

MEMÓRIA DESCRITIVA

DA

PATENTE DE INVENÇÃO

Nº 95 165

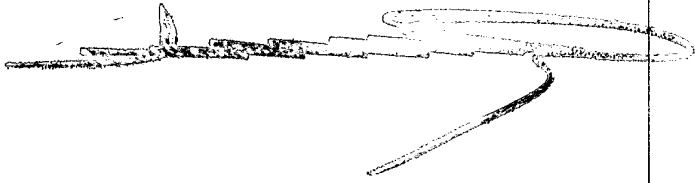
NOME: Behringwerke Aktiengesellschaft, alemã, com sede em D-3550 Marburg, Alemanha Ocidental

EPÍGRAFE: "PROCESSO PARA A IDENTIFICAÇÃO DO VÍRUS DA INFLUENZA A POR MEIO DE REACÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE (PCR) APÓS TRANSCRIPÇÃO REVERSA DE UMA REGIÃO DO GENE VIRAL DA HEMAGLUTININA"

INVENTORES: Dr. Peter A. Ceruti e Albéric Bressoud, residentes na Suíça

Reivindicação do direito de prioridade ao abrigo do artigo 4º da Convenção da União de Paris de 20 de Março de 1883.

Alemanha 2 de Setembro de 1989, sob o Nº.P39 29 144.8.



Descrição referente à patente de invenção de BEHRINGWERKE AKTIENGESSELLSCHAFT, alemã, industrial e comercial, com sede em D-3550 Marburg, Alemanha Ocidental, (inventores: Dr. Peter A. Ceruti e Albéric Bressoud, residentes na Suíça), para "PROCESSO PARA A IDENTIFICAÇÃO DO VÍRUS DA INFLUENZA A POR MEIO DE REACÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE (PCR) APÓS TRANSCRIPÇÃO REVERSA DE UMA REGIÃO DO GENE VIRAL DA HEMAGLUTININA"

D E S C R I Ç Ã O

A sensibilidade da identificação do vírus da Influenza A pode ser efectivamente aumentada, efectuando uma reacção em cadeia de polimerase (PCR) após transcrição reversa (RT) preliminar, utilizando sequências de oligonucleótidos (amplímeros) da região de certo modo conservada do gene viral da hemaglutinina. Nestas condições, a transcrição reversa e a PCR são insensíveis a mutações isoladas por troca de bases, desde que o extremo 3' dos amplímeros não esteja afectado.

O vírus da influenza A ocorre em seres humanos e também em animais como hospedeiros específico e é a causa de pandemias que se manifestam com grandes intervalos. As pandemias são desencadeadas pela troca de antígenos do vírus da influenza A. Formam-se novas variantes de antígeno, contra as quais a população não tem qualquer imunidade, e que por essa



razão alastram rapidamente, estando por isso ligadas a uma elevada mortalidade.

Por esta razão é tão importante uma identificação rápida e fiável da infecção pelo virus da influenza A. Em geral tenta-se fazer o diagnóstico laborial através da identificação do virus. A cultura do virus da influenza consegue-se aliás apenas nos primeiros dias da doença.

Após inoculação da secreção ou faríngea em culturas celulares de rim de macaco verifica-se a multiplicação do virus pela hemo-adsorção de eritrócitos de porquinhos da Índia. A especificidade pode testar-se pela inibição da hemo-adsorção por um soro imunológico específico. Nem sempre se verifica um efeito citopático. Existem estirpes de virus da influenza que se podem isolar facilmente por inoculação na cavidade amniótica do ovo de galinha embrionado.

Têm-se efectuado pesquisas no sentido de se conseguir também um diagnóstico rápido da influenza. Para este fim coloca-se o exsudado naso-faríngeo num suporte e identifica-se o antigene do virus por imunofluorescência directa ou indirecta utilizando soros imunológicos específicos. Este teste leva apenas poucas horas, mas não é muitas vezes suficientemente sensível, especialmente quando se recolhe a amostra demasiado tarde.

Existe deste modo a necessidade de melhorar a sensibilidade dos métodos de identificação de virus para o virus da influenza A.

Descobriu-se que, por meio de transcrição reversa seguida de amplificação por reacção em cadeia de polimerase através de oligonucleótidos adequados a partir de uma região conservada do gene viral da hemaglutinina, no quarto segmento do genoma do virus, se pode aumentar apreciavelmen-

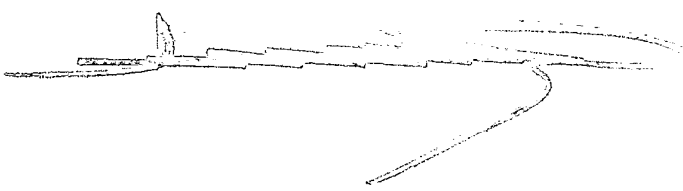
te a sensibilidade da identificação do antigene. As trocas de bases dentro da zona dos oligonucleótidos mencionados acima (amplímeros) não têm qualquer influência desde que os extremos 3' dos amplímeros não sejam afectados. Para a transcrição reversa e amplificação revelou-se mais adequada a zona da posição 96 até à posição 536 da hemaglutinina H1, sendo contudo também apropriadas as regiões afastadas ± 80 nucleótidos das posições indicadas. A escolha do gene de hemaglutinina H1 e em especial desta região tem a vantagem de, tirando as excepções acima mencionadas, abranger todos os serotipos do virus da influenza A.

A invenção refere-se assim a um método de identificação do virus da influenza A por transcrição reversa de uma região do gene da hemaglutinina H1, seguida de amplificação por PCR utilizando os amplímeros empregues na RT e subsequente identificação do cDNA amplificado, de preferência por identificação directa por coloração após separação por electroforese de gel. Pode também identificar-se contudo o cDNA amplificado por radioisótopos ou por ELISA, desde que se empreguem trifosfatos de desoxiribonucleósido previamente radiomarcados ou biotinilados. Os amplímeros escolheram-se como oligonucleótidos com um comprimento de cerca de 20 nucleótidos na região da posição 96 à 536 do gene da hemaglutinina H1. A PCR efectua-se de preferência a 59°C e 91°C e ciclos de cerca de um minuto, muito em especial durante 97 segundos e a 59°C e 85 segundos e 91°C, na presença de trifosfatos de desoxiribonucleósido 1 mM, 3% de sulfoxido dimetilico e 0,8 ug de cada amplímeros num volume total de 25 ul.

A invenção encontra-se descrita nos exemplos seguintes e nas reivindicações da patente.

EXEMPLO:

1. Isolamento de DNA viral



Extraíram-se três vezes com uma solução ácida de guanidina-tiocianato-fenol-clorofórmio suspensões de vírus de influenza H1 (A/WSN/33) em PBS com 0,2% de albumina (1) ou de 28 lavagens naso-faríngeas presumivelmente infectadas (2) ou de vírus de células infectadas após tratamento de ultra-sons (3) (P. Chomczynski e N. Sacchi, 1987, Analytical Biochemistry, 162, 156-159). Precipitou-se o RNA viral na presença de um veículo ("carrier") de t-RNA (1 µg/ml) por adição de 2,5 volumes de etanol a 90% tamponizado a -20°C. Após centrifugação levou-se o precipitado com etanol a 80% tamponizado, secou-se e ressuspendeu-se em água esterilizada. O tratamento por ultra-sons em (3) efectuou-se em óleo de parafina durante 15 segundos, no passo 2, com um aparelho de ultra-sons B15.

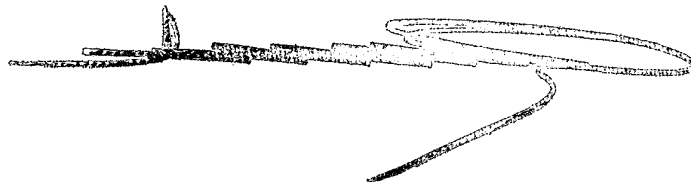
2. Transcrição reversa

A transcrição reversa efectuou-se a 42°C durante 30 minutos num volume total de 5 µl. Esse volume continha, num tampão de Tris 50 mM em HCl a pH 8,3, 50 mM KCl, 7 mM MgCl₂, 170 µg/ml de BSA, 1 mM de dATP, dTTP, dCTP e dGTP cada, 0,1% de Triton-X-100, 1 mM DTT e 10 mM de 2-mercaptoetanol (tampão A), 0,4 µg de cada um dos dois amplímeros, 7 U de transcriptase reversa AMV (Pharmacia) e 10 U de RNAsina (Promega).

3. Amplificação por PCR

O cDNA obtido acima amplificou-se do seguinte modo: a 25 µl de volume total em tampão A sem Triton-X-100 e DTT mas com 3% de DMSO e 0,8 µg de cada amplímero, adicionou-se 1 U de polimerase Taq (Biofinex, Praroman, Fribourg (Suíça)).

Fez-se a amplificação em 30 a 40 ciclos com um aparelho Ampligene (Moretronic, Suíça) a 59°C (97 segundos cada) e 91°C (85 segundos cada).



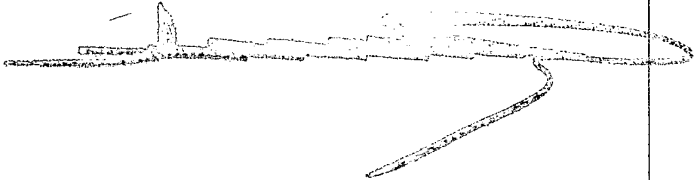
4. Identificação do cDNA amplificado

Identificaram-se as amostras amplificadas num gel de agarose a 2% em Tris-HCl 2 mM, a pH 7,4, 0,1 mM EDTA e 0,7 µg/ml de brometo de etídio, sob irradiação ultravioleta.

A tabela mostra (com sublinhado) as posições dos amplímeros utilizados, sintetizados num sintetizador de DNA (Bio Applied Systems) e purificados numa coluna de Sephadex NEP-24.

A figura mostra os resultados de um ensaio modelo, representando-se em abcissas as diluições (10^{-2} a 10^{-6}) da suspensão de vírus utilizada e em ordenadas a intensidade das bandas do gel de agarose com o comprimento de 441 pares de bases (bp).

Em 28 lavagens nasofaríngicas frescas, de pessoas possivelmente infectadas, identificaram-se por duas vezes as bandas de 441 bp.. Para controle interno co-amplificou-se em cada caso um fragmento, com o comprimento de 201 bp, do gene de β -globulina celular (posição 717 a 926, vide J.C. Schimenti e C.H. Duncan, Nucl. Acids Res. 12, 1984, 1641-1653).



REIVINDICAÇÕES

- 1ª -

Processo para a identificação do vírus da influenza A, caracterizado por se submeterem amplímeros da região conservada do gene H1 da hemaglutinina a uma transcrição reversa (RT) seguida de uma reacção em cadeia de polimerase (PCR).

- 2ª -

Processo para a identificação do vírus da influenza A, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por como amplímeros se utilizarem oligonucleótidos com um comprimento de cerca de 20 pares de bases (bp) da posição 96 $\pm$ 80 e 536 $\pm$ 80.

- 3ª -

Processo para a identificação do vírus da influenza A, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por como amplímeros se utilizarem oligonucleótidos de cerca de 20 bp da posição 96 $\pm$ 20 e 536 $\pm$ 20.

- 4ª -

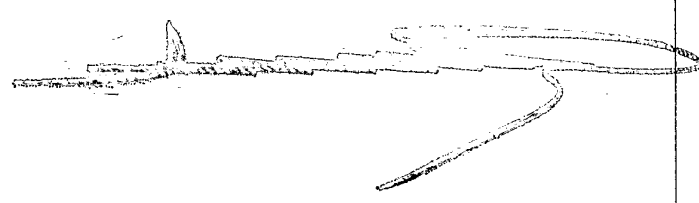
Processo para a identificação do vírus da influenza A, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por se utilizarem os amplímeros AUAGGCUA CCAUGCGAA CAA e GAAAUUU-GCUAUGG CUGA CG.

A requerente reivindica a prioridade do
pedido alemão apresentado em 2 de Setembro de 1989, sob o nº.
P 39 29 144.8.

Lisboa, 31 de Agosto de 1990

O AGENTE GERAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

A handwritten signature in dark ink, consisting of a series of loops and a long horizontal stroke.

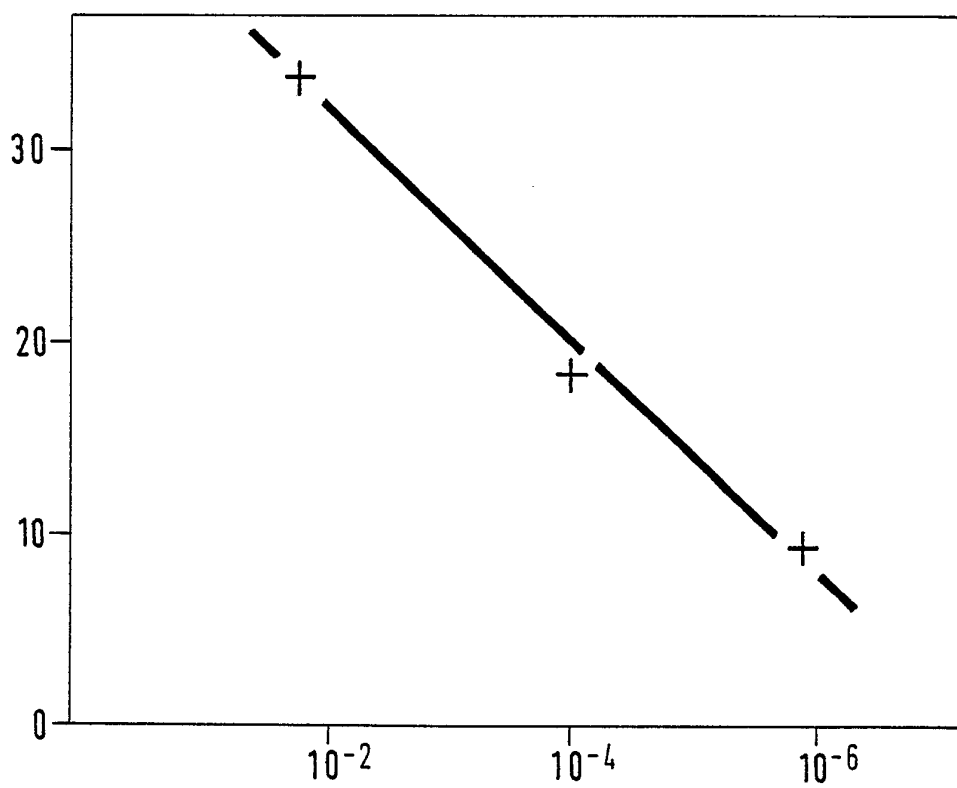
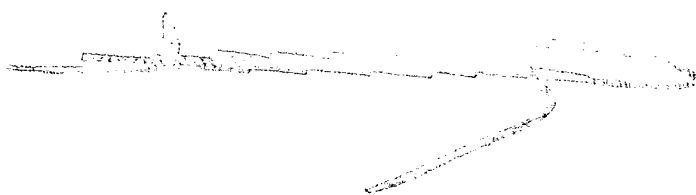


R E S U M O

"PROCESSO PARA A IDENTIFICAÇÃO DO VÍRUS DA INFLUENZA A POR MEIO DE REACÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE (PCR) APÓS TRANSCRIPÇÃO DE UMA REGIÃO DO GENE VIRAL DA HEMAGLUTININA"

A invenção refere-se a um processo para a identificação do vírus da influenza A, que compreende submeter-se amplímeros da região conservada do gene H1 da hemaglutibina a uma transcrição reversa (RT) seguida de uma reacção em cadeia de polimerase (PCR).

•
•
•



Tabela

44 CCUACTUGGUCCUGUU AUGUGCACUUGCAGC UGCAGAUGCAGACAC
89 AAUAUGJAUAGGCCUA CCAUGCGAACA AUUC AACCGACACTUGUUGA
134 CACAGUACUCGAGAA GAAUGUGACAGUGAC ACACUCUGUUAACCU
179 GCUCGAAGACAGCCA CAACGGAAAACUAUG UAGAUA AAAAGGAU
224 AGCCCCACUACAAU GGGGAA AUGUAACA U CGCCGGAUGGCUCU
269 GGGAAACCCAGAAUG CGACCCACUGCUUCC AGUGAGAUCAUGGUC
314 CUACAUTUGUAGAAAC ACCAAACUCUGAGAA UGGAAUAUGUUAUCC
359 AGGAGAUUUCAUCCA CUAUGAGGAGCTUGAG GGAGCAAUUGAGCTC
404 AGUGUCAUCAUUCGA AAGAUUCGAAAUAU UCCCAAAGAAAGCUC
449 AUGGCCCAACCACAA CACAAACGGAGUAAC GGCAGCAUGCUCCCA
494 UGAGGGGAAAAGCAG UUUUUA CAGAAAUUU GUUAUGGCUGACGGA
539 GAAGGAGGGCUCAUA CCCAAAGCUGAAAAA UUCTUAUGUGAACAA