

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

(11) (21) **PI 0506049-4 A**



(22) Data de Depósito: 20/12/2005
(43) Data de Publicação: **02/10/2007**
(RPI 1917)

(51) Int. Cl.:
G01N 33/53 (2007.01)

(54) Título: PROCESSO DE VERIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE IMUNOGLOBULINA A SECRETORA "ANTI-TOXOPLASMA GONDII" DA LÁGRIMA E OUTRAS SECREÇÕES POR MÉTODO IMUNOENZIMÁTICO

(71) Depositante(s): Universidade Federal de Pernambuco
(BR/PE)

(72) Inventor(es): Maria Isabel Lynch Gaete, Elizabeth Malagueño
de Santana

(57) Resumo: PROCESSO DE VERIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE IMUNOGLOBULINA A SECRETORA "ANTI-TOXOPLASMA gondii" DA LÁGRIMA E OUTRAS SECREÇÕES POR MÉTODO IMUNOENZIMÁTICO. Toma-se amostra de lágrima com papel filtro, de 5 cm x 0.5 cm no fundo de saco conjuntival inferior do olho comprometido, ou de qualquer outra secreção do organismo. A amostra é congelada. Retira-se a lágrima ou outra secreção colhida, para ser submetida à determinação da presença e quantidade de Imunoglobulina A secretora anti-Toxoplasma gondii, por meio de método de imunoensaio prévia sensibilização das placas com antígeno da cepa RH.

**PROCESSO DE VERIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE
IMUNOGLOBULINA A SECRETORA “ANTI-TOXOPLASMA
GONDII” DA LÁGRIMA E OUTRAS SECREÇÕES POR MÉTODO
IMUNOENZIMÁTICO.**

5 Trata-se da pesquisa, através de um teste Imunoenzimático de
captura, de IgAs específico para toxoplasmose . Permite detectar a presença
e quantificação do anticorpo na lágrima ou em outras secreções do
organismo de indivíduos suspeitos de apresentar toxoplasmoses ocular,
utilizando papel filtro para colheita e armazenamento do material da
10 amostra, o que deverá ser realizado em condições adequadas.

O diagnóstico diferencial da uveítes provocada pelo *T. gondii* está
baseado no imunodiagnóstico sorológico. Estes testes não proporcionam
dados conclusivos, pois nesta doença há produção de vários isotipos de fase
crônica, também presentes em grande parte da população sadia, como IgG
15 elevada . A presença de IgM, indicador de fase aguda nas infecções por
toxoplasma, no quadro ocular é normalmente negativa, desde que trata-se
de reagudização da infecção.

Alguns estudos têm analisado anticorpos no humor aquoso, técnica
invasiva que precisa da coleta do fluido ocular, devendo ser realizada por
20 um médico especialista em oftalmologia.

O estudo da imunoglobulina A secretora anti-*T. gondii* na lágrima e outras secreções do organismo, utilizando papel filtro para a coleta constitui uma inovação. Trata-se de um exame não invasivo, rápido, de fácil realização e com custo acessível, uma vez que utiliza o método
5 imunoenzimático de captura de anticorpos com placas sensibilizadas com antígenos de *T. gondii*, sendo possível seu desenvolvimento na produção industrial.

O teste descrito é inédito, não existindo no mercado, principalmente em relação à toma de amostra que utiliza papel filtro, sendo, portanto, não
10 invasiva e indolor. Essa peculiaridade permite que essa fase do teste venha a ser realizada por pessoas treinadas, não necessariamente médicos oftalmologistas. Ainda mais, o armazenamento do material da amostra é simples, podendo ser efetuado em qualquer localidade para posterior traslado a centros especializados.

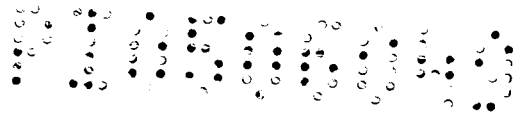
15 A presente invenção tem por objetivo servir de elemento diagnóstico para indivíduos portadores de uveítes provocada pelo *T. gondii*. Atualmente não existe qualquer teste que permita diagnóstico de certeza na doença em questão.

A toxoplasmose ocular não mostra clara preferência por sexo, porém
20 em relação à idade, os trabalhos apontam que é uma doença de jovens, o

que se traduz em problema econômico e social importante pelo severo comprometimento da visão que a doença acarreta. As uveítes têm como primeiro agente etiológico o *Toxoplasma gondii* tanto no Brasil como no mundo, com uma frequência que varia entre 60 a 80%.

5 Maior gravidade reveste a contaminação da mulher grávida desde que o comprometimento do feto tem sido largamente estudado quanto as suas temidas conseqüências. A possibilidade de um teste diagnóstico rápido, de baixo custo e realizável por pessoal para-médico, levanta a possibilidade da fabricação do “Kit” a nível industrial com ampla comercialização.

10 Utiliza papel filtro, de 5.0 x 0.5 cm, para coleta da lágrima do fundo do saco conjuntival inferior, podendo ser coletada qualquer secreção do organismo, com posterior conservação da amostra em condições adequadas por tempo indeterminado até a utilização da mesma. Para determinação dos níveis de IgA secretora é utilizado método imunoenzimático, com
15 sensibilização das placas com antígenos da cepa RH de *T.gondii*.



REIVINDICAÇÕES

1. Atualmente não existe qualquer teste que seja sensível e/ou específico o suficiente para determinar a etiologia das uveítes por *T.gondii*. Aqueles que apresentam melhores resultados são invasivos, desde que
5 fazem necessária punção do bulbo ocular para obtenção de amostras de fluidos intraoculares. A invenção apresentada é caracterizada por um processo que permite a verificação e quantificação de Imunoglobulina A secretora anti-*T. gondii*, da lágrima e outras secreções, por método imunoenzimático. Este método novo é fácil, barato e não invasivo, o que
10 virá a facilitar o diagnóstico da forma ocular da doença bem como das outras formas de apresentação da mesma. As características apresentadas fazem com que este teste possa ser produzido em escala industrial e aplicado nos diversos laboratórios de análises clínicas.

**“PROCESSO DE VERIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE
IMUNOGLOBULINA A SECRETORA “ANTI-TOXOPLASMA *gondii*”
DA LÁGRIMA E OUTRAS SECREÇÕES POR MÉTODO
IMUNOENZIMÁTICO”.**

Toma-se amostra de lágrima com papel filtro, de 5 cm x 0.5cm no fundo de saco conjuntival inferior do olho comprometido, ou de qualquer outra secreção do organismo. A amostra é congelada. Retira-se a lágrima ou outra secreção colhida, para ser submetida à determinação da presença e quantidade de Imunoglobulina A secretora anti-*Toxoplasma gondii*, por meio de método de imunoensaio, prévia sensibilização das placas com antígeno da cepa RH.

“PROCESSO DE VERIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE IMUNOGLOBULINA A SECRETORA “ANTI-*TOXOPLASMA GONDII*” DA LÁGRIMA E OUTRAS SECREÇÕES POR MÉTODO IMUNOENZIMÁTICO”.

5 Trata-se da pesquisa, através de um teste Imunoenzimático de captura, de IgAs específico para toxoplasmose. Permite detectar a presença e quantificação do anticorpo na lágrima ou em outras secreções do organismo de indivíduos suspeitos de apresentar toxoplasmoses ocular, utilizando papel filtro para colheita e armazenamento do material da
10 amostra, o que deverá ser realizado em condições adequadas.

O diagnóstico diferencial da uveítes provocada pelo *T. gondii* está baseado no imunodiagnóstico sorológico. Estes testes não proporcionam dados conclusivos, pois nesta doença há produção de vários isotipos de fase crônica, também presentes em grande parte da população sadia, como IgG elevada. A
15 presença de IgM, indicador de fase aguda nas infecções por toxoplasma, no quadro ocular é normalmente negativa, desde que trata-se de reagudização da infecção.

Alguns estudos têm analisado anticorpos no humor aquoso, técnica invasiva que precisa da coleta do fluido ocular, devendo ser realizada por um
20 médico especialista em oftalmologia. O estudo da imunoglobulina A secretora anti-/. *gondii* na lágrima e outras secreções do organismo, utilizando papel filtro para a coleta constitui uma inovação.

Trata-se de um exame não invasivo, rápido, de fácil realização e com custo acessível, uma vez que utiliza o método imunoenzimático de captura de
25 anticorpos com placas sensibilizadas com antígenos de *T. gondii*, sendo possível seu desenvolvimento na produção industrial. O teste descrito é inédito, não

existindo no mercado, principalmente em relação à toma de amostra que utiliza papel filtro, sendo, portanto, não invasiva e indolor. Essa peculiaridade permite que essa fase do teste venha a ser realizada por pessoas treinadas, não necessariamente médicos oftalmologistas. Ainda mais, o armazenamento do material da amostra é simples, podendo ser efetuado em qualquer localidade para posterior traslado a centros especializados.

A presente invenção tem por objetivo servir de elemento diagnóstico para indivíduos portadores de uveítes provocada pelo *T. gondii*. Atualmente não existe qualquer teste que permita diagnóstico de certeza na doença em questão. A toxoplasmose ocular não mostra clara preferência por sexo, porém em relação à idade, os trabalhos apontam que é uma doença de jovens, o que se traduz em problema econômico e social importante pelo severo comprometimento da visão que a doença acarreta. As uveítes têm como primeiro agente etiológico o *Toxoplasma gondii* tanto no Brasil como no mundo, com uma frequência que varia entre 60 a 80%. Maior gravidade reveste a contaminação da mulher grávida desde que o comprometimento do feto tem sido largamente estudado quanto as suas temidas consequências. A possibilidade de um teste diagnóstico rápido, de baixo custo e realizável por pessoal para-médico, levanta a possibilidade da fabricação do "Kit" a nível industrial com ampla comercialização.

No kit se utiliza papel filtro de retenção elevada entre 0,5 μ m e 2 μ m medindo aproximadamente 0,3 cm a 1 cm de largura e 2 cm a 10 cm de comprimento para coleta da lágrima, com identificação em um dos extremos. A marcação tem por finalidade controlar o volume da lágrima coletada ou de outras secreções do organismo, que deverá apresentar volume de no mínimo 5

uL. O papel de filtro com a amostra coletada pode ser conservado a menos de 5°C até uso.

Para eluição, a amostra deve ser imersa em tampão PBS de molaridade mínima de 0,01 M pH fisiológico entre 7 e 7,5 sob agitação forte e depois se
5 extrai a baixa temperatura (4-0 graus C), durante no mínimo 6 horas. Para determinação dos níveis de IgA secretória é utilizado o método imunoenzimático com placas sensibilizadas com antígeno bruto da cepa RH *Toxoplasma gondii*.

Para exemplificar, temos a utilização de papel filtro de retenção
10 elevada (1 µm) medindo aproximadamente 5 x 0,5 cms para coleta da lágrima, com identificação em um dos extremos. A marcação tem por finalidade controlar o volume da lágrima coletada ou de outras secreções do organismo, que deverá apresentar volume variável de 5 a 25 uL aproximadamente. O papel de filtro com a amostra coletada pode ser conservado a 4°C.

15 Para eluição, a amostra deve ser imersa em tampão PBS 0,01 M pH 7,2 sob agitação forte durante aproximadamente dois minutos e depois se extrai a baixa temperatura (4-0 graus C), durante 18 horas aproximadamente. Para determinação dos níveis de IgA secretória é utilizado o método imunoenzimático com placas sensibilizadas com antígeno bruto da cepa RH
20 *Toxoplasma gondii*.

REIVINDICAÇÕES

1. "PROCESSO DE VERIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE IMUNOGLOBULINA A SECRETORA "ANTI-TOXOPLASMA GONDII DE SECREÇÕES POR MÉTODO IMUNOENZIMÁTICO" composto por um
5 dispositivo de proteção, um papel filtro de retenção elevada para coleta, um tampão para extração e uma placa de poliestireno, caracterizado pelo papel filtro ter poros entre 0,5 μ m e 2 μ m, largura de 0,3 cm a 1 cm e comprimento de 2 cm a 10 cm, ser conservado, após coleta da secreção, a menos de 5°C, ter marcação para controlar o volume da secreção que deve ser no mínimo
10 de 5 μ L; pelo tampão fosfato salino (PBS) ter molaridade mínima de 0,01 M e pH fisiológico entre 7 e 7,5, que agitado fortemente em conjunto com o papel filtro contendo a secreção permite, após no mínimo 6 horas de repouso a baixa temperatura, a extração da secreção; pela placa de poliestireno conter antígeno de T. Gondii onde é depositado o material extraído
15 onde se realiza a reação imunoenzimática para captura de IgA específica, finalizando o processo.

2. "PROCESSO DE VERIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE IMUNOGLOBULINA A SECRETORA "ANTI-TOXOPLASMA GONDII DE SECREÇÕES POR MÉTODO IMUNOENZIMÁTICO" conforme reivindicação
20 1 caracterizado pelo papel filtro ter poros de 1 μ m, largura de 0,5 cm e comprimento de 5 cm, ser conservado, após coleta da secreção, a 4°C ou congelado até uso, ter marcação para controlar o volume da secreção que deve ser de 25 μ L; pelo tampão fosfato salino (PBS) ter molaridade 0,01 M e pH de 7,2, que agitado fortemente durante dois minutos em conjunto com
25 o papel filtro contendo a secreção, permite, após 18 horas de repouso a temperatura de 0 a 4°C, a extração da secreção; pela placa de poliestireno

conter antígeno de T. Gondii onde é depositado o material extraído onde se realiza a reação imunoenzimática para captura de IgA específica finalizando o processo.

3. "PROCESSO DE VERIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE
5 IMUNOGLOBULINA A SECRETORA "ANTI-TOXOPLASMA GONDII DA
LÁGRIMA POR MÉTODO IMUNOENZIMÁTICO" conforme reivindicação 1,
caracterizado pelo papel filtro ter poros entre 0,5µm e 2µm, largura de 0,3
cm a 1 cm e comprimento de 2 cm a 10 cm, ser conservado, após coleta da
lágrima, a menos de 5°C, ter marcação para controlar o volume da lágrima
10 que deve ser no mínimo de 5 µL; pelo tampão fosfato salino (PBS) ter
molaridade mínima de 0,01 M e pH fisiológico entre 7 e 7,5, que agitado
fortemente em conjunto com o papel filtro contendo a lágrima permite,
após no mínimo 6 horas de repouso a baixa temperatura, a extração da
lágrima; pela placa de poliestireno conter antígeno de T. Gondii onde é
15 depositado o material extraído onde se realiza a reação imunoenzimática para
captura de IgA específica finalizando o processo.

4. "PROCESSO DE VERIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE
IMUNOGLOBULINA A SECRETORA "ANTI-TOXOPLASMA GONDII DA
LÁGRIMA POR MÉTODO IMUNOENZIMÁTICO" conforme reivindicação 3
20 caracterizado pelo papel filtro ter poros de 1µm, largura de 0,5 cm e
comprimento de 5 cm, ser conservado, após coleta da lágrima, a 4°C ou
congelado até uso, ter marcação para controlar o volume da lágrima que
deve ser 25 µL, pelo tampão fosfato salino (PBS) ter molaridade 0,01 M e
pH de 7,2, que agitado fortemente durante dois minutos em conjunto com o
25 papel filtro contendo a lágrima, permite, após 18 horas de repouso a
temperatura de 0 a 4°C, a extração da lágrima, pela placa de poliestireno

conter antígeno de T. Gondii onde é depositado o material extraído onde se realiza a reação imunoenzimática para captura de IgA específica finalizando o processo.