hong Kong/G1/97	H9 <sup>b</sup>	5
Chicken/Hong Kong/G9/97	H9 <sup>b</sup>	5
Chicken/Hong Kong/G9/97	H10	5
Duck/England/56	H11	5
Gull/Maryland/704/77	H13	5
Normal sheep serum	-	5
Normal ferret serum	-	5

<sup>a</sup> Título de inibição da hemaglutinação para isolado de vírus do cão nº 43.

<sup>b</sup> Os anti-soros policlonais foram produzidos em furões, enquanto que todos os outros anti-soros foram produzidos em ovelhas ou cabras.

**Tabela 4.** Homologia de seqüência dos genes de A/Canino/Florida/43/04 (H3N8) com cepas eqüinas, aviárias, suínas, e humanas de influenza A.

Gene	Eqüina	Aviária	Suína	Humana
PB2 DQ124147	96,9(98,7) <sup>b</sup> Eq/kentucky/2/8 M73526	88,6 (96,8) Mall/Alberta/98/85 AY633315	87,9 (96,8) Sw/Ontario/ 01911-1/99 AF85892	86,2(96,4) PR/8/34 (HK/213/03)
PB1 DQ124148	97,1 (98,8) Eq/Tennessee/5/86 M25929	83,9 (97,1) Ck/British Columbia/04 (Gull/Md/704/77) AY61675 (M25933)	83,9 (97,1) Sw/Korea/S109/04 (Sw/Saskatch/18789/02 AY790287 (AY619955)	83,9 (97,1) WSN/33 (Sing/1/57) J02178 (M25924)
PA DQ124149	96,3 (97,5) M26082 Eq/Tennessee/5/86	87,0 (94,3) Ck/Chile/4591/02 (Ostrich/AS/08103/95) AY303660(AF508662)	84,3 (94,6) Sw/Hong Kong/ 126/02 M26081	83,8 (93,4) Taiwan/2/70 (Viet Nam/ 1203/04) AY210199 (AY818132)
HÁ (H3) DQ124190	97,4 (97,1) Eq/FL/1/93 L39916	80,7 (89,0) Dk/Norway/1/03 AJ841293	80,0 (87,7) Sw/Ontario/42729a/01 AY619977	81,8 (87,9) Hk/1/68 AF348176

## Continuação

**Tabela 4.** Homologia de seqüência dos genes de A/Canino/Florida/43/04 (H3N8) com cepas eqüinas, aviárias, suínas, e humanas de influenza A.

Gene	Eqüina	Aviária	Suína	Humana
NP DQ124150	96,6 (97,9) Eq/Tennessee/5/86 M30758	87,9 (95,1) Ck/Chile/176822/02 AY303658	85,4 (93,5) Sw/Ontario/42729a/01 (Sw/Fujian/1/2003) AY619974 (AY747611)	84,7 (93,0) HK/1073/99 (Hong Kong/ 538/97) AF255742 (Af255751)
NA (N8) DQ124151	96,8 (97,0) Eq/Tennessee/5/86 L06583	84,0 (85,2) Dk/NJ/2000 L06583	na <sup>b</sup>	na <sup>b</sup>
M DQ124152	97,9 (95,7) Eq/Tennessee/5/86 (Eq/Kentucky/92) M63529 (AF001683)	94,1 (94,0) Tky/Mn/833/80	93,7 (93,5) Sw/Saskatchewan/ 18789/02 M63527	91,2 (95,4) WSN/33 (Hong Kong/ 1073/99) J02177 (AJ278646)
NS DQ124153	97,5 (95,7) Eq/Tn/5/86 (Eq/kentucky/92) M80973 (AF001671)	92,0 (90,4) Mal/NY/6750/78 M80945	91,1 (89,1) Sw/China/8/78 (Sw/Korea/s452/04) M80968(AY790309)	91,4 (90,0) Brevig Mission/1/18 AF333238

<sup>a</sup> Porcentagem de identidade de seqüências de nucleotídeos e aminoácidos (em parênteses) dos genes de A/Canino/Florida/43/04 (H3N8) com o gene mais homólogo de isolados de vírus influenza a partir de espécies, seguida pelos seus números de acesso de banco de dados de seqüência do Genbank.

<sup>b</sup> Não aplicável: a neuraminidase N8 nunca foi descrita em vírus humanos ou suínos.

**Tabela 5.** Títulos de anticorpos para A/canino/Florida/43/03 (H3N8) em soro de galgo coletado de 1996 até 2003.

	Ano <sup>a</sup>					
	1996	1997	1998	2000	2002	2003
Nº de cães testados	8	6	19	4	6	22

Nº de cães soropositivos	0	0	0	1	2	6
Títulos de anticorpos <sup>b</sup>				512	232, 524	280-2242

<sup>a</sup> O ano da coleta da amostra de soro de galgos de corrida na Flórida.

<sup>b</sup> Títulos de anticorpos do ensaio de microneutralização para cães soropositivos, incluindo a faixa para os seis cães soropositivos de 2003.

**Tabela 6.** Resposta do anticorpo ao A/canino/Florida/43/04 (H3N8) em galgos de corrida em 4 pistas de corrida da Flórida em junho de 2004.

Resposta	Pista A	Pista B	Pista C	Pista D
Número de cães testados <sup>a</sup>	37	10	22	25
Soroconversão	46	90	100	64
Soropositivo	100	100	100	100
Título médio geométrico <sup>d</sup>	401	512	290	446

<sup>a</sup> Número de cães clinicamente doentes testados por HI usando A/canino/Florida/43/04 (H3N8).

<sup>b</sup> Porcentagem de cães com um aumento  $\geq 4$  vezes no título de anticorpo entre soros agudos e convalescentes.

<sup>c</sup> Porcentagem de cães com um título de anticorpo positivo (título de HI  $> 16$ ) nos soros convalescentes.

<sup>d</sup> Título de anticorpo médio geométrico para os soros convalescentes.

## MATERIAIS E MÉTODOS PARA OS EXEMPLOS 7-11

### Tecidos caninos

[000199] Os exames pós-morte foram efetuados pelo Anatomic Pathology Service ("Serviço de Patologia Anatômica") na University of Florida College of Veterinary Medicine em 6 cães de raça mista que morreram em abril/maio de 2005, durante um surto de influenza em uma instalação de abrigo no nordeste da Flórida, e em um cão de estimação Yorkshire Terrier que morreu em maio de 2005, durante um surto de influenza em uma clínica veterinária no sudeste da Flórida. Os

tecidos foram fixados em 10% de formalina tamponada neutra, incrustada em parafina, e as secções de 5 µm foram tingidas com hematoxilina e eosina para a diagnose histopatológica. Os tecidos não fixados foram armazenados a -80°C, aguardando análises virológicas.

#### Extração do RNA de amostras de tecidos caninos

[000200] Os tecidos dos pulmões congelados de cada um dos 7 cães foram descongelados e homogeneizados em meio essencial mínimo (MEM) suplementado com 0,5% de albumina de soro bovino (BSA) e antibióticos (gentamicina e ciprofloxacina), usando um moedor de tecido descartável (Kendall, Lifeline Medical Inc., Danbury, CT). O RNA total foi extraído usando um kit comercial (Mini Kit RNeasy®, QIAGEN Inc., Valencia, CA), de acordo com as instruções do fabricante, e eluído em um volume final de 60 µL de tampão. O RNA total foi também extraído do tecido do pulmão coletado de cães sem doença respiratória.

#### RT-PCR em tempo real

[000201] Uma RT-PCR em tempo real quantitativa, de uma única etapa, foi efetuada sobre o RNA total extraído das amostras de tecidos caninos, usando o Kit de RT-PCR de Sonda QuantiTect® contendo ROX como um corante de referência passivo (QIAGEN Inc., Valencia, CA). Resumidamente, 2 grupos de iniciador-sonda foram usados para a detecção das seqüências de influenza A em cada amostra (**Tabela 7**). Um grupo de iniciador-sonda era seletivo para as seqüências de genes de hemaglutinina (H3) caninas. O outro grupo de iniciador-sonda visou uma região altamente conservada do gene de matriz (M) do vírus influenza do tipo A. Para cada reação de RT-PCR em tempo real, 5 µL de RNA total extraído eram adicionados a uma mistura de reação contendo 12,5 µL de 2X Mistura Master de RT-PCR de Sonda QuantiTech®, 0,25 µL de Mistura de RT QuantiTech®, iniciadores *forward* e reversos (*reverse*) (concentração final de 0,4 µM para cada

um), sonda (concentração final de 0,1  $\mu$ M) e água sem RNase em um volume final de 25  $\mu$ L. Os Reagentes de Controle de RNA Ribossômico TaqMan® (Applied Biosystems, Foster City, CA) foram usados de acordo com as instruções do fabricante para a detecção de rRNA 18S como um controle interno endógeno quanto à presença de RNA extraído das amostras de tecidos caninos.

[000202] A RT-PCR em tempo real quantitativa, de uma etapa, foi efetuada sobre as misturas de reação em um Sistema de QPCR Mx3000P® (Stratagene, La Jolla, CA). As condições de ciclização incluíram uma etapa de transcrição reversa a 50°C por 30 minutos, uma etapa de desnaturação inicial a 95°C por 15 minutos para ativar a DNA polimerase HotStarTaq®, e a amplificação por 40 ciclos. Cada ciclo de amplificação incluiu a desnaturação a 94°C por 15 segundos, seguida por reconhecimento/extensão a 60°C por 1 minuto. Os sinais fluorescentes FAM (comprimento de ondas de emissão de 518 nm) e VIC (comprimento de ondas de emissão de 554 nm) foram registrados no final de cada ciclo. O ciclo limiar ( $C_t$ ) foi determinado ajustando a fluorescência limiar ( $dR$ ) em 1000 em cada experimento individual. O programa de software Mx3000P® versão 2.0 (Stratagene, La Jolla, CA) foi usado para a aquisição de dados e análise. As amostras foram consideradas positivas para o vírus influenza A quando o ciclo limiar ( $C_t$ ) para o gene de H3 ou M era 3 unidades menores do que o  $C_t$  para os tecidos do pulmão de cães sem doença respiratória. O controle positivo consistia em amplificação de RNA extraído do vírus A/canino/FL/242/03 (H3N8).

#### Isolamento do vírus em células MDCK

[000203] Os tecidos dos pulmões congelados de cada um dos 7 cães foram descongelados e homogeneizados em 10 volumes de Meio Eagle Modificado da Dulbecco (DMEM), suplementado com 0,5% de BSA e antibióticos (gentamicina e ciprofloxacina). Os fragmentos sólidos foram removidos por centrifugação e os sobrenadantes foram

inoculados sobre células de rins caninas de Madin-Darby (MDCK), cultivadas em DMEM suplementado com 1 µg/mL de tripsina tratada com TPCK (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO) e antibióticos (gentamicina e ciprofloxacina). As células foram desenvolvidas em frascos de 25 cm<sup>2</sup>, a 37°C, em uma atmosfera umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub>. As culturas foram observadas diariamente quanto a alterações morfológicas e coletadas em 5 dias após a inoculação. As culturas coletadas foram clarificadas por centrifugação e os sobrenadantes inoculados sobre células MDCK novas, conforme descrito para a inoculação inicial; duas passagens adicionais foram efetuadas para as amostras que não mostraram evidência de vírus influenza por hemaglutinação ou RT-PCR. A atividade de hemaglutinação nos sobrenadantes clarificados foi determinada usando 0,5% de células sanguíneas vermelhas de peru, como anteriormente descrito (Burleson, F. e outros, 1992; Kendal, P. e outros, 1982). A RT-PCR foi efetuada conforme descrito abaixo.

#### Isolamento do vírus em ovos de galinhas embrionados

[000204] Os homogeneizados foram preparados a partir de tecidos dos pulmões congelados, conforme descrito acima para a inoculação de células MDCK. Os homogeneizados (0,2 mL) foram inoculados no saco alantóico de ovos de galinhas embrionados de 10 dias de idade. Após 48 horas de incubação a 35°C, os ovos foram esfriados a 4°C durante a noite, antes de coletar o fluido alantóico. A atividade de hemaglutinação nos sobrenadantes clarificados foi determinada usando 0,5% de células sanguíneas vermelhas de peru, conforme anteriormente descrito (Burleson, F. e outros, 1992; Kendal, P. e outros, 1982). A RT-PCR foi efetuada conforme descrito abaixo. Foram efetuadas duas passagens adicionais nos ovos embrionados para as amostras que não mostraram evidência de vírus influenza após a inoculação inicial.

RT-PCR, seqüenciamento de nucleotídeos, e análises filogenéticas

[000205] O RNA viral foi extraído do sobrenadante de MDCK ou do fluido alantóico usando o Mini Kit de RNA Viral QIAmp® (QIAGEN Inc., Valencia, CA), de acordo com as instruções do fabricante. O RNA viral foi transcrita invertido para cDNA usando o Kit de RT-PCR QIAGEN® OneStep (QIAGEN Inc., Valencia, CA), de acordo com as instruções do fabricante. A amplificação por PCR da região de codificação dos 8 genes virais influenza no cDNA foi efetuada conforme anteriormente descrito (Klimov. A. e outros, 1992b), usando grupos de iniciadores específicos para genes universais (seqüências de iniciadores disponíveis mediante solicitação). Os amplicons de DNA resultantes foram usados como moldes para o seqüenciamento automatizado no seqüenciador de DNA automatizado ABI PRISM® 3100, usando a química de terminador de corante de seqüenciamento de ciclo (Applied Biosystems, Foster City, CA). As seqüências de nucleotídeos foram analisadas usando o Lasergene 6 Package® (DNASTAR, Inc., Madison, WI). O programa de software PHYLIP Versão 3.5® foi usado para estimar as filogêneses e calcular os valores de partida a partir das seqüências de nucleotídeos (Felsenstein, J., 1989). As árvores filogenéticas foram comparadas àquelas geradas por análise de união do próximo com o modelo de Tamura-Nei implementado no programa MEGA® (Kumar, S. e outros, 2004) e confirmadas pelo programa PAUP® 4.0 Beta (Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA).

Ensaio de Inibição da hemaglutinação (HI).

[000206] As amostras de soro foram incubadas com a enzima destruidora de receptor (RDE, DENKA SEIKEN Co., Ltd., Tóquio, Japão) (1 parte de soro: 3 partes de RDE), por 16 horas, a 37°C, antes da inativação térmica por 30 minutos, a 56°C. O vírus influenza A/Canino/Jacksonville/05 (H3N8) foi desenvolvido em células MDCK por 72 h, a 37°C, em 5% de CO<sub>2</sub>. Os sobrenadantes da cultura de

vírus foram coletados, clarificados por centrifugação, e armazenados a -80°C. Todos os outros vírus usados no ensaio de HI foram desenvolvidos em ovos de galinhas embrionados de 10 dias de idade, a partir dos quais o fluido alantóico foi coletado e armazenado a -80°C. O ensaio de HI foi efetuado conforme descrito anteriormente (Kendal, P. e outros, 1982). Resumidamente, 4 unidades de hemaglutinação do vírus em 25 µl foram adicionadas a um volume igual de soro diluído em série, em placas plásticas de 96 cavidades, e incubadas na temperatura ambiente por 30 minutos. Um volume igual de 0,5% de eritrócitos de peru foi adicionado e os títulos de hemaglutinação foram estimados visualmente após 30 minutos. O título de HI de ponto final foi definido como a última diluição de soro que inibiu completamente a hemaglutinação.

#### EXEMPLO 7 - CASOS CLÍNICOS

[000207] Em abril e maio de 2005, ocorreu um surto de doença respiratória anteriormente descrita (Crawford, P.C. e outros, 2005) em cães alojados em uma instalação de abrigo no nordeste da Flórida. O surto envolveu pelo menos 58 cães variando na idade de 3 meses a 9 anos, e incluiu cães de raça pura, bem como raças mistas. Os sinais clínicos mais comuns foram secreções nasais purulentas e uma tosse por 7 a 21 dias. Dos 43 cães que tiveram doença clínica por  $\geq 7$  dias, 41 tiveram títulos de anticorpos de HI para canino/FL/04 (H3N8) variando de 32 a  $>1024$ . Pelo menos 10 cães progrediram para pneumonia, dos quais 6 sofreram eutanásia. Estes 6 cães de raça mista incluíam 3 machos e 3 fêmeas variando na idade de 4 meses a 3 anos. A duração dos sinais clínicos variou de 2 a 10 dias na hora da eutanásia. No exame pós-morte, estes cães tiveram congestão pulmonar e edema. O exame histológico do trato respiratório revelou rinite, traqueíte, bronquite, bronquiolite, e broncopneumonia supurativa. Havia necrose e erosão das células epiteliais na traquéia, brônquios,

bronquíolos, e glândulas bronquiais. Os tecidos respiratórios foram infiltrados por neutrófilos e macrófagos.

[000208] Em maio de 2005, um surto de doença respiratória ocorreu em 40 cães de estimação em uma clínica veterinária no sudeste da Flórida. Os sinais clínicos mais comuns foram secreções nasais purulentas e uma tosse por 10 a 30 dias. Dos 40 cães, 17 eram soropositivos para canino/FL/04 (H3N8), com títulos de anticorpos de HI variando de 32 a >1024. A soroconversão ocorreu em 10 cães, para os quais os soros agudos e convalescentes em pares estavam disponíveis. Três cães progrediram para pneumonia. Um desses cães, um Yorkshire Terrier macho de 9 anos de idade, morreu 3 dias depois do início dos sinais clínicos. Esse cão teve traqueobronquite, edema e congestão pulmonar, e broncopneumonia grave. Similar aos 6 cães do abrigo, houve necrose e erosão das células epiteliais das vias aéreas e infiltrados de neutrófilos nos tecidos.

#### EXEMPLO 8 - RT-PCR EM TEMPO REAL E ISOLAMENTO VIRAL

[000209] Os tecidos dos pulmões dos 7 cães foram analisados por ensaios de RT-PCR em tempo real, quantitativa, que detectam o gene de M de influenza tipo A e o gene de H3 do vírus influenza A canino H3N8. Os pulmões de todos os 7 cães eram positivos tanto para o gene de M de influenza A quanto o gene de H3 de influenza canino (**Tabela 8**). Após 3 passagens em células MDCK, o vírus influenza A subtipo H3N8 foi isolado dos pulmões de um cão do abrigo que morreu após 3 dias de pneumonia. Este vírus foi chamado A/canino/Jacksonville/05 (H3N8) (canino/Jax/05). Após 2 passagens em ovos de galinhas embrionados, o vírus influenza A subtipo H3N8 foi recuperado dos pulmões do cão de estimação que também morreu após 3 dias de pneumonia. Este vírus foi chamado A/canino/ Miami/05 (H3N8) (canino/Miami/05).

#### EXEMPLO 9 - ANÁLISES GENÉTICAS DOS ISOLADOS DE

### INFLUENZA A H3N8 CANINOS

[000210] As análises de seqüências de canino/Jax/05 e canino/Miami/05 revelaram que os seus genes de hemaglutinina (HA) eram 98% idênticos aos isolados de canino/FL/04, canino/TX/04, e canino/Iowa/05, recuperados dos pulmões de galgos de corrida que morreram de pneumonia durante os surtos de influenza, nas pistas de corrida, em 2004 e 2005 (Crawford, P.C. e outros, 2005; Yoon K-Y. e outros, 2005). Além disso, os genes de HA de canino/Jax/05 e canino/Miami/05 eram 98% idênticos aos vírus influenza eqüinos contemporâneos, isolados após o ano de 2000. As comparações filogenéticas dos genes de HA mostraram que os vírus canino/Jax/05 e canino/Miami/05 foram agrupados com os isolados de galgos canino/FL/04, canino/TX/04, e canino/Iowa/05 e os isolados eqüinos contemporâneos, formando um grupo distinto a partir dos vírus eqüinos mais antigos, isolados nos anos 90 (figura 4). Ademais, os isolados canino/Jax/05, canino/Miami/05, e canino/Iowa/05 eram mais intimamente relacionados ao canino/Tx/04 do que ao canino/FL/04 ou ao canino/FL/03. Os isolados de 2005 formaram um subgrupo que parece ramificar-se dos vírus caninos de 2003 e 2004 mais antigos, com diferenças em aproximadamente 10 sítios de parcimônia-informativos. Essas diferenças suportam a hipótese que o vírus influenza canino está sendo transmitido horizontalmente de cão para cão, em oposição a ser reintroduzido periodicamente de uma fonte externa. O acúmulo de mutações de 2003 a 2005 ilustra o processo permanente de adaptação que o vírus deve sofrer, após ser transmitido para um novo hospedeiro, conforme é esperado ter acontecido para os vírus influenza caninos.

### EXEMPLO 10 - ANÁLISES DE AMINOÁCIDOS DOS ISOLADOS DE INFLUENZA A H3N8 CANINOS.

[000211] Houve substituições de aminoácidos conservadas em todos

os 6 isolados caninos que os diferenciaram dos vírus influenza eqüinos contemporâneos (**Tabela 9**). Estas substituições conservadas eram I15M, N83S, W222L, I328T, e N483T. As comparações filogenéticas da proteína HA madura mostraram que os vírus canino/Jax/05, canino/Miami/05, e canino/Iowa/05 formaram um subgrupo com o isolado canino/TX/04 (figura 4). Houve 3 alterações de aminoácidos (L118V, K261N, e G479E) que diferenciaram este subgrupo dos outros vírus caninos (**Tabela 9**). Houve 2 alterações de aminoácidos (F79L e G218E) que diferenciaram os isolados de 2005 de sua origem canino/TX/04. Além disso, os isolados de 2005 de cães que não eram galgos, canino/Jax/05 e canino/Miami/05, diferiram do isolado de galgo canino/Iowa/05 por uma alteração de aminoácido, R492K. Finalmente, o canino/Jax/05 diferenciou-se do canino/Miami/05 em um único aminoácido, S107P. Em todos os outros vírus H3N8 eqüinos e caninos, S é conservada na posição 107, exceto pelo A/Equine/Jilin/1/89, que tinha uma T (Guo Y. e outros, 1992).

#### EXEMPLO 11 - ANÁLISES ANTIGÊNICAS DOS ISOLADOS DE INFLUENZA A H3N8 CANINOS

[000212] Os testes de inibição da hemaglutinação (HI) foram efetuados usando um painel de antígenos de vírus influenza eqüinos mais antigos e contemporâneos e os vírus influenza caninos, e soro coletado em 2005 de cavalos e cães que tinham sido infectados com o vírus influenza (**Tabela 10**). O soro de furões imunizados contra canino/FL/04 foi também incluído nas análises. Os títulos de anticorpos de HI no soro eqüino eram 8 a 16 vezes maiores quando testados com os vírus eqüinos contemporâneos, comparados aos isolados mais antigos, porém diminuíram em pelo menos 4 vezes quando testados com os vírus caninos. O soro canino era não reativo com os vírus eqüinos mais antigos, porém os títulos de anticorpos aumentaram 4 vezes quando testados com os isolados eqüinos

contemporâneos e os isolados caninos. Isso foi também observado para o soro dos furões imunizados contra o vírus influenza canino. Esses padrões de sororreatividade demonstraram a similaridade antigênica entre os vírus influenza caninos e os vírus influenza eqüinos contemporâneos e estavam consistentes com as análises filogenéticas. Os títulos de anticorpos nos soros eqüinos, caninos, e de furões para o isolado de canino/Miami/05 eram similares àqueles para os isolados caninos de 2003 e 2004. Entretanto, os títulos eram 2 a 4 vezes menores para o isolado de canino/Jax/05. Isso sugere que o canino/Jax/05 é antigenicamente distinto dos outros isolados caninos, o que pode, em parte, estar relacionado à alteração única de aminoácido na posição 107 na HA madura.

**Tabela 7**

<b>Iniciadores e sondas para a análise por RT-PCR em tempo real, quantitativa, para o gene de matriz de vírus influenza A e o gene de H3 de influenza A canina (H3N8).</b>			
<b>Iniciadores</b>	<b>Alvo</b>	<b>Seqüência</b>	<b>Aplicação</b>
Ca-H3-F387	H3 (nt 387-406)	5'-tatgc <del>atcg</del> ctccgatccat-3' (SEQ ID NO: 79)	Iniciador <i>forward</i> para H3
Ca-H3-R487	H3 (nt 487-467)	5'-gctccacttccgtttga-3' (SEQ ID NO: 80)	Iniciador <i>reverse</i> para H3
Ca-H3-P430	H3 (nt 430-459)	FAM-aattcacagcagaggattcacatggacag-BHQ1 (SEQ ID NO: 81)	Sonda TaqMan®
FluA-M-F151	M (nt 151-174)	5'-catgg <u>artgg</u> ctaaagacaagacc-3' <sup>a</sup> (SEQ ID NO: 82)	Iniciador <i>forward</i> para M
FluA-M-R276	M (nt 276-253)	5'-agggcatttggacaa <u>ak</u> cgtcta-3' (SEQ ID NO: 83)	Iniciador <i>reverse</i> para M
FluA-M-P218	M (nt 218-235)	FAM-acgcTcaccgTgcccAgt-BHQ1 <sup>b</sup> (SEQ ID NO: 84)	Sonda TaqMan®

<sup>a</sup> A letra r sublinhada representa o nucleotídeo a ou g e a letra k sublinhada representa o nucleotídeo g ou t.

<sup>b</sup> As letras maiúsculas representam os resíduos de ácidos nucléicos fixados.

**Tabela 8.** RT-PCR em tempo real, quantitativa, e isolamento viral efetuados em tecidos de pulmões de cães que morreram de pneumonia durante os surtos de doença respiratória em um abrigo e uma clínica veterinária na Flórida.

ID do Cão	Local	Duração da doença clínica	RT-PCR em tempo real		Isolamento do Vírus
			M (Ct)	HA (Ct)	
Controle positivo A/canino/FL/242/03			28,15	27,36	
1079	Abrigo (NE da FL)	2 dias	29,81	28,84	Nenhum
1078	Abrigo (NE da FL)	3 dias	30,37	29,71	3 <sup>a</sup> passagem em MDCK
318	Abrigo (NE da FL)	9 dias	33,89	32,97	Nenhum
320	Abrigo (NE da FL)	10 dias	39,44	37,09	Nenhum
319	Abrigo (NE da FL)	6 dias	33,87	32,23	Nenhum
1080	Abrigo (NE da FL)	6dias	38,87	38,23	Nenhum
374	Clínica veterinária (SE da FL)	3 dias	24,05	22,65	2 <sup>a</sup> passagem no ovo

**Tabela 9.** Comparação de aminoácidos da HA madura para os vírus influenza caninos e os vírus influenza eqüinos contemporâneos

	Aminoácido																		
	7	15	54	78	79	83	92	107	118	159	218	<b>222</b>	261	<b>328</b>	479	<b>483</b>	492	541	
A/Eqüino/KY/5?02	G	I	N	V	F	N	S	S	L	N	G	W	K	I	G	N	R	K	
A/Eqüino/MA/213/03	.	.	.	A	.	.	.	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	
A/Eqüino/OH/1/03	D	.	K	A	.	.	.	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	
A/Canino/FL/242/03	.	<b>M</b>	K	A	.	<b>S</b>	.	.	.	S	.	<b>L</b>	.	<b>T</b>	.	<b>T</b>	.	.	
A/Canino/FL/43/04	.	<b>M</b>	K	A	.	<b>S</b>	N	.	.	S	.	<b>L</b>	.	<b>T</b>	.	<b>T</b>	.	R	
A/Canino/TX/1/04	.	<b>M</b>	K	A	.	<b>S</b>	.	.	V	S	.	<b>L</b>	N	<b>T</b>	E	T	.	.	
A/Canino/Iowa/05	.	<b>M</b>	K	A	L	<b>S</b>	.	.	V	S	E	<b>L</b>	N	<b>T</b>	E	T	.	.	
A/Canino/Miami/05	.	<b>M</b>	K	A	L	<b>S</b>	.	.	V	S	E	<b>L</b>	N	<b>T</b>	E	T	K	.	
A/Canino/Jacksonville/05	.	<b>M</b>	K	A	L	<b>S</b>	.	P	V	S	E	<b>L</b>	N	<b>T</b>	E	T	K	.	

**Tabela 10.** Títulos de anticorpos em soro eqüino, canino, e de furão para os vírus influenza mais antigos e contemporâneos e os vírus influenza caninos.

<b>Antígenos</b>	<b>Títulos de anticorpos em soros<sup>a</sup></b>		
	<b>Eqüino</b>	<b>Canino</b>	<b>Furão<sup>b</sup></b>
Eqüino/Miami/63	40	<10	16
Eqüino/Ky/86	40	40	32
Eqüino/KY/92	40	<10	32
Eqüino/NY/99	320	40	128
Eqüino/KY/05/02	320	160	256
Eqüino/MA/213/03	640	160	512
Eqüino/OH/01/03	640	160	512
Canino/FL/03	160	160	512
Canino/FL/04	160	80	512
Canino/Tx/04	160	160	512
Canino/Miami/05	160	80	256
Canino/Jax/05	40	40	128

<sup>a</sup> Os títulos de anticorpos foram determinados em um ensaio de inibição da hemaglutinação, efetuado com diluições em série de soro eqüino, canino, ou de furão e os vírus listados na coluna de antígenos.

<sup>b</sup> Soro dos furões imunizados com vírus canino/FL/04.

#### MATERIAIS E MÉTODOS PARA OS EXEMPLOS 12-15

##### Inóculo de vírus influenza canino.

[000213] O inóculo de vírus foi preparado por inoculação das células epiteliais de rins caninos de Madin-Darby (MDCK) com um estoque de A/canino/FL/43/04 (H3N8) representando 3 passagens do isolado original anteriormente descrito (Crawford e outros, 2005). As células MDCK inoculadas em Meio Essencial Mínimo da Dulbecco (DMEM), suplementado com 1 µg/mL de tripsina tratada com TPCK (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO) e antibióticos (gentamicina e ciprofloxacina), foram desenvolvidas em frascos de 250 cm<sup>2</sup>, a 37°C, em uma atmosfera umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub>. As culturas foram observadas diariamente quanto a alterações morfológicas e coletadas em 5 dias após a inoculação. As culturas coletadas foram

clarificadas por centrifugação e os sobrenadantes foram armazenados a -80°C aguardando a inoculação dos cães. Uma alíquota de sobrenadante foi usada para a determinação do título de vírus pelo método de Reed e Muench. O título eram  $10^7$  doses infecciosas de cultura de tecido médias (TCID<sub>50</sub>) de A/canino/Florida/43/04 (canino/FL/04) por mL.

Inóculo experimental.

[000214] Oito cães mestiços criados em colônia, de 4 meses de idade (Marshall BioResources, North Rose, NY) (4 machos e 4 fêmeas), foram usados para o estudo de inoculação experimental aprovado pelo University of Florida Institutional Animal Care and Use Committee. Os pesos dos corpos dos cães variaram de 13 a 17 kg. Os cães eram saudáveis com base em exames físicos, testes de sangue de linha de base, e registro das temperaturas dos corpos por 2 semanas antes da inoculação. Todos os cães estavam livres de exposição anterior ao vírus influenza canino com base em testes de sorologia efetuados em amostras de soros em pares, coletadas na hora da chegada na instalação e 2 semanas mais tarde. Os cães foram anestesiados por injeção intravenosa de propofol (Diprivan®, Zeneca Pharmaceuticals, 0,4 mg/kg de peso do corpo até o efeito) para a intubação com tubos endotraqueais. Seis cães (3 machos e 3 fêmeas) foram, cada um, inoculados com  $10^7$  TCID<sub>50</sub> de vírus canino/FL/04 em 5 mL de solução salina estéril, administrada na traquéia distal através de um cateter de borracha de diâmetro pequeno inserido no tubo endotraqueal. Dois cães (1 macho e 1 fêmea) foram inoculados falsamente com um volume igual de solução salina estéril. Os cães de controle inoculados falsamente foram alojados em uma área diferente dos cães inoculados com vírus e cuidados por uma equipe diferente. Os exames físicos e os registros das temperaturas retais foram efetuados duas vezes diariamente, por 6 dias após a

inoculação (p.i.).

Coleta de swab faríngeo e retal

[000215] Para monitorar a disseminação do vírus, os espécimes orofaríngeos foram coletados duas vezes, diariamente, de cada cão nos dias 0 a 6 p.i., usando swabs de poliéster (Fisher Scientific International Inc., Pittsburgh, PA). Os swabs foram colocados em 1 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS) contendo 0,5% de albumina de soro bovino (BSA). Os swabs retais foram coletados de cada cão, diariamente, a partir dos dias 0 até 6. Os extratos de swab foram preparados por clarificação do meio de transporte de swab por centrifugação. Uma alíquota de extrato de swab foi testada imediatamente quanto à nucleoproteína do vírus influenza A usando o kit de imunoensaio comercial Directigen® (BD, Franklin Lakes, NJ), de acordo com as instruções do fabricante. O extrato restante foi armazenado a -80°C aguardando outros ensaios virológicos.

Exames pós-morte.

[000216] No dia 1 p.i., um cão inoculado falsamente e um cão inoculado com vírus sofreram eutanásia por inoculação intravenosa de solução de Beuthanasia-D® (1 mL/5 kg de peso do corpo; Schering-Plough Animal Health Corp.). Um cão inoculado com vírus sofreu similarmente eutanásia a cada dia a partir dos dias 2 até 5 p.i. No dia 6 p.i., o cão inoculado falsamente e inoculado com vírus restante sofreu eutanásia. Os exames pós-morte completos foram efetuados por um dos investigadores (WLC). Os tecidos foram fixados em 10% de formalina tamponada neutra, incrustada em parafina, e as secções de 5 µm foram tingidas com hematoxilina e eosina para a diagnose histopatológica ou processadas para a imunoistoquímica, conforme descrito abaixo. Os tecidos de pulmões não fixados foram enviados ao Diagnostic Clinical Microbiology/Parasitology/ Serology Service ("Serviço Diagnóstico de Microbiologia Clínica/Parasitolo-

gia/Sorologia") na University of Florida College of Veterinary Medicine, para o isolamento e a identificação bacterianos. As amostras foram cultivadas em meios não seletivos, bem como em meios seletivos para a espécie *Bordetella* (Regan-Lowe; Remel, Lenexa, KS) e a espécie *Mycoplasma* (Remel). Todas as culturas foram conservadas por 21 dias antes do relatório de nenhum crescimento. Os tecidos não fixados foram também armazenados a -80°C aguardando análises virológicas.

#### Imunoistoquímica.

[000217] As secções de tecidos da traquéia e do pulmão de 5 µm desparafinizadas e reidratadas foram montadas sobre lâminas Bond-Rite® (Richard-Allan Scientific, Kalamazoo, MI) e subsequentemente tratadas com proteinase K (DAKOCytomation Inc., Carpenteria, CA), seguida por reagente de bloqueio de peroxidase (Kit de Peroxidase EnVision® da DAKO®, DAKO Corp., Carpenteria, CA). As secções foram incubadas com uma diluição a 1:500 de anticorpo monoclonal para influenza A H3 (Chemicon International, Inc., Ternecula, CA) por 2 horas, na temperatura ambiente. Os controles incluíram a incubação das mesmas secções com IgG de camundongo (1 mg/mL, Serotec, Inc. Raleigh, NC), e a incubação do anticorpo monoclonal com seções de pulmões caninos normais. Após o tratamento com o anticorpo primário, as secções foram incubadas com os reagentes de substrato secundários de imunoperoxidase e peroxidase (Kit de Peroxidase EnVision® da Dako®, Dako Corp.), de acordo com as instruções do fabricante. As secções foram contratingidas com hematoxilina, tratadas com Reagente Clarifier nº 2 e Bluing (Richard-Allan Scientific, Kalamazoo, MI), desidratadas, e as lamínulas aplicadas com Permount (ProSciTech).

#### Extração do RNA dos swabs e dos tecidos.

[000218] Os tecidos do pulmão e traqueais de cada cão foram descongelados e homogeneizados em meio essencial mínimo (MEM)

suplementado com 0,5% de albumina de soro bovino (BSA) e antibióticos (gentamicina e ciprofloxacina), usando um moedor de tecido descartável (Kendall, Lifeline Medical Inc., Danbury, CT). O RNA total foi extraído dos homogeneizados de tecidos, bem como dos extratos de swabs orofaríngeos e retais, usando um kit comercial (Mini Kit RNeasy®, QIAGEN Inc., Valencia, CA), de acordo com as instruções do fabricante, e eluído em um volume final de 60 µL de tampão.

#### RT-PCR em tempo real

[000219] Uma RT-PCR em tempo real quantitativa, de uma única etapa, foi efetuada sobre o RNA total, usando o Kit de RT-PCR de Sonda QuantiTect® contendo ROX como um corante de referência passivo (QIAGEN Inc., Valencia, CA) e um grupo de iniciador-sonda que alvejava uma região altamente conservada do gene de matriz (M) do vírus influenza do tipo A (Payungporn S. e outros, 2006a; Payungporn S. e outros, 2006b). Para cada reação de RT-PCR em tempo real, 5 µL de RNA total extraído eram adicionados a uma mistura de reação contendo 12,5 µL de 2X Mistura Master de RT-PCR de Sonda QuantiTech®, 0,25 µL de Mistura de RT QuantiTech®, iniciadores *forward* e *reverse* (concentração final de 0,4 µM para cada um), sonda (concentração final de 0,1 µM) e água sem RNase em um volume final de 25 µL. Os Reagentes de Controle de GAPDH TaqMan® (Applied Biosystems, Foster City, CA) foram usados de acordo com as instruções do fabricante, para a detecção de GAPDH como um controle interno endógeno quanto à presença de RNA extraído das amostras de swabs e de tecidos e como um controle de normalização.

[000220] A RT-PCR em tempo real quantitativa, de uma etapa, foi efetuada sobre as misturas de reação em um Sistema de QPCR Mx3000P® (Stratagene, La Jolla, CA). As condições de ciclização incluíram uma etapa de transcrição reversa a 50°C por 30 minutos,

uma etapa de desnaturação inicial a 95°C por 15 minutos para ativar a DNA polimerase HotStarTaq®, e a amplificação por 40 ciclos. Cada ciclo de amplificação incluiu a desnaturação a 94°C por 15 segundos, seguida por reconhecimento/extensão a 60°C por 1 minuto. Os sinais fluorescentes FAM (comprimento de ondas de emissão de 518 nm) e VIC (comprimento de ondas de emissão de 554 nm) foram registrados no final de cada ciclo. O ciclo limiar (C<sub>t</sub>) foi determinado ajustando a fluorescência limiar (dR) em 1000 em cada experimento individual. O programa de software Mx3000P® versão 2.0 (Stratagene, La Jolla, CA) foi usado para a aquisição de dados e análise. O controle positivo consistia em amplificação de RNA extraído do vírus A/canino/FL/242/03 (H3N8). Os resultados foram normalizados dividindo o valor de C<sub>t</sub> de M pelo valor de C<sub>t</sub> de GAPDH correspondente para cada amostra.

#### Isolamento novamente do vírus a partir dos tecidos

[000221] Os tecidos dos pulmões e das traquéias congelados dos cães inoculados com vírus foram descongelados e homogeneizados em 10 volumes de DMEM suplementado com 0,5% de BSA e antibióticos. O fragmento sólido foi removido por centrifugação e os sobrenadantes foram inoculados sobre células MDCK, cultivadas em DMEM suplementado com 1 µg/mL de tripsina tratada com TPCK (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO) e antibióticos, conforme acima descrito. As células foram desenvolvidas em frascos de 25 cm<sup>2</sup>, a 37°C, em uma atmosfera umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub>. As culturas foram observadas diariamente quanto a alterações morfológicas e coletadas em 5 dias após a inoculação. As culturas coletadas foram clarificadas por centrifugação e os sobrenadantes inoculados sobre células MDCK novas, conforme descrito para a inoculação inicial; duas passagens adicionais foram efetuadas para as amostras que não mostraram evidência de vírus influenza por hemaglutinação ou RT-

PCR. A atividade de hemaglutinação nos sobrenadantes clarificados foi determinada usando 0,5% de células sanguíneas vermelhas de peru, como anteriormente descrito (Crawford e outros, 2005). A RT-PCR foi efetuada conforme descrito abaixo.

RT-PCR, seqüenciamento de nucleotídeos, e análises filogenéticas

[000222] O RNA viral foi extraído do sobrenadante de MDCK usando o Mini Kit de RNA Viral QIAmp® (QIAGEN Inc., Valencia, CA), de acordo com as instruções do fabricante. O RNA viral foi transrito invertido para cDNA usando o Kit de RT-PCR QIAGEN® OneStep (QIAGEN Inc., Valencia, CA), de acordo com as instruções do fabricante. A amplificação por PCR da região de codificação dos 8 genes virais influenza no cDNA foi efetuada conforme anteriormente descrito (Crawford e col, 2005), usando grupos de iniciadores específicos para genes universais (seqüências de iniciadores disponíveis mediante solicitação). Os amplicons de DNA resultantes foram usados como moldes para o seqüenciamento automatizado no seqüenciador de DNA automatizado ABI PRISM® 3100, usando a química de terminador de corante de seqüenciamento de ciclo (Applied Biosystems, Foster City, CA). As seqüências de nucleotídeos foram analisadas usando o Lasergene 6 Package® (DNASTAR, Inc., Madison, WI). As seqüências de nucleotídeos para os vírus recuperados de cães infectados foram comparadas com as seqüências dos vírus no inóculo, para determinar se quaisquer alterações tinham ocorrido durante a replicação no trato respiratório.

EXEMPLO 12 - DOENÇA CLÍNICA

[000223] Todos os 6 cães inoculados com vírus desenvolveram uma febre transiente (temperatura retal  $\geq 39^{\circ}\text{C}$ ) durante os primeiros 2 dias p.i., porém nenhum exibiu sinais respiratórios, tais como tosse ou secreção nasal, durante o período de observação de 6 dias. Os cães inoculados falsamente permaneceram clinicamente saudáveis.

**EXEMPLO 13 - DISSEMINAÇÃO DO VÍRUS**

[000224] A nucleoproteína de influenza A foi detectada no swab orofaríngeo coletado de um dos cães inoculados com vírus em 24 horas p.i. Os swabs orofaríngeos coletados de um cão em 72, 84, e 120 horas p.i., e de um outro cão em 108, 120, e 132 horas p.i., eram positivos para vírus por RT-PCR em tempo real, quantitativa (**Tabela 11**). O número absoluto de cópias de genes de M de influenza por  $\mu\text{L}$  de extrato de swab aumentou com o tempo de 3 a 6 dias p.i. Nenhum vírus foi detectado nos swabs retais.

**EXEMPLO 14 - EXAMES PÓS-MORTE**

[000225] Em contraste com a infecção experimental anterior usando Beagles sem patógenos específicos (Crawford e col, 2005), os cães mestiços inoculados com vírus tiveram pneumonia, como evidenciada por análises gerais e histopatológicas dos pulmões a partir dos dias 1 até 6 p.i. Além de pneumonia, os cães tiveram rinite, traqueíte, bronquite, e bronquiolite similar àquela descrita em cães naturalmente infectados (Crawford e outros, 2005). Houve necrose epitelial e erosão do revestimento das vias aéreas e das glândulas bronquiais, com infiltração por neutrófilos e macrófagos dos tecidos submucosos (figura 5, **painéis superiores**). A imunoistoquímica detectou antígeno de H3 viral nas células epiteliais dos brônquios, bronquiolos, e glândulas bronquiais (figura 5, **painéis inferiores**). Nenhuma superinfecção bacteriana estava presente. Os tecidos respiratórios dos 2 cães inoculados falsamente estavam normais.

**EXEMPLO 15 - REPLICAÇÃO DE VÍRUS NA TRAQUÉIA E NOS PULMÕES**

[000226] A traquéia e os pulmões eram positivos para o vírus por RT-PCR em tempo real, quantitativa, em todos os cães de 1 até 6 dias p.i. (**Tabela 12**). O número absoluto de cópias de gene de M de influenza por  $\mu\text{L}$  de homogeneizado de traquéia aumentou de 1 até 5

dias p.i., então diminuiu no dia 6. O número absoluto de cópias de gene de M por  $\mu\text{L}$  de homogeneizado de pulmão diminuiu de 1 até 6 dias p.i. Em geral, a traquéia continha  $\geq$  um  $\log_{10}$  mais vírus do que o pulmão em cada um dos 6 dias p.i.

**Tabela 11.** Detecção da disseminação do vírus na orofaringe de cães mestiços inoculados com o vírus influenza canino, por RT-PCR em tempo real, quantitativa.

ID do Cão	Tempo p.i. (horas) <sup>a</sup>	Razão de M/GAPDH <sup>b</sup>	Gene de matriz (cópias / $\mu\text{L}$ ) <sup>c</sup>
860	72	1,20	1,57E+02
	84	1,30	8,25E+02
	120	1,23	1,74E+03
894	108	1,17	1,17E+02
	120	1,41	1,37E+02
	132	1,27	3,74E+02

<sup>a</sup> Tempo que os swabs orofaríngeos foram coletados dos cães após inoculação com o vírus A/canino/FL/43/04 (H3N8).

<sup>b</sup> As razões de normalização foram calculadas dividindo a M (Ct) pelo GAPDH (Ct) para cada extrato de swab.

<sup>c</sup> O número absoluto de cópias de gene de matriz por  $\mu\text{L}$  de extrato de swab.

**Tabela 12.** Detecção da replicação do vírus na traquéia e no pulmão de cães mestiços inoculados com o vírus influenza canino, por RT-PCR em tempo real, quantitativa.

ID do Cão	Tempo p.i. (horas) <sup>a</sup>	Razão de M/GAPDH <sup>b</sup>		Gene de matriz (cópias/ $\mu\text{L}$ ) <sup>c</sup>	
		Pulmão	Traquéia	Pulmão	Traquéia
797	24	1,20	1,43	8,22E+05	3,11E+04
801	48	1,33	0,99	1,15E+05	6,52E+06
789	72	1,44	1,12	2,39E+04	1,56E+05
819	96	1,40	1,27	3,19E+04	1,43E+05

860	120	1,59	1,04	3,48E+03	1,17E+06
894	144	1,70	1,15	4,78E+02	1,50E+03

<sup>a</sup> Tempo que os tecidos foram coletados dos cães após inoculação com o vírus A/canino/FL/43/04 (H3N8).

<sup>b</sup> As razões de normalização foram calculadas dividindo a M (Ct) pelo GAPDH (Ct) para cada homogeneizado de tecido.

<sup>c</sup> O número absoluto de cópias de gene de matriz por uL de homogeneizado de tecido.

#### MATERIAIS E MÉTODOS PARA O EXEMPLO 16

##### Cepas de vírus

[000227] As cepas de vírus influenza caninos, bem como aquelas de origem aviária, eqüina e humana (listadas na **Tabela 15**) foram propagadas em ovos embrionados ou células MDCK e a sua capacidade de infectar foi titulada por diluição de ponto final em embriões de galinhas, ou ensaio de placa. A rápida quantificação do vírus foi efetuada por ensaio de hemaglutinação usando os eritrócitos de células sanguíneas vermelhas de perus.

##### Espécimens diagnósticas

[000228] Um total de 60 tecidos de pulmões caninos, coletados de casos suspeitos de doença respiratória viral durante o ano de 2005, foi testado quanto à presença de vírus influenza canino.

##### Extração de RNA a partir de amostras de tecidos caninos

[000229] Os blocos de tecido de pulmão pesando entre 20 e 30 mg foram homogeneizados em um moedor de tecido descartável (Kendal). O RNA total foi extraído usando um kit comercial (Mini Kit RNeasy, Qiagen, Valencia, CA) e eluído em um volume final de 60 µL, seguindo as recomendações do fabricante.

##### Projeto dos iniciadores e das sondas

[000230] Os alinhamentos de seqüências múltiplas dos genes de H3 e M a partir de diversos subtipos e a partir de diversas espécies foram

efetuados usando o programa CLUSTAL X (Versão 1.8). Os iniciadores e a sonda de matriz (M) foram selecionados a partir das regiões conservadas de acima das seqüências conhecidas correspondendo aos diferentes subtipos de vírus influenza A, enquanto que o grupo de iniciadores e sonda específico para o gene de hemaglutinina H3 foi selecionado para corresponder-se especificamente aos genes dos vírus influenza A eqüinos e caninos e unir-se inadequadamente aos genes aviários e humanos homólogos (**Tabela 13**). O software de projeto do iniciador (OLIGOS Versão 9.1) e as ferramentas de análise baseadas na web ("rede de alcance mundial") proporcionadas por EXIQON (<http://Inatools.com>) foram usados para o cálculo de Tm e a previsão da estrutura secundária, bem como da auto-hibridação. Uma região conservada de um gene de rRNA 18S foi usada como controle interno endógeno quanto à presença de RNA extraído de amostra de tecido canino. Os Reagentes de Ensaio Pré-Desenvolvidos TaqMan® para o rRNA 18S Eucariótico (VIC/TAMRA) (Applied Biosystems) foram usados para a detecção em tempo real de rRNA 18S nas amostras de tecido.

#### Condição da RT-PCR em tempo real

[000231] Uma RT-PCR em tempo real, de uma única etapa, foi efetuada usando o Kit de RT-PCR de Sonda Quantitect contendo ROX como um corante de referência passivo (Qiagen, Valencia, CA). Em cada reação de RT-PCR em tempo real, 5 µL de amostra de RNA foram usados como um molde para combinar com uma mistura de reação contendo 10 µL de 2X Mistura Master de RT-PCR de Sonda QuantiTech, 0,2 µL de Mistura de RT QuantiTech, iniciadores (conc. final de 0,4 µM para o gene de H3 ou conc. final de 0,6 µM para o gene de M), sonda (conc. final de 0,1 µM para o gene de H3 ou conc. final de 0,2 µM para o gene de M) e água sem RNase em um volume final de 20 µL. A RT-PCR em tempo real, de uma etapa, foi efetuada

no Sistema de QPCR em Tempo Real Mx3005P (Stratagene). As condições de ciclização incluíram uma etapa de transcrição reversa a 50°C por 30 minutos. Após uma etapa de desnaturação inicial a 95°C por 15 minutos, para ativar a DNA polimerase HotStarTaq, a amplificação foi efetuada durante 40 ciclos, incluindo a desnaturação (94°C por 15 segundos) e o recozimento/extensão (60°C por 30 segundos). Os sinais fluorescentes FAM (comprimento de ondas de emissão de 516 nm para a detecção de H3 e M) e VIC (comprimento de ondas de emissão de 555 nm para a detecção de rRNA 18S) foram obtidos uma vez por ciclo no final da etapa de extensão. A aquisição de dados e a análise do ensaio de PCR em tempo real foram efetuadas usando o software Mx3005P versão 2.02 (Stratagene).

Especificidade do grupo de iniciadores/ sonda de H3 pelo influenza canino (H3N8) e universalidade do grupo de iniciadores/sonda de M para o vírus influenza tipo A

[000232] Para testar a especificidade de cada grupo de iniciadores/sonda, o RNA extraído de diversos subtipos conhecidos de vírus influenza A foi usado como um molde no ensaio de RT-PCR em tempo real (**Tabela 15**).

Padrão de RNA para a determinação do desempenho da RT-PCR em tempo real

[000233] Os genes de vírus influenza A canino (A/canino/Florida/242/2003(H3N8)) foram usados para gerar os amplicons de PCR para H3 (nt 1-487) e M (nt 1-276) usando iniciadores ligados com o promotor T7 (**Tabela 13**). Então os amplicons de PCR purificados dos genes de H3 e M foram usados como moldes para a transcrição *in vitro* usando o Sistema de Transcrição *in vitro* Riboprobe-T7 (Promega), seguindo as recomendações do fabricante. A concentração dos RNAs transcritos foi calculada medindo a absorbância a 260 nm. Os RNAs foram então diluídos em série 10

vezes, variando de  $10^8$  a 10 cópias/  $\mu\text{L}$ , para efetuar os testes de sensibilidade. Além disso, uma curva padrão foi gerada representando em gráfico o log das concentrações iniciais de molde de RNA (cópias/  $\mu\text{L}$ ) contra o ciclo limiar ( $\text{Ct}$ ) obtido a partir de cada diluição, para determinar o desempenho global da RT-PCR em tempo real.

Testes comparativos de sensibilidade entre a RT-PCR em tempo real e o kit de teste Directigen Flu A

[000234] Os vírus de estoque de duas cepas virais que incluem A/Wyoming/3/2003 (H3N2) a  $10^{6,67}$  EID<sub>50</sub>/mL (HA = 64) e A/canino/Florida/ 242/2003(H3N8) a  $10^{7,17}$  EID<sub>50</sub>/mL (HA = 16) foram usados para o ensaio limiar de detecção. A diluição logarítmica dos espécimes em solução salina tamponada com fosfato (PBS) (125  $\mu\text{L}$ ) foi usada em um kit de detecção de antígeno de influenza A rápida, Directigen Flu A, (Becton, Dickinson e Company), seguindo as instruções do fabricante. Cada dispositivo de teste de Directigen Flu A tem um ponto de antígeno de influenza H1N1 no centro da membrana que se revela como um ponto roxo e indica a integridade do teste, o qual é baseado em um anticorpo monoclonal para a nucleoproteína (NP). O desenvolvimento de um triângulo roxo circundando o ponto é indicativo da presença de NP de influenza no espécime testado. A intensidade do sinal roxo a partir do triângulo foi classificada como + (contorno do triângulo), ++ (triângulo ligeiramente colorido), +++ (triângulo roxo-escuro) e +++++ (triângulo roxo muito escuro). O RNA viral foi extraído de alíquotas de 125  $\mu\text{L}$  de cada diluição de vírus usando o MiniKit de RNA Viral QIAamp (Qiagen, Valencia, CA) e eluindo em um volume final de 50  $\mu\text{L}$ . Um volume de 5  $\mu\text{L}$  dos RNAs virais extraídos foi testado por RT-PCR em tempo real para o teste comparativo de sensibilidade com o kit Directigen Flu A.

EXEMPLO 16

[000235] O ensaio de RT-PCR em tempo real para influenza canino

vale-se da informação de três sondas moleculares que alvejam o rRNA 18S da célula hospedeira, bem como M e H3 do genoma do vírus influenza A (**Tabela 14**). A amplificação do gene hospedeiro é um repórter da qualidade e da integridade do espécime. As amostras clínicas, de necropsia ou de laboratório contendo o vírus influenza canino (H3N8) são esperadas produzirem sinal de amplificação com as três sondas. Os espécimes que produzem sinal de amplificação com as sondas de M e rRNA 18S, porém negativos para H3, seriam indicativos de um vírus influenza subtipo H3 de origem humana, suína ou aviária ou de subtipos que não de H3. Esses casos raros poderiam ser resolvidos por RT-PCR usando iniciadores de HA universais para gerar cDNA de amplicon que pode ser analisado por seqüenciamento. Os espécimes adequadamente coletados e manuseados que não têm o vírus influenza A produzem sinal de amplificação de rRNA 18S somente. As situações nas quais somente a sonda de rRNA 18S e as sondas de H3 produzem sinal de amplificação são indicativas de técnica falha, a não ser que de outro modo provado; um falso negativo com as sondas de M ou falso positivo para H3 necessitam ser demonstrados. Finalmente, os espécimes que não conseguem produzir sinais de amplificação com as três sondas são indicativos de coleta defeituosa de amostra, degradação, extração de RNA falha ou da presença de inibidores das polimerases usadas nas PCR.

[000236] Para testar a especificidade do grupo de iniciadores/sonda de H3 pelo vírus influenza A canino (H3N8) e a universalidade do grupo de iniciadores/sonda de M para o influenza tipo A, diversos subtipos de vírus influenza A foram testados por RT-PCR em tempo real. Os resultados mostram que o grupo de iniciadores/sonda de H3 produziu um sinal de amplificação positivo somente com o influenza canino (H3N8). Nenhum falso positivo significativo ou sinal de amplificação não específico foi observado nos outros subtipos ou

cepas de H3 humanas. O grupo de iniciadores/sonda de M produziu sinal de amplificação positivo com todas as cepas testadas (**Tabela 15**). Esses resultados indicaram que os iniciadores/sonda de H3 especificamente detectam o vírus influenza A canino (H3N), enquanto que os iniciadores/sonda de M detectam múltiplos subtipos de vírus influenza tipo A.

[000237] O desempenho dos ensaios de RT-PCR em tempo real foi avaliado por diluição de ponto final dos RNAs transcritos *in vitro* de M e H3. Conforme esperado, o ciclo limiar (Ct) aumentou em correlação direta com a diluição dos padrões de RNA. Os sinais fluorescentes podem ser detectados nas diluições de padrões de RNA de M e H3 como tão baixos quanto  $10^3$  e  $10^2$  cópias/ $\mu$ L, respectivamente (figuras **6A e 6B**). As curvas padrão dos genes de M e H3 foram construídas representando graficamente o log das concentrações de RNA de partida contra o ciclo limiar (Ct) obtido de cada diluição (figuras **6C e 6D**). A inclinação da curva padrão é usada para determinar a eficiência da reação PCR, que é teoricamente exponencial; 100% de eficiência de amplificação significariam a duplicação da concentração de amplicon de cada ciclo. As curvas padrões com uma inclinação entre aproximadamente -3,1 e -3,6 são tipicamente aceitáveis para a maioria das aplicações que requerem quantificação precisa (90-110% de eficiência de reação). Um valor de Rsq é a adequação de todos os dados ao gráfico da curva padrão. Se todos os dados situarem-se perfeitamente sobre a linha, o Rsq será 1,00. À medida que os dados incidem além da linha, o Rsq diminui. Um valor de  $\text{Rsq} \geq 0,985$  é aceitável para a maior parte dos ensaios. A curva padrão de M revelou uma inclinação de -3,576 (eficiência = 90,4 %) e  $\text{Rsq} = 1,00$ , enquanto que a curva padrão de H3 produziu uma inclinação de -3,423 (eficiência = 95,9%) e  $\text{Rsq} = 0,999$ . Esses valores indicam uma eficiência de amplificação e um desempenho global satisfatórios dos

ensaios de RT-PCR em tempo real. Atribui-se a eficiência e a sensibilidade menores do grupo de iniciadores/sonda de M, em comparação com o grupo de iniciadores/sonda de H3, à degeneração de N vezes das seqüências de iniciadores de M requerida para assegurar a ampla cobertura da variabilidade das seqüências do gene de M através dos vírus de múltiplos subtipos, hospedeiros e linhagens.

[000238] A sensibilidade do ensaio de RT-PCR em tempo real foi também comparada com o ensaio comercial de detecção rápida de antígeno (Directigen Flu A). As diluições logarítmicas de A/Wyoming/3/2003 (H3N2) e A/canino/Florida/242/2003(H3N8) foram analisadas com o Directigen Flu A e por RT-PCR em tempo real. Os resultados do Directigen Flu A mostraram que as sensibilidades contra ambas as cepas virais são aproximadamente 100 vezes a diluição a partir dos vírus de estoque usados nesses experimentos (figura 7). Os sinais (cor roxa) gerados pelas amostras de vírus canino (A/canino/Florida/242/2003:  $10^{6.x}$  PFU/ml) eram muito mais fracos do que aqueles verificados no vírus humano (A/Wyoming/3/2003:  $10^{7.x}$  PFU/ml), em concordância com a menor concentração de vírus nessas amostras. Alternativamente, o sinal menor para o influenza canino poderia ser atribuído à especificidade molecular dos anticorpos monoclonais contra a NP; isto é, a conservação insatisfatória dos aminoácidos dentro do epítopo de NP dos vírus influenza A caninos.

[000239] A RT-PCR em tempo real do gene de M produziu valores de Ct acima do limiar, com equivalentes de 10 e 30 PFU de vírus por reação de A/canino/Florida/242/2003 e A/Wyoming/3/2003, respectivamente (**Tabela 16**). As diferenças entre o valor de sensibilidade de 2 cepas virais por causa das diferenças nos títulos virais originais. A comparação da detecção do gene de H3 entre os vírus influenza caninos e humanos não foi efetuada porque os iniciadores/sonda de H3 em nosso ensaio de RT-PCR em tempo real

amplificam exclusivamente o vírus influenza A canino. A RT-PCR era  $10^5$  vezes mais sensível do que o kit de detecção rápida de antígeno.

[000240] Para avaliar o desempenho do teste de RT-PCR nos espécimes de necrópsia a partir de cães com doença respiratória aguda, sessenta amostras de tecidos de pulmões caninos apresentadas durante o ano de 2005 foram testadas quanto à presença de vírus influenza A canino por RT-PCR em tempo real. Um total de 12 das 60 amostras (20%) era positivo com os genes tanto de M quanto de H3, enquanto que as 48 amostras restantes produziram resultado negativo tanto para o gene de M quanto de H3. As tentativas de isolamento do vírus foram conduzidas por inoculação em ovo e célula MDCK, para avaliar a especificidade do ensaio em tempo real; 2 das 12 amostras que eram positivas para influenza canino por RT-PCR produziram vírus influenza canino (dados não mostrados, manuscrito em preparação). Embora todos os tecidos fossem coletados de cães com uma história de doença respiratória grave, a maioria das amostras não produziu nenhum vírus influenza canino por PCR em tempo real ou isolamento convencional, sugerindo uma alta incidência de outros patógenos respiratórios, tais como *Bordetella bronchiseptica*, vírus da cinomose ou parainfluenza. O ensaio de RT-PCR em tempo real, de uma única etapa, aqui contido, proporciona uma abordagem rápida, sensível e de custo efetivo para a detecção do vírus influenza A canino (H3N8). O diagnóstico rápido de laboratório das infecções pelo vírus influenza A canino (H3N8) no estágio inicial da doença pode produzir informação relevante para o controle clínico do paciente e das instalações.

**Tabela 13:** Iniciadores e sondas usados para a detecção por RT-PCR e a transcrição *in vitro*

Nome do oligo	Tipo	Alvo	Seqüência	Aplicação
Ca-H3-F387	Iniciador <i>forward</i>	H3(nt 387-406)	5'-tatgcacatcgctccgatccat-3' (SEQ ID NO: 79)	PCR em tempo real
Ca-H3-R487	Iniciador <i>reverse</i>	H3(nt 487-467)	5'-gctccacttcttccgtttga-3' (SEQ ID NO: 80)	
Ca-H3-P430	Sonda TaqMan	H3(nt 430-459)	FAM-aattcacagcagagggattcacatggacag-BHQ1 (SEQ ID NO: 81)	
FluA-M-F151	Iniciador <i>forward</i>	M (nt 151-174)	5'-catggartggctaaagacaagacc-3' (SEQ ID NO: 82)	PCR em tempo real
FluA-M-R276	Iniciador <i>reverse</i>	M (nt 276-253)	5'-agggcattttggacaaakcgtcta-3' (SEQ ID NO: 83)	
FluA-M-P218	Sonda de LNA TaqMan	M (nt 218-235)	5'- <u>tgtaatacgactcactata</u> agggctccacttcttccgtttga-3' (SEQ ID NO: 86)	
H3-F1	Iniciador <i>forward</i>	H3 (nt 1-14)	5'-tattcgctcaggagcaaaagcagggg-3' (SEQ ID NO: 85)	Transcrição <i>in vitro</i>
T7/H3-R490	Iniciador <i>reverse</i>	T7/H3 (nt 487-467)	5'- <u>tgtaatacgactcactata</u> agggctccacttcttccgtttga-3' (SEQ ID NO: 86)	
M-F1	Iniciador <i>forward</i>	M (nt 1-15)	5'-gatcgctttcaggagcaaaagcaggtag-3' (SEQ ID NO: 87)	Transcrição <i>in vitro</i>
T7/M-276	Iniciador <i>reverse</i>	M (nt 276-253)	5'- <u>tgtaatacgactcactata</u> agggcattttggacaaagcgtc-3' (SEQ ID NO: 88)	

\* = Observação: Letras maiúsculas = resíduos de LNA (Ácido Nucléico Travado), r = a ou g, k = g ou t, grifo = seqüência de promotor T6 )

**Tabela 14.** Interpretação do ensaio de RT-PCR em tempo real

Interpretação	Resultado		
	M	H3	rRNA 18S
Positivo para vírus influenza A canino (H3N8)	+	+	+
Positivo para vírus influenza A (subtipo desconhecido)	+	-	+
Negativo para vírus influenza A	-	-	+
Erro na extração de RNA ou presença de inibidor na PCR)	-	-	-

**Tabela 15.** Teste de especificidade do grupo de iniciadores/sonda de H3 e teste de universalidade do grupo de iniciadores/sonda de M com diversos subtipos de vírus influenza A

Subtipos	Nome da Cepa	Hospedeiro	Detecção por RT-PCR em tempo real	
			gene de H3 (Ct)	gene de M (Ct)
H1	A/Ohio/1983	Humano	Sem Ct	15,40
	A/WSN/1933	Humano	Sem Ct	20,09
H3	A/Wyoming/3/2003	Humano	Sem Ct	28,85
	A/Victoria/3/1975	Humano	Sem Ct	16,62
	A/canino/FL/242/2003	Canino	Sem Ct	29,25
H4	Turkey/MN/1066/1980	Aviário	Sem Ct	17,49
	Amostra clínica*	Aviário	Sem Ct	20,87
	A/chicken/Thailand/CUK2/2004	Aviário	Sem Ct	20,13
H5	A/Pheasant/NJ/1335/1998	Aviário	Sem Ct	16,64
H6	Amostra clínica*	Aviário	Sem Ct	19,52
	Amostra clínica*	Aviário	Sem Ct	25,64
H10	Amostra clínica*	Aviário	Sem Ct	19,59
	Amostra clínica*	Aviário	Sem Ct	15,72
H11	Amostra clínica*	Aviário	Sem Ct	24,55

\* Observar que os subtipos das amostras clínicas foram confirmados por seqüenciamento de nucleotídeos.

**Tabela 16.** Testes comparativos de sensibilidade para a detecção do vírus influenza A entre a RT-PCR em tempo real e o Directigen Flu A

Diluições	Directigen Flu A		RT-PCR em tempo real de M	
dos vírus	A/canino/242/03	A/Wyoming/3/03	A/canino/242/03	A/Wyoming/3/03
10 <sup>-1</sup>	++		++++	22,42
19,48	+	+++	25,85	22,66
10 <sup>-3</sup>	-	-	29,27	25,76
10 <sup>-4</sup>	Não efetuado	Não efetuado	32,66	28,66
10 <sup>-5</sup>	Não efetuado	Não efetuado	35,48	33,14
10 <sup>-6</sup>	Não efetuado	Não efetuado	37,51	35,06
10 <sup>-7</sup>	Não efetuado	Não efetuado	39,09	36,44
10 <sup>-8</sup>	Não efetuado	Não efetuado	Sem Ct	38,93

**Tabela 17.**

Classe do Aminoácido	Exemplos de Aminoácidos
Apolar	Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Met, Phe, Trp
Polar Não Carregado	Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln
Ácido	Asp, Glu
Básico	Lys, Arg, His

**Tabela 18.**

Símbolo de Letra	Aminoácido	Símbolo de Letra	Aminoácido
A	Alanina	M	Metionina
B	Asparagina ou ácido aspártico	N	Asparagina
C	Cisteína	P	Prolina
D	Ácido Aspártico	Q	Glutamina
E	Ácido Glutâmico	R	Arginina

F	Fenilalanina	S	Serina
G	Glicina	T	Treonina
H	Histidina	V	Valina
I	Isoleucina	W	Triptofano
K	Lisina	Y	Tirosina
L	Leucina	Z	Glutamina ou ácido glutâmico

**Tabela 19.** Diferenças de aminoácidos entre as proteínas PB2 dos vírus influenza eqüinos e caninos H3N8

Posição	Consenso Eqüino*	Canino/FL/03	Canino/FL/04
12	K	K	E
12	S	L	L
37	G	G	E
175	R	R	I
374	L	I	I
375	R	R	K
447	Q	Q	H

**Tabela 20.** Diferenças de aminoácidos entre as proteínas PB1 dos vírus influenza eqüinos e caninos H3N8

Posição	Consenso Eqüino*	Canino/FL/03	Canino/FL/04
114	V	I	I
154	D	G	G
221	A	T	T
317	M	I	I
459	I	I	V
682	I	I	V

**Tabela 21.** Diferenças de aminoácidos entre as proteínas PA dos vírus influenza eqüinos e caninos H3N8

Posição	Consenso Eqüino*	Canino/FL/03	Canino/FL/04
27	D	N	N
62	I	V	V
213	R	K	K
337	A	T	T
343	A	E	E
345	L	I	I
353	K	R	R
400	T	T	A
V	I	I	M
M	I	R	R
K	N	D	D

\* Com base nos genes disponíveis dos vírus isolados entre 1963 e 1998.

**Tabela 22.** Diferenças de aminoácidos entre as proteínas NP dos vírus influenza eqüinos e caninos H3N8

Posição	Consenso Eqüino*	Canino/FL/03	Canino/FL/04
16	G	D	D
157	A	T	T
214	R	R	K
285	V	V	I
286	A	T	T
359	A	T	T
375	D	D	N
384	R	K	K
452	R	K	K

**Tabela 23.** Diferenças de aminoácidos entre as proteínas NA dos vírus influenza eqüinos e caninos H3N8

Posição	Consenso Eqüino*	Canino/FL/03	Canino/FL/04
9	A/T	T	A
12	S	F	F
20	L	I	I
40	G	R	R
42	G	D	D
46	N	K	K
52	E	E	K
61	R	K	K
69	N	S	S
72	E	K	K
201	V	I	I
261	I	V	V
301	I	I	V
396	N	D	D
397	L	P	P

**Tabela 24.** Diferenças de aminoácidos entre as proteínas M1 dos vírus influenza eqüinos e caninos H3N8

Posição	Consenso Eqüino*	Canino/FL/03	Canino/FL/04
M1 161	S	S	A
M1 208	K/Q	R	R

\* Com base nos genes disponíveis dos vírus isolados entre 1963 e 1998.

**Tabela 25.** Diferenças de aminoácidos entre as proteínas NS1 dos vírus influenza eqüinos e caninos H3N8

Posição	Consenso Eqüino*	Canino/FL/03	Canino/FL/04
44	K	R	R
59	R	H	H
71	E	K	K
86	A	T	T
88	R	R	L
140	R	G	G
216	P	S	S

\* Com base nos genes disponíveis dos vírus isolados entre 1963 e 1998.

[000241] Deve ser entendido que os exemplos e as modalidades descritos nesse documento são para propósitos ilustrativos somente e que diversas modificações ou alterações levando-se em consideração isso serão sugeridas para as pessoas versadas na técnica e são para serem incluídas no espírito e no escopo deste pedido.

#### REFERÊNCIAS

Patente U.S. Nº 5.106.739

Patente U.S. Nº 5.034.322

Patente U.S. Nº 6.455.760

Patente U.S. Nº 6.696.623

Patente U.S. Nº 4.683.202

Patente U.S. Nº 4.683.195

Patente U.S. Nº 4.800.159

Patente U.S. Nº 4.965.188

Patente U.S. Nº 5.994.056

Patente U.S. Nº 6.814.934

Pedido U.S. Publicado Nº 20040078841

Pedido U.S. Publicado Nº 20040067506

Pedido U.S. Publicado Nº 20040019934

Pedido U.S. Publicado Nº 20030177536

Pedido U.S. Publicado Nº 20030084486

Pedido U.S. Publicado Nº 20040123349

Greyhound Daily News, 28/1/99. National Greyhound Association (NGA), Abilene, Kansas. <http://www.NGAgreyhounds.com>.

Comunicado particular, Dr. William Duggar, veterinário em Palm Beach Kennel Club, West Palm Beach, Flórida.

Altschul, S. F. e outros (1990) "Basic Local Alignment Search Tool" *J Mol. Biol.* 215:402-410.

Altschul, S. F. e outros (1997) "Gapped BLAST and PSI-BLAST: A New Generation of Protein Database Search Programs" *Nucl. Acids Res.* 25:3389-3402.

An, G. (1987) "Binary Ti vectors for plant transformation and promoter analysis" *Methods Enzymol* 153:292-305.

Beltz, G. A., Jacobs, K. A., Eickbush, T. H., Cherbas, P. T., Kafatos, F. C. (1983) "Isolation of multigene families and determination of homologies by filter hybridization methods" *Methods of Enzymology*, R. Wu, L. Grossman e K. Moldave [eds.] Academic Press, Nova York 100:266-285.

Burleson, F. e outros (1992) *Virology: A Laboratory Manual* (Academic Press).

Byars, N.E., A.C. Allison (1987) "Adjuvant formulation for use in vaccines to elicit both cell- mediated and humoral immunity" *Vaccine* 5:223-228.

Crawford, P. C. e col (2005) "Transmission of equine influenza virus to dogs" *Science* 310:482-485.

Chang, C.P. e outros (1976) "Influenza virus isolations from dogs during a human epidemic in Taiwan" *Int J Zoonoses* 3:61-64.

Dacso, CC. e outros (1984) "Sporadic occurrence of zoonotic swine

- influenza virus infections" *J Clin Microbiol* 20:833-835.
- de Boer, H. A., Comstock, L. J., Vasser, M. (1983) "The tac promoter: a functional hybrid derived from the trp and lac promoters" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80(1):21-25.
- Felsenstein, J. (1989) *Cladistics* 5:164.
- Fields e outros (1946) *Fields Virology*, 3<sup>a</sup> ed., editores Lippincott-Raven.
- Ford, R.B., Vaden, S.L. (1998) "Canine infectious tracheobronchitis" Em *Infectious Diseases of the Dog and Cat*, 2<sup>a</sup> edição, C.E. Greene, editor, W.B. Saunders Co., Filadélfia, PA, págs. 33-38.
- Fouchier e col, (2000) *Journal of Clinical Microbiology* 38 (11):4096-4101.
- Good, X. e outros (1994) "Reduced ethylene synthesis by transgenic tomatoes expressing S-adenosylmethionine hydrolase" *Plant Molec. Biol.* 26:781-790.
- Guan, Y. e outros (2004) "H5N1 influenza: a protean pandemic threat" *Proc Natl Acad Sci USA* 101:8156-8161.
- Guo, Y. e outros (1992) "Characterization of a new avian-like influenza A virus from horses in China" *Virology* 188:245-255.
- Houser, R.E. e col (1980) "Evidence of prior infection with influenza A/Texas/77 (H3N2) virus in dogs with clinical parainfluenza" *Can J Comp Med* 44:396-402.
- Karasin, A.I. e outros (2000) "Isolation and characterization of H4N6 avian influenza viruses from pigs with pneumonia in Canada" *J Virol* 74:9322-9327.
- Karlin S. e Altschul, S. F. (1990) "Methods for Assessing the Statistical Significance of Molecular Sequence Features by Using General Scoring Schemes" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:2264-2268.
- Karlin S. e Altschul, S. F. (1993) "Applications and Statistics for Multiple High-Scoring Segments in Molecular Sequences" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5877.

Kawaoka, Y. e col, (1989) "Avian-to-human transmission of the PB1 gene of influenza A viruses in the 1957 and 1968 pandemics" *J Virol* 63:4603-4608.

Keawcharoen, J. e outros (2004) "Avian influenza H5N1 in tigers and leopards" *Emerg Infect Dis* 10:2189-2191.

Kendal, A. P. e outros (1982) Em Concepts and Procedures for Laboratory-based Influenza Surveillance. A. P. Kendal, M. S. Pereira, J. J. Skehel, Eds. (U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention and Pan- American Health Organization, Atlanta, GA, Estados Unidos) págs. B17-B35.

Kilbourne, E.D. e outros (1975) "Demonstration of antibodies to both hemagglutinin and neuraminidase antigens of H3N2 influenza A virus in domestic dogs" *Intervirology* 6:315-318.

Kimura, K. e outros (1998) "Fatal case of swine influenza virus in an immunocompetent host" *Mayo Clin Proc* 73:243-245.

Klimov, A. I. e outros (1992a) "Sequence changes in the live attenuated, cold-adapted variants of influenza A/Leningrad/I 34/57 (H2N2) virus" *Virology* 186:795-797.

Klimov A. e outros (1992b) "Subtype H7 influenza viruses: comparative antigenic and molecular analysis of the HA-, M-, and NS-genes" *Arch Virol*. 122:143-161.

Kovacova, A. e outros (2002) "Sequence similarities and evolutionary relationships of influenza virus A hemagglutinins" *Virus Genes* 24:57-63.

Kuiken, T. e col (2004) "Avian H5N1 influenza in cats" *Science* 306:241.

Kumar, S. e outros (2004) "MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment" *Brief Bioinform* 5:150-163.

Lee, L. G. e outros (1993) "Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes" *Nucleic Acids Res.* 21(16):3761-3766.

- Lewin, B. (1985) Genes II, John Wiley & Sons, Inc., pág. 96.
- Lipatov, A.S. e outros (2004) "Influenza: emergence and control" *J Virol* 78:8951-8959.
- Livak, K. J. e outros (1995) "Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization" *PCR Methods Appl.* 4(6):357-362.
- Maniatis, T., E.F. Fritsch, J. Sambrook (1982) "Nuclease *Ba31*" *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Matrosovich, M. e outros (2000) "Early alterations of the receptor-binding properties of H1, H2, and H3 avian influenza virus hemagglutinins after their introduction into mammals" *J Virol* 74:8502-8512.
- Maertzdorf e col, (2004) *Clin Microbiol.* 42(3):981-986.
- Merrifield, R.B. (1963) "Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide" *J. Amer. Chem. Soc.* 85:2149-2154.
- Nikitin, A. e outros (1972) "Epidemiological studies of A-Hong Kong-68 virus infection in dogs" *Bull World Health Organ* 47:471-479.
- Nobusawa, E. e outros (1991) "Comparison of complete amino acid sequences and receptor-binding properties among 13 serotypes of hemagglutinins of influenza A viruses" *Virology* 182:475-485.
- Patriarca, P. A. e outros (1984) "Lack of significant person-to person spread of swine influenza-like virus following fatal infection in an immunocompromised child" *Am J Epidemiol* 119:152-158.
- Payungporn S. e outros (2006a) "Detection of canine influenza A virus (H3N8) RNA by real-time RT-PCR" (em preparação para o *Journal of Clinical Microbiology*).
- Payungporn S, e outros (2006b) "Isolation and characterization of influenza A subtype H3N8 viruses from dogs with respiratory disease in

a shelter and veterinary clinic in Florida" (em preparação para o *Emerging Infectious Diseases*).

Peiris, M. e outros (1999) "Human infection with influenza H9N2" *Lancet* 354:916-917.

Peiris, J.S. e outros (2004) "Re-emergence of fatal human influenza A subtype H5N1 disease" *Lancet* 363:617-619.

Posnett, D. N. e outros (1988) "A Novel Method for Producing Anti-peptide Antibodies" *J. Biol. Chem.* 263(4):1719-1725.

Putnam, Bob (10 de fevereiro de 1999) "Two illnesses seen in death of dogs" *St. Petersburg Times*.

Reid, A.H. e outros (2004) "Evidence of an absence: the genetic origins of the 1918 pandemic influenza virus" *Nat Rev Microbiol* 2:909-914.

Rowe, T. e outros (1999) "Detection of antibody to avian influenza A (H5N1) virus in human serum by using a combination of serologic assays" *J Clin Microbiol* 37: 937-943.

Saiki, R. (1985) "Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia" *Science* 230:1350-1354.

Sambrook, J. e outros (1989) "Plasmid Vectors" Em: Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2<sup>ª</sup> Edição, págs. 1.82-1.104. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nova York.

Subbarao, K. e outros (1998) "Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness" *Science* 279:393-396.

Suzuki, Y. e col (2000) "Sialic acid species as a determinant of the host range of influenza A viruses" *J Virol* 74:11825-11831.

Tam, J. P. (1988) "Synthetic Peptide Vaccine Design: Synthesis and Properties of a High-Density Multiple Antigenic Peptide System" *PNAS USA* 85(15):5409-5413.

Top, Jr., F.H. e outros (1977) "Swine influenza A at Fort Dix, New

Jersey (January-February 1976). IV. Summary and speculation" *J Infect Dis* 136 Supl:S376-S380.

Vines, A. e outros (1998) "The role of influenza A virus hemagglutinin residues 226 and 228 in receptor specificity and host range restriction" *J Virol* 72:7626-7631.

Wagner, R. e outros (2002) "N-Glycans attached to the stem domain of haemagglutinin efficiently regulate influenza A virus replication" *J Gen Virol* 83:601-609.

Webby, R. e outros (2004) "Molecular constraints to interspecies transmission of viral pathogens" *Nat Med* 10: S77-S81.

Webster, R.G. (1998) "Influenza: an emerging disease" *Emerg Infect Dis* 4:436-441.

Webster, R.G. e outros (1992) "Evolution and ecology of influenza A viruses" *Microbiol Rev* 56:152-179.

Weis, W. e outros (1988) "Structure of the influenza virus haemagglutinin complexed with its 35 receptor, sialic acid" *Nature* 333:426-431.

Womble, D.D. (2000) "GCG: The Wisconsin Package of sequence analysis programs" *Methods Mol Biol* 132:3-22.

Xu, D., McElroy, D., Thornburg, R. W., Wu, R. e outros (1993) "Systemic induction of a potato pin2 promoter by wounding, methyl jasmonate, and abscisic acid in transgenic rice plants" *Plant Molecular Biology* 22:573-588.

Yang, T. T. e outros (1996) "Optimized Codon Usage and Chromophore Mutations Provide Enhanced Sensitivity with the Green Fluorescent Protein" *Nucleic Acid Research* 24(22):4592-4593.

Yoon K-Y. e outros (2005) "Influenza virus infection in racing greyhounds" *Emerg Infect Dis* 11:1974-1975.

## REIVINDICAÇÕES

1. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende um vírus influenza e um veículo ou adjuvante farmaceuticamente aceitável,

em que o referido vírus influenza é vírus influenza isolado do tipo A que é capaz de infectar um animal canídeo,

em que o referido vírus influenza compreende polipeptídeos em que o referido vírus influenza compreende polipeptídeos o referido vírus influenza compreende um polinucleotídeo tendo a sequência de nucleotídeos mostrada em qualquer uma das SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 e 15 (Florida/43/04); SEQ ID NOs: 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29 e 31 (Florida/242/03); SEQ ID NOs: 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59 e 61 (Miami/2005); ou SEQ ID NOs: 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75 e 77 (Jacksonville/2005); ou uma sequência de nucleotídeos degenerada da mesma codificando a mesma sequência de aminoácidos,

em que o referido veículo ou adjuvante é selecionado dentre solução salina, óleo mineral, etanol, dimetilsulfóxido, gelatina, ciclodextranos, estearato de magnésio, dextrose, celulose, açúcares, carbonato de cálcio, glicerol, alumina, amido, dipeptídeo treonil muranil (MDP), saponina, adjuvante completo de Freund e adjuvante incompleto de Freund,

em que a matéria reivindicada na patente BR122018012345-1 é excluída.

2. Composição de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o referido vírus influenza tem um sorotipo de HA de H3 ou H5.

3. Composição de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o referido vírus influenza tem o sorotipo H3N8.

4. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende um polinucleotídeo isolado e um veículo ou adjuvante farmaceuticamente aceitável,

em que o referido polinucleotídeo tem a sequência de nucleotídeos mostrada em qualquer uma das SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, ou 77, ou uma sequência de nucleotídeos degenerada da mesma codificando a mesma sequência de aminoácidos,

em que o referido veículo ou adjuvante é selecionado dentre solução salina, óleo mineral, etanol, dimetilsulfóxido, gelatina, ciclodextranos, estearato de magnésio, dextrose, celulose, açúcares, carbonato de cálcio, glicerol, alumina, amido, dipeptídeo treonil muranil (MDP), saponina, adjuvante completo de Freund e adjuvante incompleto de Freund,

em que a matéria reivindicada na patente BR122018012345-1 é excluída.

5. Composição de acordo com a reivindicação 4, caracterizada pelo fato de que o referido polinucleotídeo compreende um gene de influenza selecionado a partir do grupo que consiste em um gene de neuraminidase, um gene de nucleoproteína, um gene de proteína de matriz, um gene de proteína básica de polimerase, um gene de proteína ácida de polimerase, um gene de proteína não estrutural, e um gene de hemaglutinina.

6. Construção de expressão de polinucleotídeo, caracterizada pelo fato de que compreende um polinucleotídeo operativamente ligado a um promotor heterólogo,

em que o referido polinucleotídeo tem a sequência de nucleotídeos mostrada em qualquer uma das SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61,

63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, ou 77, ou uma sequência de nucleotídeos degenerada da mesma codificando a mesma sequência de aminoácidos,

em que a matéria reivindicada na patente BR122018012345-1 é excluída.

7. Oligonucleotídeo, caracterizado pelo fato de que compreende uma sequência de nucleotídeos mostrada em qualquer uma das SEQ ID NOs: 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, ou 88, em que o referido oligonucleotídeo compreende molécula repórter ou marca detectável,

em que a matéria reivindicada na patente BR122018012345-1 é excluída.

8. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende um polipeptídeo isolado e um veículo ou adjuvante farmaceuticamente aceitável,

em que o referido polipeptídeo possui a sequência de aminoácidos mostrada em qualquer uma das SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 33, 34, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, ou 78,

em que o referido veículo ou adjuvante é selecionado dentre solução salina, óleo mineral, etanol, dimetilsulfóxido, gelatina, ciclodextranos, estearato de magnésio, dextrose, celulose, açúcares, carbonato de cálcio, glicerol, alumina, amido, dipeptídeo treonil muranil (MDP), saponina, adjuvante completo de Freund e adjuvante incompleto de Freund,

em que a matéria reivindicada na patente BR122018012345-1 é excluída.

9. Composição de acordo com a reivindicação 8, caracterizada pelo fato de que o referido polipeptídeo é selecionado a partir do grupo que consiste em uma proteína hemaglutinina, uma

proteína neuraminidase, uma nucleoproteína, uma proteína de matriz, uma proteína básica de polimerase, uma proteína ácida de polimerase, e uma proteína não estrutural.

10. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizada pelo fato de que é para induzir uma resposta imune em um animal canídeo contra um vírus influenza,

em que o referido vírus influenza compreende polipeptídeos tendo a sequência de aminoácidos mostrada nas SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 e 16 ou 33 (Florida/43/04); SEQ ID NOs: 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30 e 32 ou 34 (Florida/242/03); SEQ ID NOs: 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60 e 62 (Miami/2005); ou SEQ ID NOs: 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, ou 78 (Jacksonville/2005); e/ou

o referido vírus influenza compreende um polinucleotídeo tendo a sequência de nucleotídeos mostrada em qualquer uma das SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 e 15 (Florida/43/04); SEQ ID NOs: 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29 e 31 (Florida/242/03); SEQ ID NOs: 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59 e 61 (Miami/2005); ou SEQ ID NOs: 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75 e 77 (Jacksonville/2005); ou uma sequência de nucleotídeos degenerada da mesma codificando a mesma sequência de aminoácidos.

11. Composição de acordo com a reivindicação 10, caracterizada pelo fato de que a referida resposta imune é uma resposta imune protetora que impede ou inibe a infecção do referido animal por um vírus influenza.

12. Composição de acordo com a reivindicação 10, caracterizada pelo fato de que o referido animal canídeo é um cão domesticado.

13. Composição de acordo com a reivindicação 10, caracterizada pelo fato de que é para ser administrada parenteralmente.

14. Composição de acordo com a reivindicação 13, caracterizada pelo fato de é para ser administrada de modo subcutâneo, intraperitoneal, ou intramuscular.

15. Composição de acordo com a reivindicação 10, caracterizada pelo fato de que é para ser administrada de modo nasal ou oral.

16. Micro-organismo transgênico, caracterizado pelo fato de que compreende um vírus influenza ou um polinucleotídeo,

em que o referido vírus influenza compreende polipeptídeos tendo a sequência de aminoácidos mostrada nas SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 e 16 ou 33 (Florida/43/04); SEQ ID NOs: 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30 e 32 ou 34 (Florida/242/03); SEQ ID NOs: 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60 e 62 (Miami/2005); ou SEQ ID NOs: 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, ou 78 (Jacksonville/2005); e/ou o referido vírus influenza compreende um polinucleotídeo tendo a sequência de nucleotídeos mostrada em qualquer uma das SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 e 15 (Florida/43/04); SEQ ID NOs: 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29 e 31 (Florida/242/03); SEQ ID NOs: 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59 e 61 (Miami/2005); ou SEQ ID NOs: 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75 e 77 (Jacksonville/2005); ou uma sequência de nucleotídeos degenerada da mesma codificando a mesma sequência de aminoácidos,

em que o referido polinucleotídeo tem a sequência de nucleotídeos mostrada em qualquer uma das SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, ou 77, ou uma sequência de nucleotídeos degenerada da mesma codificando a mesma sequência de aminoácidos,

em que a matéria reivindicada na patente BR122018012345-1 é excluída.

17. Método para a detecção de um vírus influenza que é

capaz de infectar um animal canídeo, caracterizado pelo fato de que compreende obter uma amostra biológica de um animal e examinar a referida amostra quanto à presença de um anticorpo ou um ligante que se liga a uma proteína, polipeptídeo, ou peptídeo de um vírus influenza,

em que o referido vírus influenza compreende polipeptídeos tendo a sequência de aminoácidos mostrada nas SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 e 16 ou 33 (Florida/43/04); SEQ ID NOs: 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30 e 32 ou 34 (Florida/242/03); SEQ ID NOs: 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60 e 62 (Miami/2005); ou SEQ ID NOs: 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, ou 78 (Jacksonville/2005); e/ou o referido vírus influenza compreende um polinucleotídeo tendo a sequência de nucleotídeos mostrada em qualquer uma das SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 e 15 (Florida/43/04); SEQ ID NOs: 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29 e 31 (Florida/242/03); SEQ ID NOs: 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59 e 61 (Miami/2005); ou SEQ ID NOs: 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75 e 77 (Jacksonville/2005); ou uma sequência de nucleotídeos degenerada da mesma codificando a mesma sequência de aminoácidos,

em que as proteínas virais de superfície de influenza são hemaglutinina, neuraminidase e proteínas de matriz,

em que a matéria reivindicada na patente BR122018012345-1 é excluída.

18. Método para a detecção de um vírus influenza que é capaz de infectar um animal canídeo, caracterizado pelo fato de que compreende obter uma amostra de ácido nucléico de um animal, e contatar a referida amostra de ácido nucléico com um oligonucleotídeo como definido na reivindicação 7, e determinar se o referido oligonucleotídeo hibridiza sob condições rigorosas com o referido ácido nucléico,

em que as proteínas virais de superfície de influenza são hemaglutinina, neuraminidase e proteínas de matriz,

em que a matéria reivindicada na patente BR122018012345-1 é excluída.

19. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende um vírus reagrupado (“reassortant”) e um veículo ou adjuvante farmaceuticamente aceitável,

em que o referido vírus reagrupado que compreende pelo menos um gene, ou um polinucleotídeo de um vírus influenza,

em que o referido vírus influenza compreende polipeptídeos tendo a sequência de aminoácidos mostrada nas SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 e 16 ou 33 (Florida/43/04); SEQ ID NOs: 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30 e 32 ou 34 (Florida/242/03); SEQ ID NOs: 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60 e 62 (Miami/2005); ou SEQ ID NOs: 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, ou 78 (Jacksonville/2005); e/ou o referido vírus influenza compreende um polinucleotídeo tendo a sequência de nucleotídeos mostrada em qualquer uma das SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 e 15 (Florida/43/04); SEQ ID NOs: 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29 e 31 (Florida/242/03); SEQ ID NOs: 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59 e 61 (Miami/2005); ou SEQ ID NOs: 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75 e 77 (Jacksonville/2005); ou uma sequência de nucleotídeos degenerada da mesma codificando a mesma sequência de aminoácidos,

em que o referido veículo ou adjuvante é selecionado dentre solução salina, óleo mineral, etanol, dimetilsulfóxido, gelatina, ciclodextranos, estearato de magnésio, dextrose, celulose, açúcares, carbonato de cálcio, glicerol, alumina, amido, dipeptídeo treonil muranil (MDP), saponina, adjuvante completo de Freund e adjuvante incompleto de Freund,

em que a matéria reivindicada na patente BR122018012345-1 é excluída.

20. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende um vírus isolado e um veículo ou adjuvante

farmaceuticamente aceitável,

em que o referido vírus isolado compreende um ou mais polinucleotídeos, em que o referido um ou mais polinucleotídeo codifica uma proteína de vírus influenza canino, selecionada dentre o grupo que consiste em HA, NA, NP, MA, PB1, PB2, PA, e NS,

em que a referida proteína HA tem uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 16, 32, 33, 34, 62, e 78, e

em que o referido veículo ou adjuvante é selecionado dentre solução salina, óleo mineral, etanol, dimetilsulfóxido, gelatina, ciclodextranos, estearato de magnésio, dextrose, celulose, açúcares, carbonato de cálcio, glicerol, alumina, amido, dipeptídeo treonil muranil (MDP), saponina, adjuvante completo de Freund e adjuvante incompleto de Freund,

em que a matéria reivindicada na patente BR122018012345-1 é excluída.

21. Composição de acordo com a reivindicação 20, caracterizada pelo fato de que o referido um ou mais polinucleotídeos compreende uma sequência de nucleotídeos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, e 77, ou uma sequência de nucleotídeos degenerada da mesma codificando a mesma sequência de aminoácidos.

22. Composição de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de que a referida proteína NA tem uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 12, 28, 58, e 74.

23. Composição de acordo com a reivindicação 20, caracterizada pelo fato de que a referida proteína NP tem uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste

nas SEQ ID NOs: 10, 26, 56, e 72.

24. Composição de acordo com a reivindicação 20, caracterizada pelo fato de que a referida proteína MA tem uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 14, 30, 60, e 76.

25. Composição de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de que a referida proteína PB1 tem uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 4, 20, 50, e 66.

26. Composição de acordo com a reivindicação 20, caracterizada pelo fato de que a referida proteína PB2 tem uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 2, 18, 48, e 64.

27. Composição de acordo com a reivindicação 20, caracterizada pelo fato de que a referida proteína PA tem uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 6, 22, 52, e 68.

28. Composição de acordo com a reivindicação 20, caracterizada pelo fato de que a referida proteína NS tem uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 8, 24, 54, e 70.

29. Método para a detecção de um vírus influenza que é capaz de infectar um animal canídeo, caracterizado pelo fato de que compreende obter uma amostra contendo ácido nucléico de um animal, e contatar a referida amostra de ácido nucléico com um iniciador de oligonucleotídeo senso (“forward”) e antissenso (“reverse”) que se liga especificamente a uma sequência de polinucleotídeo ou gene do referido vírus, sob condições suficientes para a geração de um produto de amplificação, se o ácido nucléico contiver uma sequência à qual os referidos iniciadores se ligam; e detectar o referido produto de

amplificação,

em que as proteínas virais de superfície de influenza são hemaglutinina, neuraminidase e proteínas de matriz,

em que a matéria reivindicada na patente BR122018012345-1 é excluída.

30. Método de acordo com a reivindicação 29, caracterizado pelo fato de que o referido iniciador de oligonucleotídeo é um oligonucleotídeo como definido na reivindicação 7.

31. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende um vírus influenza e um veículo ou adjuvante farmaceuticamente aceitável,

em que o referido vírus influenza compreende:

(a) um polipeptídeo hemaglutinina (HA) compreendendo a sequência de aminoácidos de em qualquer uma de SEQ ID NOs: 16, 32, 33 ou 34; ou

(b) um polinucleotídeo compreendendo a sequência de nucleotídeos mostrada em qualquer uma de SEQ ID NOs: 15 ou 31, ou uma sequência de nucleotídeos degenerada da mesma codificando a mesma sequência de aminoácidos

em que o referido veículo ou adjuvante é selecionado dentre solução salina, óleo mineral, etanol, dimetilsulfóxido, gelatina, ciclodextranos, estearato de magnésio, dextrose, celulose, açúcares, carbonato de cálcio, glicerol, alumina, amido, dipeptídeo treonil muranil (MDP), saponina, adjuvante completo de Freund e adjuvante incompleto de Freund,

em que a matéria reivindicada na patente BR122018012345-1 é excluída.

32. Composição de acordo com a reivindicação 31, caracterizada pelo fato de que o polinucleotídeo compreende a sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 15 ou SEQ ID NO: 31, ou

uma sequência de nucleotídeos degenerada da mesma codificando a mesma sequência de aminoácidos.

33. Composição de acordo com a reivindicação 31, caracterizada pelo fato de que o polipeptídeo compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 33 ou SEQ ID NO: 34.

34. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende um polinucleotídeo e um veículo ou adjuvante farmaceuticamente aceitável,

em que o referido polinucleotídeo compreende uma sequência de nucleotídeos mostrada em qualquer uma de SEQ ID NO: 15 ou 31, ou uma sequência de nucleotídeos degenerada da mesma codificando a mesma sequência de aminoácidos,

em que o referido veículo ou adjuvante é selecionado dentre solução salina, óleo mineral, etanol, dimetilsulfóxido, gelatina, ciclodextranos, estearato de magnésio, dextrose, celulose, açúcares, carbonato de cálcio, glicerol, alumina, amido, dipeptídeo treonil muranil (MDP), saponina, adjuvante completo de Freund e adjuvante incompleto de Freund,

em que a matéria reivindicada na patente BR122018012345-1 é excluída.

35. Composição de acordo com a reivindicação 34, caracterizada pelo fato de que o referido polipeptídeo compreende a sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 15 ou SEQ ID NO: 31.

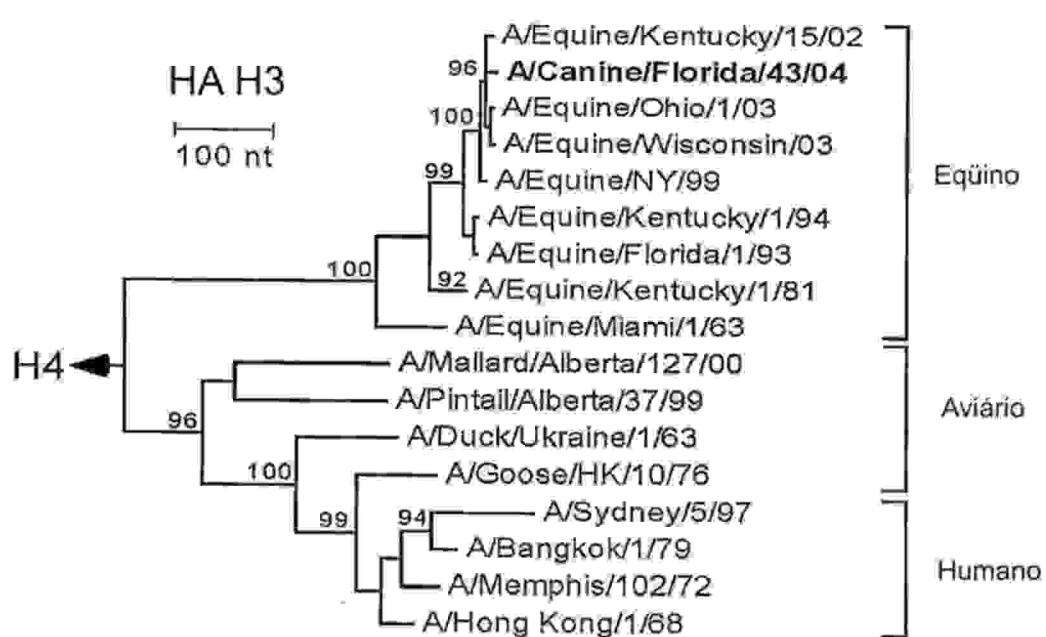


FIG. 1A

2/9

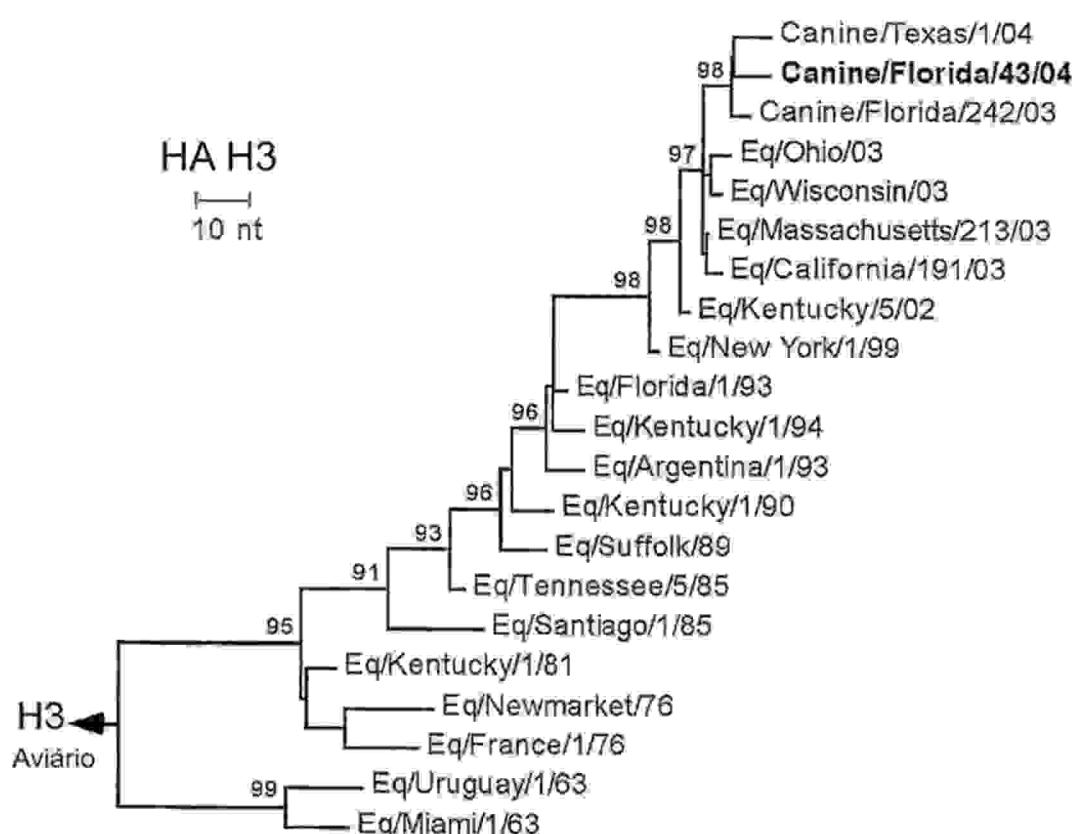


FIG. 1B

3/9

FIG. 2A



FIG. 2B



4/9



FIG. 3A



FIG. 3B

5/9

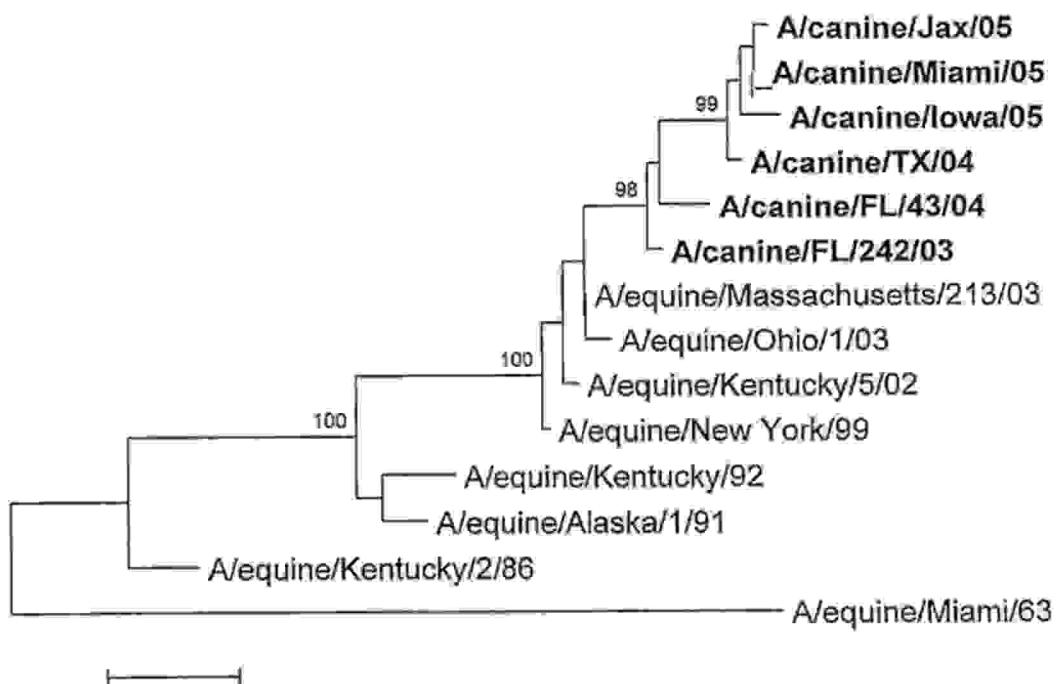


FIG. 4A

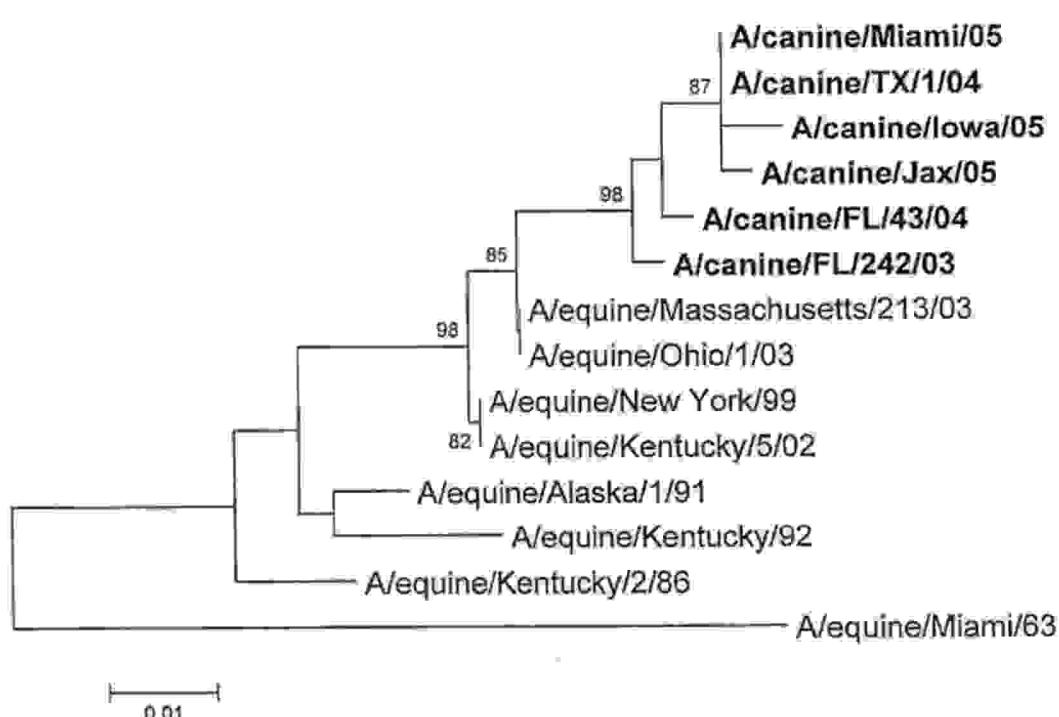


FIG. 4B

6/9

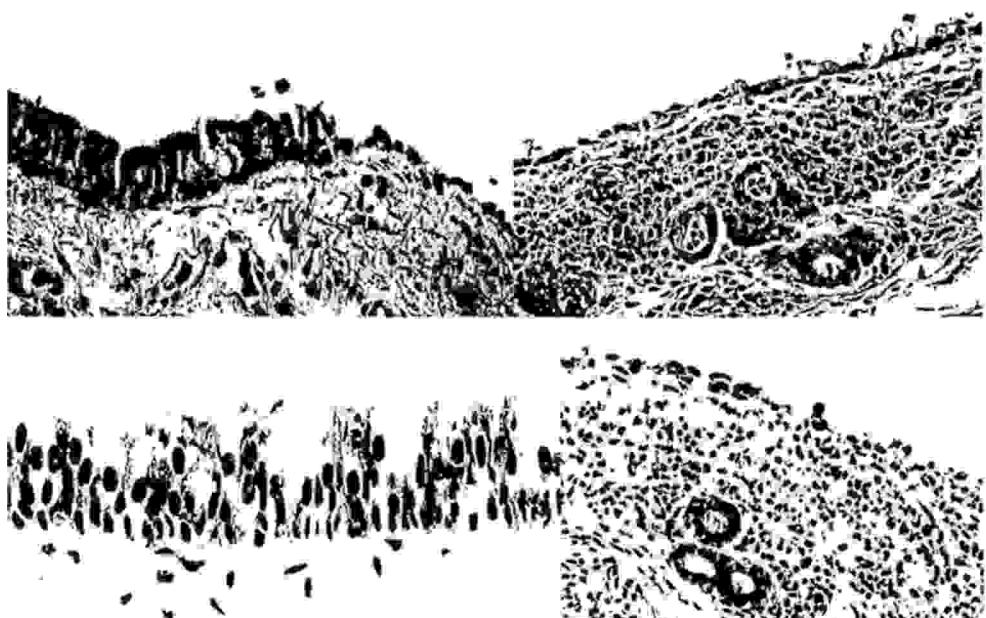


FIG. 5

7/9

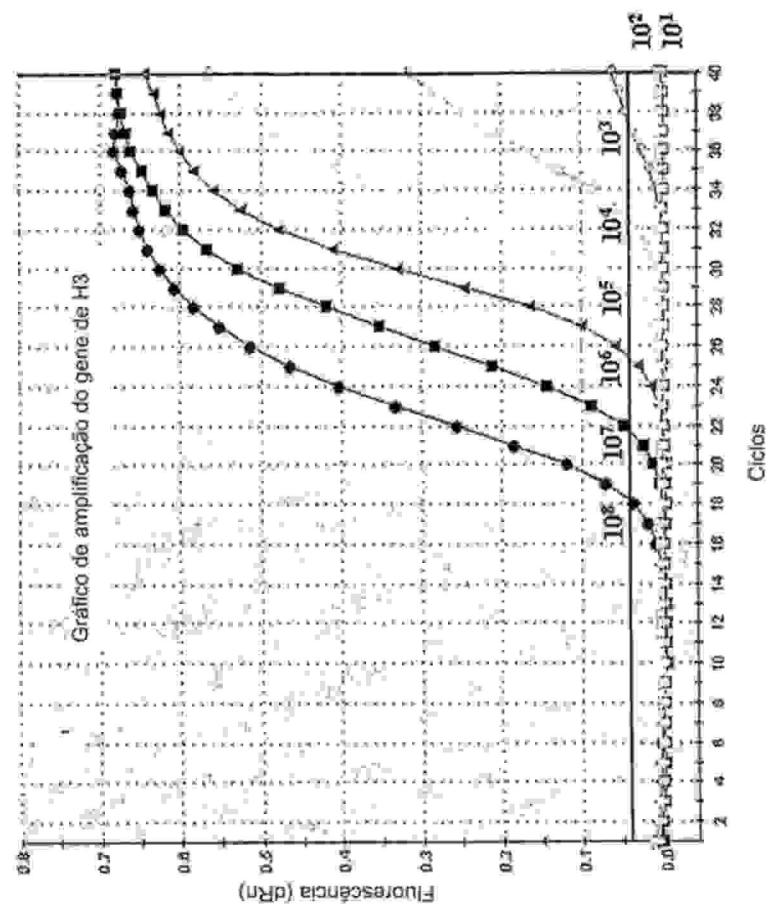


FIG. 6B

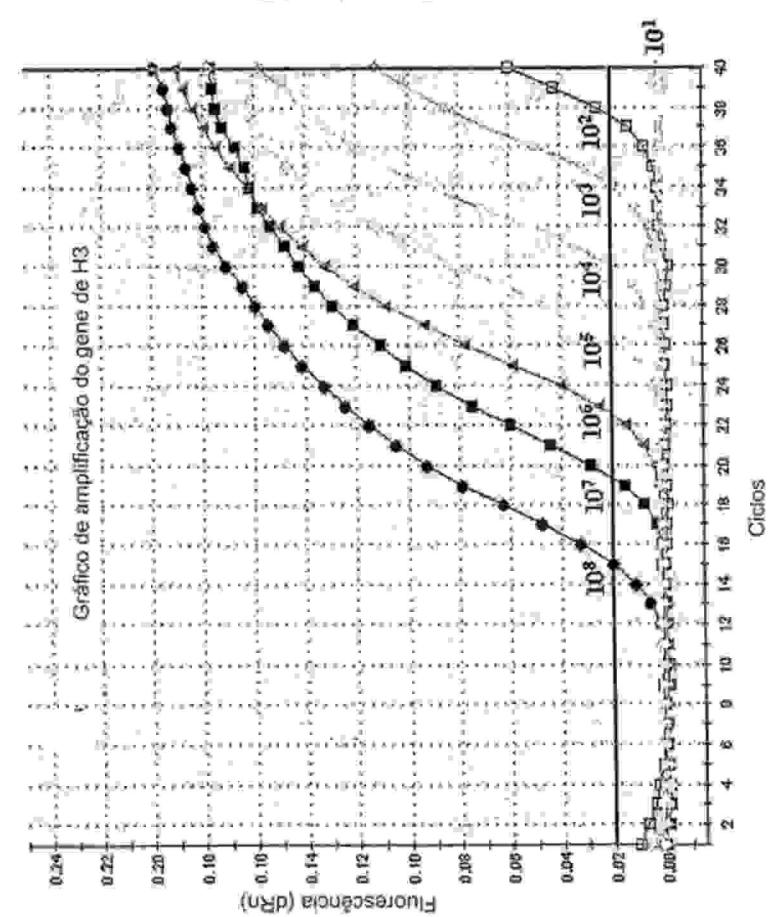


FIG. 6A

8/9

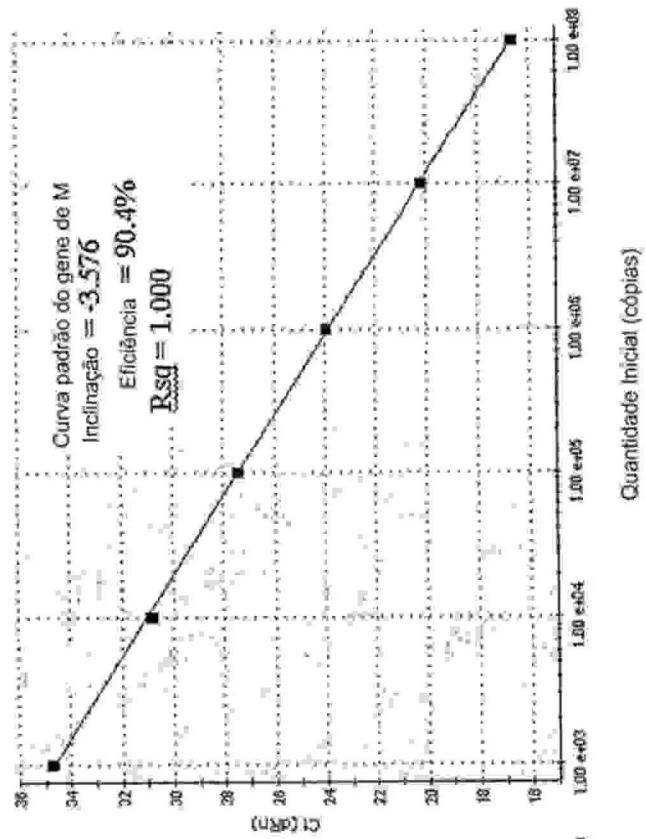


FIG. 6D

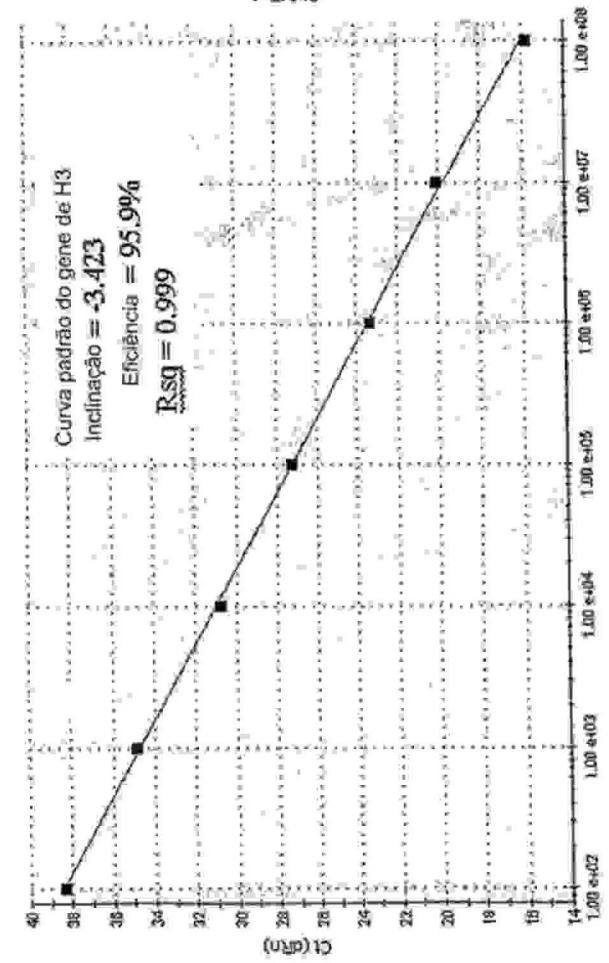


FIG. 6C

9/9

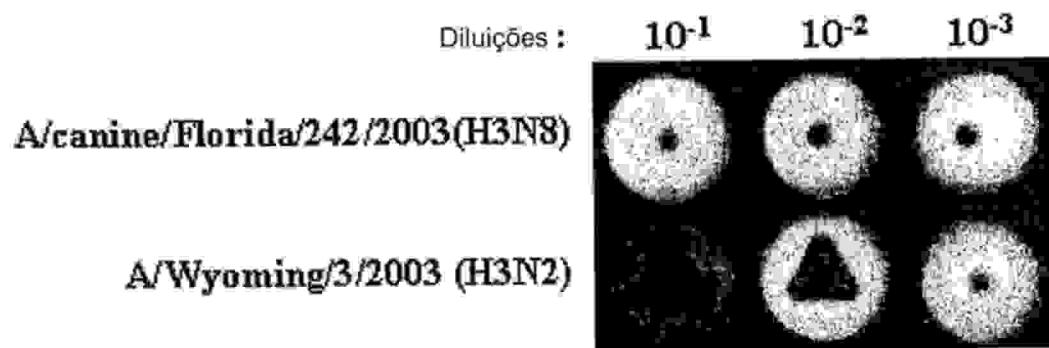


FIG. 7