REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA, COMÉRCIO E SERVIÇOS
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº BR 102016020617-0

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito: BR 102016020617-0

(22) Data do Depósito: 06/09/2016

(43) Data da Publicação Nacional: 20/03/2018

(51) Classificação Internacional: G01N 33/532; G01N 33/545; G01N 33/569; C07K 14/20.

(54) Título: PROCESSO, DISPOSITIVO E KIT PARA DIAGNÓSTICO IMUNOCROMATOGRÁFICO IN VITRO DA LEPTOSPIROSE E/OU PARA DETECÇÃO DE INFECÇÃO POR LEPTOSPIRA SPP; PROCESSO PARA SUA PREPARAÇÃO

(73) Titular: FUNDAÇÃO BUTANTAN, Associação com intuito não econômico. CGC/CPF: 61189445000156. Endereço: AV. VITAL BRASIL, 1500 - BAIRRO BUTANTÃ, São Paulo, SP, BRASIL(BR), 05503-900, Brasileira

(72) Inventor: PATRÍCIA ANTONIA ESTIMA ABREU DE ANIZ; TATIANA BARRINUEVO GOTTI; ROXANE MARIA FONTES PIAZZA; LETÍCIA BARBOZA ROCHA.

Prazo de Validade: 20 (vinte) anos contados a partir de 06/09/2016, observadas as condições legais

Expedida em: 17/12/2024

Assinado digitalmente por:
Alexandre Dantas Rodrigues
Diretor de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados

Relatório Descritivo de Patente de Invenção

PROCESSO, DISPOSITIVO E KIT PARA DIAGNÓSTICO IMUNOCROMATOGRÁFICO *IN VITRO* DA LEPTOSPIROSE E/OU PARA DETECÇÃO DE INFECÇÃO POR *LEPTOSPIRA* SPP; PROCESSO PARA SUA PREPARAÇÃO

Criação e Campo da Invenção

[1] O presente relatório contempla conhecimentos, informações e/ou dados confidenciais utilizáveis na indústria, comércio ou prestação de serviços, para os quais o detentor requer: a proteção estabelecida no inciso XXIX do Art. 5º da Constituição Federal; a manutenção do status jurídico de confidencialidade/segredo; a manutenção do status físico de confidencialidade/segredo pelo tempo previsto na Lei 9.279/96, Lei da Propriedade Industrial; e os direitos previstos no Art. 195 da Lei 9.279/96.

[2] A íntegra do conteúdo deste pedido de patente é segredo industrial do depositante, sendo ativo imaterial resultante de esforços e investimentos no desenvolvimento do objeto, na manutenção do sigilo e em sua proteção. O conceito inventivo ora revelado e exemplificado de uma ou mais formas foi tratado como segredo industrial e não foi previamente revelado publicamente até o momento do depósito deste pedido de patente.

[3] A criação industrial ora descrita compreende uma invenção passível de proteção patentária. A presente invenção encontra-se no campo da imunologia e se refere a um processo *in vitro* para diagnóstico da leptospirose ou para a detecção da ocorrência de infecção por *Leptospira* spp por meio de um conjugado (LipL32-ouro coloidal) e de um dispositivo formado por uma membrana de nitrocelulose, uma fibra de vidro e dois papéis de filtro nas extremidades. A presente invenção se refere ainda ao uso do conjugado para a preparação de um kit para detecção *in vitro* da presença de anticorpos anti-LipL32 em soro de animais e humanos.

Antecedentes da Criação/Invenção

[4] A leptospirose é uma doença bacteriana infectocontagiosa, de curso agudo ou crônico, causada por espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira*, de caráter zoonótico e cosmopolita que acomete o homem, os animais domésticos e silvestres (FAINE et al., 1999). Apresenta ampla distribuição geográfica, tendo sido evidenciada em mais da metade dos países, sendo particularmente prevalente nas Américas. Ocorre de forma endêmica na América Latina e no Caribe, com impacto na saúde pública e na economia agropecuária (GENOVEZ, 2007).

[5] Atualmente, o gênero *Leptospira* é dividido em 21 espécies, definidas por homologia de DNA e sequenciamento de genes, normalmente, o 16S rDNA (RAMADASS et al., 1992; WOO et al., 1997; ADLER e MOCTEZUMA, 2010). Estas bactérias também são classificadas em sorovares definidos por reações de aglutinação após absorção dos soros com antígenos homólogos. Os sorovares antigenicamente relacionados são reunidos num mesmo sorogrupo (FAINE et al., 1999). Existem cerca de 300 sorovares de leptospiras patogênicas e saprófitas descritos em 25 sorogrupos. Esta variedade antigênica se deve à heterogeneidade da estrutura na composição do LPS (lipopolissacarídeo). A classificação fenotípica em sorovar é amplamente utilizada devido à sua importância epidemiológica e clínica, embora, não se correlacione com a classificação genotípica (LEVETT, 2001; ADLER e MOCTEZUMA, 2010).

[6] O lipopolissacarídeo (LPS) é similar aos de outras bactérias Gram-negativas, porém com menor atividade endotoxigênica (SHIMIZU et al., 1987), sendo composto por três segmentos ligados covalentemente: lipídeo A, core, e antígeno O. O lipídeo A é uma porção lipídica altamente conservada, que ancora o LPS à membrana externa celular. O core é uma porção polissacarídica que forma a região intermediária e externamente, encontra-se o antígeno O, que consiste em grupos de polissacarídeos altamente variáveis.

Este último é considerado o principal agente antigênico dos LPSs das bactérias Gram-negativas (FAINE et al., 1999).

[7] Estes patógenos são aeróbios estritos, crescem em temperaturas entre 28°C e 30°C (QUINN et al., 1994) e são exigentes no que se refere a meios nutritivos (HANSON e TRIPATY, 1988), com divisão celular em torno de 7 a 12 horas. Apresentam afinidade tintorial por corantes à base de sais de prata, o que possibilita o emprego das técnicas de coloração de Fontana-Tribondeau para esfregaços e a de Levaditi em cortes de tecidos (SANTA ROSA, 1970), além do método de Warthin-Starry (WARTHIN e CHRONISTER, 1920). As leptospiras sobrevivem na água conforme a temperatura, o pH, a salinidade e ao grau de poluição (LEVETT, 2001), mas são pouco resistentes à luz solar direta, aos desinfetantes comuns e aos antissépticos. (FAINE et al., 1999).

[8] A leptospirose pode ser transmitida aos animais de forma direta e indireta. A via de transmissão direta ocorre quando fluidos (sangue /urina) contendo leptospiras passam de um animal infectado a outro susceptível, destacando-se as vias transplacentária e hematogênica, genital (monta natural e inseminação artificial) e o ato de mamar. A transmissão indireta ocorre quando o animal adquire leptospirose do ambiente contaminado com leptospiras originárias da urina de animais infectados, doentes ou convalescentes. Animais transitórios em um ambiente contaminado podem carrear infecção para outros ambientes ou animais distantes do original. (CÔRTES, 1993).

[9] Em teoria, qualquer sorovar de *Leptospira* spp. pode infectar qualquer espécie animal, porém na prática um número limitado de sorovares é endêmico em uma região ou país em particular. Neste caso, a infecção é determinada pelas espécies animais de contato, pelo(s) sorovar(es) existente(es) na propriedade ou região, pelas condições ambientais e climáticas, e ainda depende do manejo e das oportunidades de infecção direta ou indireta (GENOVEZ, et al., 2006a). Os sorovares Wolffi e Grippotyphosa podem estar presentes em alguns roedores silvestres e espécies marsupiais. Roedores

sinantrópicos, suínos e cães são, respectivamente, considerados hospedeiros de manutenção dos sorovares Icterohaemorrhagiae, Pomona e Canicola (ELLIS, 1984; FAINE et al., 1999; RADOSTITS et al., 2000).

[10] As leptospiras se mantêm circulando na população de hospedeiros primários, usualmente roedores selvagens, a partir dos quais alcançam outras populações de animais sinantrópicos e/ou domésticos. Estes são os hospedeiros secundários, que ao invadir o ambiente silvestre entram em contato com espécies silvestres. O ser humano é considerado um hospedeiro acidental, que se infecta quando em contato direto ou indireto com os animais.

[11] A doença tem forte associação com a atividade profissional. O trabalho diário em terrenos alagadiços frequentados por populações de roedores é um fator importante na transmissão da doença para colhedores de arroz e cana de açúcar (CÔRTES, 1993). Em alguns países, a leptospirose é considerada doença ocupacional para magarefes, fazendeiros e veterinários (FAINE et al., 1999).

[12] A concentração de grandes efetivos de animais domésticos, como os rebanhos bovinos, pode ter como consequência à criação de amplas cadeias infecciosas, que contribuem para a disseminação do agente no ambiente e atuam como fator de risco para o homem (CÔRTES, 1993). Dentre os animais domésticos que podem atuar como portadores da doença, disseminando o organismo no ambiente, destacam-se os bovinos, suínos, caprinos, ovinos, equinos e em e especial os caninos, que mantêm um convívio muito próximo ao homem. Entre as espécies silvestres destacam-se carnívoros, roedores e marsupiais (CORREA et al., 1982).

[13] Os roedores das espécies *Mus musculus* (camundongo), *Rattus* (rato de telhado) e principalmente o *Rattus norvergicus* (rato de esgoto) estão envolvidos na epidemiologia da leptospirose por eliminarem leptospiras pela urina por períodos prolongados, sendo o principal reservatório da doença em áreas urbanas (LEVETT, 2001).

[14] As portas de entrada para a leptospira invadir o organismo do hospedeiro são a pele íntegra ou com abrasões e membranas mucosas conjuntiva, oral, nasofaríngea e genital. Após a entrada, as leptospiras patogênicas alcançam a corrente sanguínea (leptospiremia) e as vias linfáticas, chegando aos pulmões, baço, rins e fígado, onde se multiplicam dando origem ao estágio febril. Nestes órgãos, ocorrem lesões nas membranas das células endoteliais de pequenos vasos, levando ao extravasamento sanguíneo, cuja consequência imediata é a perda das junções entre as células, permitindo que as leptospiras e fluido migrem para o espaço extravascular, ocasionando a desestruturação tecidual pela desintegração e morte celular (CASTRO, 2006).

[15] A habilidade em sobreviver e multiplicar-se no hospedeiro é o maior componente de virulência deste grupo de bactéria, contudo a ação dos mecanismos imunes adquiridos pode impedir o estabelecimento da doença. (FAINE, 1982, 1999). Na primo infecção, o período de incubação é de 7 a 14 dias, quando ocorre a septicemia e o aparecimento de imunoglobulinas da classe IgM, que têm atividade de poucos dias, posteriormente acontece a produção anticorpos da classe IgG. Apesar dos anticorpos ajudarem a combater a bacteremia, não eliminam por si só a infecção renal (REBHUN, 1995).

[16] A isquemia renal evolui para necrose dos túbulos contorcidos renais. Nas formas mais graves, ocorre nefrite intersticial aguda, contudo, lesões glomerulares são menos presentes. A degeneração pode evoluir para a falência renal e anúria. Lesões também são observadas em pulmões, fígado, cérebro, placenta e coração, onde estas levam a sinais clínicos de hemorragia pulmonar, falência hepática e icterícia, encefalopatia e meningite, miocardites, morte fetal e abortamento (FAINE et al., 1999).

[17] Nos animais que sobrevivem à infecção aguda, as leptospiras persistem em sítios imunologicamente protegidos, como os túbulos proximais, a câmara anterior do olho e trato genital. Nos rins, multiplicam-se ativamente, atingindo o pico máximo em 3 a 4 semanas, sendo eliminadas pela urina. Contudo, há

animais portadores que podem manter-se negativos sorologicamente, mas eliminando *Leptospira* para o meio ambiente - constituindo-se em fonte de infecção importante. Fetos podem nascer portadores renais e eliminadores de leptospiras (FAINE, 1982, 1994; FAINE et al., 1999). A persistência e a intensidade da leptospirúria variam com o hospedeiro e o sorovar infectante (GONÇALVES, 1995).

[18] A apresentação clínica da leptospirose pode cursar como um processo brando e inaparente, até como forma grave, com sintomas graves que chegam a óbito (LEVETT, 2001). A presença de falência renal aguda, pancreatite, meningite, trombocitopenia e sintomas pulmonares são comuns em humanos.

[19] O controle da leptospirose é necessário para prevenir a doença clínica, as perdas econômicas e minimizar o risco de infecção humana. Uma das formas de controle depende da diminuição da prevalência da infecção com sorovares mantidos na população e na diminuição do grau de associação ecológica das leptospiras mantidas por animais de vida livre (HATHAWAY, BLACKMORE e MARSHALL, 1981).

[20] O objetivo principal do tratamento é o controle da doença e a interrupção da leptospiúria nos animais acometidos. A diidroestreptomicina ou outras tetraciclinas são recomendáveis na dose de 25mg/Kg por um dia, durante três ou cinco dias (RADOSTITS et al., 2000). Como medida preventiva da leptospirose, deve-se vacinar o rebanho e, frente ao diagnóstico, usar a antibioticoterapia para eliminar os portadores. Como a proteção é sorovar-específica, é importante vacinar contra os sorovares prevalentes no rebanho ou na região da criação (ELLIS, 1984).

[21] Além da vacinação e do uso de estreptomicina nos animais, deve-se ainda aplicar estratégias que visem à redução ou eliminação dos fatores de risco. Medidas de prevenção consistem em eliminar o contato de animais sadios com os portadores de leptospiras, da mesma espécie ou espécie diferente, população de roedores e o acesso a águas de superfície onde coabitam animais silvestres.

[22] As vacinas comerciais existentes consistem em preparações de culturas de leptospiras de diferentes sorovares inativadas pela ação do calor e/ou formol (bacterinas) (HANSON, 1977; LANGONI, 1999). Muitas destas disponíveis no mercado nacional são compostas por cinco a dez sorovares, que atendem as soroprevalências da maioria das regiões do país e sua eficácia é aumentada com a adição de adjuvantes, como o hidróxido de alumínio (HANSON, 1977). Em condições de campo, o uso de vacinas contra leptospirose reduz a ocorrência da infecção e diminui impacto econômico da doença (SULLIVAN, 1974). Entretanto, as bacterinas promovem proteção somente contra os sorovares presentes na preparação e falham em induzir imunidade de longa duração, o que requer administração anual ou semestral (FAINE et al., 1999 e BHARTI et al., 2003).

[23] O diagnóstico de leptospirose se baseia em exames laboratoriais diretos, que detectam o agente etiológico, e os indiretos, pela detecção de anticorpos produzidos pelo hospedeiro (GENOVEZ, 2006a). Reações antígeno-anticorpo são usadas na identificação de estirpes (ou sorovares) de leptospiras no diagnóstico de infecções recentes e na investigação de anticorpos residuais resultantes de infecções passadas nos indivíduos (TURNER, 1970).

[24] A soroaglutinação microscópica (SAM) é o teste padrão de referência para diagnóstico sorológico e para classificação de leptospiras em sorovares e sorogrupos como preconiza a Organização Mundial de Saúde. Recomenda-se a realização do teste com os antígenos vivos cuja densidade ideal de crescimento é atingida em culturas de 4 a 14 dias (WHO, 1967) e contendo os sorovares representativos de cada um dos sorogrupos, além de outros de importância regional (VASCONCELLOS, 1979). Um dos inconvenientes para este teste é a necessidade de uma infraestrutura laboratorial e a manutenção de repiques das culturas vivas, o que gera a necessidade de mão-de-obra técnica, além de submeter o operador a riscos de contaminação (VASCONCELLOS, 1979; GENOVEZ e YASUDA, 1988).

[25] Outros ensaios têm sido aplicados como métodos alternativos de triagem soro epidemiológica para a leptospirose, como o ELISA que apresenta como vantagens a segurança, por não utilizar bactérias vivas, a alta sensibilidade, a facilidade de execução, rapidez e o baixo custo (CHAMPAGNE et al., 1991). Neste teste, são utilizados lisados obtidos a partir de culturas bacterianas adsorvidos em placa, cujas contaminações presentes nas preparações destas culturas, são responsáveis pela reatividade cruzada, muitas vezes, observada. Diversos ensaios imunoenzimáticos são considerados mais sensíveis que a SAM. As diferenças no desempenho destes testes se referem à sua composição, particularmente variações na preparação do antígeno (SMITH et al., 1994). Apesar da maior sensibilidade do ELISA, que eleva sua habilidade em detectar infecções recentes e o fato de que antígenos vivos não são necessitados para este teste, o ELISA possui baixa especificidade quando comparado com a SAM (SMITH et al., 1994; LEVETT, 2001). Além disso, o teste ELISA é normalmente gênero-específico, não sendo hábil para detectar o sorotipo infectante, limitando assim sua utilização para estudos epidemiológicos.

[26] O isolamento bacteriano é o diagnóstico definitivo da doença, embora apresente baixa sensibilidade, necessitando de amostras de sangue, urina ou liquor recém-colhidas que devem ser observadas em cultura por um período mínimo de 30 dias (GENOVEZ et al., 1993; SCARCELLI et al., 2004). Este método de diagnóstico apesar de suas dificuldades, sua baixa sensibilidade e ser dependente da viabilidade das leptospiras é importante para o conhecimento da doença. Permite conhecer a epidemiologia da enfermidade e possíveis mudanças do perfil de infecção numa espécie animal ou habitat ao longo dos anos.

[27] Em vista da necessidade de suprir as falhas diagnósticas de isolamento e do diagnóstico sorológico pela SAM ou ELISA, vem sendo empregados métodos com maior sensibilidade, especificidade e rapidez (MAGAJEVSKI, 2002), como a reação em cadeia pela polimerase (PCR), que permite amplificar

sequências específicas a partir de quantidades mínimas de DNA do microrganismo em diversos tipos de amostras biológicas, tais como soro, líquido cérebro-espinhal, urina, fezes e tecidos (BAL et al., 1994; SCARCELLI et al., 2004). Além disso, a PCR possibilita a identificação de leptospiras em materiais de difícil isolamento, tais como fetos abortados (SCARCELLI et al., 2004) e sêmen nas centrais de inseminação artificial (GOTTI, 2007). Porém, as mais importantes limitações desta técnica como método diagnóstico são a impossibilidade de identificar a estirpe infectante, custo e a necessidade de pessoal especializado.

[28] Recentemente, testes imunocromatográficos que empregam o uso de proteínas recombinantes vêm sendo estudados como novos métodos diagnósticos para a leptospirose e outras enfermidades.

[29] A imunocromatografia é uma técnica que começou a ser desenvolvida nos anos 60, sendo primeira criada para o estudo das proteínas séricas. Também conhecida como teste imunocromatográfico, ensaio de fluxo lateral, dipstick ou ensaio de fita, a técnica utiliza as propriedades da reação antígeno-anticorpo para a rápida detecção do analito (JIN et al., 2005).

[30] O teste imunocromatográfico se tornou amplamente utilizado no diagnóstico e na triagem de diversas patologias como diabetes, doenças cardíacas e renais, nas e doenças infecciosas como: dengue, malária, amebíase, peste bubônica, brucelose, giardíase, leishmaniose visceral, hepatite B, infecção por HIV, cinomose, parvovirose, *Helicobacter pylori*, *Streptococcus pneumoniae*, entre outras. Este método possui como principais características a de ser de baixo custo, simples e ser realizado em um curto período de tempo, entre 15 a 30 minutos (LIN et al., 2010). Esta técnica permite identificar doenças com mais rapidez aumentando as chances de recuperação dos pacientes.

[31] A detecção de anticorpos, através de teste imunocromatográfico, para outros patógenos também vem sendo amplamente aplicados, como em Alvarez e colaboradores (2010), que realizaram um teste imunocromatográfico para o

diagnóstico de anemia infecciosa equina com a proteína recombinante p26 proteína do capsídio, apresentando sensibilidade de 98,3% e especificidade de 87,4% quando comparado a imunodifusão em gel de agarose.

[32] Um teste rápido em látex (LAT) com antígeno recombinante (LipL32) foi utilizado realizados em soros de cães e humanos, para o diagnóstico da leptospirose (DEY et al., 2007). O teste apresentou boa especificidade e sensibilidade, porém o aprimoramento na detecção na fase aguda da doença se faz necessário, principalmente focando na melhoria da sensibilidade do teste.

[33] Outros ensaios como o que detecta a presença de leptospiras na urina utilizando nanopartículas de ouro (CHIRATHAWORN et al., 2011; WIDIYANTI et al., 2013) utilizando anticorpos policlonais e monoclonais para diferentes sorovares e sorogrupos de Leptospiras têm sido descritos (BALASSIANO, VITAL-BRAZIL e PEREIRA, 2012). Goarant e colaboradores (2013) desenvolveram um teste rápido de fluxo lateral vertical para detecção de IgM em humanos. Obtiveram valores bons em relação à sensibilidade (89,8%) e à especificidade (93,7%) do teste. Porém, foi utilizado lisado total do sorovar Faine, podendo apresentar reações cruzadas.

[34] Considerando as facilidades descritas, os testes imunocromatográficos têm sido muito aplicados no diagnóstico em domicílio, no campo ou em regiões com poucos recursos. Seu emprego inclui diferentes moléculas alvo, como: antígenos, anticorpos, hormônios, citocinas, receptores de células, haptenos, resíduos de drogas, ácidos nucléicos, oligonucleotídeos e marcadores sanguíneos (ZHANG, GUO, WANG, 2009), podendo se utilizados pelas áreas médica, veterinária e sanitária (POSTHUMA-TRUMPIE, KORF e VAN AMERONGEN, 2009).

[35] O ensaio do tipo dipstick, empregando antígenos preparados a partir de culturas de *L. biflexa* inativadas pela ação do calor, também já foi estudado e é comercialmente disponível. Neste caso, a detecção é feita utilizando-se anti-IgM conjugado com ouro coloidal. A fita é colocada em contato com a amostra

de soro e, quando existem anticorpos da classe IgM, os mesmos se ligam aos antígenos da fita e são detectados pela ligação do conjugado marcado (SMITS et al., 2000). Este método apresenta sensibilidade e especificidade comparáveis com os obtidos para o ELISA IgM com a vantagem de ser de execução simples e rápida e utiliza pequeno volume de amostra. Entretanto, como é utilizado o lisado total de leptospiras também é observada reatividade cruzada, o que pode resultar em resultados falso-negativos (SMITS et al., 1999; GUSSENHOVEN et al., 1997).

[36] A técnica do teste imunocromatográfico, é uma metodologia de detecção baseada na utilização de tiras de um material de suporte impregnadas com reagentes secos que são ativadas pela aplicação de amostras fluidas. O sistema é realizado em uma matriz constituída de membrana de nitrocelulose ou de náilon coberta por acetato transparente para facilitar a visualização do teste.

[37] Nos testes imunocromatográficos os geradores de sinal mais utilizados para preparação do conjugado são o látex e o ouro coloidal. As partículas de ouro são menores que as de látex, e mais comumente usadas nestes testes (POSTHUMA-TRUMPIE, KORF e VAN AMERONGEN, 2009). Outros conjugados de enzimas, metais coloidais, partículas fluorescentes e partículas magnéticas também são usadas (MILLIPORE, 2008).

[38] Métodos sorológicos utilizando proteínas recombinantes como antígenos podem possibilitar sensibilidade e especificidade maiores devido à maior concentração de antígenos imunoreativos e à ausência de sítios inespecíficos. Tomich et al. (2009) observou em bovinos uma alta sensibilidade e especificidade apresentada pelo Teste IgG ELISA utilizando a lipoproteína de membrana externa LipL32 em sua forma recombinante. Os resultados obtidos sugerem a aplicação deste antígeno em investigações soroepidemiológicas de leptospirose bovina, para triagem de animais positivos, conferindo mais rapidez e praticidade aos procedimentos laboratoriais.

[39] A LipL32 é a mais abundante proteína de membrana externa de espécies patogênicas de Leptospiras, tem sido considerada um promissor candidato à antígeno vacinal embora seja capaz de induzir somente imunidade protetora parcial em hamsters desafiados com inóculo letal de *Leptospira* (HAAKE et al., 2000). Além disso, a resposta imunológica do hospedeiro à LipL32 é bastante intensa (NABITY et al., 2012). Essas características sugerem que a LipL32 seja adequada ao desenvolvimento de novos testes de diagnóstico sorológico para a leptospirose (HAAKE et al., 2000).

[40] O documento CN101363855 revela uma tira de papel para a detecção de anticorpos contra o antígeno LipL32 em amostras de fluidos de pacientes para a detecção da leptospirose. Isso permite uma detecção qualitativa e semi-quantitativa rápida dos anticorpos presentes na amostra. Tal documento não deixa claro como é realizada a identificação do anticorpo da amostra, de forma que a comparação com a presente invenção fica prejudicada neste momento.

[41] O documento de CHIRATHAWORN, et. al. (CHIRATHAWORN, C. et. al., Development of an immunochromatographic test with anti-LipL32-coupled gold nanoparticles for *Leptospira* detection, New Microbiologica, 37, 201-207, 2014) revela um método para a identificação do antígeno LipL32 em amostras de pacientes por meio de um teste imunocromatográfico em tiras de papel. Tal documento tem o intuito de identificar o antígeno LipL32, e não o anticorpo anti-LipL32. Dessa forma, o referido teste não é indicativo da infecção por *Leptospira* ou de estados de alto título de anticorpos em um paciente. A tira de papel apresentada no referido documento possui um anticorpo anti-LipL32 conjugado a nanopartículas de ouro. Além disso, o método de identificação da linha controle envolve o uso de um anticorpo (secundário) capaz de identificar o anticorpo (primário) ligado ao ouro. A presente invenção, em contraste com o revelado no referido documento, proporciona a detecção de anticorpos presentes no soro de pacientes infectados, viabilizando assim um diagnóstico mais preciso, sensível, rápido e/ou mais informativo, uma vez que a

concentração de anticorpos no soro de paciente infectado tende a ser maior e mais persistente do que a concentração de proteínas de *Leptospira*.

[42] Do que se depreende da literatura pesquisada, não foram encontrados documentos antecipando ou sugerindo os ensinamentos da presente invenção, de forma que a solução aqui proposta possui, aos olhos dos inventores, novidade e atividade inventiva frente ao estado da técnica.

Sumário da Criação/Invenção

[43] A presente invenção tem por objetivo resolver os problemas constantes no estado da técnica para diagnóstico de leptospirose a partir de um processo *in vitro* mais rápido para a detecção de anticorpos anti-LipL32 em soro para diagnóstico.

[44] Em um primeiro objeto, a presente invenção apresenta um processo para a preparação de um dispositivo ou kit para o diagnóstico *in vitro* de leptospirose ou para detecção da ocorrência de infecção por *Lepstospira* spp, referido processo compreendendo as etapas de:

a. conjugar a proteína recombinante LipL32 com o ouro coloidal;
b. aplicar o conjugado em fibra de vidro sobreposta em membrana de celulose;
c. aplicar um anticorpo anti-proteína LipL32 em um local específico da membrana, para controle positivo da reação.

[45] Em um aspecto, o processo da presente invenção adicionalmente inclui uma ou mais das seguintes etapas:

a. clonagem, expressão e purificação da proteína recombinante LipL32;
b. obtenção de ouro coloidal; e/ou
c. obtenção do anticorpo anti-proteína LipL32 em coelho.

[46] Em uma concretização, a etapa de clonagem, expressão e purificação da proteína recombinante LipL32 é compreendida por:

- obter a sequência codificante da proteína LipL32 madura sem peptídeo sinal por reação em cadeia pela polimerase;

- clonar a sequência obtida em vetor de clonagem e subclonar em vetor de expressão de *Brevibacillus choshinensis*;

- expressar a proteína recombinante;

- purificar a proteína por cromatografia de afinidade a metal à partir do sobrenadante do cultivo bacteriano; e

- dialisar a proteína purificada.

[47] Em uma outra concretização, a etapa de clonagem, expressão e purificação da proteína recombinante LipL32 ainda apresenta uma subetapa adicional de avaliação da purificação e atividade funcional da proteína LipL32 por meio de SDS-PAGE e/ou Western-blotting após a etapa de dialisar a proteína purificada.

[48] Em uma outra concretização, a etapa de obtenção de ouro coloidal é compreendida por:

- aquecer o cloreto de ouro III até a ebulição;

- adicionar citrato de sódio; e

- agitar até a formação de uma coloração vermelha escura.

[49] Em uma outra concretização, a etapa de obtenção de ouro coloidal ainda apresenta uma subetapa adicional de avaliação do tamanho das partículas de ouro por leitura da absorbância e por microscopia eletrônica de transmissão.

[50] Em uma outra concretização, a etapa de conjugação da proteína recombinante LipL32 com o ouro coloidal é compreendida por:

- dialisar a proteína recombinante LipL32;

- determinar a quantidade ótima de proteína para estabilizar o ouro;

- conjugar 10 ml da solução de ouro coloidal 20 nm na concentração de 0,01% à quantidade de antígeno determinada na etapa anterior;

- estabilizar a reação; e

- centrifugar a solução para eliminação da proteína não conjugada.

[51] Em uma outra concretização, a quantidade ótima de proteína é de 320 µg de proteína LipL32 recombinante purificada no processo de conjugação.

[52] Em uma outra concretização, são utilizados 20 µL da solução da proteína recombinante LipL32 conjugada ao ouro na concentração de 30,5 µg/ml na fibra de vidro da fita cromatográfica.

[53] Em uma outra concretização, a etapa de obtenção do anticorpo anti-proteína LipL32 é compreendida por:

- inocular a proteína LipL32 recombinante purificada em coelho, extrair sangue do coelho inoculado;

- purificar o anticorpo IgG anti-LipL32 por meio de precipitação por ácido caprílico; e

- dialisar o anticorpo purificado.

[54] Em uma outra concretização, a etapa de obtenção do anticorpo anti-proteína LipL32 ainda apresenta uma subetapa adicional de avaliação da atividade funcional dos anticorpos por meio de ELISA após a etapa de diálise.

[55] Em uma outra concretização, são aplicados 1,5 µl de anticorpo purificado na concentração de 32 mg/ml na linha controle da fita cromatográfica.

[56] Em um segundo objeto da invenção, é provido um processo *in vitro* para o diagnóstico de leptospirose ou para detecção da ocorrência de infecção por *Lepstospira* spp, referido processo *in vitro* compreendendo as etapas de:

- contatar soro suspeito de conter anticorpos anti-LipL32 com a porção final de uma membrana contendo um conjugado de proteína recombinante LipL32 com o ouro coloidal; e

- detectar a ligação do anticorpo com o antígeno (LipL32) conjugado com o ouro coloidal, através da visualização das duas linhas (linha teste e linha controle) de coloração avermelhada.

[57] Em uma outra concretização, o fluido biológico é o soro obtido do sangue.

[58] Em uma outra concretização, o soro foi usado em uma diluição de 1:10.

[59] Em uma outra concretização, o volume de soro testado é de 300 µL.

[60] Em uma outra concretização, o tempo de incubação da amostra de soro com a fita é de 20 min.

[61] Em um terceiro objeto, a presente invenção apresenta um dispositivo imunocromatográfico do tipo dipstick, compreendendo:

- uma membrana de nitrocelulose;
- uma fibra de vidro; e
- dois papéis de filtro nas extremidades;

caracterizado pelo fato de que :

- a referida membrana/fibra de vidro contém um conjugado de proteína recombinante LipL32 com o ouro coloidal dispositivo, para uso no diagnóstico da leptospirose ou para a detecção *in vitro* da ocorrência de infecção por *Leptospira* spp.

[62] Em um quarto objeto, a presente invenção apresenta um kit para detecção *in vitro* de *Leptospira* spp, referido kit compreendendo:

- proteína recombinante LipL32 conjugada a ouro coloidal, aplicada em fibra de vidro sobreposta em membrana de celulose;
- anticorpo anti-LipL32 produzido em coelho, imobilizado na linha de controle da fita; e
- dispositivo imunocromatográfico do tipo dipstick.

[63] Em uma concretização, o teste é positivo, quando as duas linhas (linha teste e linha controle) são visíveis, independentemente da variação da intensidade de cor. Na reação negativa, apenas a banda controle é corada.

[64] Estes e outros objetos da invenção serão imediatamente valorizados pelos versados na arte e pelas empresas com interesses no segmento, e serão descritos em detalhes suficientes para sua reprodução na descrição a seguir.

Breve Descrição das Figuras

[65] Com o intuito de melhor definir e esclarecer o conteúdo do presente pedido de patente são apresentadas as presentes figuras:

[66] A figura 1 mostra a análise do produto obtido por PCR. Gel de agarose (1%) corado com corante fluorescente - gel Red. Poço M: Padrão de Peso Molecular – High Range; M1: Produto de PCR do gene codificante da proteína LipL32.

[67] A figura 2 mostra a análise de restrição de um clone positivo de pGEMT-LipL32. Gel de agarose (1%) corado com corante fluorescente - gel Red Poço M: Padrão de peso molecular - High Range; Poço M1: pGEMT vazio não digerido; Poços M2 e M3: PGEMT vazio digerido com XbaI e HindIII, separadamente; Poço M4: pGEMT-LipL32 não digerido; Poços M5 e M6: pGEMT-LipL32 digerido com XbaI e HindIII, separadamente; Poço M7: Dupla digestão com XbaI e HindIII da construção pGEMT-LipL32.

[68] A figura 3 mostra a análise da expressão da proteína LipL32 (corresponde a transformação com a construção pNCHis-LipL32) recombinante em *Brevibacillus choshinensis*, com 48h e 72h de cultivo em gel SDS-Page 10% corado com comassie blue; ou vetor: corresponde à colônia obtida com a transformação com o vetor pNCHisF vazio (controle negativo). Poços N: Padrão de peso molecular LMW. Poços P: Lisado total obtido do sedimento bacteriano (pellet) ressuspendido em PBS; Poços S: Sobrenadante do meio de cultura. O asterisco indica a banda da proteína LipL32 com aproximadamente 32 kDa.

[69] A figura 4 mostra a análise em duplicata da proteína LipL32 recombinante purificada após diálise, em Gel SDS-Page 10% corado com comassie blue (poços N1 e N2); Poço N: Padrão de peso molecular LMW. Setas: banda da proteína LipL32 com aproximadamente 32 kDa.

[70] A figura 5 mostra a avaliação da funcionalidade da proteína recombinante LipL32 purificada por Western-blotting, utilizando amostras de soros individuais de bovinos não-reagentes para leptospirose (controle negativo). À esquerda está a membrana de nitrocelulose corada com Ponceau e à direita o filme de RX revelado (detecção por ECL). A membrana foi recortada em tiras para incubação com os soros individuais. Q – Padrão de

peso molecular (PageRuler) pré-corado; Proteína LipL32. (Poços Q1 a Q8): Soros não-reagentes para leptospirose de amostras individuais de bovinos.

[71] A figura 6 mostra a avaliação da funcionalidade da proteína recombinante LipL32 purificada por Western blotting, utilizando amostras de soros individuais de bovinos reagentes para leptospirose (controle negativo). À esquerda está a membrana de nitrocelulose corada com Ponceau e à direita o filme de RX revelado (detecção por ECL). A membrana foi recortada em tiras para incubação com os soros individuais. Q – Padrão de peso molecular (PageRuler) pré-corado; Proteína LipL32. (Poços R1 a R8): Soros reagentes para leptospirose de amostras individuais de bovinos.

[72] A figura 7 mostra as fotografias obtidas da análise das partículas de ouro coloidal produzidas por microscopia eletrônica de transmissão.

[73] A figura 8 se refere à avaliação da concentração de proteína recombinante LipL32 purificada necessária para estabilizar o ouro coloidal. Para tanto, em cada tubo 100 µL de ouro coloidal 0,01% foram conjugados com 10 µL de diferentes concentrações de LipL32: (T1) 3,2 µg; (T2) 1,6 µg; (T3) 0,8 µg; (T4) 0,4 µg; (T5) 0,2 µg. Após 10 minutos as soluções foram acrescidas de 11 µL de NaCl 10% e a leitura dos resultados foi realizada visualmente. O ouro foi estabilizado com 3,2 µg de antígeno para cada 100 µL da solução, ou seja, 30,2 µg/ mL.

[74] A figura 9 mostra o resultado da conjugação do ouro coloidal com a proteína recombinante LipL32 purificada.

[75] A figura 10 mostra as curvas de titulação de IgG total obtidas por ELISA utilizando o soro de coelho imunizado com a proteína recombinante LipL32 purificada. As curvas foram obtidas com os soros pré-imune, antes e depois da purificação das imunoglobulinas por precipitação com ácido caprílico. O eixo Y corresponde ao valor de densidade óptica a 492 nm e o eixo x ao inverso das diluições dos soros. Este teste foi realizado para avaliar a funcionalidade da IgG após a purificação por ácido caprílico e sulfato de amônio.

[76] A figura 11 mostra um desenho representativo de um teste do tipo dipstick desenvolvido.

[77] A figura 12 mostra as fitas do teste imunocromatográfico produzidas manualmente.

[78] A figura 13 corresponde a um desenho representativo da interpretação do teste. O teste é positivo quando duas linhas são visíveis, uma linha na região controle (C) e outra na região teste (T); e é negativo quando apenas uma linha controle (C) é visualizada, não sendo observada a linha teste (T). O teste é considerado inválido quando não é observado a linha controle (C).

[79] A figura 14 mostra um exemplo de aplicação do teste imunocromatográfico utilizando (A1) soro não-reagente e (A2) soro reagente de coelho. As fitas foram imersas por 20 min em 300 µl da amostra de soro de coelho não diluído.

[80] A figura 15 mostra outro exemplo de aplicação do teste imunocromatográfico utilizando (B1) soro reagente e (B2) soro não-reagente de coelho. As fitas foram imersas por 20 min em 300 µl da amostra de soro de coelho diluída 1/10 em tampão PBS.

[81] A figura 16 representa outro exemplo de avaliação do teste imunocromatográfico, utilizando soro reagente (C1-C4) e não-reagente (D1-D4) de coelho. As fitas foram imersas por 20 min em 300 µl da amostra de soro com 4 diferentes diluições: (1) 1/10; (2) 1/20; (3) 1/30; (4)1/50.

[82] A figura 17 representa a avaliação do limite de detecção do teste imunocromatográfico, utilizando soro reagente de coelho em diferentes diluições (1/10 na primeira fita da esquerda para a direita até 1/25.600 na décima fita). As fitas foram imersas por 20 min em 300 µl da amostra.

[83] A figura 18 representa a avaliação do limite de detecção do teste imunocromatográfico, utilizando soro não-reagente (controle negativo) de coelho em diferentes diluições (1/10 na primeira fita da esquerda para a direita até 1/25.600 na décima fita). As fitas foram imersas por 20 min em 300 µl da amostra.

[84] A figura 19 se refere à avaliação da aplicação do teste utilizando soros de coelhos reagentes a 4 diferentes estirpes de leptospiras. (L1) reagente para a estirpe L1-130; (L2) reagente para a estirpe Hardjobovis; (L3) reagente para a estirpe LPF; (L4) reagente para a estirpe Grippothiphosa. As fitas foram imersas por 20 min em 300 µl da amostra de soro diluída 1/10 em PBS.

[85] A figura 20 mostra outro exemplo de aplicação do teste imunocromatográfico utilizando soros reagentes (R, fitas 1, 2, 4, 5 e 7-13) e não-reagentes (NR, fitas 3 e 6) de bovinos. As fitas foram imersas por 20 min em 300 µl da amostra de soro diluída 1/10 em tampão PBS.

Descrição Detalhada da Criação/Invenção

[86] As descrições que se seguem são apresentadas a título de exemplo e não limitativas ao escopo da invenção e farão compreender de forma mais clara o objeto do presente pedido de patente.

[87] Embora tenham sido mostradas apenas algumas modalidades da presente invenção, será entendido que várias omissões, substituições e alterações podem ser feitas por um técnico versado no assunto, sem se afastar do espírito e escopo da presente invenção.

[88] É expressamente previsto que todas as combinações dos elementos que desempenham a mesma função substancialmente da mesma forma para alcançar os mesmos resultados estão dentro do escopo da invenção. Substituições de elementos de uma modalidade descrita para outra são também totalmente pretendidos e contemplados.

[89] Os exemplos aqui mostrados têm o intuito somente de exemplificar uma das inúmeras maneiras de se realizar a invenção, contudo sem limitar, o escopo da mesma.

[90] A presente invenção se relaciona a anticorpos ou antígenos de detecção que são marcados com um gerador de sinal, normalmente esferas de látex ou ouro coloidal, e outro anticorpo ou antígeno, que é denominado partícula de captura, ambos são imobilizados sobre superfície sólida. Os anticorpos ou

antígenos de detecção, conjugados com ouro, são colocados em um estado desidratado na membrana de fibra de vidro de modo que são dissolvidos quando em contato com o meio aquoso contendo o analito. Em seguida, forma-se o complexo analito-conjugado, no qual este migra por capilaridade do meio até ser capturado pelo anticorpo ou antígeno previamente imobilizado sobre a superfície da membrana de nitrocelulose na linha teste. Um anticorpo adicional específico para o anticorpo de detecção pode ser utilizado para produzir um sinal na linha controle. A fibra de celulose possui a atribuição de aumentar o volume da amostra que entra na tira do teste. Sua função é absorver tanto os reagentes de revelação quanto a amostra que migraram pelos poros das membranas, garantindo uma absorção contínua dos componentes do sistema na plataforma.

[91] O resultado do teste imunocromatográfico é considerado positivo quando duas linhas são visíveis, sendo uma linha na região controle e outra na região teste. A intensidade de cor da linha teste poderá variar de acordo com a concentração presente na amostra. Todavia, qualquer intensidade de cor na linha teste indica resultado positivo. No resultado negativo apenas uma linha é visível na região controle, não sendo observada linha na região teste. O teste é considerado inválido quando não é evidenciada a linha controle. As razões mais comuns de falha são o volume insuficiente de amostra ou falha no procedimento técnico.

[92] Tais resultados demonstram uma metodologia mais fácil para a detecção de leptospiras e permitem o diagnóstico precoce da leptospirose.

[93] Exemplo 1 – Processo para a obtenção de dispositivo/kit de diagnóstico de *Leptospira* - Clonagem, expressão e purificação da proteína recombinante LipL32:

[94] A sequência codificante da proteína LipL32 foi clonada no vetor de expressão de *Brevibacillus choshinensis*, denominado pNCHis (Takara). Esta bactéria apresenta grande capacidade de expressão de proteínas heterólogas, sendo capaz de secretar proteínas para o meio extracelular com bastante

eficiência e produzir pequenas quantidades de proteases endógenas extracelularmente, resultando em degradação mínima de proteínas recombinante.

[95] Para tanto, a sequência codificante da proteína LipL32 sem peptídeo sinal foi amplificada por PCR a partir do DNA genomico de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni estirpe L1-130 (L1-130), utilizando os oligonucleotídeos sintéticos forward 5´TCTAGATGGTGCTTTCGGTGGTCTG3´ e reverso 5´GCGAAGCTTTTACTTAGTCGCGTC3´.

[96] A reação de amplificação do fragmento foi realizada em aparelho termociclador de PCR (Perkin-Elmer). Cada reação foi executada num volume final de 100µl com 50ng de DNA molde; 10 pmoles de cada oligonucleotídeo; 1X tampão PCR (fornecido pelo fabricante da Taq DNA polimerase); 1mM $MgCl_2$; 0,2mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP e dTTP); 5U de Taq DNA polimerase.

[97] O programa utilizado foi: desnaturação (94°C, 4 minutos), 35 ciclos de desnaturação (94°C; 50 segundos), anelamento (55°C; 50 segundos), extensão (72°C; 1 minuto) e extensão final (72° C, 7 minutos). O fragmento amplificado por PCR foi isolado do gel de agarose, purificado utilizando-se o kit PureLink – gel extraction (Invitrogen) e quantificado por leitura espectrofotométrica a 260 nm.

[98] O produto de PCR foi clonado no vetor pGEM-T easy (Promega) para facilitar a digestão com as enzimas de restrição apropriadas.

[99] A reação de ligação foi realizada usando-se 50 ng de vetor e a quantidade de fragmento de DNA purificado de forma que fornecesse uma relação de 1:3 moles de terminações do vetor e inserto respectivamente, com 2 µl de tampão da enzima T4 DNA ligase, 1µl de T4 DNA Ligase (400U/mL), num volume final de 10 µl, a 4°C por 16 horas. A mistura de ligação do produto de PCR e pGEM-T foi usada na transformação da linhagem *E. coli* DH5α por $CaCl_2$.

[100] As colônias recombinantes foram selecionadas em meio contendo ampicilina (50µg/ml). Posteriormente, para confirmar a presença dos insertos, foram feitas preparações plasmidiais utilizando kit PureLink – Plasmid miniprep (Invitrogen). O DNA obtido foi digerido com enzimas de restrição apropriadas e analisado em géis de agarose.

[101] Os clones positivos foram sequenciados pelo método da terminação da cadeia, utilizando os oligonucleotídeos sintéticos M13-forward e M13-reverse.

[102] O inserto clonado no pGEM-T com sequência correta foi transferido para o vetor de expressão de *B. choshinensis*, denominado pNCHis (Takara). O fragmento de interesse foi isolado do gel de agarose, purificado utilizando-se o kit PureLink – gel extraction (Invitrogen) e subclonado no vetor pNCHis, previamente digerido com as mesmas enzimas (XbaI e HindIII). As reações de ligação foram realizadas usando-se 50 ng de vetor digerido e purificado em um excesso de inserto em relação ao vetor (10 vezes), com 2µl de tampão da enzima T4 DNA ligase, 1µl de T4 DNA Ligase (400 U/mL), num volume final de 10µl, a 4°C por 16 horas. A mistura de ligação foi usada na transformação da linhagem *E. coli* DH5α por $CaCl_2$.

[103] As colônias recombinantes foram selecionadas em meio contendo neomicina (10 µg/mL). Para verificar a presença de inserto, foram feitas preparações plasmidiais das colônias obtidas da transformação utilizando-se o kit PureLink – Plasmid miniprep (Invitrogen). O DNA obtido foi digerido com enzimas de restrição (XbaI e HindIII) e analisado em géis de agarose.

[104] Os clones positivos foram sequenciados para confirmação conforme descrito anteriormente, utilizando os oligonucleotídeos forward 5’CGCTTGCAGGATTCGG3’ e reverso 5’CAATGTAATTGTTCCCTACCTGC3’.

[105] O clone com a sequência correta foi denominado PNCF-LipL32. Para a expressão da proteína recombinante LipL32 em *B. choshinensis*, foi realizada a transformação utilizando-se o Kit Brevibacillus Competent Cells (Takara), conforme instruções do fabricante.

[106] Duas colônias isoladas obtidas foram inoculadas no meio 2SY (20 g/L glicose, 40 g/L Bacto Soytone, 5 g/L Bacto Yeast Extract, 0,15 g/L $CaCl_2$) suplementado 10 µg/mL de neomicina. As culturas foram incubadas a 30°C por aproximadamente 18 horas, sob agitação de 180rpm.

[107] Os pré-inóculos foram transferidos para o mesmo meio utilizando-se uma diluição 1:50. As culturas foram incubadas a 30°C sob mesma agitação, por 48 horas.

[108] Os sobrenadantes (80 µL de cada amostra) foram coletados por centrifugação em dois tempos diferentes (24 e 48 horas de cultivo), os sedimentos bacterianos foram ressuspendidos em 80 µL PBS, sendo adicionados 20 µL de tampão de amostra 5X SDS-Page nas amostras do sobrenadante e do sedimento ressuspendido. As amostras (15 µL) foram analisadas em gel SDS-Page com 10% de acrilamida.

[109] Para a purificação da LipL32 recombinante, uma colônia isolada da transformação com a construção pNCHis-LipL32 foi inoculada em meio 2SY (20 g/L glicose, 40 g/L Bacto Soytone, 5 g/L Bacto Yeast Extract, 0,15 g/L $CaCl_2$) suplementado com 10 µg/mL de neomicina. A cultura foi incubada a 30°C por 12-18 horas, sob agitação. Este pré-inóculo foi transferido para meio fresco contendo neomicina, utilizando-se a diluição 1:50. A cultura foi incubada novamente sob agitação por até 48 horas. As células e o sobrenadante do cultivo foram obtidos por centrifugação (2.000xg por 15 minutos a 4°C).

[110] A LipL32 presente no sobrenadante do cultivo foi purificada utilizando-se resina de afinidade metálica (“Fast Flow chelating Sepharose” – GE Healthcare) carregada com 5 volumes de 100 mM NiSO4 e equilibrada com 3 volumes de tampão de ligação (20 mM Tris-HCl, 0,5 M NaCl, 5mM imidazol e pH 7,9). A seguir, a fração solúvel foi adsorvida à resina com fluxo 0,5 ml/min.

[111] Para eliminação das proteínas contaminantes, a resina foi lavada com 10 volumes do tampão de ligação (20 mM Tris-HCl, 0,5 M NaCl, 5mM imidazol e pH 7,9) e 20 volumes do tampão de lavagem (20 mM Tris-HCl, 0,5 M NaCl, 60 mM de imidazol e pH 7,9). A proteína recombinante foi eluída com 6

volumes do tampão de eluição (20 mM Tris-HCl, 0,5 M NaCl, 1 M imidazol e pH 7,9).

[112] A proteína purificada foi dialisada progressivamente contra: (i) tampão 1 (20 mM Tris-HCl, 0,5 M NaCl, 0,5 M imidazol, 1 mM EDTA e pH 7,9); (ii) tampão 2 (10 mM Tris-HCl, 0,5 M NaCl, pH 7,9; (iii) PBS com e pH 7.6. A proteína recombinante LipL32 purificada e dialisada foi analisada em gel SDS-PAGE com 10 % de acrilamida e por Western-blotting.

[113] **SDS-PAGE:**

[114] Os géis foram preparados com 1,0mm de espessura, contendo 5% de acrilamida no gel de empilhamento e 10% de acrilamida no gel de separação.

[115] Para a corrida eletroforética foi utilizada uma amperagem de 25 mA e 250 V de voltagem, a temperatura de 25ºC. Os géis foram corados com Coomassie Blue Brillant R-250 (USB) em 50% etanol e 10% ácido acético em água por 1h a 25ºC e descorados em solução de 30% etanol e 10% ácido acético em água. Os mesmos foram secos também a 25ºC durante a noite.

[116] **Western-Blotting:**

[117] A proteína recombinante LipL32 purificada foi submetida à eletroforese em gel SDS-PAGE (10%) e transferidas por sistema úmido (BioRad Laboratories) para uma membrana de nitrocelulose (Hybond-ECL - GE Healthcare), durante uma hora a 0,65 mA/cm de gel, imersos em tampão de transferência (48 mM Tris-Base, 39 mM Glicina, 20% etanol e 0, 037% SDS, pH 8,3).

[118] Após a transferência, a membrana foi corada com Ponceau S (0,1% Ponceau em 10% ácido acético). O excesso de corante foi lavado com água destilada e a membrana foi digitalizada para monitorização da transferência.

[119] O gel foi corado com 0,25% de Coomassie Blue Brillant em 50% etanol e 10% ácido acético em água, por 1-2 horas, a temperatura ambiente e descorado com solução de 30% etanol e 10% ácido acético em água para controle da transferência.

[120] Para realização do western-blotting, os sítios inespecíficos foram bloqueados incubando-se a membrana com solução de bloqueio (10% leite desnatado liofilizado em PBS com 0,2% Tween-20) sob agitação, por 16 horas, a 4°C.

[121] Posteriormente, a membrana foi lavada três vezes com PBS-T (PBS com 0,2% Tween-20) sob agitação por 15 minutos. A reação com o soro reagente e não reagente para leptospirose foi feita com soro dos animais, na diluição 1:100 seguido de incubação com o segundo anticorpo anti-IgG bovino conjugado com peroxidase (KPL) na diluição 1:5000. Os soros e anticorpos foram diluídos em PBS-T e as incubações foram realizadas por 1 hora a temperatura ambiente com agitação. Depois de cada incubação, a membrana foi lavada três vezes com PBS-T, por 15 minutos, em temperatura ambiente com agitação.

[122] A detecção foi realizada através da utilização de kit ECL (GE Healthcare). A membrana foi exposta a filme de raios-X (Hyperfilm - GE Healthcare) por tempos curtos (30 segundos a 2 minutos), e em seguida o filme foi revelado e digitalizado.

[123] **Produção e caracterização do ouro coloidal:**

[124] 2,5 ml de cloreto de ouro III (2 mg/ml em água) foi aquecido até ocorrer à ebulição. Posteriormente, 2,5 ml de citrato de sódio 25 mM foram adicionados à solução de ouro com agitação. Logo após atingir uma coloração vermelho escuro, a suspensão foi armazenada a 4°C até o momento do uso e conservada com azida sódica 0,02%.

[125] Posteriormente, para a determinação qualitativa do tamanho das partículas de ouro, foi realizada a leitura da absorbância UV/VIS entre os comprimentos de 400-700 nm.

[126] Em seguida, as partículas de ouro obtidas foram examinadas por microscopia eletrônica de transmissão, onde as partículas de diferentes tamanhos foram visualizadas como pontos elétron-densos negros, sendo possível avaliar o tamanho, forma e homogeneidade das mesmas.

Posteriormente, uma fina camada da suspensão de ouro (10 µl) coloidal foi adicionada a um pedaço de parafilme e uma tela de cobre revestido com carbono foi colocada sobre a amostra.

[127] Após 2 minutos de incubação, a tela de cobre foi seca cuidadosamente utilizando papel de filtro, a secagem completa foi realizada durante a noite. As amostras foram analisadas em microscópio eletrônico de transmissão LEO 906 E da Zeiss; modelo programa de captura de imagem – ITEM, Olympus soft imaging solutions GmbH, version ITEM E 23082007; Câmera mega viem III.

[128] **Conjugação da proteína recombinante LipL32 com o ouro coloidal:**

[129] 1,0 mg do antígeno foi ressuspendido em tampão borato 0,2 M (borato de sódio 0,2 M, NaCl 0,15 M, pH 7,0) e a solução foi dialisada contra tampão borato 2 mM (borato de sódio 2 mM, NaCl 1,5 mM, pH 7,0) a temperatura ambiente por 2 horas.

[130] Posteriormente, a quantidade ótima de antígeno necessária para estabilizar o ouro coloidal foi determinada, utilizando-se 100 µl de ouro coloidal a 0,01% e 10 µl de diluições seriadas do antígeno em tampão borato 2 mM. A quantidade de antígeno satisfatória para estabilizar o ouro foi à observada na diluição em que a solução não sofreu alteração de cor.

[131] Em seguida, a conjugação foi realizada adicionando-se 10 ml da solução de ouro coloidal a 0,01% à quantidade de antígeno determinada na etapa anterior, mantendo-se em agitação por 30 minutos à temperatura ambiente. A reação foi estabilizada com 1% de BSA em agitação por mais 30 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente, a solução foi centrifugada a 12.000 x g por 20 minutos a 4ºC e o sobrenadante descartado.

[132] O sedimento foi ressuspendido em 2 ml de 2% BSA (2% de BSA em 0,01M de tampão borato) e centrifugado a 12.000 x g por 20 minutos a 4ºC. Esta etapa foi repetida mais uma vez para a completa eliminação das proteínas livres. Por fim, o sedimento foi ressuspendido em 1 ml de tampão de armazenamento (3% de BSA, 3% de sacarose, 0,01 M de borato de sódio e 0,05% de azida de sódio) e armazenado a 4ºC até o momento do uso.

[133] **Produção do soro policlonal contra a proteína LipL32 e purificação das imunoglobulinas:**

[134] Para a produção do soro policlonal, um coelho fêmea espécie Nova Zelândia foi imunizado subcutaneamente com 250 µg de proteína recombinante LipL32 e hidróxido de alumínio como adjuvante, com dois reforços em intervalo de 15 dias. Quinze dias depois da última imunização, o animal foi anestesiado com quetamina e xilazina para posterior sangria a partir de punção intra-cardíaca com seringa de 50mL.

[135] O sangue total coletado foi transferido para um Becker, e mantido em repouso por 30 min a 37ºC para separação do soro e células vermelhas, inicialmente com pipeta. A amostra foi posteriormente centrifugada a 2000 rpm por 15 min a 20ºC, duas vezes. Com subsequente armazenamento a -20ºC. O soro foi diluído quatro vezes em tampão acetato de Sódio 60 mM pH 4,0, com posterior ajuste do pH do soro para 4,5. Foram adicionados 25µL, gota a gota, de ácido caprílico para cada mL de solução sob constante agitação. Após 30min, a amostra foi centrifugada por 30 min a 10.000xg a temperatura de 25ºC.

[136] Ao sobrenadante filtrado foi adicionado tampão fosfato-salino concentrado 10x (PBS 10x) numa proporção de 1:10 do volume final. O pH foi ajustado para 7,4. O sobrenadante foi resfriado a 4ºC e fracionado com 0,277 g de sulfato de amônio por mL de solução, para obtenção de uma saturação de 45%. Após agitação por 30 min, foi centrifugado a 10.000xg por 1h a 4ºC. O precipitado foi ressuspendido em tampão PBS na proporção de 1:10 do volume. A amostra foi dialisada por 48 h em tampão PBS diluído 1x em volume de 100x o volume da amostra, sendo realizadas quatro trocas do mesmo. O anticorpo purificado foi analisado por ELISA.

[137] **ELISA:**

[138] Para a adsorção do antígeno, placas de microdiluição de 96 poços de poliestireno de alta afinidade foram expostas a uma solução de 5 µg/mL de LipL32 recombinante purificada em tampão 0,1 M carbonato/bicarbonato pH

9,6 e incubadas, por 16 horas, a 4°C. Os sítios inespecíficos foram bloqueados com 10% leite desnatado liofilizado em PBS com 0,05% Tween-20, por 1 hora, a 37°C. Posteriormente, a placa foi lavada três vezes com PBS-T (PBS com 0,05% Tween-20) para retirar o excesso de solução de bloqueio.

[139] Após as lavagens, foram realizadas diluições seriadas dos soros dos animais reagentes e não reagentes para leptospirose em tampão de diluição (1% leite desnatado liofilizado em PBS com 0,01% Tween-20). Seguida pela incubação por 1 hora a 37°C. Posteriormente, os poços foram lavados três vezes com PBS-T e a reação com o segundo anticorpo conjugado com peroxidase, diluído 1:5000 em tampão de diluição, foi realizada, por 1 hora, a 37°C, seguido de lavagens como descrito anteriormente. O reconhecimento foi realizado através de reação, com o substrato orto-fenilenodiamina (OPD), em tampão citrato-fosfato na presença de traços de H_2O_2, por 10 minutos.

[140] A reação foi interrompida pela adição de 2 N de H_2SO_4 e a intensidade da reação foi determinada pela leitura da DO em 492 nm (Multiskan EX, Thermo Fisher Scientific).

[141] **Tratamento, secagem dos papéis e montagem da fita:**

[142] Na produção da fita imunocromatográfica foram empregados três tipos de papéis:

(1) A membrana de nitrocelulose de alto fluxo (HiFlow Plus 240, Millipore), que é utilizada na imobilização dos anticorpos na linha teste e na linha controle e possibilita o fluxo da amostra na fita;

(2) Fibra de celulose (Millipore) cuja função é absorver a amostra no início (sample pad) e no final (adsorbing pad) da fita;

(3) Fibra de vidro (Millipore) usada na aplicação do conjugado (LipL32 e ouro).

[143] Cada um destes papéis foi tratado de diferentes maneiras, como descrito a seguir:

(I) A fibra de celulose do Sample pad foi imersa em tampão pad-Tween (20 mM de tampão borato de sódio; 0,05% de azida de sódio, 3% Tween 20,

pH 7) por alguns segundos e seca a temperatura ambiente em dessecador a vácuo durante a noite.

(II) Na fibra de vidro do conjugate pad foram aplicados 20 µL da solução da proteína recombinante LipL32 conjugada ao ouro na concentração de 30,5 µg/ml. Em seguida, a fibra foi seca em dessecador a vácuo durante a noite com umidade relativa entre 20-22%.

(III) A membrana de nitrocelulose não foi tratada antes da imobilização dos anticorpos. Na linha teste, foram aplicados 1,5 µL de anticorpo específico para a espécie que o teste será aplicado (por exemplo, anti-IgG bovino marca KPL ou anticorpo anti-IgG coelho marca Sigma) na concentração de 2 mg/ml. Antes da aplicação na linha teste, a solução contendo anti-IgG foi dialisada para eliminação de sais e contaminantes do processo de produção, utilizando-se solução tampão fosfato 10mM, pH 7,5 acrescida de 5% sacarose. E, na linha controle foram aplicados 1,5 µL do anticorpo anti-proteína recombinante produzido em coelho (anti-LipL32) na concentração de 32 mg/ml diluído em PBS 0,01 M pH 7,2. A linha controle localiza-se acima da linha teste numa distância de 0,5 cm. Logo depois da aplicação, a membrana foi seca em dessecador a vácuo, a temperatura ambiente durante à noite.

(IV) O absorbing pad não necessita de tratamento. Para montagem da fita, os papéis previamente cortados, tratados e secos foram sobrepostos manualmente em uma base plástica de aproximadamente 6 x 0,5 cm e fixados com auxílio de fita adesiva dupla-face.

[144] **Exemplo 2 – Processo e kit de diagnóstico de *Leptospira***

[145] Para a aplicação do teste, a porção final (sample pad) da fita foi colocada em contato com a amostra de soro. Os tempos de incubação e as diluições das amostras dos soros foram definidos utilizando-se soro de coelho reagente. As condições ideais para realização do teste são:

(1) o tempo de incubação deve ser de 20 minutos;

(2) diluição de 1:10 do soro a ser testado; e

(3) leitura realizada visualmente.

[146] A intensidade de coloração avermelhada é o indicativo da reação positiva. O teste é considerado positivo, quando as duas linhas (linha teste e linha controle) foram visíveis, independentemente da variação da intensidade de cor. Na reação negativa apenas a banda controle deverá estar corada.

[147] As figuras 11-20 mostram detalhes de diversas concretizações efetivamente realizadas.

[148] A figura 11 mostra um desenho representativo de um teste do tipo dipstick desenvolvido.

[149] A figura 12 mostra as fitas do teste imunocromatográfico produzidas manualmente.

[150] A figura 13 corresponde a um desenho representativo da interpretação do teste. O teste é POSITIVO: quando duas linhas são visíveis, uma linha na região controle (C) e outra na região teste (T), NEGATIVO: quando apenas uma linha controle (C) é visualizada, não sendo observada a linha teste (T) e INVÁLIDO: quando não é observado a linha controle (C).

[151] A figura 14 mostra um exemplo de aplicação do teste imunocromatográfico utilizando (1) soro não-reagente e (2) soro reagente de coelho. As fitas foram imersas por 20 min em 300 µl da amostra de soro de coelho não diluído.

[152] A figura 15 mostra outro exemplo de aplicação do teste imunocromatográfico utilizando (1) soro reagente e (2) soro não-reagente de coelho. As fitas foram imersas por 20 min em 300 µl da amostra de soro de coelho diluída 1/10 em tampão PBS.

[153] A figura 16 representa outro exemplo de avaliação do teste imunocromatográfico, utilizando soro reagente (A) e não-reagente (B) de coelho. As fitas foram imersas por 20 min em 300 µl da amostra de soro com 4 diferentes diluições: (1) 1/10; (2) 1/20; (3) 1/30; (4)1/50.

[154] A figura 17 representa a avaliação do limite de detecção do teste imunocromatográfico, utilizando soro reagente de coelho em diferentes diluições (1/10 até 1/25.600).

[155] A figura 18 representa a avaliação do limite de detecção do teste imunocromatográfico, utilizando soro não-reagente (controle negativo) de coelho em diferentes diluições (1/10 até 1/25.600). As fitas foram imersas por 20 min em 300 µl da amostra.

[156] A figura 19 se refere à avaliação da aplicação do teste utilizando soros de coelhos reagentes a 4 diferentes estirpes de leptospiras. (1) reagente para a estirpe L1-130; (2) reagente para a estirpe Hardjobovis; (3) reagente para a estirpe LPF; 4) reagente para a estirpe Grippothiphosa. As fitas foram imersas por 20 min em 300 µl da amostra de soro diluída 1/10 em PBS.

[157] A figura 20 mostra outro exemplo de aplicação do teste imunocromatográfico utilizando soros reagentes (fitas 1,2, 4, 5 e 7-13) e (2) não-reagentes (fitas 3 e 6) de bovinos. As fitas foram imersas por 20 min em 300 µl da amostra de soro diluída 1/10 em tampão PBS.

[158] O depositante, ao depositar este pedido de patente perante o órgão competente/garante, busca e pretende: (i) nomear os inventores em respeito a seus respectivos direitos morais; (ii) indicar inequivocamente que é possuidor do segredo industrial e titular de qualquer forma de propriedade intelectual que dele derivar e o depositante desejar; (iii) descrever em detalhes o conteúdo objeto do segredo, comprovando sua existência nos planos físico e jurídico; (iv) estabelecer a relação entre os exemplos/concretizações e o conceito inventivo segundo a cognição do depositante e seu contexto, para demonstrar com clareza o alcance de seu bem intangível tutelado e/ou tutelável; (v) requerer e obter os direitos adicionais previstos para as patentes, se o depositante optar por prosseguir com o procedimento administrativo até o final.

[159] A eventual futura publicação do pedido de patente não constitui, em si, autorização de uso comercial por terceiros. Ainda que o conteúdo passe a integrar o mundo físico acessível a terceiros, a publicação do pedido de patente nos termos da lei não elimina o status *jurídico* de segredo, servindo apenas e tão somente ao espírito da Lei para: (i) indicar inequivocamente seu possuidor/titular e inventor(es); (ii) cientificar terceiros quanto à existência do

referido segredo industrial, do conteúdo para o que se requer proteção patentária e da data de seu depósito, a partir da qual será iniciado o prazo de vigência da exclusividade patentária; e (iii) auxiliar no desenvolvimento tecnológico e econômico do País, a partir da autorização do uso do segredo única e excepcionalmente para fins de estudos e/ou desenvolvimento de novas melhorias, evitando com isso reinvestimento paralelo por terceiros no desenvolvimento do mesmo bem.

[160] Desde logo adverte-se que eventual uso comercial requer autorização do possuidor/titular e que o uso não autorizado enseja sanções previstas em Lei. Neste contexto, dado o amplo detalhamento segundo o qual o conceito e os exemplos foram revelados pelo depositante, os versados na arte poderão, sem muito esforço, considerar outras formas de concretizar a presente invenção de formas não idênticas às meramente exemplificadas acima. Entretanto, tais formas são ou poderão ser consideradas como dentro do escopo de uma ou mais das reivindicações anexas.

Reivindicações

1. Processo para a preparação de um dispositivo ou kit para o diagnóstico *in vitro* leptospirose ou para detecção da ocorrência de infecção por *Lepstospira* spp, **caracterizado** por compreender as etapas de:
    a. conjugar a proteína recombinante LipL32 com o ouro coloidal;
    b. aplicar o conjugado em fibra de vidro sobreposta em membrana de celulose;
    c. aplicar um anticorpo anti-proteína LipL32 em um local específico da membrana, para controle positivo da reação.
2. Processo de acordo com a reivindicação 1 **caracterizado** por adicionalmente compreender uma ou mais das seguintes etapas:
    a. clonagem, expressão e purificação da proteína recombinante LipL32;
    b. obtenção de ouro coloidal; e/ou
    c. obtenção do anticorpo anti-proteína LipL32 em coelho.
3. Processo de acordo com a reivindicação 2 **caracterizado** pelo fato de que a etapa de clonagem, expressão e purificação da proteína recombinante LipL32 é compreendida por:

    - obter a sequência codificante da proteína LipL32 madura sem peptídeo sinal por reação em cadeia pela polimerase;

    - clonar a sequência obtida em vetor de clonagem e subclonar em vetor de expressão de *Brevibacillus choshinensis*;

    - expressar a proteína recombinante;

    - purificar a proteína por cromatografia de afinidade a metal à partir do sobrenadante do cultivo bacteriano; e

    - dialisar a proteína purificada.
4. Processo de acordo com a reivindicação 3 **caracterizado** pelo fato de que a etapa de clonagem, expressão e purificação da proteína recombinante LipL32 adicionalmente compreende uma subetapa de

avaliação da purificação e atividade funcional da proteína LipL32 por meio de SDS-PAGE e/ou Western-blotting após a etapa de dialisar a proteína purificada.

5. Processo de acordo com a reivindicação 2 **caracterizado** pelo fato de etapa de obtenção de ouro coloidal é compreendida por:

- aquecer o cloreto de ouro III até a ebulição;
- adicionar citrato de sódio; e
- agitar até a formação de uma coloração vermelha escura.

6. Processo de acordo com a reivindicação 2 ou 5 **caracterizado** pelo fato de que a etapa de obtenção de ouro coloidal adicionalmente compreender uma subetapa de avaliação do tamanho das partículas de ouro por leitura da absorbância e por microscopia eletrônica de transmissão.

7. Processo de acordo com a reivindicação 1 ou 2 **caracterizado** pelo fato da etapa de conjugação da proteína recombinante com o ouro coloidal ser compreendida por:

- dialisar a proteína recombinante;
- determinar a quantidade ótima de proteína para estabilizar o ouro;
- conjugar 10 ml da solução de ouro coloidal 20 nm na concentração de 0,01% à quantidade de antígeno determinada na etapa anterior;
- estabilizar a reação; e
- centrifugar a solução para eliminação da proteína não conjugada.

8. Processo de acordo com a reivindicação 7 **caracterizado** pelo fato da proteína recombinante LipL32 ser purificada até a quantidade de 320 µg.

9. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 7 e 8 **caracterizado** pelo fato da etapa de conjugação da proteína recombinante com o ouro coloidal são utilizados 20 µL da solução da proteína recombinante LipL32 conjugada ao ouro na concentração de 30,5 µg/ml na fibra de vidro da fita cromatográfica.

10. Processo de acordo com a reivindicação 2 **caracterizado** pelo fato da etapa de obtenção do anticorpo anti-proteína ser compreendida por:

- inocular a proteína LipL32 recombinante purificada em coelho, extrair sangue do coelho inoculado;

- purificar o anticorpo IgG anti-LipL32 por meio de precipitação por ácido caprílico; e

- dialisar o anticorpo purificado.

11. Processo de acordo com a reivindicação 10 **caracterizado** pelo fato da etapa de obtenção do anticorpo anti-proteína LipL32 adicionalmente compreender uma subetapa adicional de avaliação da atividade funcional dos anticorpos por meio de ELISA após a etapa de diálise.

12. Processo de acordo com a reivindicação 10 ou 11, **caracterizado** pelo fato de que na etapa de obtenção do anticorpo anti-proteína LipL32 são aplicados 1,5 µl de anticorpo purificado na concentração de 32 mg/ml na linha controle da fita cromatográfica.

13. Processo *in vitro* para o diagnóstico de leptospirose ou para detecção da ocorrência de infecção por *Lepstospira* spp, **caracterizado** por compreender as etapas de:

- contatar soro suspeito de conter anticorpos anti-LipL32 com a porção final de uma membrana contendo um conjugado de proteína recombinante LipL32 com o ouro coloidal; e

- detectar a ligação do anticorpo com o antígeno (LipL32) conjugado com o ouro coloidal, através da visualização das duas linhas (linha teste e linha controle) de coloração avermelhada.

14. Processo de acordo com a reivindicação 13 **caracterizado** pelo fato de que o fluido biológico é o soro obtido do sangue.

15. Processo de acordo com a reivindicação 13 **caracterizado** pelo fato de que se usa soro em uma diluição de 1:10 e/ou o volume de soro testado é de 300 µL e/ou o tempo de incubação da amostra de soro com a fita é de 20 min.

16. Dispositivo imunocromatográfico do tipo dipstick compreendendo:

- uma membrana de nitrocelulose;
- uma fibra de vidro; e
- dois papéis de filtro nas extremidades;

caracterizado pelo fato de que a referida membrana/fibra de vidro contém um conjugado de proteína recombinante LipL32 com o ouro coloidal dispositivo, para uso no diagnóstico da leptospirose ou para a detecção *in vitro* da ocorrência de infecção por *Leptospira* spp.

17. Kit para a detecção *in vitro* de *Leptospira* spp **caracterizado** por compreender:

- proteína recombinante LipL32 conjugada a ouro coloidal, aplicada em fibra de vidro sobreposta em membrana de celulose;
- anticorpo anti-LipL32 produzido em coelho, imobilizado na linha de controle da fita; e
- dispositivo imunocromatográfico do tipo dipstick.

18. Kit de acordo com a reivindicação 17 **caracterizado** pelo fato de compreender duas linhas visíveis, linha teste e linha controle, independentemente da variação da intensidade de cor.

FIGURAS

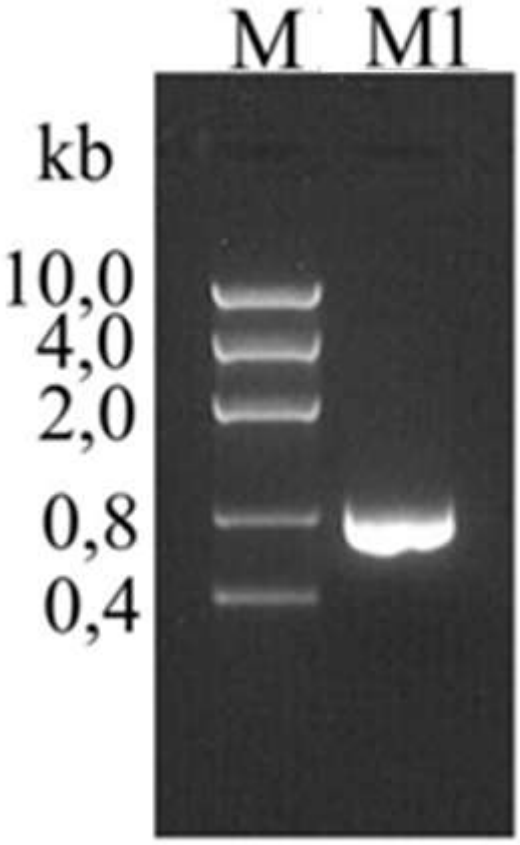


Figura 1

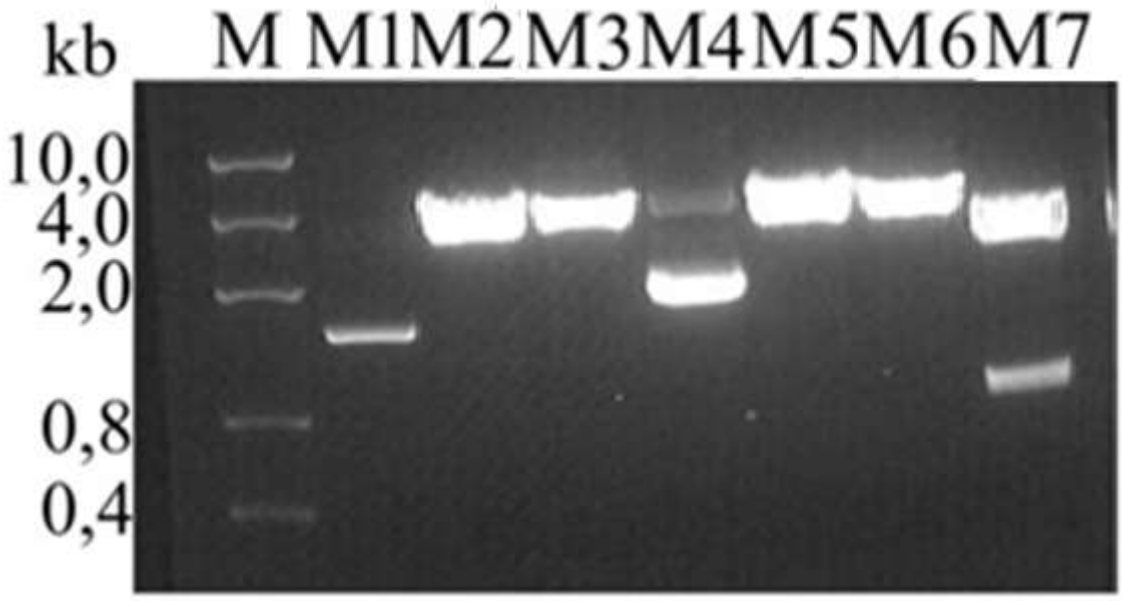


Figura 2

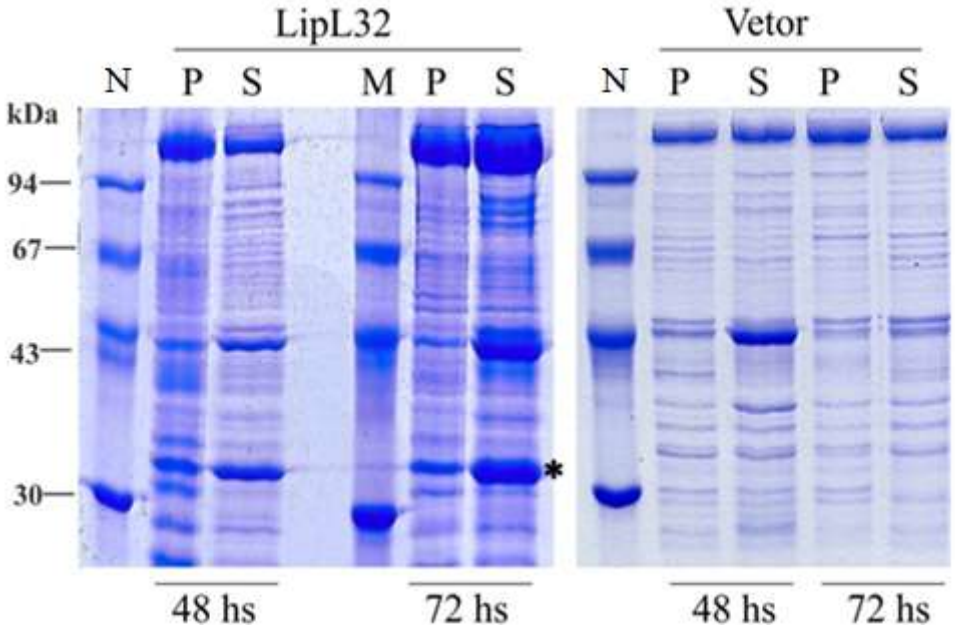


Figura 3

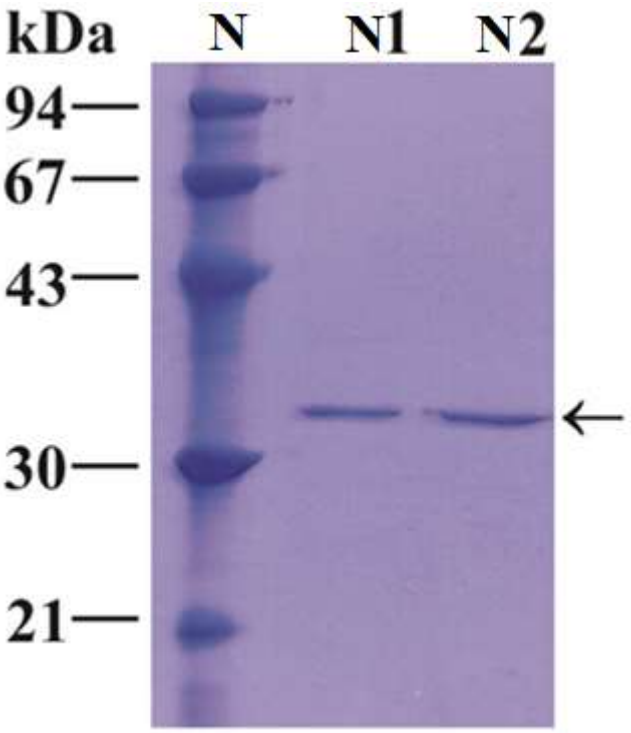


Figura 4

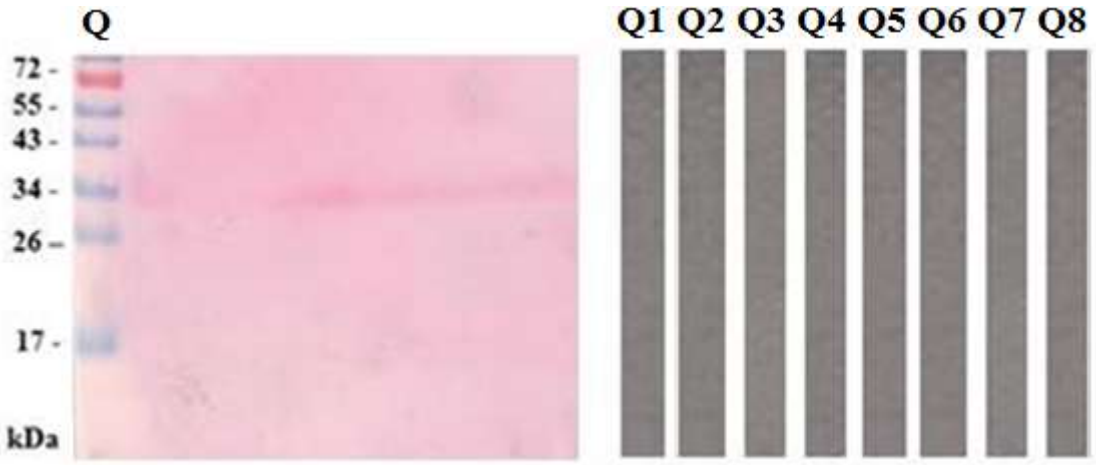


Figura 5

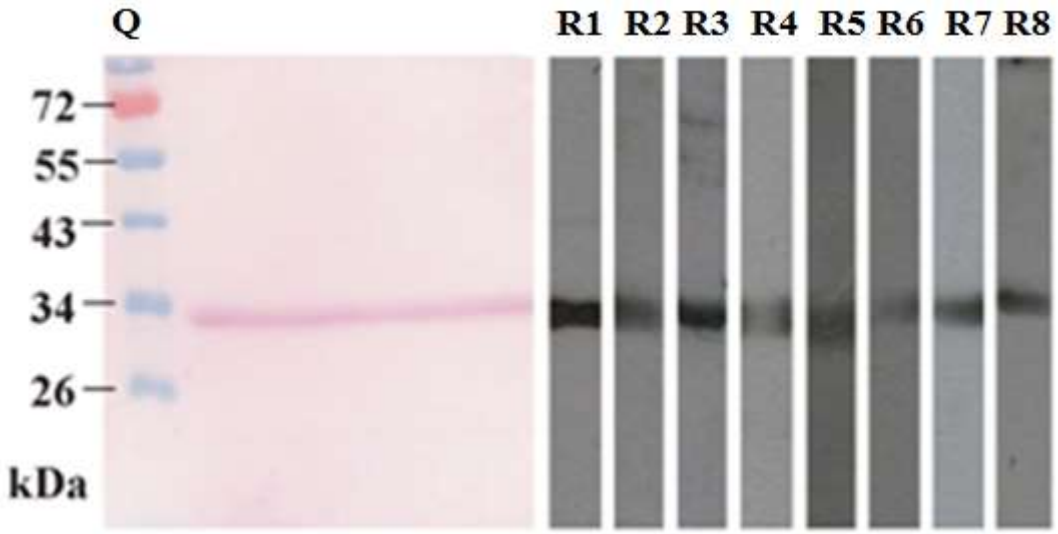


Figura 6

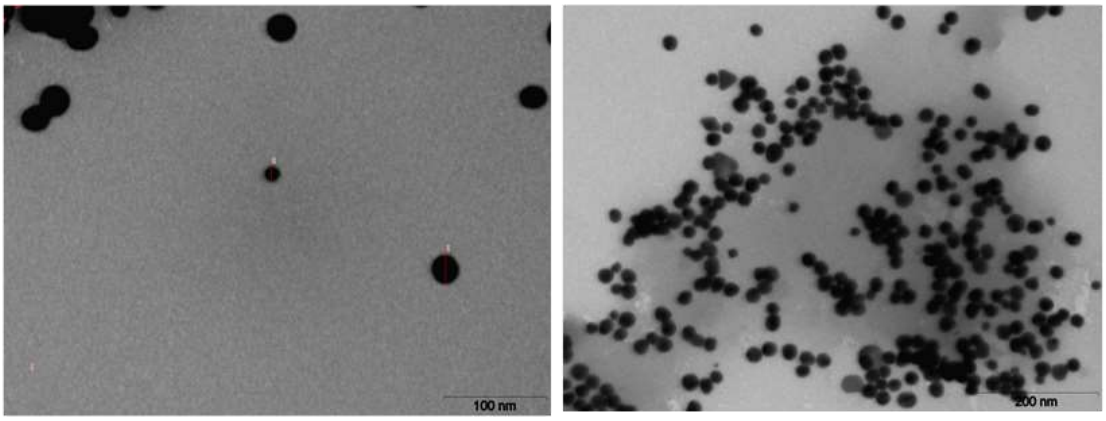


Figura 7

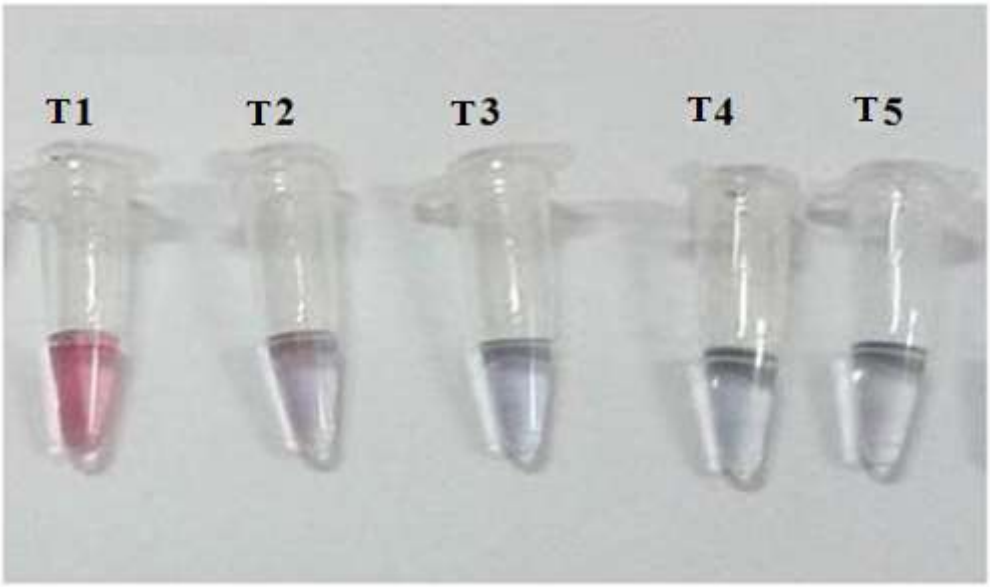


Figura 8

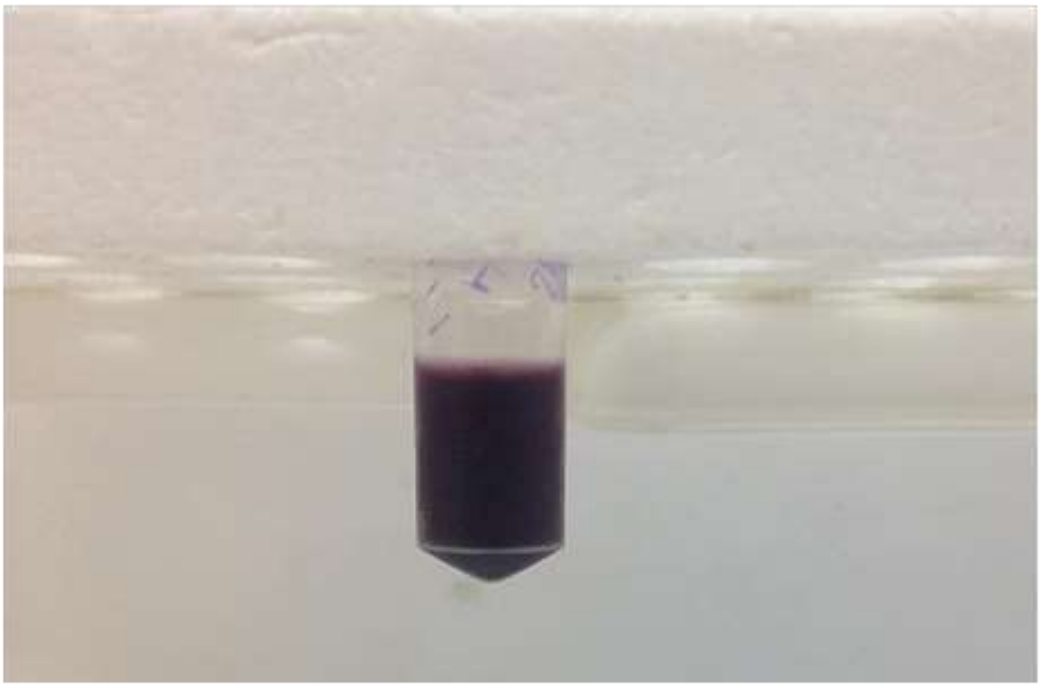


Figura 9

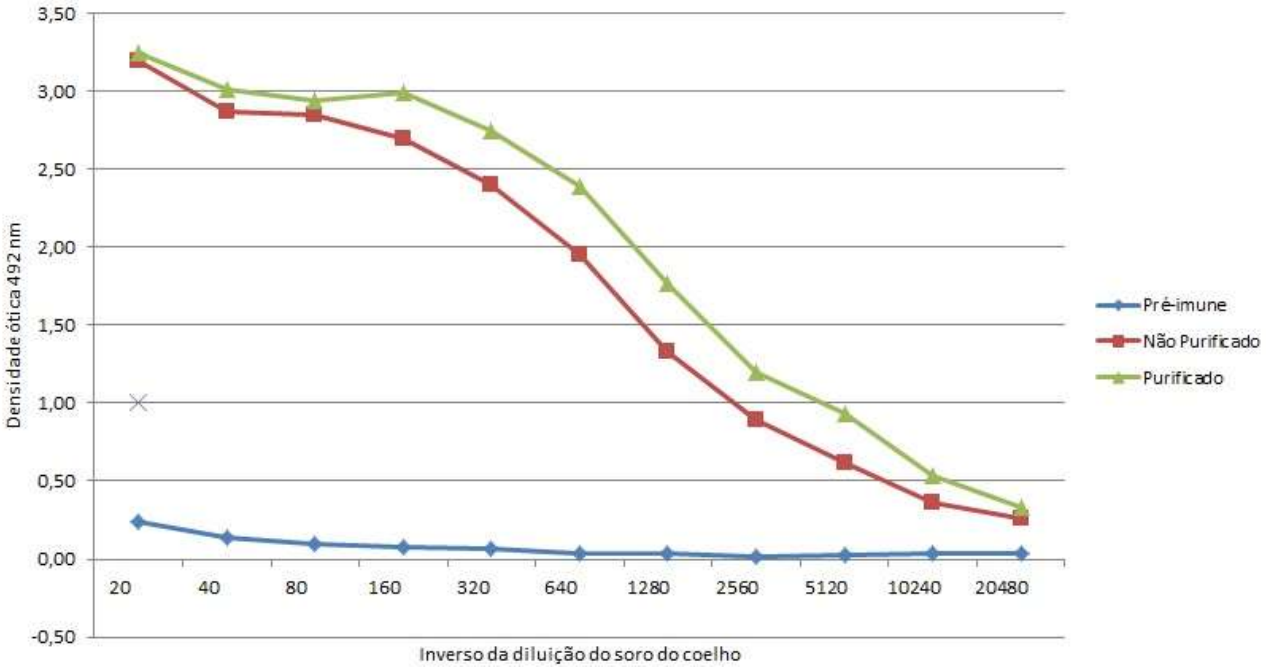

3,50
3,00
2,50
2,00
1,50
1,00
0,50
0,00
-0,50
Densidade ótica 492 nm
20
40
80
160
320
640
1280
2560
5120
10240
20480
Inverso da diluição do soro do coelho
Pré-imune
Não Purificado
Purificado

Figura 10

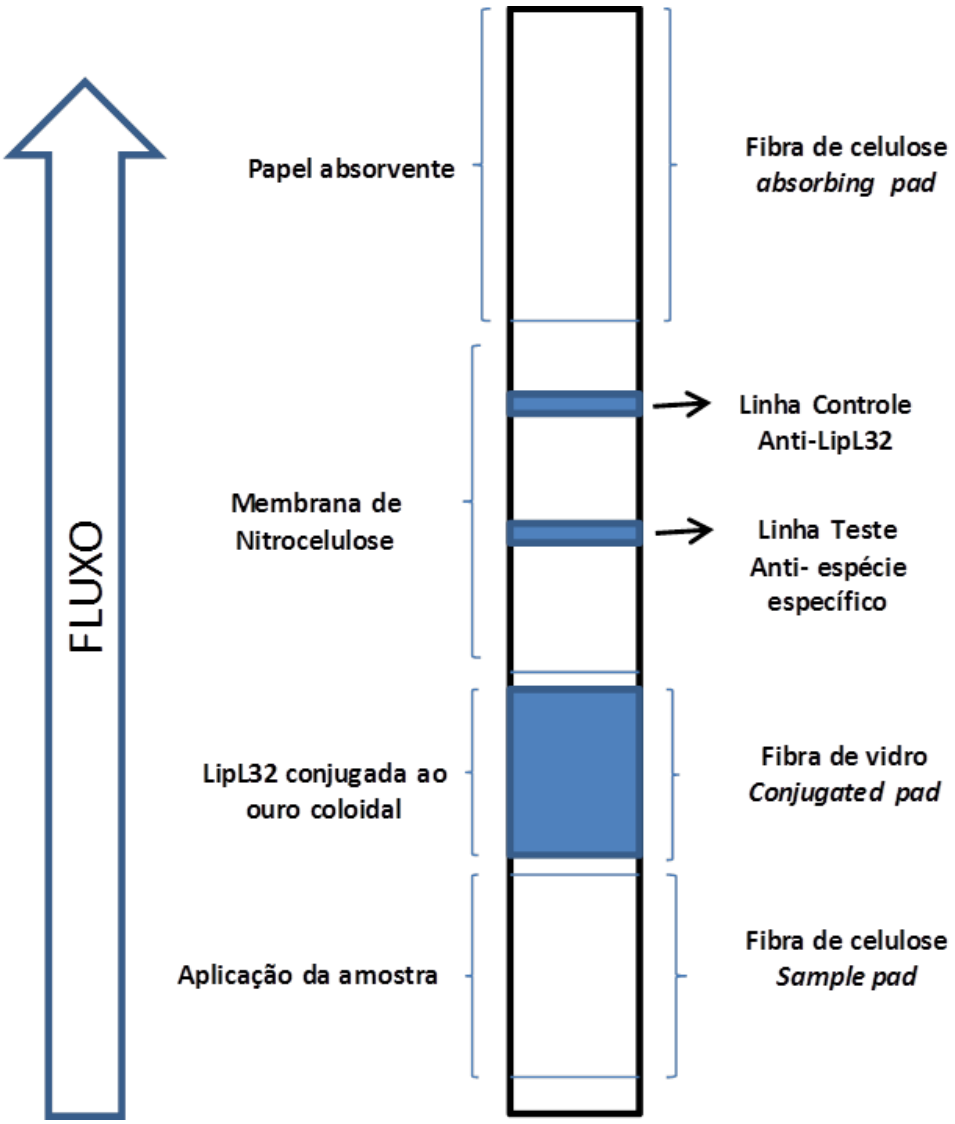

FLUXO
Papel absorvente
Fibra de celulose
absorbing pad
Linha Controle
Anti-LipL32
Membrana de
Nitrocelulose
Linha Teste
Anti- espécie
específico
LipL32 conjugada ao
ouro coloidal
Fibra de vidro
Conjugated pad
Aplicação da amostra
Fibra de celulose
Sample pad

Figura 11

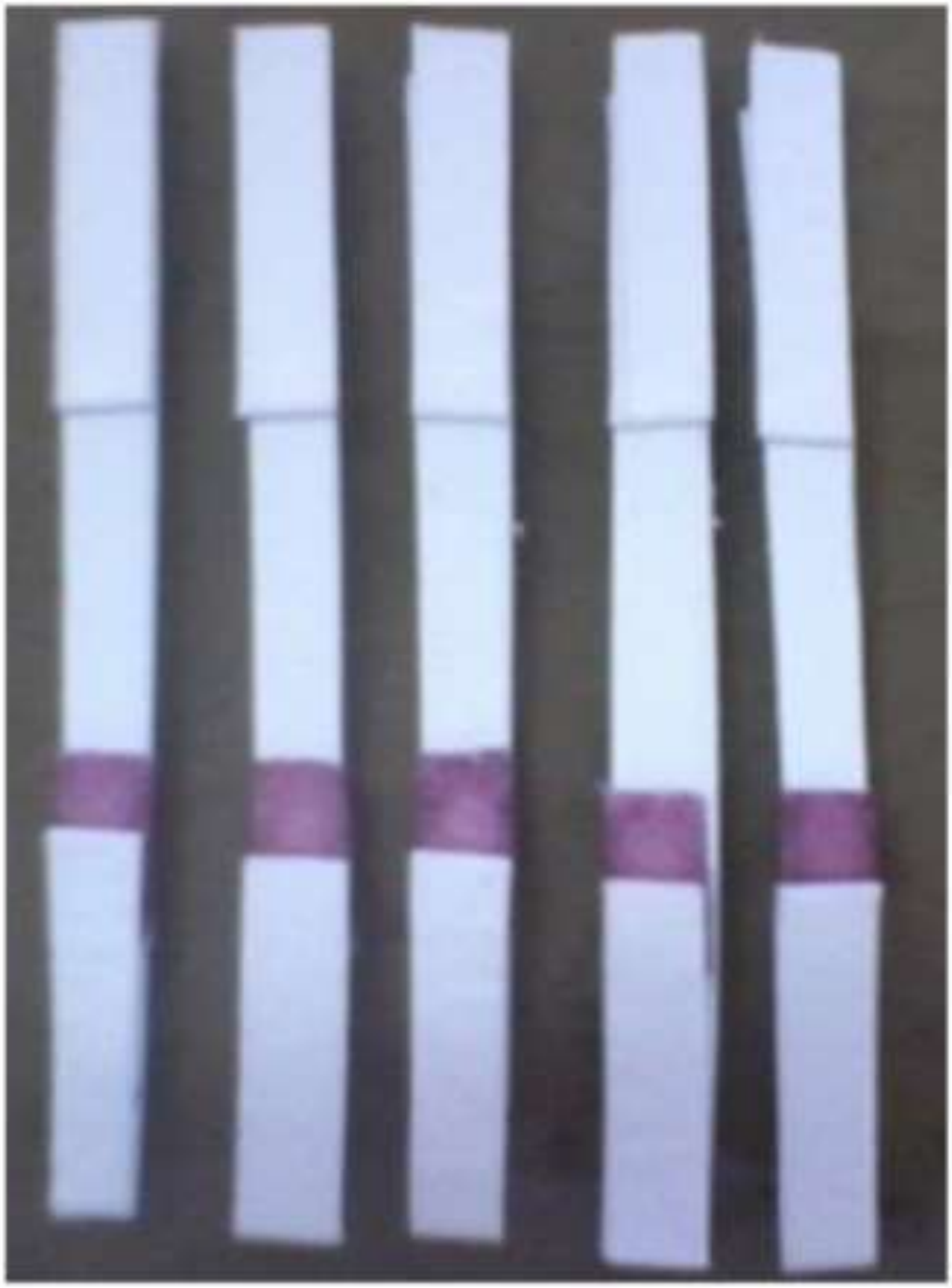


Figura 12

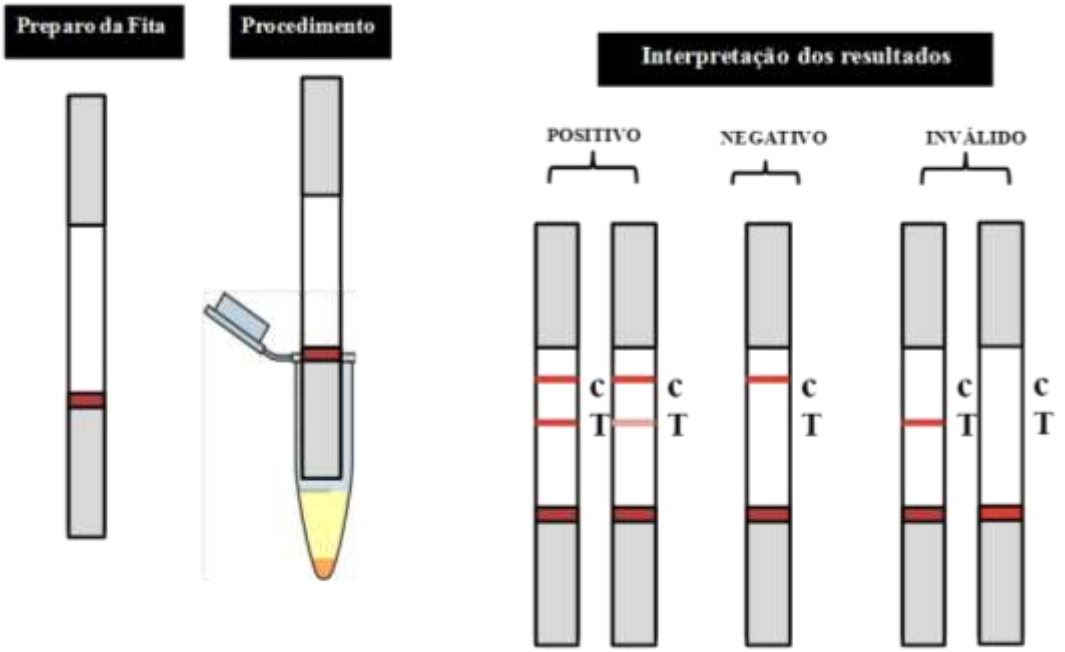

Preparo da Fita
Procedimento
Interpretação dos resultados
POSITIVO
NEGATIVO
INVÁLIDO
C
T

Figura 13



Figura 14



Figura 15

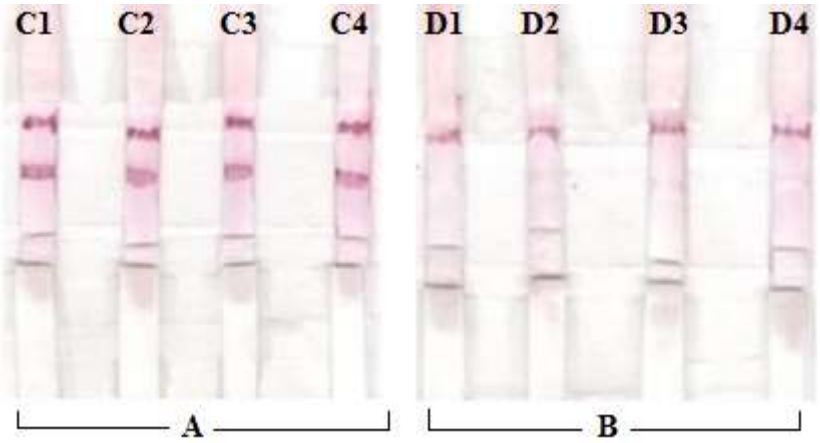


Figura 16



Figura 17

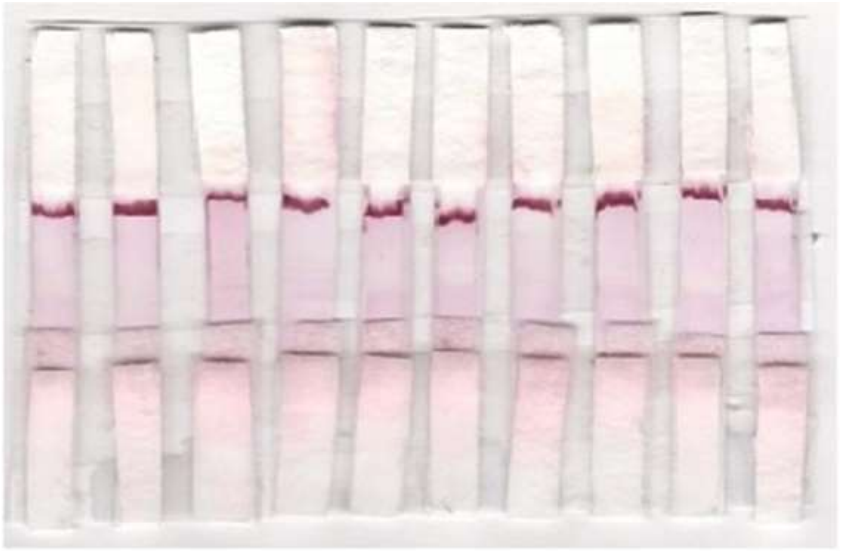


Figura 18



Figura 19

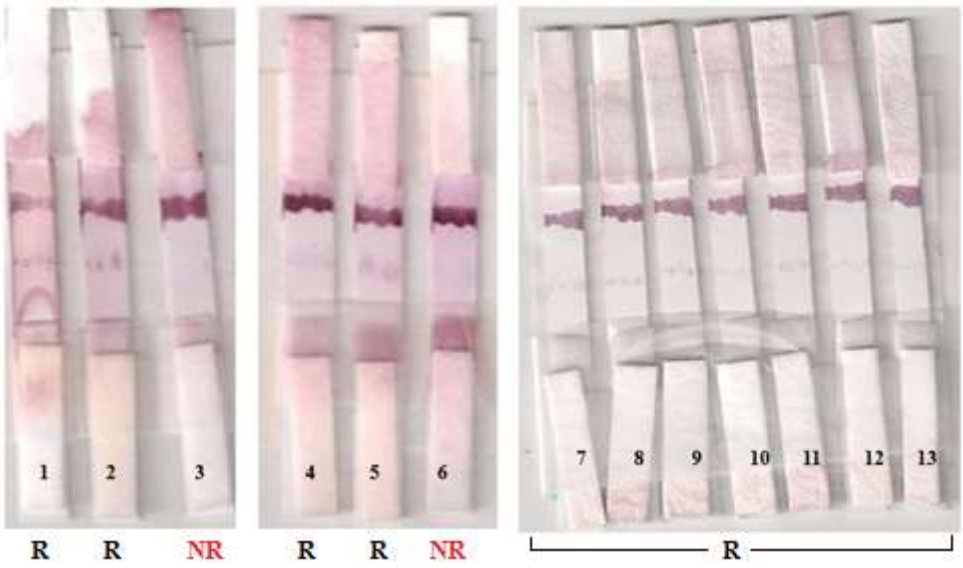


Figura 20