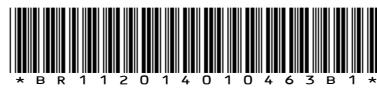




República Federativa do Brasil  
Ministério da Economia  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) BR 112014010463-8 B1



(22) Data do Depósito: 25/10/2012

(45) Data de Concessão: 30/03/2021

**(54) Título:** PROCESSO PARA DETECTAR UM OU MAIS SOROTIPOS DO VÍRUS DA DENGUE EM UMA AMOSTRA E PROCESSO PARA DIAGNOSTICAR OU CONFIRMAR O DIAGNÓSTICO DA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DO VÍRUS DA DENGUE EM UM INDIVÍDUO

(51) Int.Cl.: C12Q 1/68; C12Q 1/04; C12N 15/11.

(30) Prioridade Unionista: 01/11/2011 US 61/554,126.

(73) Titular(es): THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF AMERICA, AS REPRESENTED BY THE SECRETARY, OF THE DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES.

(72) Inventor(es): JORGE L MUÑOZ JORDAN; EDGARDO VERGNE; GILBERTO SANTIAGO.

(86) Pedido PCT: PCT US2012061828 de 25/10/2012

(87) Publicação PCT: WO 2013/066705 de 10/05/2013

(85) Data do Início da Fase Nacional: 30/04/2014

**(57) Resumo:** PROCESSO PARA DETECTAR UM OU MAIS SOROTIPOS DO VÍRUS DA DENGUE EM UMA AMOSTRA, KIT PARA DETECÇÃO DA INFECÇÃO POR VÍRUS DA DENGUE, OLIGONUCLEOTÍDEO ISOLADO, PLURALIDADE DE OLIGONUCLEOTÍDEOS ISOLADOS, PROCESSO PARA DIAGNOSTICAR OU CONFIRMAR O DIAGNÓSTICO DA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DO VÍRUS DA DENGUE EM UM INDIVÍDUO, PROCESSO PARA DETECTAR A PRESENÇA OU AUSÊNCIA DO VÍRUS DA DENGUE EM UMA AMOSTRA E USO DE UM PRIMER OU SONDA DE ÁCIDO NUCLÉICO PARA PREPARAR UMA COMPOSIÇÃO PARA DIAGNOSTICAR OU CONFIRMAR A PRESENÇA OU AUSÊNCIA DO VÍRUS DA DENGUE EM UM INDIVÍDUO. A presente invenção provê processos para detecção do ácido nucléico do vírus da Dengue (DENV) em uma amostra incluindo a produção de um produto de amplificação para amplificar a sequência de nucleotídeos DENV e detecção de uma amplificação por hibridização de uma sonda ou outra técnica. Os processos utilizam primers ou sondas com mutações introduzidas e ou degeneram as bases que provem excelente superioridade na detecção e sorotipagem de DENV em uma amostra.

"PROCESSO PARA DETECTAR UM OU MAIS SOROTIPOS DO VÍRUS DA DENGUE EM UMA AMOSTRA E PROCESSO PARA DIAGNOSTICAR OU CONFIRMAR O DIAGNÓSTICO DA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DO VÍRUS DA DENGUE EM UM INDIVÍDUO"

Campo da invenção

[001] Esta invenção refere-se geralmente a processos para detecção dos organismos exógenos em amostras fluidas. Mais especificamente, a invenção refere-se à detecção do vírus da dengue (DENV) em meio biológico ou em outro meio fluido. Os processos são descritos para detecção rápida e sensível e subtipagem (sorotipagem) de DENV em amostras biológicas e quantificação da mesma. Os kits de diagnóstico são provados para detecção de sorotipos DENV em amostras de sangue (soro ou plasma) a partir de pacientes com sintomas da doença da dengue em uma clínica, laboratório, ou em um cenário em campo.

Antecedentes da invenção

[002] O vírus da Dengue (DENV) é a causa da doença da dengue (febre da dengue, dengue hemorrágica, e síndrome do choque da dengue), que é relatado em centenas de milhares de pessoas a cada ano. A febre da dengue hemorrágica é fatal em cerca de 0,5% dos casos. Os DENVs são um grupo de quadro arbovírus mais proximamente relacionados, representados pelos sorotipos DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4. Nas áreas de alta presença do vírus, todos os quatro sorotipos de DENV podem estar circulando simultaneamente.

[003] Os quatro sorotipos de DENV são distintos antigenicamente, mas relacionados sorologicamente. Assim, a infecção por um sorotipo não provê proteção a partir das infecções subsequentes por outros sorotipos. Os estudos

demonstraram que o hospedeiro desenvolveu anticorpos dirigidos ao primeiro sorotipo infectante pode ter alguma afinidade para um segundo sorotipo infectante e conduz à melhora da capacidade do segundo vírus infectar o hospedeiro. [004] Os pacientes com dengue usualmente procuram atenção médica durante os primeiros cinco dias da doença; quando o vírus está presente no sangue e os anticorpo IgM não são detectáveis. Portanto, os testes de diagnóstico confiam altamente em sua capacidade de detectar os componentes virais tais como RNA viral.

[005] A identificação do DENV através de métodos sorológicos é complicado devido a extensiva reatividade cruzada entre os flavivírus. O nível de IgM circulante não é uniforme com base no tipo de infecção. Por exemplo, a infecção por um segundo sorotipo DENV pode mostrar pouco a nenhuma resposta IgM, e sua presença pode ser mascarada pelo IgM circulante tanto antes da infecção por DENV, quanto a partir da infecção por um outro flavivírus. Assim, em áreas com transmissão alta ou transmissão epidêmica de flavivírus múltiplos, identificação de DENV pode não ser possível pelos métodos serológicos.

[006] Dentro de cada sorotipo DENV, existem 4-6 genotipos, que representa linhagens que podem diferir a partir de outra, em aproximadamente 5-10% de seus genomas.

[007] Assim, existe a necessidade para composições e métodos para a detecção específica de DENV em amostras fluidas tais como, todo o sangue, plasma, ou soro precoce durante a apresentação da doença que não depende da sorologia do anticorpo, ainda é suficientemente específico o suficiente para detectar amplamente os múltiplos sorotipos DENV.

### Sumário da invenção

[008] A descrição a seguir do sumário da invenção é provida para facilitar um entendimento de algumas das características inovativas únicas da presente invenção e não pretendem ser uma descrição completa. Uma apreciação total de vários aspectos da invenção pode ser conseguida a partir de todo o relatório, das reivindicações, desenhos, e resumo como um todo.

[009] As composições e métodos são providos para detecção superior de DENV em uma amostra tal como uma amostra fluida. Estes métodos capitalizam um ou mais primers ou sondas apropriadas para uso com um sistema de análise capitalizando a reação de cadeia de polimerase que permite a detecção de todos os vírus conhecidos em um sorotipo específico. Como tal, os métodos e composições providos podem ser utilizados para prover crédito superior na determinação da presença ou ausência de um vírus DENV em uma amostra tanto em um formato de análise singleplex ou multiplex.

[010] Os processos são providos para detecção de DENV em uma amostra que inclui a produção de um produto de amplificação através da amplificação de uma sequência de nucleotídeos usando um primer à frente que hibridiza em uma primeira região dentro do genoma do vírus da Dengue, e um primer reverso que hibridiza em uma segunda região dentro do genoma do vírus da Dengue, sob condições apropriadas para uma reação de cadeia de polimerase e, opcionalmente, onde pelo menos um dos primer à frente ou primer reverso tem um ou mais substituições de nucleotídeos degeneradas ou não alelo selvagem; e detecção de um primeiro sinal de detecção da correlação para a presença do produto de amplificação para

detectar o vírus da Dengue em uma amostra. Um primeiro primer inclui, opcionalmente, a sequência da SEQ ID NO:1; SEQ ID NO:4; SEQ ID NO:7; SEQ ID NO:10; ou combinações destes primers são utilizados. Um primer reverso opcionalmente inclui a sequência da SEQ ID NO:2; SEQ ID NO:5; SEQ ID NO:8; SEQ ID NO:11, ou combinações destes primers são utilizados. Uma sonda inclui, opcionalmente, a sequência de SEQ ID NO:3; SEQ ID NO:6; SEQ ID NO:9; SEQ ID NO:12, ou combinações destas sondas são utilizadas.

[011] Qualquer sistema de detecção apropriado pode ser utilizado para detectar um produto de amplificação, mesmo na ausência de uma sonda. Na ausência de uma sonda, um primeiro sinal de detecção é produzido pelo próprio produto de amplificação ou pelo sinal de não sonda dirigido ao produto de amplificação. Ilustrativamente, um produto de amplificação é detectado pela eletroforese em gel, Southern blotting, cromatografia líquida, espectrometria de massa, cromatografia líquida/espectrometria de massa, espectrometria de massa, fluorescência estática, fluorescência dinâmica, cromatografia líquida de alta performance, cromatografia líquida de ultra-desempenho, análise de imuno-absorvância ligada a enzima, PCR em tempo real, sequenciamento de nucleotídeo, ou combinações dos mesmos.

[012] As composições e os processos podem ser utilizados para diagnosticar ou confirmar o diagnóstico da presença ou ausência de DENV em um indivíduo ou confirmar a presença ou a ausência de um DENV em uma amostra, ou para preparação de uma composição, kit, ou outros dispositivos que podem ser utilizados para diagnosticar ou confirmar o diagnóstico da presença ou ausência de DENV em um indivíduo ou uma amostra.

[013] As composições e processos providos melhoram dramaticamente a crença em diagnósticos ou detecção no DENV a partir de um ou mais sorotipos em uma amostra.

Breve descrição dos desenhos

[014] A figura 1 ilustra a detecção específica dos sorotipos DENV 1-4, como medido em equivalentes na cópia do genoma pro mL da amostra (GCE/mL) entre as diluições do vírus no soro humano e no plasma humano demonstrando a Figura 1A dos formatos de análise (singleplex) e na figura 1B (multiplex); e

[015] A figura 2 representa a capacidade da análise para detectar os sorotipos DENV após os ciclos de congelamento/descongelamento múltiplos.

Descrição detalhada das concretizações da invenção

[016] A descrição a seguir das concretizações particulares é meramente exemplificativo na natureza e não é um caminho pretendido limitar o escopo da invenção, sua aplicação, ou usos, que podem é claro, variar. A invenção é descrita com relação às definições não limitativas e a terminologia incluída aqui. Estas definições e terminologia não são designadas para funcionar como uma limitação no escopo ou na prática da invenção, mas são apresentados para ilustrar e descrever os propósitos apenas. Embora os processos são descritos como uma ordem de etapas individuais ou usando materiais específicos, é apreciado que as etapas descritas ou materiais podem ser intercaladamente tais que a descrição da invenção inclui partes múltiplas ou etapas arranjadas em muitos caminhos como é facilmente apreciado por um técnico no assunto. Embora vários elementos da descrição são dirigidos aos primers da SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, e a sonda da SEQ ID

NO:3, é apreciado que outros primers ou sondas são substituíveis como é facilmente apreciado por um técnico no assunto, bem como, a inclusão de primers da SEQ ID NO:1; SEQ ID NO:2; e sonda da SEQ ID NO:3 em uma análise multiplex, junto com outros primers e sondas.

[017] A invenção tem utilidade para a detecção de DENV em uma amostra. Como é atualmente necessário detectar DENV em espécimes clínicos através de métodos padrões sorológicos, técnicas sensíveis tal como RT-PCR pode prover um diagnóstico mais confiável do que outros sistemas de análise atualmente empregados. As tentativas anteriores na designação de ácido nucléico com base nos métodos de diagnóstico obteve um sucesso limitado devido ao pouco reconhecimento de sorotipos DENV múltiplos, incapacidade aos multiplex da análise, ou perda da sensibilidade. Apesar das falhas dos investigadores anteriores, os inventores identificaram uma nova família de primers e sondas apropriadas para o RT-PCR únicos ou o RT-PCR em tempo real multiplexado que são mais superiores ao primer anteriores, e sequências de sondas na sua capacidade para amplificar e detectar todos os quatro sorotipos de DENV a partir dos membros múltiplos dos sorotipos que tem variações das sequências.

[018] As composições e métodos são providos para a detecção sensível de DENV em amostras, tais como amostras biológicas ou amostras dos meios, usando técnicas envolvendo PCR. Os primers são providos pra amplificar as regiões do RNA genético de DENV com alta especificidade e amplo reconhecimento de DENV que são subsequentemente detectáveis, opcionalmente, pelo sistema de detecção sensível.

[019] Os termos de definição a seguir são utilizados

através do relatório com relação ao deslocamento relativo destes termos.

[020] Como utilizado aqui, o termo "variante" define tanto um mutante genético de ocorrência natural de DENV ou uma variação recombinantemente preparada do DENV. O termo "variante" pode também referir tanto a uma variação de ocorrência natural de um determinado peptídeo codificado ou uma variação de preparado recombinantemente de um determinado peptídeo codificado ou proteína no qual um ou mais resíduos de aminoácidos foram modificados pela substituição do aminoácido, adição, ou deleção de aminoácido.

[021] Como utilizado aqui, o termo "análogo" no contexto de uma análogo não proteináceo define uma segunda molécula orgânica ou inorgânica que possui uma função similar ou idêntica como uma primeira molécula orgânica ou inorgânica e é estruturalmente similar à primeira molécula orgânica ou inorgânica.

[022] Como utilizado aqui, o termo "derivado" no contexto de um derivado não proteináceo define uma segunda molécula orgânica ou inorgânica que é formado com base na estrutura de uma primeira molécula orgânica ou inorgânica. Um derivado de uma molécula orgânica inclui, mas não está limitado a, uma molécula modificada, por exemplo, pela adição ou deleção de uma hidroxila, metila, etila, carboxila ou grupo amina. Uma molécula orgânica pode também ser esterificada, alquilada e/ou fosforilada. Um derivado também define como uma base de degeneração imitando uma mistura C/T, tal como aquele obtido da "Glen Research Corporation", Sterling, VA, ilustrativamente LNA-dA ou LNA-dT, ou outra modificação de nucleotídeo conhecido da técnica ou de outromodo.

[023] Como utilizado aqui, o termo "mutante" define a presença de mutações na sequência de nucleotídeo de um organismo quando comparado a um organismo alelo-selvagem. Um mutante é uma variante.

[024] A descrição de primers e sondas para amplificar e detectar um ou mais moléculas de ácido nucléico alvo é apresentada. Em algumas concretizações, o primer, sondas, ou ambos incluem, especificamente, variantes, análogos, derivados e mutantes das sequências apresentadas aqui. Em algumas concretizações, os primers, sondas, ou ambos excluem especificamente variantes, análogos, derivados, e mutantes das sequências ensinadas aqui ou as sequências alelo-selvagem.

[025] Como utilizado aqui, o termo "hibridiza sob condições severas" descreve condições para hibridização e lavagem sob a qual as sequências de nucleotídeos tendo pelo menos 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, ou mais, pares de base combinados, um com outro que permaneceu tipicamente hibridizado um no outro. As condições de hibridização ilustrativas são descritas em, por exemplo, mas não limitadas a, "Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1 6.3.6.; Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier Science Publishing Co., Inc., N.Y. ( 1986), pp.75 78, and 84 87; and Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. ( 1982), pp.387 389" e são bem conhecidos dos técnicos no assunto. Um exemplo não limitativo de condições de hibridização severas é a hibridização em 6x de cloreto de sódio/citrato de sódio (SSC), 0,5% de SDS em cerca de 60°C seguido por um ou mais lavagens em 2x SSC, 0,5% de SDS em temperatura ambiente. Um

outro exemplo não limitativo de condições de hibridização severas é a hibridização em 6xSSC em cerca de 45°C após uma ou mais lavagens em 0,2 xSSC, 0,1% SDS em 50 a 65°C. Outras condições de hibridização severas serão evidentes a um ou mais técnicos no assunto com base no conhecimento geral da técnica, bem como neste pedido.

[026] Uma sequência de nucleotídeo ou oligonucleotídeo "isolado" ou "purificado" é substancialmente livre de material celular ou outras proteínas contaminantes da fonte de célula ou de tecido a partir da qual o nucleotídeo é derivado, ou é substancialmente livre de precursores químicos ou outros químicos quando quimicamente sintetizados. A linguagem "substancialmente livre de material celular" inclui preparações de um nucleotídeo/oligonucleotídeo na qual o nucleotídeo/oligonucleotídeo é separado de componentes celulares das células a partir das quais ele é isolado ou produzido. Assim, um nucleotídeo/oligonucleotídeo que é substancialmente livre de material celular inclui preparações do nucleotídeo tendo menos que cerca de 30%, 20%, 10%, 5%, 2,5%, ou 1% (em peso seco) do material contaminante. Quando nucleotídeo/oligonucleotídeo é produzido pela síntese química, é opcionalmente substancialmente livre de precursores químicos ou outros químicos, ou seja, é separada dos precursores químicos ou de outros químicos que estão envolvidos na síntese da molécula. Consequentemente, tais preparações de nucleotídeo/oligonucleotídeo têm menos que cerca de 30%, 20%, 10%, ou 5% (em peso seco) de precursores químicos ou outros compostos de nucleotídeo/oligonucleotídeo de interesse. Em algumas concretizações da presente invenção, um nucleotídeo/oligonucleotídeo é isolado ou purificado. Este

termo "isolado" ou "purificado" é exclusivo de um ácido nucléico que é um membro de uma biblioteca que não foram purificados a partir de clones de outras bibliotecas contendo outras moléculas de ácido nucléico.

[027] Como utilizado aqui, o termo "amostra" é uma porção de uma fonte maior. Uma amostra é opcionalmente sólida, gasosa, ou fluida. Uma amostra é ilustrativamente uma amostra do meio ou uma amostra biológica. Uma amostra do meio é ilustrativamente, mas não limitada a, água, esgoto, solo, ou ar. Uma "amostra biológica" é uma amostra obtida a partir do organismo biológico, um tecido, célula, meio de cultura celular, ou qualquer meio apropriado para imitar as condições biológicas. Exemplos não limitativos incluem, saliva, secreções da gengiva, fluido cerebroespinal, fluido gastrointestinal, muco, secreções urogenitais, fluidosinovial, sangue, soro, plasma, urina, fluidocístico, fluido da linfa, ascites, efusão pleural, fluido intersticial, fluido intracelular, fluidos ocular, fluido seminal, secreções de mama, e fluido vitreal, e secreções nasais, materiais de garganta e nasal. Em algumas concretizações, os agentes alvos estão contidos em: soro, plasma, todo o sangue; fezes, urina, fluido de garganta, fluido nasofaringeal, ou outro fluido respiratório.

[028] Como utilizado aqui, o termo "meio" se refere a qualquer líquido ou amostra fluida na presença ou ausência de um vírus. Um meio é ilustrativamente uma amostra sólida que foi suspensa, solubilizada, ou de outro modo combinada com o fluido para formar uma amostra fluida. Exemplos não limitativos incluem solução de salina tamponada, médio de cultura celular, acetonitrila, ácido trifluoroacético,

combinações dos mesmos, ou qualquer outro fluido reconhecido no estado da técnica, como apropriado para combinação com o vírus ou outras células, ou para diluição de uma amostra biológica ou amplificação do produto para análise.

[029] Para determinar a porcentagem de identidade de duas sequências de ácido nucléico, as sequências são alinhadas para o propósito de comparação ótima (por exemplo, lacunas podem ser introduzidas nas sequências de um primeiro aminoácido ou sequencia de ácido nucléico para o alinhamento ótimo com um segundo aminoácido ou sequência de ácido nucléico). Os nucleotídeos nas posições de nucleotídeo correspondentes são então comparados. Quando uma posição na primeira sequência é ocupada pelos mesmos nucleotídeos que na posição correspondente na segunda sequência, então as moléculas são idênticas naquela posição. A porcentagem de identidade entre as duas sequências é uma função do número de posições idênticas compartilhadas pelas sequências (ou seja, % de identidade = número de identidade de sobreposição das posições/número total de posições, tempo.100%). Em algumas concretizações, as duas sequências tem o mesmo comprimento.

[030] A determinação da porcentagem de identidade entre duas sequências podem também ser acompanhada usando um algoritmo matemático. Um exemplo não limitativo de um algoritmo matemático utilizado para comparação de duas sequências é o algoritmo de Karlin e Altschul, 1990, PNAS 87:2264, 2268, modificado como em Karlin e Altschul, 1993, PNAS. 90:5873-5877. O referido algoritmo é incorporado dentro de programas NBLAST e XBLAST de Altschul et al., 1990, "J. Mol. Biol.", 215:403. As buscas nos nucleotídeos BLAST são realizadas com o conjunto de parâmetros do programa de

nucleotídeo NBLAST, por exemplo, para pontuação =100, comprimento =12 para obter as sequências de nucleotídeos homólogos para uma molécula de ácido nucléico da presente invenção. A busca por proteína BLAST é realizada com os parâmetros do programa XBLAST, por exemplo, a pontuação 50, comprimento 3 para obter as sequências de aminoácidos homólogos para uma molécula de proteína da presente invenção. Para obter os alinhamentos das lacunas para o propósito de comparação, Gapped BLAST são utilizados como descrito em Altschul et al., 1997, "Nucleic Acids Res.", 25:3389-3402. Alternativamente, PSI BLAST é utilizado para realizar uma busca inteirada que detecta a relação da distância entre as moléculas (Id). Quando se utiliza os programas BLAST, Gapped BLAST, e PSI BLAST, os parâmetros de omissão dos respectivos programas (por exemplo, de XBLAST e NBLAST) são utilizados (ver, por exemplo, o site NCBI). Um outro exemplo não limitativo de um algoritmo matemático utilizado para a comparação das sequências é o algoritmo de Myers e Miller, 1988, CABIOS 4:11-17. O referido algoritmo é incorporado no programa ALIGN (versão 2.0) que é parte do pacote do software de alinhamento da sequência GCG. Quando utiliza-se o programa ALIGN para comparação as sequências de aminoácido, uma tabela de resíduos com peso PAM120, um comprimento de intervalo de 12, e uma falta de intervalo ("gap penalty") de 4 é utilizada.

[031] A porcentagem de identidade entre duas sequências é determinada usando técnicas similares para aquelas descritas aqui ou de outro modo conhecidas da técnica, com ou sem a permissão de intervalos. No cálculo da porcentagem de identidade, tipicamente apenas as combinações exatas são

contadas.

[032] Como utilizado aqui, os termos "indivíduo" e "paciente" são sinônimos e se referem a um humano ou a um animal não humano, opcionalmente, um mamífero, incluindo um humano, um não primata, tal como vaca, porco, cavalo, cabra, ovelha, gatos, cachorros, espécies de aves e roedores; e um primata não humano tal como macaco, chimpanzé, e macaco ("apes"); e um humano, também opcionalmente descrito especificamente como um "indivíduo humano".

[033] Os processos são descritos os quais proveem uma análise rápida, específica e sensível para detecção de DENV em uma amostra através da amplificação de uma ou mais sequências de nucleotídeos do genoma de RNA de DENV pelo processo similar ao da reação em cadeia de polimerase (PCR). Os processos são similarmente providos para diagnóstico da presença ou ausência da infecção DENV em um indivíduo. A presença de DENV detectada em uma amostra a partir do indivíduo diagnostica ou confirma um diagnóstico precoce da infecção do indivíduo por DENV. A ausência de DENV em uma amostra a partir de um indivíduo diagnostica a ausência de uma infecção do indivíduo por DENV.

[034] Um primer à frente de oligonucleotídeo com uma sequência de nucleotídeo complementar a uma sequência única em uma sequência de nucleotídeo DENV é hibridizado a sua sequência complementar e estendida. Uma sequência de nucleotídeo é complementar se ela hibridiza sob condições sevaras. Similarmente, um primer reverso de oligonucleotídeo complementa a uma segunda fita do RNA de DENV (ou DNA transscrito de forma reversa) é hibridizado e estendido. O produto de amplificação do primer reverso e à frente sobrepõe

na sequência complementar provendo um produto de amplificação uniforme a partir de cada par de primers reverso e à frente. Este sistema permite a amplificação das sequências de ácido nucleico específicas e é apropriado para sistemas de detecção simultâneo e sequencial.

[035] A presente invenção refere-se ao uso da informação da sequencia de DENV para diagnosticar ou outros processos de detecção. Em particular, a presente invenção provê um processo para detecção a presença ou ausência de moléculas de ácido nucléico de DENV, variantes naturais ou artificiais, análogos, ou derivados dos mesmos, em uma amostra. Em algumas concretizações, os processos envolvem a obtenção de uma amostra biológica a partir de um ou mais de várias fontes e contatar a amostra com um composto ou um agente (por exemplo, primer ou sonda) capazes de detectar uma sequência de ácido nucléico de DENV, variantes naturais ou artificiais, análogos, ou derivados dos mesmos, tais que a presença de DENV, variantes naturais ou artificiais, análogos, ou derivados dos mesmos, seja detectada na amostra. Opcionalmente, a infecção por DENV é diagnosticada pela positividade da detecção de um ou mais sorotipos de DENV na amostra. Em algumas concretizações, a presença de DENV, variantes naturais ou artificiais, análogos ou derivados dos mesmos, é detectada na amostra usando uma reação de PCR ou reação em cadeia de polimerase em tempo real (RT-PCR) incluindo primers que são construídos com base em uma sequência de nucleotídeo parcial do organismo DENV com a provisão de que pelo menos um de uma sonda, primer à frente, ou primer reverso, aloje a sequência que não é alelo-selvagem. Os inventores descobriram que pela introdução dos

nucleotídeos não alelo-selvagem e, opcionalmente, um ou mais posições de degeneração do não-alelo selvagem, o uso dos primers ou sondas resulta em muito mais afinidade de detecção do que previamente detectável pelas sequências de primers e sonda da técnica anterior ou combinações de sequências. A localização de um nucleotídeo não alelo-selvagem ou degeneração foi supreendentemente sem conhecimento da técnica que sugere que estas posições ou tipos de substituições poderiam alterar uma análise de detecção.

[036] Os primers devem ser designados para amplificar o alvo a partir do maior número de cepas DENV enquanto previne, simultaneamente, os falsos positivos. Em uma concretização não limitativa, um primer à frente designado para ter sucesso na amplificação seletiva em um PCR com base na análise, tal como em um processo RT-PCR é ilustrativamente 5'-CAAAAGGAAGTCGYGCAATA-3' (SEQ ID NO:1). Como utilizado aqui, a anotação de nucleotídeo "Y" representa uma purina degenerada que é tanto adenina ou guanina. A observação de nucleotídeo "R" como utilizada aqui representa uma pirimidina degenerada que é tanto timina ou citosina. Em algumas concretizações para detecção de DENV-1, um primer reverso designado para ter sucesso para a amplificação seletiva em um PCR com base na análise, tal como em um processo RT-PCR é ilustrativamente 5'-CTGAGTGAATTCTCTTGCTRAAC-3' (SEQ ID NO:2). Em algumas concretizações, os primers utilizados em um processo são as sequências de ácido nucléico da SEA ID NOS: 1 e 2. Como utilizado aqui, o termo "amplificar" é definido como produzindo uma ou mais cópias de uma molécula alvo, ou uma complementação do mesmo. Um ácido nucléico tal como DNA ou RNA é amplificado para produzir um ou mais produtos de

amplificação. Ilustrativamente, um primer à frente e um primer reverso opcional são contatados com um alvo sob condições apropriados para uma reação em cadeia de polimerase para produzir um produto de amplificação.

[037] Um agente para detecção das sequências de ácido nucléico DENV é, opcionalmente, uma sonda de ácido nucléico marcada capaz de hibridizar a uma porção do genoma DENV, ou produtos de amplificação derivado do mesmo, tal como DNA produzido pela transcrição reversa do genoma RNA ou uma porção do mesmo. Em algumas concretizações para a detecção de DENV-1, a sonda de ácido nucléico é uma molécula de ácido nucléico da sequência de ácido nucléico de 5'-CATGTGGYTGGGAGCRCGC-3' (SEQ ID NO:3), que hibridiza suficiente e especificamente sob condições adversas em uma sequência de ácido nucléico de DENV. Uma sonda é, opcionalmente, marcada com uma molécula fluorescente tal como uma molécula fluoresceína (FAM) e, opcionalmente, um supressor, tal como o supressor de buraco negro ("black hole") BHQ1.

[038] Os primers e sondas são providos para detecção singleplex e multiplex de um ou mais sorotipos de DENV em uma amostra. Os primers ilustrativos e sondas são providos na tabela 1, onde os nucleotídeos em negrito representam a localização da base degenerada ou outras substituições não alelo-selvagem.

Tabela 1

	Oligonucleotídeo		SEQ ID NO:
D1-f	CDC DENV-1-4 RT-PCR em tempo real	CAAAAG GAAGTCGYG CAATA	1
D1-r	CDC DENV-1-4 RT-PCR em tempo real	CAAAAG GAAGTCGYG CAATA	2

D1-Sonda	CDC DENV-1-4 RT-PCR em tempo real	CATGTGGYTGGGAGCRCGC	3
D2-F	CDC DENV-1-4 RT-PCR em tempo real	CAGGCTATGG C ACY GTCACG AT	4
D2-R	CDC DENV-1-4 RT-PCR em tempo real	CCATYTGCAGCARCACCATCTC	5
D2-Sonda	CDC DENV-1-4 RT-PCR em tempo real	CTCYCCRAGAACGGGCCTCGACTTCAA	6
D3-F	CDC DENV-1-4 RT-PCR em tempo real	ACTRG ACAC ACG CACCCA	7
D3-R	CDC DENV-1-4 RT-PCR em tempo real	CATGTCTCTACCTTCTCGACTTGYCT	8
D3-Sonda	CDC DENV-1-4 RT-PCR em tempo real	ACCTGGATGTCGGCTGAAGGAGCTTG	9
D4-F	CDC DENV-1-4 RT-PCR em tempo real	TTGTCCTAATGATGCTRGTCG	10
D4-R	CDC DENV-1-4 RT-PCR em tempo real	TCCACCYGAGACTCCTCCA	11
D4-Sonda	CDC DENV-1-4 RT-PCR em tempo real	TYCCTACYCCTACGCATCG CATTCCG	12

[039] Os processos envolvem, opcionalmente, uma análise de PCR em tempo real (RT-PCR), opcionalmente, uma análise de PCR quantitativa em tempo real. Em algumas concretizações, a análise de PCR é uma análise TaqMan (Holland et al., PNAS 88 (16):7276 (1991)). É apreciado que os processos sejam amenos para realização de um outro sistema de RT-PCR e os protocolos que utilizam reagentes alternativos ilustrativamente incluindo, mas não limitados as sondas moleculares Beacons, sondas Scorpion, repórteres múltiplos para o PCR multiplex, combinações dos mesmos, ou outros sistemas de detecção de DNA.

[040] As análises são realizadas em um instrumento designado para realizar as referidas análises, por exemplo, aqueles disponíveis na Applied Biosystems (Foster City, Calif.). Em algumas concretizações uma análise de PCR quantitativa em tempo real é utilizada para detectar a presença de DENV, variações naturais ou sintéticas, análogos,

ou derivados dos mesmos, em uma amostra através da submissão do ácido nucléico de DENV de uma amostra para as reações de PCR usando primers específicos, e a detecção o produto amplificado usando uma sonda uma sonda. Em algumas concretizações, a sonda é uma sonda Taqman que consiste de um oligonucleotídeo com um corante repórter-5' e um corante 3'-supressor.

[041] Um corante repórter fluorescente, tal como corante FAM (ilustrativamente, 6-carboxifluoresceína), é covalentemente ligado, opcionalmente à extremidade 5' da sonda de oligonucleotídeo. Outros corantes incluem, ilustrativamente TAMRA, corante AlexaFluor, tal como AlexaFluor 495 ou 590, Azul Cascade, marina Blue, Pacific Blue, Oregon Green, Rhodamine, Fluoresceína, TET, HEX, Cy5, Cy3, e tetrametilrodamina. Um repórter é, opcionalmente, suprimido por um corante na extremidade 3' ou outra supressor não fluorescente. As moléculas supressoras são, opcionalmente, apropriadamente combinadas ao máximo de fluorescência do corante. Qualquer sonda fluorescente apropriada para uso em sistemas de detecção RT-PCR é ilustrativamente operável no exemplo da invenção. Similarmente, qualquer molécula supressora para uso nos sistemas RT-PCR é ilustrativamente operável. Em algumas concretizações, um corante repórter 6-carboxifluoresceína está presente na extremidade 5'- e combinado ao BLACK HOLE QUENCHER (BHQ1, Biosearch Technologies, Inc., Novato, CA). Os sinais de fluorescência a partir destas reações são capturados no extremo das etapas de extensão como produto de PCR é gerado em uma faixa de ciclos térmicos, permitindo, desse modo, a determinação quantitativa da carga de bactéria

na amostra com base em um plano de amplificação.

[042] As sequências de ácido nucléico DENV são, opcionalmente, transcrições reversas e/ou amplificadas antes ou simultaneamente quando detectada. O termo "amplificado" define o processo de preparo de cópias múltiplas do ácido nucléico a partir de uma cópia única ou número de cópias inferiores da molécula da sequência de ácido nucléico. A amplificação da sequência de ácido nucléico é realizada *in vitro* através dos processos bioquímicos conhecidos pelos técnicos no assunto, ilustrativamente pelas técnicas de PCR. O agente de amplificação pode ser qualquer composto ou sistema que irá funcionar para acompanhar a síntese dos produtos de extensão do primer, incluindo enzimas. As enzimas apropriadas para este propósito incluem, por exemplo, polimerase de DNA de *E.coli* I, polimerase Taq, fragmento Klenow da polimerase de DNA de *E. coli* I, polimerase de DNA T4, polimerase de DNA ampliTaq Gold, a partir de Biosistemas ampliados, outras polimerases de DNA disponíveis, transcriptase reversa (preferivelmente, iScript RNase H+ transcriptase reversa), ligase, e outras enzimas, incluindo enzimas estáveis ao calor (ou seja, aquelas enzimas que realizam a extensão do primer após ser submetida a temperaturas suficientemente elevadas para causar desnaturação). Em algumas concretizações, a enzima é polimerase iTaq DNA iniciada por calor, obtida da Bio-rad (Hercules, CA). As enzimas apropriadas irão facilitar a combinação de nucleotídeos de maneira apropriada para formar os produtos de extensão do primer que são complementares a cada fita de nucleotídeo mutante. Geralmente, a síntese é iniciada na extremidade 3' - de cada primer e prossegue na

direção 5' - ao longo da fita padrão, até a síntese terminar, produzindo moléculas de comprimentos diferentes. Podem existir agentes de amplificação, no entanto, iniciam a síntese na extremidade 5' - e prosseguem na outra direção, usando o mesmo processo ou processos similares tal como descrito aqui. Em alguns exemplos, o sistema Superscript II platinum One-Step RT-PCR com a polimerase PLATINUM Taq DNA (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) é utilizada. Em qualquer evento, os processos da invenção não são limitados às concretizações da amplificação descritas aqui.

[043] Um processo de amplificação *in vitro*, o qual é, opcionalmente, utilizado de acordo com esta invenção, é a reação em cadeia de polimerase (PCR) descrita nas patentes norte-americanas Nos.: US 4,683,202 e US 5,683,195. O termo "reação em cadeia de polimerase" refere-se a um processo de amplificação de uma sequência de DNA usando uma polimerase de DNA estável ao calor e dois primers de oligonucleotídeo, um complementar à fita-(+) em uma extremidade da sequência para ser amplificada a outra fita-(-) complementar na outra extremidade. Devido as fitas recentemente sintetizadas de DNA poderem subsequentemente servir como molde adicional para a mesma sequência de primer, rodadas sucessivas de anelamento do primer, alongamento da fita, e dissociação produzem amplificação altamente específica e rápida da sequência desejada. Muitos processos em cadeia de polimerase são conhecidos pelos técnicos no assunto e podem ser utilizados nos processos da invenção. Por exemplo, DNA é submetida a 30 a 35 ciclos de amplificação em um termociclador como a seguir: 2 minutos a 50°, 10 minutos a 95°C, e então 50x (15 segundos a 95°C mais 1 minuto a 60°C).

[044] Os primers para uso na amplificação de mRNA ou DNA genômico de DENV podem ser preparados usando qualquer processo apropriado, tal como fosfotriéster convencional e processos fosfodiéster ou concretizações automatizadas do mesmo, enquanto os primers são capazes de hibridizar às sequências de ácido nucléico de interesse. Um processo para sintetização de oligonucleotídeos em um suporte sólido modificado é descrito na patente US No. 4,458,066. O comprimento exato do primer irá depender de muitos fatores, incluindo temperatura, tampão, e composição de nucleotídeo. O primer deve primeiro sintetizar os produtos de extensão na presença do agente induzindo a amplificação.

[045] Os primers utilizados de acordo com o processo da invenção são complementares a cada fita da sequência de nucleotídeo a ser amplificado. O termo "complementaridade" significa que o primer hibridiza com sua respectiva fita sob condições, que permitam que o agente para polimerização funcione, tal como em condições de hibridização severas. Em outras palavras, os primers que são complementares às sequências dos flancos hibridizam com as sequências dos flancos e permite a amplificação da sequência de nucleotídeo. Opcionalmente, o terminal 3' - do primer que é estendido é perfeitamente (100%) pareado com a fita do flanco complementar. As sondas possuem, opcionalmente, possuem sequências de nucleotídeo complementares a uma ou mais fitas de DENV. Opcionalmente, os primers contém as sequências de nucleotídeos da SEQ ID NOS: 1 e 2. É apreciado que os complementos da SEQ ID NOS: 1 e 2 são similarmente apropriados para uso nos exemplos da invenção. É adicionalmente apreciado que as sequências de

oligonucleotídeo que hibridizam com as SEQ ID NOS: 1 ou 2 também são similarmente apropriadas. Finalmente, as posições múltiplas estão disponíveis para hibridização em DENV e serão também apropriadas para hibridização com uma sonda quando utilizada com os primers reversos ou à frente ("forward") apropriados.

[046] Os técnicos no assunto saberão que vários processos de amplificação podem também ser utilizados para aumentar o número de cópias da sequência de ácido nucleico DENV alvo. As sequências de ácido nucléico detectados no processo da invenção são, opcionalmente avaliados, detectados, clonados, sequenciados e do gênero, tanto na solução quanto após a ligação a um suporte sólido, por qualquer processo usualmente aplicado à detecção de uma sequência de ácido nucléico específica, tal como uma outra reação em cadeia de polimerase, restrição de oligômero (Saiki et al., BioTechnology 3:1008 - 1012 (1985)), análise de sonda de oligonucleotídeo alelo-específico (ASO) (Conner et al., PNAS 80:278 (1983)), análise de ligação de oligonucleotídeo (OLAs) (Landegren et al., "Science" 241:1077 (1988)), análise de proteção de RNase, entre outras. As técnicas moleculares para análise de DNA foram revisadas (Landegren et al., Science 242:229 237 (1988)). A amplificação do DNA a seguir, o produto de reação pode ser detectado pela análise Southern blot, com ou sem o uso de sondas radioativas. No referido processo, por exemplo, uma amostra pequena do DNA contendo a sequência de ácido nucléico obtida a partir do tecido ou indivíduo é amplificada, e analisada via uma técnica de Southern blotting. O uso de sondas não-radioativas ou marcadores é facilitada pelo nível alto do sinal amplificado.

Em algumas concretizações da invenção, um nucleosídeo trifosfato é radioativamente marcado, permitindo, desse modo, a visualização direta do produto de amplificação por autorradiografia. Em algumas concretizações, os primers de amplificação são marcados fluorescentemente e correm através de um sistema de eletroforese. A visualização dos produtos de amplificação é por detecção de luz seguida por visualização gráfica assistida por computador, sem um sinal radioativo.

[047] Outros métodos de detecção do oligonucleotídeo amplificado inclui, ilustrativamente, eletroforese em gel, espectrometria de massa, cromatografia líquida, fluorescência, luminescência, análise da estrutura de mobilidade em gel,, transferência de energia por ressonância fluorescente, sequenciamento de nucleotídeo, análise imunoabsorvente ligada à enzima, cromatografia de afinidade, outros métodos de cromatografia, métodos imunoenzimáticos (Ortiz, A e Ritter E., "Nucleic Acids Res.", 1996; 24: 3280-3281), enzimas conjugadas a estreptavidinio, migração de ramificação do DNA (Lishanski, A., et al, "Nucleic Acids Res, 2000; 28(9):e42), digestão da enzima (patente US No. 5,580,730), métodos calorimétricos (Lee, K., "Biotechnology Letters", 2003; 25:1730-1742), ou combinações dos mesmos. Um sinal de detecção é produzido o qual está relacionado ao método de detecção empregado, sendo RT-PCR ou outro método de detecção. Uma amostra de teste produz, opcionalmente, um primeiro sinal de detecção durante a amplificação de um alvo. Uma amostra controle produz, opcionalmente, um segundo sinal de detecção durante a amplificação de uma molécula controle.

[048] O termo "marcado" com relação á sonda pretende abranger marcação direta da sonda pelo acoplamento (ou seja,

ligação física) com uma substância detectável para a sonda, bem como marcação indireta com a sonda por reatividade com um outro reagente que é diretamente marcado. Exemplos de marcação indireta incluem detecção e uma sonda usando um anticorpo marcado fluorescentemente e marcação final ou marcação central de uma sonda DNA com biotina tal que possa ser detectado com estreptavidinina marcada fluorescentemente. Os métodos de detecção podem ser utilizados para detectar DNA, RNA, ácido nucléico genômico, ou produtos de amplificação do mesmo, em uma amostra *in vitro* bem como *in vivo*. Por exemplo, as técnicas *in vitro* para detecção de ácido nucléico incluem hibridização Northern, hibridização *in situ*, PCR de transcrição reversa, PCR em tempo real, e proteção de DNase. As técnicas *in vivo* para detecção de DENV incluem a introdução dentro de um determinado organismo um anticorpo marcado dirigido contra um componente polipeptídeo ou dirigido contra uma sequência de ácido nucléico particular de DENV. Por exemplo, o anticorpo pode ser marcado com um marcador radioativo cuja presença e localização do organismo pode ser detectada pela técnica padrão de imagem, incluindo autorradiografia.

[049] O tamanho dos primers utilizados para amplificar uma porção da sequência de ácido nucléico de DENV é pelo menos 5, e frequentemente 10, 15, 20, 25, 30 ou mais nucleotídeos em comprimento, opcionalmente qualquer valor ou faixa entre 5 e 30 nucleotídeos de comprimento. Opcionalmente, a proporção GC está acima de 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55% ou 60% de modo a prevenir a estrutura de grampo no primer. O amplicon é, opcionalmente, de comprimento suficiente para ser detectado pela metodologia de biologia molecular padrão. O primer à

frente é, opcionalmente, menor que o primer reverso ou vice-versa. As técnicas para modificação de  $T_m$  tanto do primer também são operáveis aqui. Um primer reverso ou à frente ilustrativo contém LNA-dA ou LNA-dT (Glen Research Corporation) de modo a  $T_m$  combinado com um primer alternativo correspondente.

[050] Um par de primer à frente e reverso hibridiza, opcionalmente a um alvo que representa o mesmo gene ou produto do mesmo gene dentro de um ou mais DENV. Ilustrativamente, SEQ ID NOS: 1 e 2 cada um são dirigido às posições no gene NS5. As SEQ ID NOS: 4 e 5 são cada uma dirigidas às posições no gene E. As SEQ ID NOS: 7 e 8 são cada um dirigido às posições no gene prM. As SEQ ID NOS: 10 e 11 são cada um dirigidos às posições no gene prM. Em algumas concretizações, o produto de amplificação produzido pelo par de primer particular que é único aquele sorotipo DENV. Ilustrativamente, algumas concretizações envolvem um processo para detecção da presença ou ausência de múltiplos sorotipos DENV onde cada par de primer reconhece uma porção única do mesmo gene ou genes diferentes dentro DENV.

[051] Um processo inventivo utiliza uma reação de polimerização que empregue uma enzima de polimerização de ácido nucléico, ilustrativamente, uma polimerase de DNA, polimerase de RNA, transcriptase reversa, ou misturas dos mesmos. É adicionalmente apreciado que as proteínas acessório ou moléculas estão presentes para formar o maquinário de replicação. Uma enzima de polimerização é opcionalmente uma polimerase termoestável ou polimerase termodegradável. O uso de polimerase termoestáveis é bem conhecido da técnica, tal como polimerase Taq disponível a partir da Invitrogen

Corporation, Carlsbad, CA. As polimerases termoestável permite uma reação em polimerização ser iniciada ou fechada pela mudança da temperatura, outra condição na mistura de reação sem destruir a atividade da polimerase.

[052] A precisão dos pares de base de amplificação da sequência de DNA é provida pela especificidade da enzima. As taxas de erro para a polimerase Taq tendem a ser incorporação da base falsa de  $10^{-5}$  ou menos. (Johnson, "Annual Reviews of Biochemistry", 1993, 62:685-713; Kunkel, "Journal of Biological Chemistry", 1992; 267:18251-18254). Os exemplos específicos das polimerases termoestáveis ilustrativamente incluem aqueles isolados *Thermits aquations*, *Thermus thermophilus*, *Pyrococcus woesei*, *Pyrococcus furiostis*, *Thermococcus litoralis* and *Thermotoga maritima*. As polimerases termodegradáveis incluem, ilustrativamente polimerase de DNA E. coli, o framento Klenow da polimerase E. coli DNA, polimerase de T4 DNA, polimerase de T7 DNA e outros exemplos conhecidos da técnica. É reconhecido da técnica que outras enzimas de polimerizaçõesão similarmente ilustrativamente apropriados incluindo, E. coli, T7, T3, polimerase SP6 RNA e AMV, M-MLV, e as transcriptase reversas de HIV.

[053] As polimerases são opcionalmente ligadas ao primer. Quando a sequência DENV é uma molécula de RNA de fita única devido à desnaturação por calor, a polimerase é ligada no fim do primer do ácido nucléico de fita única em uma origem de replicação. Um sítio de ligação para uma polimerase apropriada é opcionalmente criada por uma proteína acessório ou por qualquer ácido nucléico de fita única principal.

[054] Em algumas concretizações, a detecção o produto de

PCR é conseguida pela espectrometria em massa. A espectrometria de massa tem várias vantagens durante o sistema de PCR em tempo real no qual ele pode ser utilizado para detectar, simultaneamente a presença de DENV e mutações decifradas nas sequências de ácido nucleico alvo permitindo a identificação e monitoramento das cepas emergentes. Ademais, os espetrômetros de massa são prevalentes no laboratório clínico. Similar aos sistemas de detecção em base fluorescente, a espectrometria de massa é capaz de detectar, simultaneamente, múltiplos produtos de amplificação para uma busca controlada e multiplexada para quantificar com precisão os componentes das amostras biológicas ou meios.

[055] As plataformas de espectrometria de massa múltiplas são apropriadas para uso na invenção, incluindo, ilustrativamente, um tempo de ionização de dessorção do laser assistido pela matriz da espectrometria em massa de escape (MALDI), espectrometria de massa eletro-pulverização, ionização-Fourier eletro-pulverização transforma a espectrometria em massa de ressonância de ciclotron por íon (ESI-FTICR), análise de fragmentação de espectrometria de massa em múltiplos estágios (MS/MS), espectrometria de massa acoplada com cromatografia líquida, tal como cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) e cromatografia líquida de ultra-desempenho com espectrometria de massa de isótopo tandem com diluição (UPLC-ID/MS/MS), e variações dos mesmos.

[056] É apreciado que vários outros processos de detecção são similarmente apropriados para medir o produto de amplificação pela detecção de um sinal de detecção. Os exemplos ilustrativos incluem, mas não são limitativos a, cromatografia líquida, espectrometria de massa, cromatografia

líquida/espectrometria de massa, fluorescência estática, fluorescência dinâmica, cromatografia líquida de alto desempenho, cromatografia líquida de ultra-alto desempenho, análise de Imunoabsorbância ligada à enzima, PCR em tempo real (RT-PCR), eletroforese em gel, ou combinações dos mesmos.

[057] Opcionalmente, os produtos de amplificação de PCR são gerados usando primers de oligonucleotídeo complementar à frente ou reverso. Em um exemplo não limitativo, as sequências genéticas de DENV-1 ou fragmentos dos mesmos são amplificados pelo par de primer da SEQ ID NOS:1 e 2. O produto de amplificação resultante é tanto diretamente detectado tal como uma sonda, ou é subsequentemente processado e preparado para detecção por processos conhecidos da técnica. É apreciado que os complementos das SEQ ID NOS: 1 e 2 são similarmente apropriados para uso na invenção. É adicionalmente apreciado que as sequências de oligonucleotídeo que hibridiza com SEQ ID NOS: 1 ou 2 são também similarmente apropriados. Finalmente, as posições múltiplas são disponíveis para hibridização no genoma DENV, ou outro e irá também hibridizar apropriadamente com primers à frente e reversa que podem ou não ser utilizado com uma sonda para PCR.

[058] Um par de primer é, opcionalmente, as SEQ ID NOS: 1 e 2, SEQ ID NOS: 4 e 5, SEQ ID NOS: 7 e 8, ou SEQ ID NOS: 10 e 11.

[059] Em algumas concretizações, uma análise multiplex ou conjunto de análises singleplex são realizados. Opcionalmente, uma análise detecta a presença ou ausência de DENV-1. Opcionalmente, uma análise detecta a presença ou

ausência de DENV-2. Opcionalmente, uma análise detecta a presença ou ausência de DENV-3. Opcionalmente, uma análise detecta a presença ou ausência de DENV-1 e DENV-2. Opcionalmente, uma análise detecta a presença ou ausência de DENV-1 e DENV-3. Opcionalmente, uma análise detecta a presença ou ausência de DENV-1 e DENV-4. Opcionalmente, uma análise detecta a presença ou ausência de DENV-2 e DENV-3. Opcionalmente, uma análise detecta a presença ou ausência de DENV-2 e DENV-4. Opcionalmente, uma análise detecta a presença ou ausência de DENV-3 e DENV-4. Opcionalmente, uma análise detecta a presença ou ausência de DENV-1, DENV-2 e DENV-4. Opcionalmente, uma análise detecta a presença ou ausência de DENV-2, DENV-3 e DENV-4. Opcionalmente, uma análise detecta a presença ou ausência de DENV-1, DENV-3 e DENV-4. Opcionalmente, uma análise detecta a presença ou ausência de DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4. Opcionalmente, uma análise detecta a presença ou ausência dos sorotipos 1, 2, 3 ou 4 selecionados a partir de DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4.

[060] Opcionalmente, múltiplos produtos de amplificação são simultaneamente produzidos em um multiplex. A reação de PCR que são então disponíveis para detecção simultânea e quantificação. Assim, os sinais de múltipla detecção são inherentemente produzidos ou emitidos que são separadamente e detectou unicamente em um ou mais sistemas de detecção. Em algumas concretizações, o conjunto de primer e sondas da tabela 1 são todos simultaneamente utilizados em câmara de reação única em uma reação única multiplex. Opcionalmente, o par de primers e sondas relacionadas da tabela 1 são utilizados em uma pluralidade de reações singleplex com cada

tubo possuindo primers suficiente e sondas para reconhecer um ou mais sorotipos DENV. Um ou mais reações singleplex são opcionalmente realizadas simultaneamente ou sequencialmente. Os sinais de detecção múltiplas produzidos pelas sondas múltiplas são opcionalmente produzidos em paralelo. Opcionalmente, uma amostra biológica única é submetida a análise para a detecção simultânea ou sequencial de sequências genéticas DENV. É apreciado que três ou mais sequências independentes ou de sobreposição são simultaneamente ou sequencialmente medidas nos processos inventivos. Os primers de oligonucleotídeos combinados (ilustrativamente, SEQ ID NOS: 1 e 2) são simultaneamente ou sequencialmente adicionados e a amostra biológica, ou uma porção do mesmo, é submetida a parâmetros de reação de termociclagem apropriados. Para detecção por espectrometria de massa, uma amostra única de produtos de amplificação de cada um dos genes é simultaneamente analisada permitindo uma determinação rápida e precisa da presença de DENV. Opcionalmente, a análise pelo PCR em tempo real é empregada capitalizando em múltiplas sondas com uma assinatura fluorescente única. Assim, cada gene é detectado sem interferência por outro produto de amplificação. Assim, a abordagem de múltiplos alvos aumenta a segurança na quantificação e provê um controle interno adicional.

[061] Em algumas concretizações, os processos envolvem adicional e opcionalmente obtendo uma amostra controle de um indivíduo controle, contatando uma amostra controle, opcionalmente do referido indivíduo, com um composto ou agente capaz de detectar a presença de ácido nucléico DENV na amostra, e comparar a presença ou ausência de RNA ou DNA na

amostra controle com a presença de RNA ou DNA na amostra de teste. Uma amostra controle é, opcionalmente, uma porção de uma amostra de teste processada em paralelo com a amostra de teste. Uma amostra controle é opcionalmente, uma sequência de ácido nucléico de outra forma processada, purificada, ou isolada de concentrações conhecidas incluindo, opcionalmente pelo menos uma porção da sequência DENV, onde a sequência de ácido nucléico ou porção do mesmo irá hibridizar sob condições severas com um primer à frente, um primer reverso e, opcionalmente, uma sonda. Uma amostra controle é utilizada para produzir um produto de amplificação complementar tanto simultaneamente com ou sequencialmente ao primeiro produto de amplificação produzido a partir de um alvo. O produto de amplificação complementar é, opcionalmente detectado por detecção de um segundo sinal de detecção pelo mesmo de um método diferente daquele utilizado para detectar o primeiro produto de amplificação. Ilustrativamente, um segundo produto de amplificação é detectado usando uma segunda sonda do mesmo ou de uma sequência diferente daquela utilizada para detectar o primeiro produto de amplificação. Uma segunda sonda tem, opcionalmente um ou mais marcadores que são o mesmo ou diferentes daqueles da primeira sonda, quando presente. Ilustrativamente, uma amostra controle é submetida a condições de amplificação idênticas na mesma ou de outra análise paralela, tal como no mesmo instrumento, como o da amostra teste. Se a amostra de teste e a amostra controle são processadas em câmaras de reação diferentes, a mesma sonda com os mesmos marcadores podem ser utilizados.

[062] Algumas concretizações incluem o uso de um calibrador de ácido nucléico para produzir um sinal a partir de uma

quantidade conhecida da molécula da amostra. Um calibrador de ácido nucléico é, opcionalmente, idêntico a ou diferente de uma molécula alvo. A amplificação de um calibrador de ácido nucléico produz um terceiro sinal de detecção, a presença de, a intensidade de, ou tamanho de é, opcionalmente, comparado a um primeiro sinal de detecção para quantificar a quantidade alvo, ou produto de amplificação na amostra de teste. Opcionalmente, uma pluralidade de calibradores de ácido nucléico é utilizada. Uma pluralidade de calibradores de ácido nucléico é, opcionalmente, de diferentes concentrações tais como aquelas apropriadas para produzir uma curva padrão. O sinal de detecção a partir da amostra de teste é opcionalmente comparado ao da curva padrão para quantificar a quantidade de produto de amplificação ou alvo na amostra de teste. Um calibrador de ácido nucléico inclui, opcionalmente, uma quantidade conhecida da sequência de ácido nucléico DENV, ou uma porção de uma sequência de ácido nucléico DENV.

[063] Também provido são um ou mais kits para detecção ou diagnóstico da infecção por DENV que contém reagentes para a amplificação, ou detecção direta de DENV ou porções do mesmo em uma amostra. Um exemplo de kit inclui, opcionalmente um par de primer à frente e reverso, e uma sonda. O kit inclui qualquer primer, sonda, ou um conjunto de primer ou sondas definidos aqui, análogos destes, variantes dos mesmos, ou derivados dos mesmos. É adicionalmente apreciado que um kit inclui, opcionalmente, inclui reagentes auxiliares tais como tampões, solventes, polimerases termoestáveis, nucleotídeos, e outros reagentes necessários e reconhecidos na técnica para amplificação e detecção de DENV em uma amostra.

[064] Um kit para detecção da infecção DENV em um

indivíduos contém, opcionalmente, reagentes para detecção à base de PCR da sequência genética de DENV, tanto estrutural quanto não estrutura e, opcionalmente, para detecção de anticorpos dirigidos às proteínas DENV. Os componentes dos kits são qualquer um dos reagentes descritos acima ou outros reagentes necessários e não necessários conhecidos da técnica, para solubilização, detecção, lavagem, armazenamento, ou outras necessidades para um kit de análise de diagnóstico. Os anticorpos apropriados são conhecidos da técnica.

[065] A invenção também abrange kits para detecção da presença dos ácidos nucléicos de DENV em uma amostra de teste. O kit, por exemplo, inclui um composto marcado ou agente capaz de detectar uma molécula de ácido nucléico em uma amostra de teste e, em determinadas concretizações, para determinação da quantidade de DENV na amostra.

[066] Para os kits a base de oligonucleotídeo, o kit inclui, por exemplo: (1) um oligonucleotídeo, por exemplo, um oligonucleotídeo detectavelmente marcado, que hibridiza a uma sequência de ácido nucleico de DENV e/ou (2) um ou um par dos primers (um primer à frente e um primer reverso) útil para amplificação de uma molécula de ácido nucléico contendo pelo menos uma porção da sequência DENV. O kit pode também incluir, por exemplo, um agente tampão, um conservante, ou um agente de estabilização e proteína. O kit pode também incluir componentes necessários para detecção do agente detectável (por exemplo, uma enzima ou um substrato). O kit pode também conter uma amostra controle ou uma série de amostra de controle que é avaliada e comparada ao contido na amostra de teste. Cada componente do kit é, usualmente, incluído dentro

de um recipiente individual e todos os vários recipientes são usualmente incluídos dentro de um pacote único junto com as instruções de uso.

[067] É também provida uma biblioteca de primers de ácido nucléico e sondas apropriadas para uso no diagnóstico da infecção DENV, detecção da presença ou ausência de DENV em uma amostra, ou para combinação com outros kits apropriados para os referidos propósitos. Uma biblioteca inclui, opcionalmente, um par de primers e uma sonda para detecção e DENV-1. Um primer à frente é, opcionalmente SEQ ID NO:1. Um primer reverse é, opcionalmente SEQ ID NO:2. Um sonda é opcionalmente SEQ ID NO: 3. Uma biblioteca ou kit inclui, opcionalmente um par de primers e uma sonda(s) para detecção de DENV-2. Uma primer à frente é opcionalmente SEQ ID NO:4. Um primer reverso é, opcionalmente SEQ ID NO:5. Uma sonda é opcionalmente SEQ ID NO:6. Uma biblioteca inclui, opcionalmente, um par de primers e uma sonda para detecção e DENV-3. Um primer à frente é, opcionalmente SEQ ID NO:7. Um primer reverso é, opcionalmente SEQ ID NO:8. Uma sonda é, opcionalmente SEQ ID NO:9. Uma biblioteca inclui um par de primers e uma sonda para detecção de DENV-4. Um primer à frente é, opcionalmente SEQ ID NO:7. NO:10. Um primer reverso é, opcionalmente SEQ ID NO:11. Uma sonda é, opcionalmente SEQ ID NO:12. Um par (ou mais) dos primers à frente, primers reverso, sondas, ou ambos com cada um das sequências de um primer ou sonda da degeneração representada na biblioteca ou kit. As bibliotecas ou kits são providos que incluem um número suficiente de primers ou sondas para representar cada ácido nucléico degenerado nas posições indicadas na Tabela 1. Um kit ou uma biblioteca inclui, opcionalmente primer ou

sonda para DENV-1, DENV-2, DENV-3, e DENV-4 ou qualquer subgrupo do mesmo

[068] Os processos são receptivos ao uso para diagnósticos de infecção DENV ou detecção simples da presença de DENV em indivíduos, tais como insetos, e quaisquer outros organismos capazes de infecção ou transfecção por ou com DENV.

[069] Para aumentar a confiança e servir como um controle interno ou externo, uma solução purificada contendo DENV é, opcionalmente utilizado como uma amostra. Opcionalmente, pela amplificação de uma amostra única com quantidades conhecidas de DENV ou de um conjunto de amostras representando uma titulação e DENV, o nível de DENV em amostras biológicas desconhecidas é determinado, opcionalmente, como um controle. Opcionalmente, a solução purificada e quantificadas da solução DENV é analisada em paralelo com a amostra biológica desconhecida para reduzir o erro inter-análise ou para servir como uma curva padrão para quantificação de DENV desconhecido na amostra de teste. O uso da solução DENV purificada e quantificada providos para uma fita de RNA base genética completa para amplificação.

[070] Em algumas concretizações, um fragmento sub-genômico é clonado dentro de um plasmídeo para amplificação, purificação, e uso como um comparador quantitativo ou calibrador de ácido nucléico. Em um exemplo não limitativo, um fragmento de RNA de DENV é, opcionalmente, amplificado a partir de uma amostra de soro positivo usando primers colocado entre colchetes, às regiões alvos do RT-PCR em DENV. A concentração conhecida do fragmento sub-genômico é utilizado para criar uma curva padrão para determinações quantitativas e para acessar a eficiência da amplificação.

[071] Vários aspectos da presente invenção são ilustrados pelos exemplos não limitativos a seguir. Os exemplos são para propósito ilustrativo e não são uma limitação em qualquer prática da presente invenção. Será entendido que variações e modificações podem ser feitas sem fugir do espírito e do escopo de proteção da invenção. Embora os exemplos sejam geralmente dirigidos às amostras derivadas de um humano, um técnico no assunto tendo conhecimento da técnica reconheceria que técnicas similares e outras técnicas conhecidas traduziriam facilmente os exemplos para outros organismos. Os reagentes ilustrados aqui são comumente cruzados entre as espécies de mamíferos ou reagentes alternativos com propriedades similares são comercialmente disponíveis e, um técnico no assunto entenderia, facilmente, que tais reagentes podem ser obtidos.

#### EXEMPLOS

Exemplo 1: Desenho da análise RT-PCR

[072] Os primers DENV sorotipo-específico e as sondas fluorogênicas são designados pelo uso de uma nova sequência consenso gerada com base nas múltiplas entradas dentro dos bancos de dados das sequências genéticas de DENV. A sequência consenso DENV é introduzida dentro do primer Express 3.0 (Applied Biosystems). Cada um dos primers e sondas são utilizados para gerar famílias dos primers e sondas com várias mutações ou degenerações introduzidas nas regiões selecionadas dos primers ou sondas. Cada primer e sonda são alinhadas ao alinhamento do sorotipo correspondente e a frequência de cada base no oligonucleotídeo é determinada. As incompatibilidades entre os primers antecedentes/sondas e os alinhamentos das sequências são atendidas como a seguir: a

degeneração é introduzida em uma determinada posição do nucleotídeo quando a incompatibilidade é 40% ou maior entre 2 ou mais cepas em uma posição determinada. O código da International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) são utilizados para todas as bases degeneradas. Estas novas sequências de primers e sondas identificadas levam em consideração as sequências disponíveis das linhagens DENV contemporânea. Os primers e as sondas são analisados quanto a homologia para outras sequências conhecidas usando a Ferramenta de busca "Basic Local Alignment Search Tool" (BLAST). Altschul SF, et al., "J. Mol. Biol.", 1990; 215: 403-410. Estes primers e sondas, que não são identificados pela ferramenta de expressão de primer ("Primer Express Tool"), são estudadas quanto a possível amplificação das sequências DENV. Os primers e sondas identificadas são comparados às sequências de referência como na Tabela 2 com o nucleotídeo em negrito representando uma substituição degenerativa ou uma substituição não alelo-selvagem.

Tabela 2

Oligonucleotídeo		
D1-F	Referência (24)	CAAAAGGAAGTCGTGCAATA (SEQ ID NO: 13)
	CDC DENV-1-4 Real Time RT-PCR	CAAAAGGAAGTCGYGCAATA (SEQ ID NO: 1)
D1-R	Referência (24)	CTGAGTGAATTCTCTACTGAAC (SEQ ID NO: 14)
	CDC DENV-1-4 Real Time RT-PCR	CTGAGTGAATTCTCTGCTRAAC (SEQ ID NO: 2)
D1-Sonda	Referência (24)	CATGTGGTTGGGAGCACGC (SEQ ID NO: 15)
	CDC DENV-1-4 Real Time RT-PCR	CATGTGGYGGAGCRCGC (SEQ ID NO: 3)
D2-F	Referência (24)	CAGGTTATGGCACTGTCACGAT (SEQ ID NO: 16)
	CDC DENV-1-4 Real Time RT-PCR	CAGGCTATGGCACYGTCACGAT (SEQ ID NO: 4)
D2-R	Referência (24)	CCATCTGCAGCAACACCATCTC (SEQ ID NO: 17)
	CDC DENV-1-4 Real Time RT-PCR	CCATYTGCAGCARMACCATCTC (SEQ ID NO: 5)
D2-Sonda	Referência (24)	CTCTCCGAGAACAGGCCTCGACTCAA (SEQ ID NO: 18)
	CDC DENV-1-4 Real Time RT-PCR	CTCYCCRAGAACGGGCCTCGACTCAA (SEQ ID NO: 6)
D3-F	Referência (24)	GGACTGGACACACGCACACTCA (SEQ ID NO: 19)
	CDC DENV-1-4 Real Time RT-PCR	GGACTRGAACACACGCACCCA (SEQ ID NO: 7)
D3-R	Referência (24)	CATGTCTCTACCTTCTGACTTGTCT (SEQ ID NO: 20)
	CDC DENV-1-4 Real Time RT-PCR	CATGTCTCTACCTTCTGACTTGYCT (SEQ ID NO: 8)
D3-Sonda	Referência (24)	ACCTGGATGTCGGCTGAAGGGAGCTTG (SEQ ID NO: 21)
	CDC DENV-1-4 Real Time RT-PCR	ACCTGGATGTCGGCTGAAGGGAGCTTG (SEQ ID NO: 9)
D4-F	Referência (24)	TTGTCCTAATGATGCTGGTCG (SEQ ID NO: 22)
	CDC DENV-1-4 Real Time RT-PCR	TTGTCCTAATGATGCTRGTCG (SEQ ID NO: 10)

D4-R	Referência (24)	TCCACCTGAGACTCCTTCCA (SEQ ID NO: 23)
	CDC DENV-1-4 Real Time RT-PCR	TCCACC <del>Y</del> GAGACTCCTTCCA (SEQ ID NO: 11)
D4-Sonda	Referência (24)	TTCCTACTCCTACGCATCGCATTCCG (SEQ ID NO: 24)
	CDC DENV-1-4 Real Time RT-PCR	T <del>Y</del> CCTAC <del>Y</del> CCTACGCATCGCATTCCG (SEQ ID NO: 12)

[073] A sonda DENV-1 é marcada na extremidade 5' - com o corante repórter 6-carboxilfluoresceína (FAM) e na extremidade 3' - com o repressor de buraco negro 1 (BHQ-1) fluoróforo; a sonda DENV-2 é marcada com HEX e BHQ-1; a sonda DNV-3 é marcada com Texas vermelho (TR) e BHA-2; e a sonda DENV-4 é marcada com Cy5 e BHQ-3. As sequências genéticas de um não flavivírus DENV são utilizadas como controle.

[074] O RT-PCR é realizado como a seguir: nas misturas de reação singleplex, 5 µl de RNA são combinados com 25 pmol em cada primer e 4,5 pmol da sonda em um volume total de 25 µl da reação usando um RT-PCR de uma etapa Superscript III (Invitrogen, Carlsbad, CA). Cada mistura de reação contém um par de primer sorotipo DENV único (com a sequência degenerada) e sonda (com sequência degenerada); portanto, em uma análise singleplex, quatro reações separadas são realizadas para cada amostra de RNA. Em misturas de reação fourplex (por exemplo, multiplex), 5 µl do RNA são combinados com 25 pmol de cada primer de DENV-1 e DENV-3, 12,5 pmol de cada primer de DENV-2 e DENV-4 (cada), e 4,5 pmol de cada respectiva sonda (primers e sondas utilizados estão listados na tabela 2), em uma mistura de reação com volume total de 25 µl. A transcrição reversa de 30 minutos em 50°C é seguida por 45 ciclos de amplificação em um ABI 7500 Dx (Applied Biosystems, Foster City, CA) de acordo com a Invitrogen Superscript Instructions para as condições de RT-PCR em tempo

real e usando uma temperatura de anelamento 60°C.

[075] Identificação do limite de detecção (LoD):

[076] O limite da análise CDC DENV-1-4 de detecção (LoD) é determinado usando uma painel de estoque (pfu/mL) de cepas de laboratório infecciosas DENV-1, DENV-2, DENV-3, e DENV-4 diluído no soro humano ou plasma com oito (8) diluições de 1:10, 5 replicações por diluição. O RNA viral a partir de cada amostra replicada é extraído e testado usando o protocolo acima. A análise é corrida com um componente quantitativo de modo a comparar as versões diferentes da análise com acurácia melhorada. O LoD da análise é definida como a última diluição na qual o vírus é detectado em 100% de replicações. A detecção do vírus, medida em cópias equivalentes do genoma por mL da amostra (GCE/mL) é comparada entre as diluições do vírus em soro humano e plasma humano e os resultados ilustrados na Figura 1A (singleplex) e 1B (multiplex). A detecção equivalente dos sorotipos DENV é conseguida em ambos, os formatos singleplex e multiplex da análise diluída no soro ou plasma. O LoD é medido em aproximadamente  $1 \times 10^4$  GCE/mL, em ambos os formatos, que correspondem à titulação de aproximadamente  $1 \times 10^3$  pfu/mL.

[077] Reconhecimento amplo das cepas DENV:

[078] A análise é adicionalmente testada em 29 DENV-1-4 e quantificada clinicamente os isolados obtidos a partir de locais internacionais de modo a confirmar que as condições de análise escolhidas acima serão amplamente reconhecidas nas cepas DENV de uma fonte de distribuição geográfica. Os estoques quantificados são serialmente diluídos em soro humano em diluições de 1:10 para  $1 \times 10^2$  pfu/mL em triplicata. Um LoD similar é determinado em todos os isolados clínicos

cultivados como é ilustrado na Tabela 3 representada pelo ano da fonte de infecção, local em que a amostra foi tomada, e o genótipo da cepa de DENV.

Tabela 3

				$10^3$ pfu/mL	$10^2$ pfu/mL
Soro- tipo	Ano	País	genótipo	Taxa positiva	Taxa Positiva
DENV-1	2003	Brasil	Africano/ Americano	3/3	0/3
DENV-1	2007	México	Africano/ Americano	3/3	0/3
DENV-1	2007	Venezuela	Africano/ Americano	3/3	
DENV-1	1994	Sri Lanka	Pacífico sul	3/3	0/3
DENV-1	2004	Filipinas	Pacífico Sul	3/3	0/3
DENV-1	2004	Tailândia	Ásia	3/3	0/3
DENV-1	2006	Tailândia	Ásia	3/3	0/3
DENV-2	2006	Brasil	Ásia SE/Americano	3/3	0/3
DENV-2	2007	Colômbia	SE/Americano	3/3	0/3
DENV-2	1980	Costa Ivory	Sylvatic	3/3	2/3
DENV-2	1988	Viet Nam	Ásia II	3/3	1/3
DENV-2	2006	Tailândia	Ásia II	3/3	0/3
DENV-2	2003	Rep. Dominicana	SE Ásia/Americano	3/3	1/3
DENV-2	2003	Costa Rica	SE Ásia/Americano	3/3	0/3
DENV-2	1996	Peru	Americano	3/3	1/3
DENV-2	1982	Burkina Faso	Cosmopolitana	3/3	1/3
DENV-2	2006	Índia	Cosmopolitana	3/3	0/3
DENV-3	2006	Porto Rico	Subcont. Indiano	3/3	0/3
DENV-3	2003	Brasil	Subcont. Indiano	3/3	1/3
DENV-3	1995	Samoa	Pacífico Sul	3/3	0/3
DENV-3	2006	Tailândia	Tailândia	3/3	0/3
DENV-3	2000	Equador	Subconta. Indiano	3/3	1/3
DENV-3	1991	Ilha Cook	Pacífico Sul	3/3	0/3
DENV-4	2006	Colômbia	Indonésia	3/3	0/3
DENV-4	2006	México	Indonésia	3/3	0/3
DENV-4	1992	Sri Lanka	Ásia SE	3/3	1/3
DENV-4	2006	Tailândia	Ásia SE	3/3	0/3
DENV-4	1994	St. Croix	Indonésia	3/3	0/3
DENV-4	1999	Equador	Indonésia	3/3	1/3
DENV-4	1995	Micronésia	Ásia SE	3/3	0/3

Reatividade cruzada:

[079] A análise acima é adicionalmente avaliada para especificidade analítica pelo teste com os ácidos nucléicos extraídos a partir de 12 organismos representando patógenos comuns presente no sangue de pacientes com doença febril. A análise acima é realizada em todas as 12 amostras em triplicata. Todos os testes de amostras negativas para DENV (Tabela 4). Apenas as amostras cravadas com o texto positivo DENV indicando que as análises atuais sem reatividade cruzada com qualquer patógeno testado nas concentrações clinicamente relevante.

Tabela 4

Patógeno	Tipo de amostra	concentração	Taxa positiva RT-PCR DENV
Vírus	Soro marcado	Pfu/ml	3/3
DENV-1	Soro marcado	$1 \times 10^6$	3/3
DENV-2	Soro marcado	$1 \times 10^6$	3/3
DENV-3	Soro marcado	$1 \times 10^6$	3/3
DENV-4	Soro marcado	$1 \times 10^6$	0/3
WNV	Soro marcado	$6,9 \times 10^7$	0/3
YFV	Soro marcado	$3,7 \times 10^6$	0/3
SLEV	Soro marcado	$3,7 \times 10^6$	0/3
CHIKV	Soro marcado	$4,0 \times 10^6$	0/3
HCV	Soro clínico	Desconhecida	0/3
HAV	Soro clínico	Desconhecida	0/3
HSV-1	Soro marcado	$1 \times 10^5$	0/3
HSV-2	Soro marcado	$1 \times 10^5$	0/3
CMV	Soro marcado	$1 \times 10^5$	0/3
VZV	Soro marcado	$1 \times 10^5$	0/3
Bactéria		Bactéria/ml	
Leptospira	Soro marcado	$2,5 \times 10^5$	0/3
Borrelia burgdorferi	Soro marcado	$1 \times 10^6$	0/3

Interferência com materiais de amostras potencialmente contaminantes:

[080] A análise acima foi avaliada na presença de soro humano normal (NHS) ou em NHS contendo bilirrubina, colesterol, hemoglobina, triglicerídeos, ou DNA genômico.

Cada estudo de interferência foi realizado na presença de estoques cultivados e quantificados (pfu/mL) de cepas infectantes de laboratório DENV 1-4 diluídas para concentrações de 1:10 acima da diluição LoD ( $1\times 10^4$  pfu/mL). Nenhuma interferência significante na detecção DENV é observada na presença de qualquer um dos endógenos humanos potenciais interferindo nas biomoléculas testadas.

Estudos de contaminação cruzada ou efeito colateral:

[081] Um painel de DENV 1-4 diluído em concentrações altamente positivas ( $10^7$  pfu/mL) e altamente negativas ( $5\times 10^2$  pfu/ml) é utilizado para determinar a sensibilidade da análise acima para contaminação cruzada. Oito replicações altamente positivas e 8 altamente negativas são testadas em séries alternadas. O RNA viral a partir de cada amostra replicada é extraído usando o Kit Qiagen QIAamp® DSP Viral RNA e a análise é realizada como acima. Todos os testes para amostras negativas foram negativos (32/32) e todos os testes de amostras positivas foram positivos para DENV (32/32) indicando nenhuma observação de contaminação cruzada.

Efeito da amostra congelada/descongelada na análise da capacidade de detecção:

[082] Efeitos da variação de temperatura no desempenho da análise acima são avaliados pela detecção de comparação de amostras de soro humano DENV encravadas após múltiplos ciclos de congelamento/descongelamento usando o procedimento de análise acima. As diluições positivas moderadas e baixas são preparadas em triplicata e congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas e então submetidas a cinco ciclos consecutivos de congelamento/descongelamento. Uma vez descongelada, cada amostra é consequentemente processada. Esta validação

determinou uma concordância qualitativa de 100% entre os resultados de detecção do início e do fim do ciclo de congelamento/descongelamento (1, 2, 3, 4, e 5) como ilustrado na figura 2.

EXEMPLO 2: análise para a presença de DENV em amostras biológicas a partir das fontes clínicas.

A capacidade da análise DENV do Exemplo 1 em detectar DENV usando o RNA extraído do soro obtido tanto dos indivíduos controle quanto dos indivíduos diagnosticados como DENV positivo pela análise sorológica foi avaliada. A análise RT-PCR do Exemplo 1 foi utilizada para examinar cada uma das amostras quanto à presença ou ausência de DENV.

[083] Os resultados estão ilustrados na tabela 5 onde as substituições degeneradas e outras substituições não alelo-selvagem são destacadas em negrito.

Tabela 5

	oligonucleotídeo		Frequênci-a	posição	gene	Sítio amplicon
D1-F	Referência (24)	CAAAAGGAAGTCGTGCAATA (SEQ ID NO:13)	12/16	8936–8955	NS5	112bp
	PCR-RT em tempo real de CDC DENVI 1-4	CAAAAGGAAGTCGYGCAATA (SEQ ID NO:1)	16/16			
D1-R	Referência (24)	CTGAGTGAATTCTCTACTGAAC (SEQ ID NO:14)	3/16	9023–9047	NS5	112bp
	PCR-RT em tempo real de CDC DENVI 1-4	CTGAGTGAATTCTCTCTGCTRAAC (SEQ ID NO:2)	16/16			
D1-Sonda	Referência (24)	CATGTGGTTGGGAGCACGC (SEQ ID NO:15)	4/16	8961–8979	NS5	112bp
	PCR-RT em tempo real de CDC DENVI 1-4	CATGTGGYTGGGAGCRCGC (SEQ ID NO:3)	16/16			
D2-F	Referência (24)	CAGGTTATGGCACTGTCACGAT (SEQ ID NO:16)	0/16	1426–1447	E	78bp
	PCR-RT em tempo real de CDC DENVI 1-4	CAGGCTATGGCACCYGTCACGAT (SEQ ID NO:4)	13/16			
D2-R	Referência (24)	CCATCTGCAGAACACCATCTC (SEQ ID NO:17)	3/16	1482–1504	E	78bp
	PCR-RT em tempo real de CDC DENVI 1-4	CCATYTGAGCARCACCATCTC (SEQ ID NO:5)	16/16			
D2-Sonda	Referência (24)	CTCTCCGAGAACAGGCCTCGACTTCAA (SEQ ID NO:18)	10/16	1454–1480	E	78bp
	PCR-RT em tempo real de CDC DENVI 1-4	CTCYCCRAGAACGGGCCTCGACTTCAA (SEQ ID NO:6)	14/16			
D3-F	Referência (24)	GGACTGGACACACGCACTCA (SEQ ID NO:19)	9/15	701–720	prM	78bp
	PCR-RT em tempo real de CDC DENVI 1-4	GGACTRGACACACGCACCCCA (SEQ ID NO:7)	15/15			
D3-R	Referência (24)	CATGTCTCTACCTTCTCGACTTGTCT (SEQ ID NO:20)	5/15	749–775	prM	74bp
	PCR-RT em tempo real de CDC DENVI 1-4	CATGTCTCTACCTTCTCGACTTGYCT (SEQ ID NO:8)	15/15			
D3-Sonda	Referência (24)	ACCTGGATGTCGGCTGAAGGAGCTTG (SEQ ID NO:21)	14/15	722–747	prM	74bp
	PCR-RT em tempo real de CDC DENVI 1-4	ACCTGGATGTCGGCTGAAGGAGCTTG (SEQ ID NO:9)	14/15			
D4-F	Referência (24)	TTGTCCTAATGATGCTGGTCG (SEQ ID NO:22)	4/7	884–904	prM	89bp
	PCR-RT em tempo real de CDC DENVI 1-4	TTGTCCTAATGATGCTRGTCG (SEQ ID NO:10)	7/7			

D4-R	Referência (24)	TCCACCTGAGACTCCTTCCA (SEQ ID NO:23)	5/7	953–973	prM	89bp
	PCR-RT em tempo real de CDC DENV 1-4	TCCACCYGAGACTCCTTCCA (SEQ ID NO:11)	7/7			
D4-Sonda	Referência (24)	TTCCTACTCCTACGCATCGCATTC CG (SEQ ID NO:24)	4/7	939–965	prM	89bp
	PCR-RT em tempo real de CDC DENV 1-4	TYCCTACYCCTACGCATCGCATTC CG (SEQ ID NO:12)	7/7			

[084] Resumidamente, os primers e sondas da SEQ ID NOS: 1-12 mostram maior superioridade em sua capacidade de reconhecer cada sorotipo DENV como ilustrado pela frequência superior de reconhecimento do vírus alvo. Para este primeiro período, esta análise é robusta suficiente para ser utilizada em uma análise de detecção, onde um resultado positivo demonstra o diagnóstico da infecção DENV em um indivíduo, e a ausência de um resultado de diagnóstico positivo a ausência de infecção DENV em um indivíduo.

EXEMPLO 3: Detecção de DENV em amostras clínicas em um estudo prospectivo:

[085] Um total de 86 amostras de soro agudo são coletadas a partir do suspeito de dengue, pacientes febril (0-5 dias de sintomas; idade média de 14,3, 2% de F) em 3 diferentes laboratórios públicos de saúde (2009-2011). Cinquenta (50) amostras de soro são obtidas através da febre da dengue passivo do sistema de vigilância administrado pelo CDC - Ramificação Dengue: 25 destas amostras de soro são testadas no Laboratório do CDC, na ramificação e Dengue e 25 amostras de soro são decodificadas e enviadas, e testadas para o Departamento de Porto Rico da Saúde. Trinta e seis (36) amostras de soro são obtidas como parte de uma vigilância nacional e o programa de referência na Costa Rica. As amostras são recebidas pelo Laboratório Nacional na Costa Rica e decodificadas antes do teste. Todos os três

laboratórios seguem o mesmo protocolo: RNA viral é extraído usando o Mini Kit de RNA Qiagen QIAamp® DSP Viral (cat# 61904) seguindo o protocolo do fabricante. O RNA viral eluído foi testado pela análise do Exemplo 1 usando os primers e sondas da Tabela 1. Para confirmar o diagnóstico, o gene envelope de DENV é sequenciado em todas as 86 amostras usando o sequenciamento bidirecional Sanger. As aplicações dos dados da sequência como um método de referência, a análise conseguiu uma concordância positiva de 97,92% e 100% de concordância negativa 100% (Tabela 6). As amostras prospectivas não são completadas por uma segunda espécie convalescente.

Tabela 6

Resultados de comparação da análise do RT-PCR em tempo real de CDC DENV 1-4 Multiplex

		Método de referência (sequenciamento)		
		Positivo	Negativo	Total
Análise de RT-PCR em tempo real de CDC DENV 1-4	positivo	47	0	47
	Negativo	1*	38	39
	Total	48	38	86
		Valor	95% do intervalo de confiança	
Porcentagem positiva de acordo		97,92%	89,10-99,63	
Porcentagem negativa de acordo		100%	90,82-100	

EXEMPLO 4: Detecção de DENV em um estudo retrospectivo de amostras clínicas:

[086] A análise do Exemplo 1 foi adicionalmente avaliada usando as amostras clínicas retrospectivas obtidas dos espécimes de vigilância de dengue da rotina do CDC coletadas em pares (2007-2011). As amostras agudas foram colhidas durante os primeiros cinco dias do sintoma, e as amostras convalescentes foram coletadas pelo menos 6 dias após o

início do sintoma. Estas amostras foram testadas com a análise de Imunoabsorvência ligada a enzima de Captura IgM (CDC MAC-ELIZA - validado internamente) de modo a estabelecer a soro-conversão. Um total de 371 amostras agudas: 39 amostras internacionais dengue-positivas; 82 amostras de dengue-positivas do sistema de vigilância de dengue de Porto Rico; e um adicional de 250 amostras negativas de dengue (sem conversão de IgM), também de Porto Rico, são incluídas no teste. A concordância da porcentagem (%) entre o resultado usando a análise do Exemplo 1 e a conversão do IgM é calculada para o número de amostras dos resultados positivos e negativos recebidos e os resultados apresentados na Tabela 7. Em adição, o sequenciamento bidirecional Sanger do gene DENV E é realizado para confirmar os resultados de sorotipagem e detecção positiva de RT-PCR em tempo real CDC DENV 1-4.

Tabela 7

Resultados de Comparação da análise de RT-PCR em tempo real de CDC DENV 1-4 Multiplex

		Método de referência (Conversão IgM) †		
		Positivo	Negativo	total
CDC DENV 1-4	Positivo	100*	4***	104
Análise de RT-PCR em tempo real	Negativo	2**	265	267
	Total	102	269	371
		Valor	Intervalo de confiança 95%	
Porcentagem positiva de acordo		98,04%	93,13-99,46	
Porcentagem negativa de acordo		98,51%	96,24-99,42	

#### EXEMPLO 5: Detecção de DENV por PCR/LC/MS

[087] As amostras do Exemplo 2 são cada uma re-classificadas usando a amplificação RT-PCR com parâmetros similares a análise RT-PCR do Exemplo 1. Os produtos de

reação são submetidos às análises por espectrometria de massa por ionização por eletro-pulverização, substancialmente como descrito por Naito, Y., et al., "Rapid Communications in Mass Spectrometry", 1995; 9:1484-1486; ou em Wunschel DS, et al., Rapid Commun Mass Spectrom.", 1996; 10(1):29-35. Cada um dos produtos de reação a partir das reações de PCR são detectadas com sucesso e rapidamente.

**EXEMPLO 6:** Detecção de DENV por PCR/eletroforese em gel:

[088] As amostras do Exemplo 2 são cada uma reclassificadas usando amplificação por PCR com parâmetros similares aos da análise RT-PCR do Exemplo 1. Os produtos de reação amplificados são separados por eletroforese em gel e detectados por imagem fluorescente. Cada um dos pares de primer e sondas mostrou DENV amplificado detectável.

[089] Os métodos envolvendo técnicas de biologia convencional são descritos aqui. As referidas técnicas são geralmente conhecidas do estado da técnica e estão descritas em detalhes nas metodologias de pesquisa tais como "Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed., vol. 1-3, ed. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press", Cold Spring Harbor, N.Y., 2001 ; Current Protocols in Molecular Biology, ed. Ausubel et al., Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York, 1992 (with periodic updates); e Short Protocols in Molecular Biology, ed. Ausubel et al., 52 ed., Wiley-Interscience, New York, 2002. Métodos imunológicos (por exemplo: "Preparation of antigen-specific antibodies, immunoprecipitation, and immunoblotting") são descritos, por exemplo, em "Current Protocols in Immunology, ed. Coligan et al., John Wiley & Sons, New York, 1991 ; e Methods of Immunological Analysis, ed. Masseyeff et al., John Wiley &

Sons, New York, 1992".

[090] Os protocolos adicionais tais como Protocolo de pCR podem ser observados em um "Guide to Methods and Applications Academic Press, NY".

[091] Várias modificações da presente invenção, em adição aquelas mostrada e descrevem aqui, serão aparentes aos técnicos no assunto da descrição acima. As referidas modificações também são pretendidas dentro do escopo de proteção das reivindicações anexas.

[092] Deve ser apreciado que todos os reagentes são obtidos pelas fontes conhecidas da técnica a menos que de outro modo especificado. Os métodos de amplificação de nucleotídeo, transfecção celular, e expressão de proteína e purificação estão similarmente dentro do conhecimento técnico do estado da técnica.

[093] Várias modificações da presente invenção, em adição àquelas mostradas e descritas aqui, serão aparentes aos técnicos no assunto, em função da descrição acima. As referidas modificações também estão dentro do escopo das reivindicações anexas.

#### Lista de referências

1. Alexander, N., A. Balmaseda, I. C. Coelho, E. Dimaano, T. T. Hien, N. T. Hung, T. Janisch, A. Kroeger, L. C. Lum, E. Martinez, J. B. Siqueira, T. T. Thuy, I. Vi!lalobos, E. Villegas, B. Wills, and W. H. O. s. D. S. G. on behalf of the European Union. 201 1 . Multicentre prospective study on dengue classification in four Southeast Asian and three Latin American countries. *Trop Med Int Health.*
2. Ayala, A., A. Rivera, M. Johansson, and J. L. Munoz-Jordan. 2006. Travel-Associated Dengue -United States, 2005.

MMWR 55 :700-702.

3. Bessoff, M. Delorey, W. Sun, and E. Hunsperger. 2008. Comparison of two commercially available dengue virus (DENV) NS 1 capture enzyme-linked immunosorbent assays using a single clinical sample for diagnosis of acute DENV infection. Clin Vaccine Immunol 15: 1513-1518.
4. Brunkard, J. M., J. L. Robles Lopez, J. Ramirez, E. Cifuentes, S. J. Rothenberg, E. A. Hunsperger, C. G. Moore, R. M. Brussolo, N. A. Villarreal, and B. M. Haddad. 2007. Dengue Fever Seroprevalence and Risk Factors, Texas-Mexico Border, 2004. Emerg Infect Dis 13: 1477-1483.
5. Callahan, J. D., S. J. Wu, A. Dion-Schultz, B. E. Mangold, L. F. Peruski, D. M. Watts, R. Porter, G. R. Murphy, W. Suharyono, C. C. King, C. G. Hayes, and J. J. Temenak. 2001. Development and evaluation of serotype- and group-specific fluorogenic reverse transcriptase PCR (TaqMan) assays for dengue virus. J Clin Microbiol 39:41 19-4124.
6. Centers for Disease, C, and Prevention. 2010. Locally acquired Dengue- Key West, Florida, 2009-2010. MMWR. Morbidity and mortality weekly report 59:577-581.
7. Chau, T. N., K. L. Anders, B. Lien E, N. T. Hung, L. T. Hieu, N. M. Tuan, T. T. Thuy, T. Phuong le, N. T. Tham, M. M. Lanh, J. J. Farrar, S. S. Whitehead, and C. P. Simmons. 2010. Clinical and virological features of Dengue in Vietnamese infants. PLoS Negl Trop Dis 4:e657.
8. Chien, L. J., T. L. Liao, P. Y. Shu, J. H. Huang, D. J. Gubler, and G. J. Chang. 2006. Development of real-time reverse transcriptase PCR assays to detect and serotype dengue viruses. J Clin Microbiol 44: 1295-1304.
9. Condon, R., G. Taleo, T. Stewart, T. Sweeney, and T.

- Kiedrzynski. 2000. Dengue surveillance in the Pacific Islands. *Pacific health dialog* 7: 122-126.
10. Descloux, E., V. M. Cao-Lormeau, C. Roche, and X. De Lambalierie. 2009. Dengue 1 diversity and microevolution, French Polynesia 2001-2006: connection with epidemiology and clinics. *PLoS Negl Trop Dis* 3:e493.
11. Dussart, P., L. Petit, B. Labeau, L. Bremand, A. Leduc, D. Moua, S. Matheus, and L. Baril. 2008. Evaluation of Two New Commercial Tests for the Diagnosis of Acute Dengue Virus Infection Using NS 1 Antigen Detection in Human Serum. *PLoS Negl Trop Dis* 2:e280.
12. Effter, P. V., L. Pang, P. Kitsutani, V. Vorndam, M. Nakata, T. Ayers, J. Elm, T. Tom, P. Reiter, J. G. Rigau-Perez, J. M. Hayes, K. Mills, M. Napier, G. G. Clark, and D. J. Gubler. 2005. Dengue fever, Hawaii, 2001 -2002. *Emerg Infect Dis* 11 :742-749.
13. Franco, C, N. A. Hynes, N. Bouri, and D. A. Henderson. 2010. The dengue threat to the United States. *Biosecurity and bioterrorism: biodefense strategy, practice, and science* 8:273-276.
14. Gomes, A. L., A. M. Silva, M. T. Cordeiro, G. F. Guimaraes, E. T. Marques, Jr., and F. G. Abath. 2007. Single-tube nested PCR using immobilized internal primers for the identification of dengue virus serotypes. *J Virol Methods* 145:76-79.
15. Gregory, C. J., L. M. Santiago, D. F. Arguello, E. Hunsperger, and K. M. Tomashek. 2010. Clinical and laboratory features that differentiate dengue from other febrile illnesses in an endemic area-Puerto Rico, 2007-2008. *Am J Trop Med Hyg* 82:922-929.

16. Gregory, C. J., and K. M. Tomashek. 2012. Management of severe dengue. *Pediatr Crit Care Med* 13: 125; author reply 125-126.
17. Gubler, D. J. 2002. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21 st century. *Trends Microbiol* 10: 100-103.
18. Gubler, D. J., G. Kuno, G. E. Sather, M. Velez, and A. Oliver. 1984. Mosquito cell cultures and specific monoclonal antibodies in surveillance for dengue viruses. *Am J Trop Med Hyg* 33: 158-165.
19. Gubler, D. J., W. Suharyono, I. Lubis, S. Eram, and S. Gunarso. 1981. Epidemic dengue 3 in central Java, associated with low viremia in man. *Am J Trop Med Hyg* 30: 1094-1099.
20. Henchal, E. A., S. L. Polo, V. Vorndam, C. Yaemsiri, B. L. Innis, and C. H. Hoke. 1991. Sensitivity and specificity of a universal primer set for the rapid diagnosis of dengue virus infections by polymerase chain reaction and nucleic acid hybridization. *Am J Trop Med Hyg* 45:418-428.
21. Holmes, E. C, and S. S. Twiddy. 2003. The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus, *Infect Genet Evol* 3: 19-28.
22. Hsieh, C. J., and M. J. Chen. 2009. The commercial dengue NS 1 antigen-capture ELISA may be superior to IgM detection, virus isolation and RT-PCR for rapid laboratory diagnosis of acute dengue infection based on a single serum sample. *J Clin Virol* 44: 102.
23. Huhtamo, E., E. Hasu, N. Y. Uzcategui, E. Erra, S. Nikkari, A. Kantele, O. Vapa!ahti, and H. Piiparinens. 2010. Early diagnosis of dengue in travelers:  
comparison of a novel real-time RT-PCR, NS 1 antigen

- detection and serology. *J Clin Virol* 47:49–53.
24. Johnson, B. W., B. J. Russell, and R. S. Lanciotti. 2005. Serotype-specific detection of dengue viruses in a fourplex real-time reverse transcriptase PCR assay. *J Clin Microbiol* 43:4977–4983.
25. Lanciotti, R. S. 2003. Molecular amplification assays for the detection of flaviviruses. *Adv Virus Res* 61 :67–99.
26. Leitmeyer, K. C., D. W. Vaughn, D. M. Watts, R. Salas, I. Vilalobos, C. de, C. Ramos, and R. Rico-Hesse. 1999. Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. *J Virol* 73:4738–4747.
27. Low, J. G., A. Ong, L. . Tan, S. Chaterji, A. Chow, W. Y. Lim, . W. Lee, R. Chua, C. R. Chua, S. W. Tan, Y. B. Cheung, M. L. Hibberd, S. G. Vasudevan, L. C. Ng, Y. S. Leo, and E. E. Ooi. 2011. The early clinical features of dengue in adults: challenges for early clinical diagnosis. *PLoS Negl Trop Dis* 5:e1 191.
28. McElroy, K. L., G. A. Santiago, M. J. Lennon, B. W. Birren, M. R. Henn, and J. L. Munoz-Jordan. 2011. Endurance, refuge, and reemergence of dengue virus type 2, Puerto Rico, 1986–2007. *Emerg Infect Dis* 17:64–71.
29. Mohammed, H., M. Ramos, J. Armstrong, J. Munoz-Jordan, O. Arnold-Lewis, A. Ayala, G. G. Clark, E. S. Tull, and M. E. Beatty. 2010. An outbreak of dengue fever in St. Croix (US Virgin Islands), 2005. *PLoS One* 5 :e 13729.
30. Mohammed, H. P., M. M. Ramos, A. Rivera, M. Johansson, J. L., Munoz-Jordan, W. Sun, and K. M. Tomashek. 2008. Travel-associated dengue infections in the United States, 1996 to 2005. *J Travel Med* 17:8– 14.
31. Munoz-Jordan, J. L., C. S. Collins, E. Vergne, G. A.

- Santiago, L. Petersen, W. Sun, and J. M. Linnen. 2009. Highly sensitive detection of dengue virus nucleic acid in samples from clinically ill patients. *J Clin Microbiol* 47:927–9 1.
32. Organization, W. H. 2009. Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. Geneva <http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241547871ene.pdf>.
33. Radke, E. G., C. J. Gregory, K. W. Kintziger, E. K. Sauber-Schatz, E. A. Hunsperger, G. R. Gallagher, J. M. Barber, B. J. Biggerstaff, D. R. Stanek, K. M. Tomashek, and C. G. Blackmore. 2012. Dengue outbreak in key west, Florida, USA, 2009. *Emerg Infect Dis* 18: 135– 137.
34. Ramos, M. M., H. Mohammed, E. Zielinski-Gutierrez, M. H. Hayden, J. L. Lopez, M. Fou nier, A. R. Trujillo, R. Burton, J. M. Brunkard, L. Anaya-Lopez, A. A. Banicki, P. Morales, B. Smith, J. L. Munoz-Jordan, and S. H. Waterman. 2008. Epidemic Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever at the Texas-Mexico Border: Results of a Household-based Seroepidemiologic Survey, December 2005. *Am J Trop Med Hyg* 78:364–369.
35. Rico-Hesse, R. 2007. Dengue virus evolution and virulence models. *Clin Infect Dis* 44: 1462–1466.
36. Rico-Hesse, R. 1990. Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. *Virology* 174:479–493.
37. Rigau-Perez, J. G., A. Ayala-Lopez, E. J. Garcia-Rivera, S. M. Hudson, V. Vorndam, P. Reiter, M. P. Cano, and G. G. Clark. 2002. The reappearance of dengue-3 and a subsequent dengue-4 and dengue- 1 epidemic in Puerto Rico in 1998. *Am J Trop Med Hyg* 67:355–362.
38. Sanchez-Seco, M. P., D. Rosario, L. Hernandez, C.

- Domingo, K. Valdes, M. G. Guzman, and A. Tenorio. 2006. Detection and subtyping of dengue 1-4 and yellow fever viruses by means of a multiplex RT-nested-PCR using degenerated primers. *Trop Med Int Health* 11: 1432-1441.
39. Sharp, T. M., P. Pillai, E. Hunsperger, G. A. Santiago, T. Anderson, T. Vap, J. Collinson, B. F. Buss, T. J. Safranek, M. J. Sotir, E. S. Jentes, J. L. Munoz-Jordan, and D. F. Arguello. 2012. A cluster of dengue cases in American missionaries returning from Haiti, 2010. *Am J Trop Med Hyg* 86: 16-22.
40. Steel, A., D. J. Gubler, and S. N. Bennett. 2010. Natural attenuation of dengue virus type-2 after a series of island outbreaks: a retrospective phylogenetic study of events in the South Pacific three decades ago. *Virology* 405:505-512.
41. Thomas, L., V. Moravie, F. Besnier, R. Valentino, S. Kaidomar, L. V. Coquet, F. Najjoullah, F. Lengelle, R. Cesaire, A. Cabie, and D. Working Group on. 2012. Clinical presentation of dengue among patients admitted to the adult emergency department of a tertiary care hospital in Martinique: implications for triage, management, and reporting. *Ann Emerg Med* 59:42-50.
42. Tomashek, K. M., A. Rivera, J. L. Munoz-Jordan, E. Hunsperger, L. Santiago, O. Padro, E. Garcia, and W. Sun. 2009. Description of a large island-wide outbreak of dengue in Puerto Rico, 2007. *Am J Trop Med Hyg* 81 :467-474.
43. Tricou, V., N. N. Minh, J. Farrar, H. T. Tran, and C. P. Simmons. 2011. Kinetics of viremia and NS 1 antigenemia are shaped by immune status and virus serotype in adults with dengue. *PLoS Negl Trop Dis* 5 :e1309.
44. Twiddy, S. S., J. J. Farrar, N. Vinh Chau, B. Wills, E.

A. Gould, T. Gritsun, G. Lloyd, and E. C. Holmes. 2002. Phylogenetic relationships and differential selection pressures among genotypes of dengue-2 virus. *Virology* 298:63-72.

45. World-Health-Organization. 2010. Impact of Dengue. <http://www.who.int/csr/disease/dengue/impact/en/index.html>.

[094] As patentes e publicações mencionadas no relatório descritivo são indicativas do nível dos técnicos do assunto ao qual a invenção pertence. Estas patentes e publicação são incorporadas aqui por referência na mesma extensão em que cada pedido individual ou publicação foi especificamente e individualmente incorporado aqui por referência.

[095] A descrição acima mencionada é ilustrativa das concretizações particulares da invenção, mas significa limitativa durante a prática da mesma. As reivindicações a seguir, incluindo todos os equivalentes das mesmas, pretendem definir o escopo de proteção da invenção.

REIVINDICAÇÕES

1. Processo para detectar um ou mais sorotipos do vírus da Dengue em uma amostra, caracterizado pelo fato de compreender:

- produzir um produto de amplificação através da amplificação de uma sequência de nucleotídeos do vírus da dengue através da hibridização de um primer à frente para uma primeira região dentro de um genoma do vírus da Dengue, e hibridizar um primer reverso para uma segunda região dentro do genoma do vírus da dengue, sob condições apropriadas para uma reação de cadeia de polimerase, sendo que pelo menos um de dito primer à frente ou primer reverso tem um ou mais substituições de nucleotídeo degenerado ou não alelo-selvagem, sendo que:

(i) dito primer à frente consiste da sequência da SEQ ID NO: 1, e dito primer reverso consiste da sequência da SEQ ID NO: 2;

(ii) dito primer à frente consiste da sequência da SEQ ID NO: 4, e dito primer reverso consiste da sequência da SEQ ID NO: 5;

(iii) dito primer à frente consiste da sequência da SEQ ID NO: 7, e dito primer reverso consiste da sequência da SEQ ID NO: 8; ou

(iv) dito primer à frente consiste da sequência da SEQ ID NO: 10, e dito primer reverso consiste da sequência da SEQ ID NO: 11; e

- produzir dito produto de amplificação através de uma reação em cadeia de polimerase usando dito primer à frente e dito primer reverso.

2. Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de:

- (i) o referido primer à frente consistir da sequência da SEQ ID NO:1 e o dito primer reverso consistir da sequência da SEQ ID NO:2;
- (ii) o referido primer à frente consistir da sequência da SEQ ID NO:4 e o primer reverso consistir da sequência da SEQ ID NO:5;
- (iii) o referido primer à frente consistir da sequência da SEQ ID NO:7 e o dito primer reverso consistir da sequência da SEQ ID NO:8; e
- (iv) dito primer à frente consistir da sequência da SEQ ID NO:10 e referido primer reverso consistir da sequência da SEQ ID NO:11.

3. Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de adicionalmente compreender detectar o referido produto de amplificação.

4. Processo, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de a detecção de dito produto de amplificação compreender a hibridização do dito produto de amplificação à sonda, sendo que:

- (i) dito primer à frente consiste da sequência da SEQ ID NO:1, dito primer reverso consiste da sequência da SEQ ID NO:2, e dita sonda consiste da sequência da SEQ ID NO:3;
- (ii) dito primer à frente consiste da sequência da SEQ ID NO:4, dito primer reverso consiste da sequência da SEQ ID NO:5, e dita sonda consiste da sequência da SEQ ID NO:6;
- (iii) dito primer à frente consiste da sequência da SEQ ID NO:7, dito primer reverso consiste da sequência da SEQ ID NO:8; e dita sonda consiste da sequência da SEQ ID NO:9; ou
- (iv) dito primer à frente consiste da sequência da SEQ ID NO:10, dito primer reverso consiste da sequência da SEQ ID NO:11.

NO:11, e dita sonda consiste da sequência da SEQ ID NO:12.

5. Processo, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de compreender adicionalmente detectar um primeiro sinal de detecção a partir da referida sonda hibridizada ao referido produto de amplificação.

6. Processo, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de compreender adicionalmente comparar o referido primeiro sinal de detecção para um segundo sinal de detecção, sendo que o referido segundo sinal de detecção resulta da detecção de um produto de amplificação de complementação produzido a partir de uma amostra de controle.

7. Processo, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de o referido produto de amplificação de complementação ser produzido através da amplificação por PCR de um vírus da Dengue purificado, ou porção do mesmo.

8. Processo, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de o primeiro sinal de detecção ser comparado a um terceiro sinal de detecção a partir de um calibrador de ácido nucleico extraído em paralelo à referida amostra.

9. Processo, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de o referido calibrador de ácido nucléico compreender uma quantidade conhecida da sequência de ácido nucléico do vírus da Dengue e uma quantidade conhecida de um meio similar ao da amostra.

10. Processo para diagnosticar ou confirmar o diagnóstico da presença ou ausência do vírus da Dengue em um indivíduo, caracterizado pelo fato de compreender:

- obter uma amostra a partir de um indivíduo;
- contatar a citada amostra com um primer à frente que hibridiza em uma região dentro de uma sequência genética do

vírus da Dengue (DENV), ou um produto de amplificação derivado da mesma, e um primer reverso que hibridiza em uma região dentro da referida sequência genética do DENV, ou produto de amplificação derivado da mesma, sob condições apropriadas para uma reação em cadeia de polimerase, sendo que pelo menos um dos referidos primers à frente e reverso tem um ou mais substituições de nucleotídeos degenerativas ou não-alelo selvagem; sendo que:

(i) o referido primer à frente consiste da sequência da SEQ ID NO:1 e o dito primer reverso consiste da sequência da SEQ ID NO:2;

(ii) o referido primer à frente consiste da sequência da SEQ ID NO:4 e o primer reverso consiste da sequência da SEQ ID NO:5;

(iii) o referido primer à frente consiste da sequência da SEQ ID NO:7 e o dito primer reverso consiste da sequência da SEQ ID NO:8; e

(iv) dito primer à frente consiste da sequência da SEQ ID NO:10 e referido primer reverso consiste da sequência da SEQ ID NO:11; e

- diagnosticar ou confirmar o diagnóstico da presença ou ausência da infecção do vírus da Dengue no citado indivíduo através da detecção da presença ou ausência de um produto de amplificação por meio dos referidos primer à frente e primer reverso.

11. Processo, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de:

(i) o referido primer à frente consiste da sequência SEQ ID NO:1 e o primer reverso consiste da sequência SEQ ID NO:2;

(ii) o referido primer à frente consiste da sequência SEQ ID

NO:4 e o primer reverso consiste da sequência SEQ ID NO:5;  
(iii) o referido primer à frente consiste da sequência SEQ ID NO:7 e o dito primer reverso consiste da sequência SEQ ID NO:8; e

(iv) o referido primer à frente consiste da sequência SEQ ID NO:10, e o dito primer reverso consiste da sequência SEQ ID NO:11.

12. Processo, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de compreender ainda a detecção do dito produto de amplificação, sendo que a detecção do dito produto de amplificação comprehende a hibridização do dito produto de amplificação à sonda, sendo que:

(i) dito primer à frente consiste da sequência SEQ ID NO: 1, dito primer reverso consiste da sequência SEQ ID NO:2, e dita sonda consiste da sequência SEQ ID NO:3;

(ii) dito primer à frente consiste da sequência SEQ ID NO: 4, dito primer reverso consiste da sequência SEQ ID NO:5, e dita sonda consiste da sequência SEQ ID NO:6;

(iii) dito primer à frente consiste da sequência SEQ ID NO: 7, dito primer reverso consiste da sequência SEQ ID NO:8; e dita sonda consiste da sequência SEQ ID NO:9; ou

(iv) dito primer à frente consiste da sequência SEQ ID NO: 10, dito primer reverso consiste da sequência SEQ ID NO:11, e dita sonda consiste da sequência SEQ ID NO:12, dita sonda produzindo um primeiro sinal de detecção quando hibridizada ao referido produto de amplificação.

13. Processo, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de compreender adicionalmente detectar o dito primeiro sinal de detecção a partir da referida sonda hibridizada para o citado produto de amplificação.

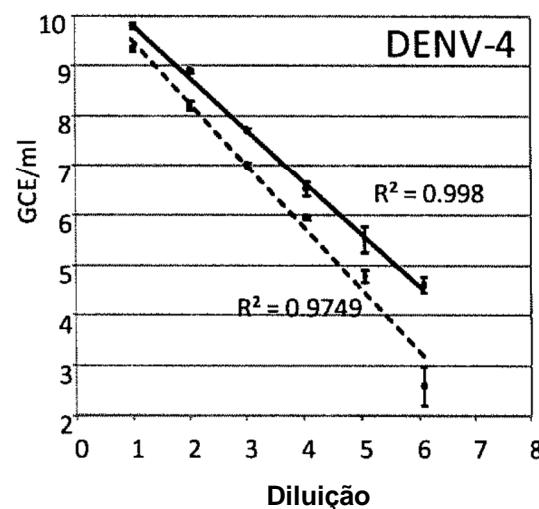
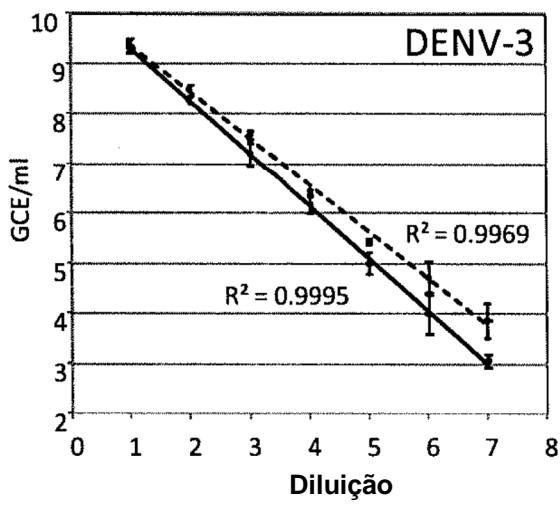
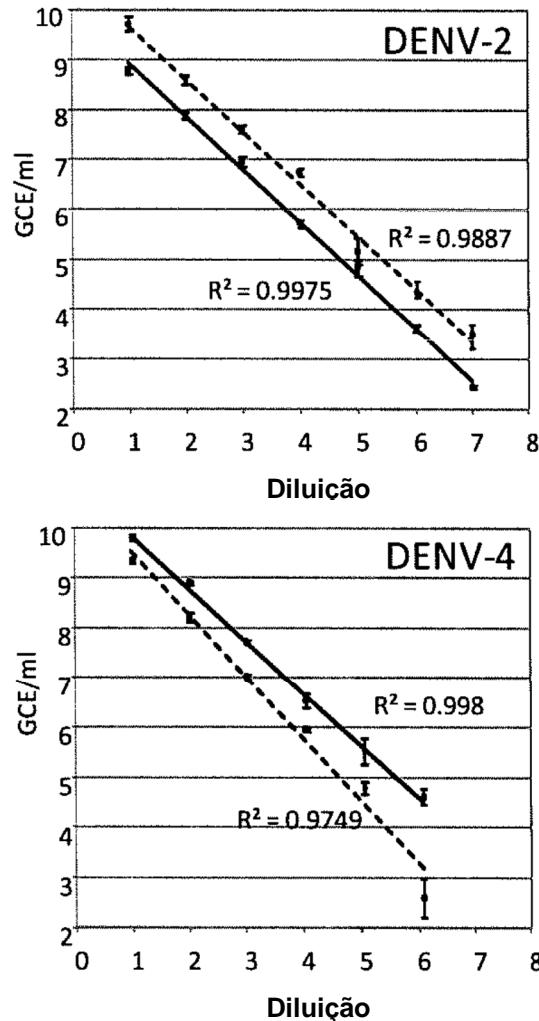
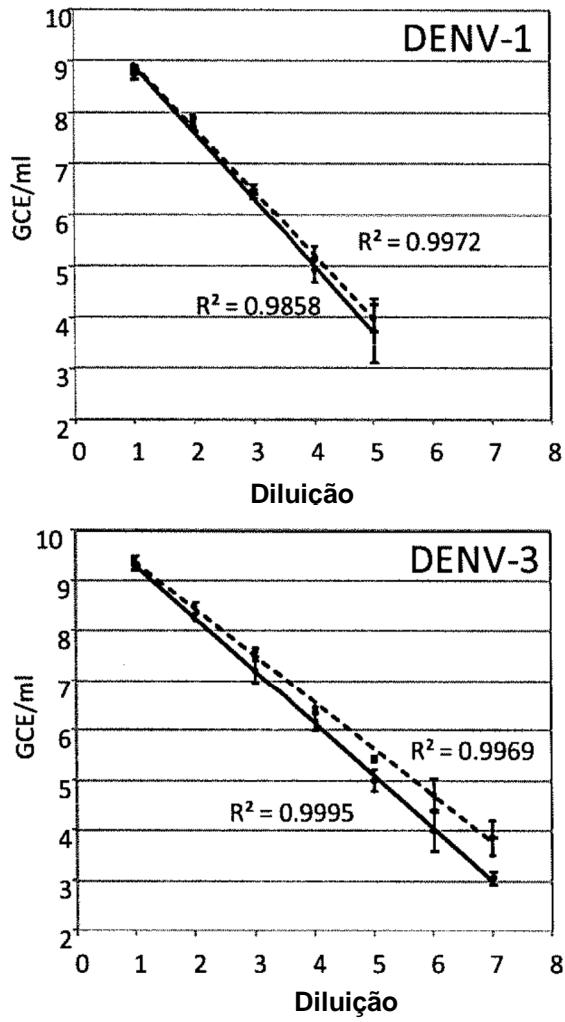
14. Processo, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de compreender adicionalmente comparar o dito primeiro sinal de detecção para um segundo sinal de detecção, sendo que o referido segundo sinal de detecção resulta da detecção de um produto de amplificação complementar produzido a partir de uma amostra controle.

15. Processo, de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de o referido produto de amplificação de complementação ser produzido através de amplificação por PCR de um vírus da Dengue purificado, ou de uma porção do mesmo.

16. Processo, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de o referido primeiro sinal de detecção ser comparado a um terceiro sinal de detecção a partir de um calibrador de ácido nucléico extraído em paralelo à referida amostra.

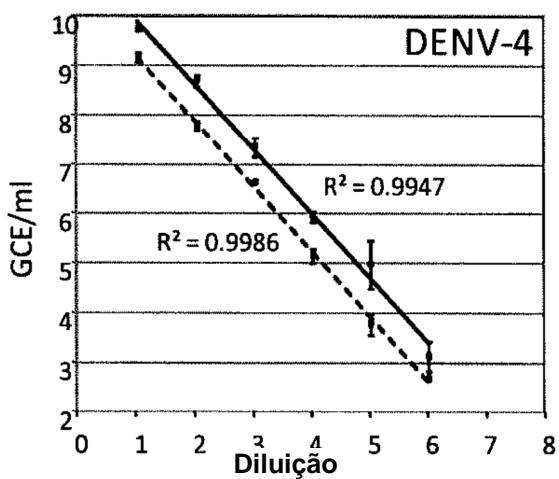
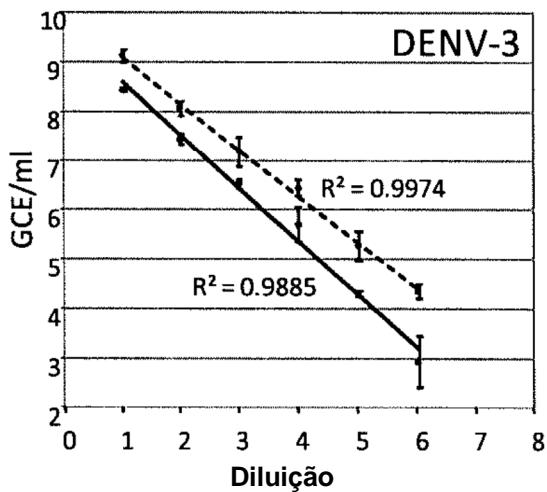
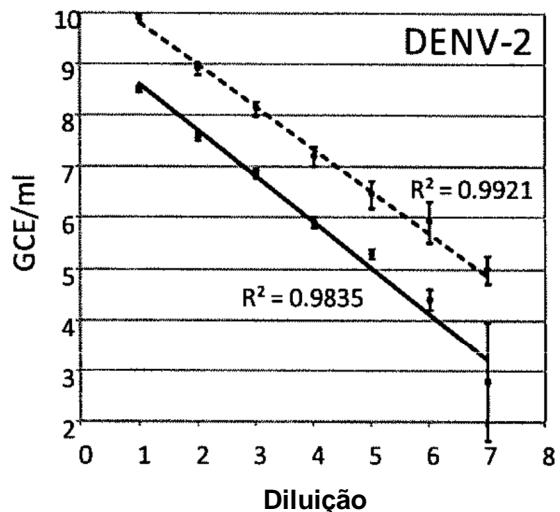
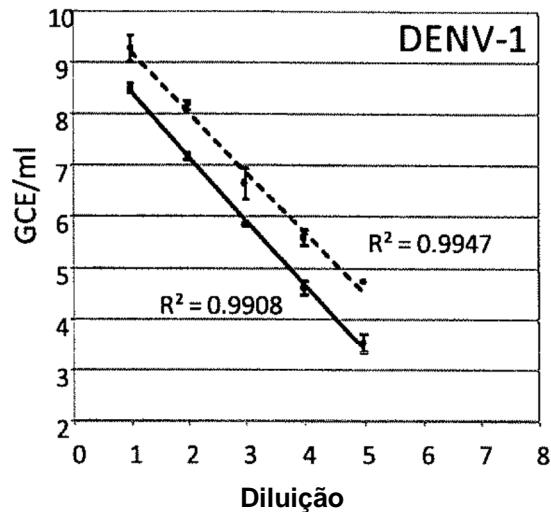
17. Processo, de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de o citado calibrador de ácido nucléico compreender uma quantidade conhecida da sequência de ácido nucléico do vírus da Dengue e uma quantidade conhecida de um meio similar ao da amostra.

1/3



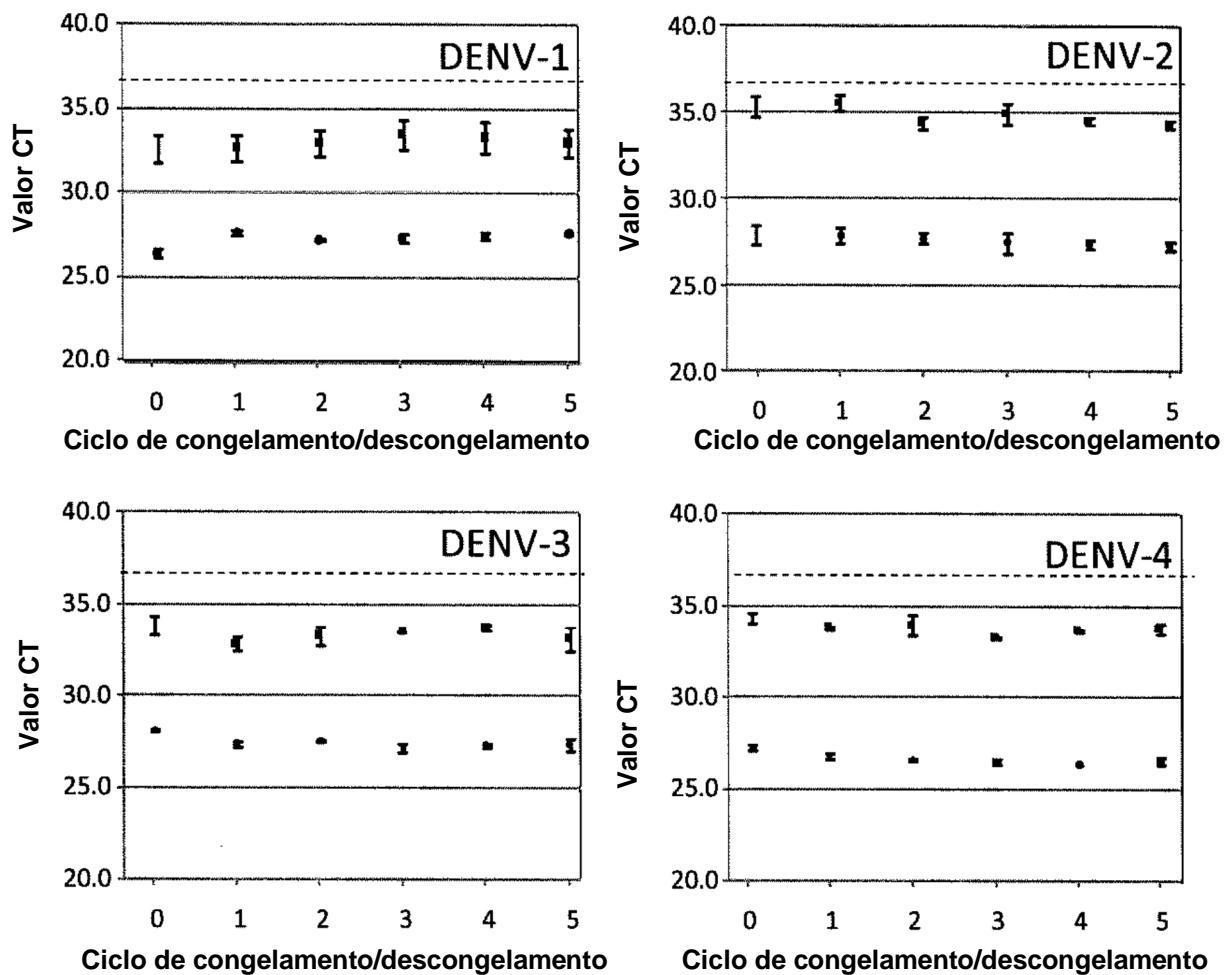
**FIG.1A**

**2/3**



**FIG.1B**

**3/3**



**FIG.2**