

(12) PEDIDO INTERNACIONAL PUBLICADO SOB O TRATADO DE COOPERAÇÃO EM MATÉRIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organização Mundial da Propriedade Intelectual
Secretaria Internacional



(10) Número de Publicação Internacional
WO 2016/054708 A1

(43) Data de Publicação Internacional
14 de Abril de 2016 (14.04.2016)

WIPO | PCT

- (51) Classificação Internacional de Patentes :
C12Q 1/68 (2006.01) C12N 15/33 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)
- (21) Número do Pedido Internacional :
PCT/BR2015/050161
- (22) Data do Depósito Internacional :
25 de Setembro de 2015 (25.09.2015)
- (25) Língua de Depósito Internacional : Português
- (26) Língua de Publicação : Português
- (30) Dados Relativos à Prioridade :
BR1020140249052
6 de Outubro de 2014 (06.10.2014) BR
- (71) Requerentes : FUNDAÇÃO HEMOCENTRO DE RIBEIRÃO PRETO [BR/BR]; Rua Tenente Catão Roxo, 2501, Bairro Monte Alegre, 14051-140 Ribeirão Preto, SP (BR). UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - USP [BR/BR]; Rua da Reitoria, 374, Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, 05508-220 São Paulo, SP (BR).
- (72) Inventores : ROCHA, JUNIOR, Maurício Cristiano; Rua Odair de Oliveira, 135, apto 33, 14026-591 Ribeirão Preto, SP (BR). HADDAD, Simone, Kashima; Rua Tenente Catão Roxo, 2501, Bairro Monte Alegre, 14051-140 Ribeirão Preto, SP (BR). COVAS, Dimas Tadeu; Rua Tenente Catão Roxo, 2501, Bairro Monte Alegre, 14051-140 Ribeirão Preto, São Paulo (BR).
- (74) Mandatário : KASZNAR LEONARDOS PROPRIEDADE INTELECTUAL; Rua Teófilo Otoni, 63 / 5º ao 8º andar, 20090-080 Rio de Janeiro, RJ (BR).
- (81) Estados Designados (sem indicação contrária, para todos os tipos de proteção nacional existentes) : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM,

(Continua na página seguinte)

(54) Title : OLIGONUCLEOTIDES, SET OF OLIGONUCLEOTIDES, HTLV-I/HTLV-II INFECTION DIAGNOSTIC AND DISCRIMINATION KIT, POLYNUCLEOTIDE SUITABLE AS REFERENCE TARGET FOR DESIGNING PRIMERS AND PROBES FOR THE DETECTION AND DIFFERENTIATION OF HTLV-I AND HTLV-II, AMPLICON AND METHOD FOR DETECTING AT LEAST ONE HTLV TARGET

(54) Título : OLIGONUCLEOTÍDEOS, CONJUNTO DE OLIGONUCLEOTÍDEOS, KIT PARA DIAGNÓSTICO E DISCRIMINAÇÃO DE INFECÇÃO POR HTLV-1/2, POLINUCLEOTÍDEO ADEQUADO PARA USO COMO ALVO DE REFERÊNCIA PARA O DESENHO DE INICIADORES E SONDAS PARA DETECÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DE HTLV-1 E HTLV-2, AMPLICON, E, MÉTODO PARA DETECÇÃO DE PELO MENOS UM ALVO DE HTLV

(57) Abstract : The presence of the human T-cell lymphotropic virus (HTLV) can be detected and virus type I or II can be identified by the present method, which involves the amplification of DNA sequences of HTLV by real-time polymerase chain reaction. For that purpose, primers were developed to amplify a particular region of the genome of HTLV-I and HTLV-II. The presence of HTLV-I and/or HTLV-II in a sample is indicated by the fluorescence released by probes specific to each subtype.

(57) Resumo :

(Continua na página seguinte)

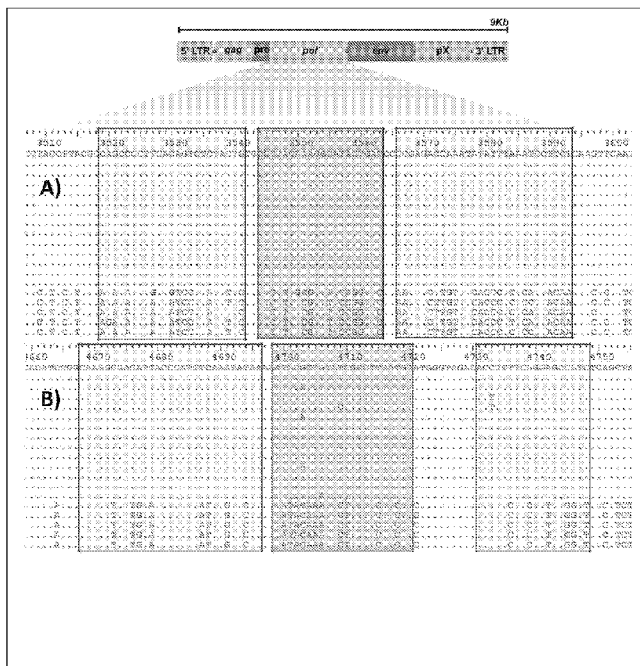


FIGURA 2

WO 2016/054708 A1



TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados Designados (*sem indicação contrária, para todos os tipos de proteção regional existentes*): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasiático (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), Europeu (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO,

RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicado:

- *com relatório de pesquisa internacional (Art. 21(3))*
- *com listagem de sequências, parte da descrição (Regra 5.2(a))*

A presença do vírus linfotrópico de células T humanas (HTLV) pode ser detectada e vírus pode ser tipado como tipo 1 ou 2 pelo método aqui descrito, que envolve a amplificação de sequências de DNA do HTLV por reação de polimerase em cadeia em tempo real. Para isto, foram desenvolvidos iniciadores utilizados para amplificar uma região particular do genoma do HTLV1 e 2. A presença do HTLV-1 e/ou do HTLV-2 em uma amostra é indicada pela formação de fluorescência liberada pelas sondas específicas para cada subtipo.

“OLIGONUCLEOTÍDEOS, CONJUNTO DE OLIGONUCLEOTÍDEOS, KIT PARA DIAGNÓSTICO E DISCRIMINAÇÃO DE INFECÇÃO POR HTLV-1/2, POLINUCLEOTÍDEO ADEQUADO PARA USO COMO ALVO DE REFERÊNCIA PARA O DESENHO DE INICIADORES E SONDAS PARA DETECÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DE HTLV-1 E HTLV-2, AMPLICON, E, MÉTODO PARA DETECÇÃO DE PELO MENOS UM ALVO DE HTLV.”

Campo da invenção

[0001] A invenção refere-se de forma geral à amplificação e detecção de ácidos nucleicos. Mais especificamente, são providos métodos, oligonucleotídeos e *kit* de diagnóstico para confirmar, quantificar e discriminar infecções por HTLV-1 e/ou HTLV-2 a partir de amostras do paciente.

Antecedentes da Invenção

[0002] O primeiro indício de que as infecções virais poderiam ser a causa de neoplasias em humanos foi documentado por Rous (J Exp Med, v. 13, n. 4, p. 397-411, 1911). Em 1979, o isolamento do vírus linfotrópico de células T humanas do tipo 1 (HTLV-1), a partir de células cancerígenas de um paciente com linfoma cutâneo de células T (Poiesz *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A, v. 77, n. 12, p. 7415-9, 1980) confirmou a hipótese da existência de um retrovírus como agente etiológico do desenvolvimento do câncer. O HTLV-1 foi o primeiro retrovírus humano descrito, estabelecendo definitivamente o envolvimento dos retrovírus nas infecções humanas. Pouco tempo após sua identificação, um segundo retrovírus humano foi descrito, o HTLV-2, que por sua vez, foi isolado a partir de uma linhagem de células T obtidas de um paciente com leucemia de células pilosas (Kalyanaraman *et al.*, Science, v. 218, n. 4572, p. 571-3, 1982.).

[0003] O HTLV-1 está associado a duas principais manifestações clínicas: i) uma doença hematológica aguda envolvendo células T denominada leucemia/linfoma de células T do adulto (ATLL) (Poiesz *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A, v. 77, n. 12, p. 7415-9, 1980; Yoshida *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A, v. 79, n. 6, p. 2031-5, 1982); ii) uma doença de caráter neuroinflamatório degenerativa e progressiva denominada mielopatia associada ao HTLV-1/Paraparesia Espástica Tropical (HAM/TSP). O risco para o desenvolvimento tanto da ATLL quanto HAM/TSP é cerca de 3 a 5%, o que torna assintomática a maioria dos indivíduos portadores deste retrovírus. A infecção pelo HTLV-2 tem sido associada a casos esporádicos de doenças neurológicas que se assemelham a HAM/TSP. Em 2005, dois novos tipos de HTLV foram identificados em caçadores camaroneses de primatas: HTLV-3 e HTLV-4 (Calattini *et al.*, Retrovirology, v. 2, p. 30, 2005; Wolfe *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A, v. 102, n. 22, p. 7994-9, 2005). No entanto, as informações sobre estes novos tipos virais não são suficientes para determinar se estes retrovírus são transmissíveis, ou ainda, se são capazes de desencadear doenças em seus portadores (Mahieux e Gessain, Pathol Biol (Paris), v. 57, n. 2, p. 161-6, 2009).

[0004] O potencial da disseminação do HTLV-1/2 por meio da transfusão sanguínea incitou a triagem sorológica em bancos de sangue, inicialmente no Japão em 1986, seguida dos Estados Unidos em 1988, sendo gradativamente implantada em outros países (Vrieling *et al.*, Transfus Med Rev, v. 11, n. 3, p. 173-9, 1997). No Brasil, a triagem sorológica em doadores de sangue tornou-se compulsória a partir de 1993, de acordo com a Portaria nº 1.376 (19/11/1993) do Ministério da Saúde.

[0005] Hoje, sabe-se que, além da transmissão via transfusão de sangue e/ou hemoderivados, o HTLV-1 e o HTLV-2 também são transmitidos através de contato sexual (Murphy *et al.* Ann. Intern. Med. 111:555-560, 1989); de mãe para filho através da amamentação (Hino *et al.* Jpn. J. Cancer. Res. 1985,

76:474-480, 1985; Vitek *et al.* J. Infect. Dis. 171 : 1022-1026, 1995) e compartilhamento de seringas intravenosas por usuários de drogas (Van Brussel *et al.* Rev. Med. Virol. 9:155-170, 1999). Assim, faz-se importante o uso de metodologias adequadas para o diagnóstico eficaz e seguro, para aumentar principalmente a segurança de transplante de órgãos sólidos e transfusional, o correto aconselhamento dos pacientes e a adoção de medidas preventivas em relação à transmissão de HTLV-1/2, impactando diretamente na redução da transmissão deste retrovírus.

[0006] Atualmente, no mundo, os procedimentos de testes diagnósticos requerem, em adição aos testes de triagem, a condução testes confirmatórios adicionais, todos baseados em testes sorológicos, que apresentam altos custos e ainda assim, mostram-se insuficientes para a diferenciação entre infecções causadas pelo HTLV-1 e HTLV-2. Assim, notam-se problemas relacionados à conclusão do diagnóstico, como o elevado número de resultados indeterminados.

[0007] Para fins ilustrativos, no Brasil, o diagnóstico da infecção pelo HTLV é realizado em duas etapas: triagem e confirmação. Na triagem, são utilizados testes sorológicos que detectam a presença de anticorpos dirigidos contra o vírus, tais como testes imunoenzimáticos (EIA), quimioluminescência e aglutinação de micropartículas de látex sensibilizadas (Verdier *et al.*, J Clin Microbiol, v. 28, n. 9, p. 1988-93, 1990; Thorstensson *et al.*, Transfusion, v. 42, n. 6, p. 780-91, 2002). Os antígenos frequentemente utilizados nos testes disponíveis no mercado são aqueles encontrados no lisado viral do HTLV-1 e HTLV-2 acrescidos das proteínas recombinantes derivadas do envelope viral, as quais aumentam a sensibilidade do teste. Para a confirmação, podem ser utilizados o *Western Blot* (WB), a reação em cadeia da polimerase (PCR), a radioimunoprecipitação (RIPA) e a imunofluorescência indireta (IFA) (Verdier *et al.*, J Virol Methods, v. 30, n. 3, p. 283-9, Dec 1990; Thorstensson *et al.*, Transfusion, v. 42, n. 6, p. 780-91, 2002; Costa *et*

al., J Virol Methods, v. 173, n. 2, p. 280-6, 2011).

[0008] Rotineiramente, o WB é utilizado como método confirmatório, porém apresenta frequentemente resultados inconclusivos devido a reatividades inespecíficas (Kwok *et al.*, Transfusion, v. 30, n. 6, p. 491-4, 1990; Lal, J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol, v. 13 Suppl 1, p. S170-8, 1996; Thorstensson *et al.*, Transfusion, v. 42, n. 6, p. 780-91, 2002; Abrams *et al.*, Viruses, v. 3, n. 8, p. 1320-31, 2011). O teste ainda apresenta elevado custo, o que o torna inviável para implementação do mesmo na rotina diagnóstica (Carneiro-Proietti *et al.* Rev Panam Salud Publica, v. 19, n. 1, p. 44-53, 2006; Andrade *et al.* Rev Soc Bras Med Trop, v. 43, n. 2, p. 111-5, 2010). Ainda, a infecção por HTLV não pode ser detectada durante o período de pré-soroconversão (janela imunológica), que pode variar de 36 a 72 dias, ou quando a resposta imunológica é deficiente.

[0009] Por este motivo, apesar dos algoritmos para a triagem sorológica em doadores de sangue, inclusive o algoritmo brasileiro, preconizarem a utilização de um método altamente sensível como o EIA, a confirmação dos resultados positivos da triagem sorológica por outro método, como o WB, ainda apresentam problemas de ineficiência do teste, associado ao alto custo. No Brasil, ainda há a agravante de que o WB não é obrigatório devido a estes problemas.

[00010] Diante dessas dificuldades, o desenvolvimento de ferramentas moleculares altamente sensíveis e específicas para a conclusão segura do diagnóstico da infecção pelo HTLV, em complemento ou substituição ao teste de WB, torna-se necessário.

[00011] O diagnóstico molecular realizado por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) para a pesquisa de sequências genômicas provirais do HTLV no espécime clínico apresenta alta sensibilidade e especificidade devido à amplificação de fragmentos de DNA pré-determinados. Desta forma, a PCR possibilita a identificação de cepas divergentes que não estão incluídas

nos testes sorológicos, bem como a identificação da infecção em pacientes que se encontram no período de janela imunológica (Madeleine *et al.* Int J Cancer, v. 54, n. 2, p. 255-60, 1993; Ishak *et al.* Rev Soc Bras Med Trop, v. 31, n. 2, p. 193-7, 1998).

[00012] O DNA proviral do HTLV-1/2 pode ser detectado e/ou quantificado por meio da amplificação de diferentes regiões do genoma viral. As regiões *gag*, *pol*, *env*, *tax* e *rex* são comumente utilizadas neste procedimento (Gabbai *et al.*, Am J Trop Med Hyg, v. 49, n. 6, p. 664-71, 1993; Poiesz *et al.* Transfusion, v. 40, n. 8, p. 924-30, 2000; Thorstensson *et al.* Transfusion, v. 42, n. 6, p. 780-91, 2002; Vitone *et al.*, BMC Infect Dis, v. 6, p. 41, 2006). Com o objetivo de aumentar a sensibilidade e especificidade, a *nested*-PCR pode ser realizada, na qual uma segunda reação de amplificação é realizada com o produto da primeira reação. Em 1992, Higuchi e colaboradores (Biotechnology (N Y), v. 10, n. 4, p. 413-7, 1992) introduziram a ideia da PCR em tempo real (qPCR). Esta técnica é capaz de detectar e quantificar em tempo real os produtos da PCR durante a reação de amplificação, medindo o aumento da intensidade de fluorescência durante a reação. Esta tecnologia detecta os produtos específicos de uma reação de PCR por meio da clivagem de uma sonda duplamente marcada com fluoróforo, a qual se hibridiza na região do DNA entre os sítios de ligação dos iniciadores. Pela característica de apresentar alta sensibilidade e especificidade, a qPCR é um método capaz de esclarecer estados sorológicos indeterminados, e de discriminar a infecção causada pelo HTLV-1 e HTLV-2.

[00013] Diversos autores descrevem diferentes protocolos de qPCR para o diagnóstico do HTLV-1/2 (Dehee *et al.* J Virol Methods, v. 102, n. 1-2, p. 37-51, 2002; Adui *et al.*, J Neurovirol, v. 12, n. 6, p. 456-65, 2006; Estes e Sevall, Mol Cell Probes, v. 17, n. 2-3, p. 59-68, 2003; Besson e Kazanji, J Clin Microbiol, v. 47, n. 4, p. 1129-35, 2009; Moens *et al.*, J Clin Microbiol, v. 47, n. 11, p. 3682-91, 2009; Waters *et al.*, J Clin Virol, v. 52, n. 1, p. 38-44,

2011; Besson *et al.*, Blood, 99: 88-94, 2002; Tamegão-Lopes *et al.*, Rev. Soc. Bras. Med. Trop., 39 (6): 548-552, 2006; Andrade *et al.*, Rev. Soc. Bras. Med. Trop., 43 (2): 111-115, 2010; Costa *et al.*, J. Virol. Methods, 173: 280-286, 2011; US Patent Application No. 2012052501). Contudo, estes e outros protocolos descritos utilizam regiões gênicas virais e/ou iniciadores e/ou sondas e/ou métodos de detecção distintos daqueles descritos na presente invenção. De forma mais importante, importa informar que as metodologias por eles propostos apresentam deficiências na padronização, e os seus processos de validação são considerados incompletos, impactando diretamente tanto na confiabilidade quanto na sensibilidade e especificidade dos testes .

[00014] Adicionalmente, os inventores, até o presente momento, não têm conhecimento da existência de testes diagnósticos comerciais baseados em tecnologia de amplificação de ácidos nucleicos para HTLV-1/2. A implementação da tecnologia aqui descrita poderia sobrepor-se a todas as desvantagens metodológicas mencionadas anteriormente, permitindo a conclusão segura do diagnóstico.

[00015] A este respeito, os inventores apontam como vantagens da presente invenção:

[00016] 1) É uma metodologia capaz de detectar e discriminar a infecção pelo HTLV-1/2 em uma única reação, além da presença do controle endógeno, mandatório em testes diagnósticos que utilizam a metodologia da PCR.

[00017] 2) Métodos de PCR em tempo real no formato *singleplex* são descritos para o diagnóstico do HTLV, no entanto, a maioria destes é direcionada apenas para o HTLV-1. A discriminação entre os tipos virais é de fundamental importância, pois as manifestações clínicas da infecção estão principalmente associadas ao HTLV-1. Além disso, como os dois tipos virais compartilham as mesmas vias de transmissão, a não detecção do HTLV-2

implicaria na contínua disseminação deste retrovírus. Ainda, os protocolos *singleplex*, além de agregar custo, necessitam de um maior tempo execução, pois ao menos duas reações são necessárias para a definição do diagnóstico. Na plataforma aqui desenvolvida, apenas uma reação é necessária para conclusão o diagnóstico, reduzindo significativamente o custo e tempo de realização do teste.

[00018] 3) Foi realizado um processo de validação abrangente e completo. Assim:

[00019] 3.1) Além das metodologias *singleplex* para o diagnóstico do HTLV-1, um restrito número de *métodos multiplex* capaz de detectar e discriminar o HTLV-1 e HTLV-2 em uma mesma reação é descrito. Mais restrito ainda são os métodos que incluem no *multiplex* o controle endógeno, mandatório em métodos diagnósticos baseados na PCR. Contudo, estes testes apresentam falhas graves nos processos de validação analíticos e diagnósticos, que por sua vez comprometem a acurácia e confiabilidade dos resultados. Em relação aos parâmetros analíticos, a definição da sensibilidade ou limite de detecção (LoD) dos testes disponíveis é realizada por meio de diluições seriadas de controles positivos, nas quais o LoD é definido como o última diluição que apresentou curva de amplificação. Esta estratégia é inadequada, pois não representa o valor real deste parâmetro. Segundo o Colégio Americano de Patologistas, o LoD deve ser calculado por meio de uma regressão linear (Probit) na qual o LoD será definido em uma probabilidade entre 0 e 100% de se obter um resultado positivo. Na processo de validação da plataforma aqui proposta, foi obtido o LoD utilizando este modelo.

[00020] 3.2) A especificidade de métodos baseados na PCR deve ser realizada tanto *in vitro*, quanto *in silico*. A maioria dos métodos encontrados não avaliou este parâmetro, ou realizaram somente a avaliação da especificidade *in silico*, confrontando a sequência das sondas e iniciadores contra uma base de dados pública (BLAST). Outro problema da técnica é que,

quando há avaliação deste parâmetro, a grande maioria dos métodos realizam testes em um número estatisticamente muito pequeno de indivíduos. Não existe um número mínimo de amostras ou microrganismos a serem avaliados, entretanto, organismos geneticamente similares devem ser testados. A avaliação inadequada deste parâmetro pode não identificar possíveis reações cruzadas com outros organismos não investigados, reduzindo drasticamente a especificidade do ensaio. No teste desenvolvido, o conjunto de sondas e iniciadores foram avaliados *in silico*, bem como *in vitro*, por meio de reações que contemplavam os vírus HAV, HBV, HCV, HIV-1, HIV-2, B19, além de 30 pacientes portadores de HBV, HCV e HIV.

[00021] 3.3) Outro parâmetro que deve ser contemplado nos testes diagnósticos é a reprodutibilidade. A maioria dos ensaios descritos, quando avaliam este parâmetro, o faz de maneira não sistematizada e, muitas vezes inadequada. No teste proposto, a reprodutibilidade foi avaliada por meio de inter-ensaios e intra-ensaios, utilizando diferentes concentrações do analito (alta, média e baixa).

[00022] 3.4) O parâmetro robustez, convencionado como o potencial da contaminação cruzada de uma amostra positiva para uma amostra negativa avaliado nesta plataforma, não foi contemplado em nenhuma das metodologias anteriormente descritas.

[00023] 3.5) Quanto aos parâmetros diagnósticos, os inventores observam que as metodologias desenvolvidas utilizam restrito e inadequado número de amostras positivas para ambos os tipos virais. Ainda, outros trabalhos simulam amostras positivas adicionando DNA extraído de células infectadas a amostras de sangue, obtidas a partir de indivíduos não infectados, o que não reflete o verdadeiro *status* de infecção. O inadequado espaço amostral de amostras positivas pode superestimar ou subestimar o valor da sensibilidade diagnóstica do teste, podendo gerar resultados inconsistentes quando aplicados na rotina diagnóstica. Por fim, as metodologias disponíveis

ou não avaliaram a especificidade do teste com amostras de indivíduos não infectados ou utilizaram um número inadequado de amostras, podendo mascarar a inexistência de resultados falsos positivos, colocando em risco a conclusão segura do diagnóstico.

[00024] Assim, é altamente desejável prover um método melhorado para detectar e diferenciar simultaneamente em uma única reação, infecções por HTLV-1 e/ou HTLV-2. Ainda, é altamente desejável que este método seja rápido e fácil de executar em larga escala, em qualquer laboratório de biologia molecular, com alta sensibilidade e especificidade, tendo sido realizados de forma acurada os testes de padronização e validação. Em particular, o teste melhorado deve ser capaz de detectar todas as amostras positivas, com um número mínimo de falsos positivos, e ainda ser capaz de distinguir HTLV-1 de HTLV-2.

Sumário da Invenção

[00025] Em um aspecto, a invenção provê um oligonucleotídeo capaz de se ligar à região *pol* de HTLV e ser adequado como iniciador, compreendendo pelo menos de 10 a 15 nucleotídeos consecutivos das sequências selecionadas de SEQ ID Nos: 1, 2, 4, 5 e 6.

[00026] Em uma concretização, o oligonucleotídeo adequado como iniciador compreende as sequências de SEQ ID Nos: 1, 2, 4, 5 e 6.

[00027] Em uma outra concretização, o oligonucleotídeo adequado como iniciador consiste nas SEQ ID Nos: 1, 2, 4, 5 e 6.

[00028] Em um outro aspecto da invenção, é provido um oligonucleotídeo capaz de ser ligar à região *pol* de HTLV e ser adequado como sonda, dito oligonucleotídeo sonda compreendendo pelo menos de 8 a 15 nucleotídeos consecutivos das sequências selecionadas de SEQ ID Nos: 3 e 7.

[00029] Em uma concretização, este oligonucleotídeo compreende as

seqüências de SEQ ID Nos: 3 e 7. Em uma outra concretização, este oligonucleotídeo consistir nas seqüências de SEQ ID Nos: 3 e 7.

[00030] Em uma concretização adicional, o oligonucleotídeo adequado como sonda é marcado com uma marcação detectável, preferencialmente, um grupamento fluorescente, compreendendo um par de fluoróforo doador e um *quencher*.

[00031] Em um aspecto adicional, a invenção também se refere a um conjunto de oligonucleotídeos, que compreende pelo menos dois oligonucleotídeos selecionados de seqüências compreendendo SEQ ID Nos: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7.

[00032] Em um outro aspecto adicional, é provido um método para detecção de pelo menos um alvo de HTLV, compreendendo as etapas de:

a) produzir pelo menos um amplicon usando pelo menos dois oligonucleotídeos, ditos oligonucleotídeos sendo iniciadores adequados para a amplificação de pelo menos um alvo de referência selecionado do grupo que consiste da seqüência localizada entre as posições 3340 e 3414 da SEQ ID NO: 11 e seqüência localizada entre as posições 4483 e 4563 da SEQ ID NO: 12, e

b) detectar o amplicon através de pelo menos uma sonda.

[00033] Em uma concretização, tal método é realizado com pelo menos um iniciador compreendendo pelo menos de 10 a 15 nucleotídeos consecutivos das seqüências selecionadas de SEQ ID Nos: 1, 2, 4, 5 e 6; ou um iniciador compreendendo as seqüências de SEQ ID Nos: 1, 2, 4, 5 e 6; ou um iniciador consistindo nas SEQ ID Nos: 1, 2, 4, 5 e 6.

[00034] Em uma concretização, o método é realizado com os iniciadores de SEQ ID Nos: 1 e 2.

[00035] Em uma outra concretização, o método é realizado com os conjuntos de iniciadores selecionados de SEQ ID Nos: 4 e 5, SEQ ID Nos: 4 e 6 ou SEQ ID Nos: 4, 5 e 6.

[00036] Em uma outra concretização, e etapa do método referente a detectar o amplicon é realizada com pelo menos uma sonda como acima definida.

[00037] Em uma outra concretização, a dita etapa de produzir pelo menos um amplicon compreende pelo menos um de amplificação por PCR *multiplex*, *singleplex*, quantitativo, qualitativo, convencional ou em tempo real.

[00038] Em outra concretização adicional, o método permite discriminar entre infecções por HTLV-1 e HTLV-2.

[00039] Um outro aspecto da invenção diz respeito a um *kit* para diagnóstico e discriminação de infecção por HTLV-1/2, compreendendo: a) pelo menos um oligonucleotídeo adequado como iniciador como acima definido; e/ou b) pelo menos um conjunto de oligonucleotídeos adequando como sonda como definido acima; e c) opcionalmente, instruções para uso.

[00040] Adicionalmente, em uma concretização, o *kit* da invenção ainda inclui um controle negativo e/ou um controle positivo de reação.

[00041] Em outro aspecto da invenção, é provido um polinucleotídeo adequado para uso como alvo de referência para o desenho de iniciadores e sondas para detecção e diferenciação de HTLV-1 e HTLV-2, selecionado do grupo que consiste da sequência localizada entre as posições 3340 e 3414 da SEQ ID NO: 11 e sequência localizada entre as posições 4483 e 4563 da SEQ ID NO: 12.

[00042] Em um aspecto adicional, a invenção provê um amplicon obtível pelo método acima descrito, a partir de uma amostra contendo HTLV.

[00043] Em uma concretização, o amplicon é obtido com um par de iniciadores selecionado de: um iniciador de SEQ ID No: 1 e um iniciador de SEQ ID NO: 2; ou um iniciador de SEQ ID NO: 4 e um iniciador de SEQ ID NO: 5, ou um iniciador de SEQ ID NO: 4 e um iniciador de SEQ ID NO: 6.

Breve Descrição das Figuras

[00044] **Figura 1:** Isolados de HTLV-1 e HTLV-2 utilizados no múltiplo alinhamento.

[00045] **Figura 2:** Alinhamento parcial do gene *pol* do HTLV-1 e HTLV-2. (A) Iniciadores e sonda para detecção do HTLV-1. (B) Iniciadores e sonda para detecção do HTLV-2. As caixas amarelas representam os sítios escolhidos para desenho dos iniciadores. A caixa em verde representa o sítio para desenho da sonda para HTLV-1 e a caixa em vermelho representa o sítio para desenho da sonda para HTLV-2.

[00046] **Figura 3:** Curvas de amplificação e curvas padrão no formato *singleplex*. Diluições decimais seriadas variando de 10^5 a 10^0 cópias virais/reação dos controles positivos MT-2 (HTLV-1) e Gu (HTLV-2) foram utilizadas nas reações de qPCR. (A) Curvas de amplificação para o HTLV-1. (B) Curva padrão para HTLV-1. (C) Curvas de amplificação para o HTLV-2. (D) Curva padrão para HTLV-2. (E) Curvas de amplificação para o controle interno. (F) Curva padrão para o controle interno.

[00047] **Figura 4:** Curvas de amplificação nos formatos *singleplex* e *multiplex* (*biplex* e *triplex*). Diluições decimais seriadas variando de 10^5 a 10^0 cópias virais/reação dos controles positivos MT-2 (HTLV-1) e Gu (HTLV-2) foram utilizadas nas reações. (A) Curvas de amplificação no formato *singleplex* para o HTLV-1. (B) Curvas de amplificação no formato *biplex* para o HTLV-1 e controle interno. (C) Curvas de amplificação no formato *singleplex* para o HTLV-2. (D) Curvas de amplificação no formato *biplex* para o HTLV-2 e controle interno. (E) Curvas de amplificação no formato *biplex* para HTLV-1 e HTLV-2. (F) Curvas de amplificação no formato *triplex* para HTLV-1, HTLV-2 e controle interno.

[00048] **Figura 5:** Curvas de amplificação no formato *singleplex* para HTLV-2. Cada reação foi realizada em duplicata e continha 10^5 , 10^3 e 10^1 cópias virais/reação. A curva em vermelho representa a concentração de 100

nM da sonda, em amarelo, 200 nM e em verde, 300 nM. Nota-se que há aumento na intensidade de fluorescência (ΔR_n) à medida que a concentração da sonda é aumentada.

[00049] **Figura 6:** Esquema do segundo iniciador reverso para HTLV-2. Nota-se que com a utilização de dois iniciadores reversos, dois *amplicons* de tamanho diferentes são gerados, e estes são alvos de uma única sonda. Com o aumento do número de *amplicons* gerados, mais sondas serão aneladas aos mesmos, proporcionando o aumento da fluorescência, redução no Ct, e consequentemente, aumento da sensibilidade.

[00050] **Figura 7:** Comparação entre as curvas de amplificação no formato *singleplex* utilizando um ou dois iniciadores reversos para HTLV-2. As curvas de amplificação em vermelho são referente às reações contendo um iniciador reverso. As curvas de amplificação em verde referem-se a reações contendo dois iniciadores reversos. Ao adicionar o segundo iniciador reverso à reação, notou-se o aumento da fluorescência associado a uma ligeira redução nos valores de *cycle threshold* (Ct).

[00051] **Figura 8:** Curvas de amplificação no formato *singleplex* utilizando diferentes concentrações de iniciadores e sondas. Três diluições (10^5 , 10^3 , e 10^1) dos controles positivos MT-2 (HTLV-1) e Gu (HTLV-2) foram utilizadas nas reações de qPCR. (A) Curvas de amplificação para o controle interno. (B) Curvas de amplificação para HTLV-1. (C) Curvas de amplificação para HTLV-2. (D) Curvas de amplificação para HTLV-2.

[00052] **Figura 9:** Curva de amplificação no formato *multiplex* com a presença de três alvos (HTLV-1, HTLV-2 e controle interno). A diluição de 10^5 cópias virais/reação dos controles positivos MT-2 (HTLV-1) e Gu (HTLV-2) foi utilizada na reação de qPCR.

[00053] **Figura 10:** Curvas de amplificação e curvas padrão no formato *multiplex* com a presença de três alvos (HTLV-1, HTLV-2 e controle interno). Diluições decimais seriadas variando de 10^5 a 10^1 cópias virais/reação dos

controles positivos MT-2 (HTLV-1) e Gu (HTLV-2) foram utilizadas nas reações de qPCR.

[00054] **Figura 11:** Esquema da montagem da placa de reação para o ensaio de robustez. Amostras positivas para HTLV-1 foram pipetadas lado a lado com amostras sem alvo por toda a placa em forma de “mesa de xadrez”.

Descrição Detalhada da Invenção

[00055] A não ser que sejam definidos de maneira diferente, todos os termos técnicos e científicos aqui utilizados têm o mesmo significado entendido por um técnico no assunto ao qual a invenção pertence. As técnicas convencionais de biologia molecular são bem conhecidas de um técnico no assunto, podendo ser encontradas, por exemplo, em Ausubel *et al.*, eds. Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc. N.Y. (1987-2008), incluindo todos os suplementos; Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2^a edição, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989). O relatório descritivo também provê definições de termos para auxiliar na interpretação daquilo que é aqui descrito e das reivindicações. A não ser que seja indicado de forma diferente, todos os números expressando quantidades, porcentagens e proporções, e outros valores numéricos usados no relatório descritivo e nas reivindicações, devem ser entendidos como sendo modificados, em todos os casos, pelo termo “cerca de”. Assim, a não ser que seja indicado o contrário, os parâmetros numéricos mostrados no relatório descritivo e nas reivindicações são aproximações que podem variar, dependendo das propriedades a serem obtidas.

[00056] A invenção aqui descrita refere-se a novos oligonucleotídeos para amplificação, detecção, diferenciação e quantificação de subtipos de HTLV, e métodos e *kits* relacionados. Mais especificamente, a presente invenção provê oligonucleotídeos, incluindo iniciadores e sondas, que são adequados para a detecção e discriminação de HTLV-1 e HTLV-2.

Oligonucleotídeos e kits de diagnóstico

[00057] “Oligonucleotídeo” refere-se a qualquer polímero curto de nucleotídeos, em que os nucleotídeos podem ser ribonucleotídeos, deoxirribonucleotídeos, dideoxirribonucleotídeos, nucleotídeos degenerados, e similares. Ditos oligonucleotídeos são preferencialmente fita simples. O comprimento de ditos oligonucleotídeos pode variar, e é usualmente menor que 150 nucleotídeos (nt), preferencialmente na faixa de 10-100 nt, mais preferencialmente na 10-60 nt, ainda mais preferencialmente de 13-50 nt. Podem ainda apresentar modificações químicas, tais como uma etiqueta (“tag”) ou uma marcação, por exemplo, fluorescente, radioativa, biotinizada, DIG (digoxigenina), e similares. Os oligonucleotídeos da invenção podem ser tanto *forward* (senso) quanto reverso (antisense).

[00058] Em um aspecto, os oligonucleotídeos de acordo com a presente invenção incluem iniciadores e sondas. A não ser que seja informado do contrário, as sequências são apresentadas na direção de 5’ para 3’. Ditos oligonucleotídeos podem estar em várias formas, por exemplo, em solução/suspensão em um solvente adequado e em uma concentração desejada, secos ou liofilizados. O técnico no assunto tem conhecimento dos solventes, concentrações e condições de estocagem adequadas para os oligonucleotídeos da invenção. Em particular, o técnico no assunto tem conhecimento de como preparar ditos oligonucleotídeos como soluções de estoque. Os oligonucleotídeos de acordo com a invenção podem apresentar vários graus de pureza, que podem ser avaliados por um técnico no assunto, por exemplo, através de cromatografia por HPLC.

[00059] Além disto, deve ser aqui lembrado que, apesar das funções preferidas poderem ser mencionadas em relação a alguns oligonucleotídeos, é óbvio que um dado oligonucleotídeo pode assumir diversas funções, e pode ser utilizado em diferentes formas de acordo com a presente invenção. Como

é de conhecimento do técnico no assunto, em algumas situações, um iniciador pode ser usado como sonda e vice-versa, além de ser aplicável em procedimentos de hibridização, detecção etc. Assim, observa-se que os produtos de acordo com a presente invenção, especialmente, *inter alia*, os oligonucleotídeos, não estão limitados aos usos aqui mostrados, mas, ao contrário, os usos devem ser interpretados de forma ampla, independente do uso aqui indicado. Além disto, quando um oligonucleotídeo é descrito como sendo útil como sonda capaz de se ligar a um amplicon, o técnico no assunto também entende que a sequência complementar deste oligonucleotídeo é igualmente útil como uma sonda para se ligar ao mesmo amplicon. O mesmo ocorre com as sequências descritas como úteis como iniciadores. Adicionalmente, é também óbvio que qualquer iniciador adequado para um protocolo *multiplex* pode ser também, dentro do significado e escopo da presente invenção, ser utilizado em um protocolo *singleplex*. O mesmo se aplica a um iniciador adequado para um protocolo de PCR em tempo real, que pode ser usado em um protocolo de PCR convencional, dentro do significado da presente invenção.

[00060] Os termos “hibridizar” e “anelar” são usados de forma intercambiável e significam a interação de pareamento de bases de um ácido nucleico com outro ácido nucleico que resulta na formação de um *biplex*, *triplex*, ou outras estruturas mais complexas. Em algumas concretizações, a interação primária é específica, por exemplo, C/G e A/T, pela ligação por pontes de hidrogênio.

[00061] O técnico no assunto, a este respeito, entende que os oligonucleotídeos da presente invenção, isto é, os iniciadores e sondas, não precisam ser completamente complementares a uma parte da sequência do alvo. O iniciador pode apresentar complementaridade suficiente para hibridizar com a sequência alvo e desempenhar as funções intrínsecas de um iniciador. O mesmo se aplica a uma sonda, ou seja, uma sonda pode

apresentar complementaridade suficiente para hibridizar com a sequência alvo e desempenhar as funções intrínsecas de uma sonda. Portanto, um iniciador ou uma sonda, em uma concretização, não necessita ser completamente complementar à sequência alvo. Em uma concretização, o iniciador ou a sonda pode se hibridizar ou anelar com uma parte do alvo para formar uma fita dupla. As condições de hibridização de um ácido nucleico são descritas por Joseph Sambrook *et al.*, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001) e Haymes *et al.*, Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach, IRL Press, Washington, D.C. (1985). Assim, uma vez que não é necessário haver complementariedade completa para ocorrer anelamento, um técnico no assunto entenderá que as sequências de iniciadores e de sondas aqui descritas podem ser modificadas até certo grau sem a perda de suas utilidades como iniciadores e sondas específicas para HTLV-1 e HTVL-2.

[00062] Com relação à definição de “iniciador”, um técnico no assunto sabe que inclui qualquer oligonucleotídeo fita simples capaz de se anelar a um molde alvo complementar, em condições de estringência adequada, e que serve como ponto de início para a síntese de um produto de extensão (amplicon) a partir do iniciador, pela alongação da fita por uma DNA polimerase em condições adequadas. Estas condições incluem 4 tipos diferentes de deoxinucleosídeos trifosfatos e DNA polimerase ou transcriptase reversa em condições de temperatura adequadas e em uma solução tampão adequada. O comprimento do iniciador pode variar de acordo com diversos fatores, mas o comprimento típico de um iniciador é de 5-50 nt, preferencialmente 15-30 nt, mais preferencialmente 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 ou 30 nt. De acordo com a presente invenção, é preferível que cada iniciador tenha de 10-30 nt. Os iniciadores *forward* e reverso são iniciadores que se ligam, respectivamente, a uma extremidade 3' e a uma extremidade 5' de uma região específica do alvo que é amplificado

pela reação de PCR.

[00063] Os iniciadores providos pela presente invenção são desenhados baseados nas sequências consensos dos genomas do HTLV-1 e do HTLV-2, resultantes da análise de vários isolados de HTLV-1 e HTLV-2 (vide Figura 1, e SEQ ID Nos: 11 e 12). Mais especificamente, a região *pol* de HTLV-1 e de HTLV-2 foi o alvo. Preferencialmente, estes iniciadores são, mas não limitados particularmente a um iniciador compreendendo pelo menos 10 a 15 nucleotídeos consecutivos de qualquer uma das sequências descritas nas SEQ ID Nos: 1-2 e 4-6, e suas sequências complementares, capaz de amplificar uma região do gene *pol* de HTLV-1 e HTLV-2. O iniciador também pode consistir de qualquer uma das sequências de SEQ ID Nos: 1-2 e 4-6, e suas sequências complementares.

[00064] A definição de sonda também é conhecida por um técnico no assunto, e inclui qualquer oligonucleotídeo que seja capaz de hibridizar com uma sequência alvo complementar em condições de hibridização adequadas. Uma vez que a sonda é marcada, ela pode ser usada para detectar a presença de determinadas sequências nucleotídicas. As sondas podem ser preparadas na forma de fita simples de DNA, fita dupla de DNA, de RNA ou híbrido DNA-RNA. O comprimento típico de uma sonda é de 10-60 nt, preferencialmente 15-55 nt, mais preferencialmente 20-50 nt, mais preferencialmente 30-45 nt, ainda mais preferencialmente 10-30 nt. As sondas providas pela presente invenção também são desenhadas baseadas nas sequências consensos dos genomas do HTLV-1 e do HTLV-2, resultantes da análise de sequências de vários isolados de HTLV-1 e HTLV-2, mais especificamente se ligando à região *pol* de HTLV-1 e HTLV-2. Assim, de acordo com a presente invenção, a sonda pode incluir ou compreender pelo menos 8-15 nucleotídeos consecutivos de qualquer uma das sequências descritas nas SEQ ID Nos: 3 ou 7. A sonda também pode compreender ou consistir de qualquer uma das sequências de SEQ ID Nos: 3 ou 7, e suas sequências complementares.

[00065] Vários formatos de sondas podem ser utilizadas para realizar uma PCR em tempo real, como as sondas marcadas com fluorescência. Mais especificamente, as sondas podem ser do tipo FRET (*fluorescence resonance energy transfer*) que incluem, mas não estão limitadas a sondas do tipo TaqMan™, Molecular Beacon™, Scorpion™, e LUX™. Em uma forma de concretização preferida, as sondas de acordo com a invenção são do tipo TaqMan™.

[00066] Mais especificamente, com relação à sonda TaqMan™, um oligonucleotídeo, cuja região 5' terminal é modificada com um fluoróforo e a região 3' terminal é modificada com um *quencher*, é adicionada à reação de PCR. Também se entende que é possível ligar o fluoróforo na região 3' terminal e o *quencher* na região 5' terminal. Os produtos de reação são detectados pela fluorescência gerada após a atividade exonuclease 5' → 3' da DNA polimerase. Os fluoróforos, que se referem a compostos fluorescentes que emitem luz com a excitação por luz tendo um comprimento de onda mais curto que a luz que é emitida, podem ser, mas não estão limitados a, FAM, TAMRA, VIC, JOE, TET, HEX, ROX, RED610, RED670, NED, Cy3, Cy5, e Texas Red. Os *quenchers* podem ser, mas não estão limitados ao, 6-TAMRA, BHQ-1,2,3 e MGB-NFQ. A escolha do par fluoróforo-*quencher* pode ser feita de forma que o espectro de excitação do *quencher* tenha uma sobreposição com o espectro de emissão do fluoróforo. Um exemplo é o par FAM-TAMRA, FAM-MGB, VIC-MGB e assim por diante. Um técnico no assunto saberá reconhecer outros pares apropriados.

[00067] Em uma forma de concretização preferencial de acordo com a invenção, as propriedades de espectro de ditas sondas são escolhidas de forma que uma sonda não interfira com a outra. Em particular, quando as sondas são usadas em reações *multiplex*, cada sonda terá o seu próprio fluoróforo sendo espectral e significativamente diferente de outra sonda, isto é, os espectros de absorção/emissão das diferentes sondas são essencialmente não-sobrepostos.

Isto permite, de forma vantajosa, a detecção de cada sonda individualmente, já que os sinais individuais não interferem uns com os outros durante a detecção.

[00068] A fluorescência emitida durante a reação de amplificação do ácido nucleico alvo é medida com o objetivo de monitorar o acúmulo de produtos de amplificação específicos. O sinal de fluorescência é proporcional à quantidade do amplicon específico produzido. Na presença das sequências alvos de HTLV-1 e/ou HTLV-2, a fluorescência irá aumentar. Na ausência das sequências alvos, a fluorescência manter-se-á consistentemente baixa ao longo da reação. Um aumento na fluorescência ou um nível inalterado de fluorescência indicam a presença ou ausência dos alvos de HTLV-1 e/ou HTLV-2, respectivamente.

[00069] Além disto, para prover um padrão para determinar a extração do ácido nucleico de uma amostra biológica compreendendo a sequência alvo de HTLV ou para determinar a presença ou ausência de potenciais inibidores de reação, podem-se utilizar iniciadores capazes de amplificar, e sondas capazes de detectar, amplicons resultantes da amplificação de sequências humanas. Exemplo não-limitante é um iniciador compreendendo ou consistindo da sequência de SEQ ID Nos: 8 e 9 e uma sonda compreendendo ou consistindo da SEQ ID NO: 10, que têm como alvo o gene da beta-globina humana. Cabe aqui salientar que um técnico no assunto pode determinar outros iniciadores e sondas adequados direcionados a outras sequências úteis para este fim.

[00070] Ainda, para prover um meio de servir como controle positivo e/ou para facilitar a quantificação de uma carga viral em uma dada amostra biológica a ser analisada, um controle positivo pode ser incorporado. Na presente invenção, pode-se utilizar uma amostra de ácido nucleico contendo cópias do alvo de HTLV-1 e/ou de HTLV-2, por exemplo, um cassete ou vetor compreendendo a sequência alvo a ser amplificada, ou uma determinada quantidade de amostra de ácido nucleico proveniente de uma linhagem celular

humana contendo um número conhecido de inserções de sequências virais. Exemplos não limitantes incluem, por exemplo, as linhagens celulares MT-2 e Gu.

[00071] Da mesma forma, pode-se incorporar um controle negativo de reação. Este controle pode ser uma amostra de ácido nucleico que não contém nenhuma cópia do alvo de HTLV-1 e nem de HTLV-2, por exemplo, DNA de linhagem celular humana que não apresente inserções de sequências virais de HTLV-1 e nem de HTLV-2.

[00072] Um outro aspecto da invenção é um *kit* usado para diagnosticar, diferenciar e quantificar infecções causadas por subtipos de HTLV, preferencialmente HTLV-1 e HTLV-2, de forma simultânea, compreendendo pelo menos um conjunto de oligonucleotídeos. Por “conjunto de oligonucleotídeos” entende-se qualquer combinação compreendendo pelo menos um oligonucleotídeo, preferencialmente pelo menos dois, por exemplo, de 2 a 20 oligonucleotídeos. Dito conjunto pode, por exemplo, compreender pelo menos um iniciador e pelo menos uma sonda, ou pelo menos um par de iniciadores e pelo menos uma sonda, e assim por diante. Ditos oligonucleotídeos podem ser mantidos separados, ou parcialmente misturados, ou totalmente misturados.

[00073] Preferencialmente, dito *kit* compreende pelo menos um conjunto de oligonucleotídeos de acordo com a invenção, desenhados especificamente para HTLV-1 e HTLV-2. Ditos oligonucleotídeos podem ser mantidos tanto separadamente, ou parcialmente misturados, ou totalmente misturados. Os oligonucleotídeos podem ser providos na forma seca, ou solubilizados em um solvente adequado, de acordo com o conhecimento da arte. Por exemplo, solventes adequados incluem TE, água ultrapura, e similares.

[00074] Em uma forma de concretização, o *kit* de acordo com a invenção pode também conter reagentes adicionais adequados para a reação de amplificação, incluindo água, água livre de nuclease, água livre de RNase,

água livre de DNase, água ultrapura, sais (tais como sais de magnésio, potássio), tampões (como os tampões convencionais de PCR, conhecidos na arte), enzimas, incluindo polimerases termoestáveis, como Taq, Vent, Pwo, Pfu, transcriptase reversa, e similares, nucleotídeos como deoxinucleotídeos, dideoxinucleotídeos, dNTPs, dATP, dTTP, dCTP, dGTP, dUTP, outros reagentes, como aditivos, inibidores de RNase ou DNase, e polinucleotídeos tais como poliT, polidT, e outros oligonucleotídeos, como iniciadores e sondas para outros patógenos, por exemplo, HIV, HBV, HCV e para controles internos, como beta-globina humana. Os reagentes podem ser providos em uma forma concentrada para diluição para uma concentração apropriada pelo usuário final. Ainda, pelo menos parte dos reagentes pode ser provida na forma de pré-mix.

[00075] Ditos reagentes podem estar acomodados em recipientes, que para os fins da presente invenção incluem, mas não se limitam a, microtubos, tubos, placas de PCR com diferentes quantidades de poços, chips, ou qualquer outro meio adequado e inerte onde a reação de amplificação possa ocorrer, e que não reaja com os fluidos e soluções da presente invenção. Além disto, o recipiente pode ser ainda rotulado e identificado, por exemplo, com cores, para evitar a confusão e prover facilidade de uso para um técnico no laboratório.

[00076] Ainda, em uma forma de concretização, o *kit* de acordo com a invenção contém instruções para o uso do mesmo. Ditas instruções podem ser estar em um folheto, cartão, ou similares. Ditas instruções podem estar sob duas formas: uma detalhada, trazendo informações exaustivas com relação ao *kit* e ao uso do mesmo, possivelmente também incluindo dados de literatura; e outra simples, na forma de uma guia rápido, trazendo informações essenciais necessárias para o uso do *kit*.

[00077] Em uma forma preferida, dito *kit* é um *kit* de diagnóstico, especialmente um *kit* de diagnóstico *in vitro*, por exemplo, um *kit* de

diagnóstico de HTLV. Mais preferencialmente, o dito *kit* é um *kit* para diagnóstico e diferenciação de HTLV-1 e HTLV-2.

[00078] Em uma outra forma de concretização da presente invenção, o *kit* diagnóstico pode ainda incluir um *kit* para extração e isolamento de ácidos nucleicos a partir de uma amostra biológica. Dito *kit* para extração pode compreender um tampão de lise, um tampão de lavagem e um tampão de eluição. O *kit* de extração pode ainda ser provido com recipientes vazios e colunas de adsorção para extração e isolamento de ácidos nucleicos.

Extração do ácido nucleico a partir de amostras biológicas

[00079] Polinucleotídeos de HTLV, mais preferencialmente, de HTLV-1 e HTLV-2, são os alvos ou a fonte do alvo para a reação de amplificação da presente invenção. A expressão “sequência alvo”, ou simplesmente “alvo”, se refere a uma sequência de ácido nucleico que serve como um molde para a amplificação em uma reação de PCR. Estas sequências de ácido nucleico podem conter deoxirribonucleotídeos, ribonucleotídeos, e/ou seus análogos. A sequência pode ser um gene ou fragmento de gene, mRNA, cDNA, DNA total isolado, RNA total isolado, e similares. Exemplos de sequências alvos incluem, mas não estão limitados a, DNA do provírus integrado de HTLV, cDNA de HTLV presente em uma célula antes da integração viral no genoma do hospedeiro, RNA viral extraído de partículas virais ou a partir de células hospedeiras durante a replicação viral, transcritos de RNA primários de HTLV, mRNA processado por splicing, etc.

[00080] Mais especificamente, as sequências alvos da presente invenção estão localizadas no gene *pol* das sequências genômicas de HTLV-1 e HTLV-2. A sequência alvo de HTLV-1 está localizada entre as bases 3340 e 3414 da sequência consenso do genoma de HTLV-1 conforme apresentada na SEQ ID NO: 11. A sequência alvo de HTLV-2 está localizada entre as bases 4483 e 4563 da sequência consenso do genoma de HTLV-2 conforme apresentada na

SEQ ID NO: 12. Estas sequências são, para fins desta invenção, sequências moldes de referência, isto é, os iniciadores adequados de acordo com a presente invenção são capazes de amplificar pelo menos estas sequências referências. Da mesma forma, as sondas adequadas de acordo com a presente invenção são capazes igualmente de hibridizar com pelo menos estas sequências referências.

[00081] Além disto, é possível utilizar uma sequência alvo humana como padrão ou controle da extração do ácido nucleico de uma amostra biológica. Exemplo não-limitante de alvo controle é o gene da beta-globina humana. O técnico no assunto certamente saberá determinar outros alvos controles adequados, que podem consistir de outros genes humanos.

[00082] Em uma concretização, a sequência alvo está presente em uma amostra de material biológico coletada a partir de um indivíduo. Por “amostra”, portanto, entende-se qualquer substância ou material biológico que possa conter um HTLV, uma célula infectada pelo HTLV, ou uma sequência alvo de HTLV, e inclui, mas não está limitada a, sangue, plasma, soro, células sanguíneas, fluido seminal, secreções vaginais, leite materno, saliva, e similares. Mais preferencialmente, a amostra compreende ou consiste de células sanguíneas humanas e/ou sangue total.

[00083] Os procedimentos para a extração e purificação de ácidos nucleicos são bem conhecidos na técnica. Exemplos de métodos para extrair ácidos nucleicos a partir de sangue total são ensinados, por exemplo, em Casareale *et al.* (Genome Res., 2: 149-153, 1992) e na Patente U.S. nº 5,334,499.

[00084] Além disto, vários *kits* comerciais estão disponíveis para o isolamento de ácidos nucleicos a partir de sangue total. Exemplos de *kits* incluem, mas não estão limitados a, QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen); Spin Plus ReliaPrep™ Blood gDNA Miniprep System (Promega) e BIOPUR Kit Extração Mini Spin Plus (Biopur).

Amplificação de sequências alvos por PCR e métodos de diagnóstico

[00085] Uma vez que os iniciadores estão preparados, a amplificação de ácido nucleico alvo pode ser realizada por uma variedade de métodos, incluindo, mas não se limitando a, PCR convencional, PCR em tempo real, RT-PCR, *nested*-PCR, PCR semi-quantitativo e outros. De forma preferencial, o método utilizado é PCR em tempo real.

[00086] "Amplificação" refere-se aos procedimentos de amplificação de ácidos nucleicos utilizando iniciadores e polimerases que geram múltiplas cópias de um ácido nucleico alvo. Tais reações de amplificação são conhecidas pelo técnico no assunto como "PCR" (reação de polimerase em cadeia), que por sua vez, inclui, para fins desta invenção, qualquer método baseado em PCR, incluindo PCR convencional, qualitativo, semi-quantitativo, em tempo real, reação de transcrição reversa (RT-PCR), PCR *singleplex*, *multiplex*, e similares.

[00087] Um "amplicon" ou "produto de PCR", os termos sendo usados de forma intercambiável, referem-se ao um ácido nucleico (ou coletivamente, a pluralidade de moléculas de ácido nucleico) que foi sintetizado durante os procedimentos de amplificação. Um amplicon é tipicamente, mas não exclusivamente, um fragmento de DNA.

[00088] Por "PCR em tempo real" compreende-se qualquer método baseado em PCR que permita monitorar a fluorescência emitida durante a reação, como um indicador da produção do produto de PCR ou amplicon durante cada ciclo de PCR, ao contrário da detecção ao final da realização de todos os ciclos nos métodos de PCR convencionais.

[00089] Por "PCR quantitativo" (qPCR), entende-se qualquer método baseado em PCR que permita a estimativa da quantidade inicial de uma determinada sequência alvo em uma dada amostra.

[00090] Como usado aqui, "PCR *multiplex*" refere-se a qualquer reação

de PCR que tenha por objetivo a amplificação de mais de um alvo. Por exemplo, a PCR *multiplex* inclui PCR *biplex* (dois alvos), PCR *tríplice* (três alvos), e assim por diante. PCR *multiplex* inclui reações de PCR com mais do que um par de iniciadores, por exemplo, dois pares de iniciadores. Neste caso, poderá haver quatro iniciadores diferentes, mas também é possível que haja um iniciador em comum, por exemplo, o iniciador *forward*, e dois iniciadores reversos distintos. PCR *multiplex* também inclui reações de PCR com um único par de iniciadores, mas com mais de uma sonda. Ainda, como exemplos não limitantes, a amplificação *multiplex* inclui reações de amplificação de diferentes genes, diferentes alelos de um único gene e/ou diferentes fragmentos de um único gene.

[00091] Um “tampão” é uma composição adicionada à reação de amplificação, compreendendo um agente tamponante, que modifica a estabilidade, atividade e/ou longevidade de um ou mais componentes da reação de amplificação, através da regulagem do pH da reação de amplificação. Os agentes tamponantes da invenção são compatíveis com a atividade da polimerase a ser utilizada, qual seja, uma DNA polimerase. Agentes tamponantes são bem conhecidos na arte e incluem, mas não estão limitados a Tris, Tricina, MOPS (ácido 3-(N-morfolino)propano-sulfônico), e HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-etanosulfônico).

[00092] Além disto, os tampões de PCR podem geralmente conter até cerca de 70 mM KCl e cerca de 1,5 mM ou mais de MgCl₂, a cerca de 50-500 μM de cada um dos nucleotídeos dATP, dCTP, dGTP e dTTP.

[00093] Os tampões da invenção podem ainda conter aditivos. Um aditivo é um composto adicionado a uma composição que modifica a estabilidade, a atividade e/ou a longevidade de um ou mais componentes da composição. Em algumas concretizações, a composição é uma composição de amplificação. Em algumas concretizações, um aditivo inativa enzimas contaminantes, estabiliza o dobramento de proteínas e/ou diminui a

agregação. De acordo com a invenção, aditivos podem ser adicionados para melhorar a seletividade do anelamento de um iniciador e/ou de uma sonda, desde que o aditivo não interfira com a atividade da DNA polimerase.

[00094] Exemplos de aditivos são, mas não estão limitados a, betaína, glicerol, formamida, KCl, CaCl₂, MgOAc, MgCl₂, NaCl, NH₄OAc, NaI, Na(CO₃)₂, LiCl, MnOAc, NMP, trealose, DMSO, etileno glicol, ditioneitol (“DTT”), pirofosfatase (incluindo, mas não limitado a pirofosfatase inorgânica de *Thermoplasma acidophilum* (“TAP”)), albumina de soro bovino (“BSA”), propileno glicol, glicinamida, CHES, Percoll™, ácido aurintricarboxílico, Tween 20, Tween 21, Tween 40, Tween 60, Tween 85, Brij 30, NP-40, Triton X-100, CHAPS, CHAPSO, Mackernium, LDAO (N-dodecil-N,N-dimetilamino-N-óxido), Zwittergente 3-10, Xwittergente 3-14, Xwittergente SB 3-16, Empigen, NDSB-20, T4G32, SSB de *E. coli*, RecA, 7-deazaG, dUTP, UNG, detergentes aniônicos, detergentes catiônicos, detergentes não-iônicos, zwittergente, esteróis, cátions, e quaisquer outros químicos, proteínas, ou cofatores que podem alterar a eficiência da amplificação.

[00095] Como aqui usado, o termo “termoestável”, quando aplicado à enzima, refere-se a uma enzima que retém sua atividade biológica em temperaturas elevadas (por exemplo, a 55°C ou mais), ou retém sua atividade biológica após ciclos repetidos de aquecimento e resfriamento. Polimerases de nucleotídeos termoestáveis são particularmente preferidos para a presente invenção, uma vez que eliminam a necessidade de adicionar enzima antes de cada ciclo de PCR.

[00096] A “atividade de polimerase” refere-se a uma atividade enzimática que catalisa a polimerização de deoxirribonucleotídeos. Geralmente, a enzima irá iniciar a síntese na extremidade 3’ do iniciador anelado à sequência alvo, e irá prosseguir em direção à extremidade 5’ da fita molde. Em determinadas concretizações, essa enzima é uma DNA polimerase

termoestável.

[00097] Exemplos não limitantes de DNA polimerases termoestáveis incluem, mas não se limitam a, polimerases isoladas de *Thermus aquaticus* (Taq polimerase), *Thermus thermophilus* (Tth polimerase), *Thermococcus litoralis* (Tli ou VENT™ polimerase), *Pyrococcus furiosus* (Pfu ou DEEPVENT™ polimerase), *Pyrococcus woosii* (Pwo polimerase) e outras espécies de *Pyrococcus*, *Bacillus stearothermophilus* (Bst polimerase), *Sulfolobus acidocaldarius* (Sac polimerase), *Thermoplasma acidophilum* (Tac polimerase), *Thermus ruber* (Tru polimerase), *Thermus brockianus* (DYNAZYME™ polimerase) (Tne polimerase), *Thermotoga maritime* (Tma) e outras espécies de *Thermotoga* genus (Tsp polimerase), e *Methanobacterium thermoautotrophicum* (Mth polimerase).

[00098] A reação de PCR pode conter mais do que uma enzima polimerase termoestável com propriedades complementares, resultando em amplificação mais eficiente das sequências alvos. Por exemplo, uma polimerase com alta habilidade de amplificar segmentos grandes de nucleotídeos pode ser complementada com outra polimerase com capacidade de corrigir erros ocorridos durante a elongação da sequência de ácido nucleico alvo, assim criando uma reação de PCR que pode amplificar uma sequência alvo longa com alta fidelidade. A polimerase termoestável pode ser usada em sua forma selvagem, ou, alternativamente, a polimerase pode ser modificada para conter um fragmento de uma enzima ou para conter uma mutação que forneça propriedades benéficas para facilitar a reação de PCR. Em uma concretização, a polimerase pode ser a Taq polimerase. Muitas variantes da Taq polimerase com propriedades melhoradas são conhecidas e incluem, mas não são limitadas a AmpliTaq™, fragmento Stoffel, SuperTaq™, SuperTaq™ plus, LA Taq™, LApro Taq™, e EX Taq™.

[00099] Como já mencionado mais acima, a expressão “condições de hibridização” refere-se às condições que permitem que o iniciador ou sonda

se anelem à sequência nucleotídica de interesse. Estas condições são dependentes da temperatura e da força iônica da solução na qual a hibridização ocorre. Estas são as condições de estringência. Como é compreendido por um técnico no assunto, a estringência de anelamento pode ser alterada de forma a identificar ou detectar sequências de polinucleotídeo idênticas ou relacionadas. Como será apreciado por um técnico no assunto, a temperatura de *melting*, T_m , pode ser calculada por fórmulas conhecidas na arte, dependendo de diversos parâmetros, como o comprimento do iniciador ou sonda em número de nucleotídeos, ou ingredientes presentes no tampão e condições. Para tanto, ver, por exemplo, T. Maniatis *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1982 e J. Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989).

[000100] De forma ilustrativa, para a determinação de condições de hibridização, basicamente as seguintes fórmulas são usadas: para o cálculo básico de T_m para sequências mais longas que 13 nt, a seguinte fórmula pode ser usada:

$$T_m = 64.9 + 41 * (yG + zC - 16.4) / (wA + xT + yG + zC)$$

[000101] em que “w”, “x”, “y” e “z” são os números de bases A, T, G e C na sequência, respectivamente (Marmur e Doty. J Mol Biol 5:109-118, 1962). Esta equação assume que o anelamento ocorre sob condições padrões de 50 nM iniciador, 50 mM Na⁺, e pH 7,0.

[000102] Para o cálculo básico de T_m ajustado por sal, a seguinte equação pode ser usada:

$$T_m = 100.5 + (41 * (yG + zC) / (wA + xT + yG + zC)) - (820 / (wA + xT + yG + zC)) + 16.6 * \log_{10}([Na^+])$$

[000103] em que “w”, “x”, “y” e “z” são os números de bases A, T, G e C na sequência, respectivamente.

[000104] O termo $16.6 * \log_{10}([Na^+])$ ajusta a T_m para mudanças na

concentração de sal (vide para informações adicionais, por exemplo, Howley et al., J. Biol. Chem. 254, 4876-4883, 1979).

[000105] As faixas de temperatura de anelamento podem variar de cerca de 50°C e 62°C, mas os iniciadores podem ser desenhados para serem ótimos em cerca de 58°C a 60°C. Uma consideração adicional ao desenhar os iniciadores é o conteúdo de guanina e de citosina. Geralmente, o conteúdo de GC para um iniciador pode ser de cerca de 30-70%, mas pode ser menor e pode ser ajustado de forma apropriada por um técnico no assunto. O anelamento de oligonucleotídeos complementares ou parcialmente complementares a um determinado alvo pode ser obtido pela modificação das condições de anelamento visando o aumento ou diminuição da estringência, por exemplo, ajustando a temperatura ou a concentração de sal no tampão. Tais modificações para manter a especificidade ao HTLV-1 e HTLV-2 podem ser realizadas de forma rotineira por um técnico no assunto.

[000106] Para a amplificação, um par de iniciadores de um tipo específico pode ser usado sozinho (por exemplo, um iniciador *forward* e um iniciador reverso de HTLV-1; um iniciador *forward* e um iniciador reverso de HTLV-2; ou um iniciador *forward* e um ou dois iniciadores reversos de HTLV-2, e assim por diante). A amplificação *multiplex* pode ser usada para amplificar regiões de HTLV-1 e HTLV-2 de forma concomitante. As concentrações finais dos iniciadores podem ser ajustadas de forma apropriada, variando de cerca de 50 nM a cerca de 2000 nM, preferencialmente de cerca de 100 nM a cerca de 1000 nM, mais preferencialmente de cerca de 200 nM a cerca de 600 nM, mais preferencialmente de cerca de 250 nM a cerca de 500 nM, de cada um dos iniciadores representados por SEQ ID Nos: 1-2, 4-6 e 8-9.

[000107] As concentrações finais das sondas também podem ser ajustadas de forma apropriada por um técnico no assunto, variando de cerca de 50 nM a 1000 nM. Mais preferencialmente, a concentração final varia de cerca de 100 a cerca de 300 nM, mais preferencialmente, de 150 a 250 nM de cada uma das

sondas representadas por SEQ ID Nos: 3, 7 e 10.

[000108] Em um outro aspecto da invenção, é provido um método para detectar a presença de HTLV a partir de ácidos nucleicos extraídos de uma amostra biológica, compreendendo a etapa de misturar em um recipiente adequado os dNTPs, a DNA polimerase, tampão, pelo menos um iniciador e pelo menos uma sonda conforme descritos no presente pedido, o ácido nucleico extraído da amostra biológica, e submeter o recipiente contendo a mistura a incubação em um termociclador.

[000109] Em um outro aspecto, a invenção provê um método para detectar a presença de HTLV, compreendendo realizar uma reação de polimerase em cadeia usando pelo menos um ou um conjunto de iniciadores selecionados do grupo de iniciadores *forward* de SEQ ID Nos: 1 e 4, e pelo menos um ou um conjunto de iniciadores selecionados do grupo de iniciadores reversos de SEQ ID Nos: 2, 5 e 6.

[000110] O técnico no assunto tem conhecimento das condições de reação de PCR, em particular, as condições de ciclagem termal, por exemplo, temperaturas, duração, número de ciclos, taxa de aquecimento/resfriamento, etc. Em uma concretização preferida, as condições de reação de PCR incluem condições adequadas para uma PCR *multiplex*. Em uma outra concretização preferida, ditas condições incluem aquelas adequadas para uma PCR *multiplex* quantitativa em tempo real. Em outra concretização, dito método compreende a etapa de colocar a amostra na presença de sonda(s) em condições adequadas ao anelamento de dita(s) sonda(s) ao amplicon. Em outra concretização preferida, o método compreende a etapa de detectar pelo menos um amplicon em tempo real, permitindo a avaliação da presença ou ausência de HTLV-1 e/ou HTLV-2 na amostra. Isto é atingido de forma vantajosa pelas medições de intensidade de fluorescência.

[000111] Os procedimentos de medição de fluorescência são conhecidos na arte. Resumidamente, a amostra é iluminada em cerca da onda de excitação

do fluoróforo, e a intensidade de emissão é medida. Em outra concretização, dito método compreende a etapa de medir pelo menos uma vez, e mais preferivelmente em tempo real, a quantidade de sonda que se anela ao amplicon. Em outra concretização preferida, dito método compreende a etapa de estimar pelo menos uma vez o número de cópias do alvo inicialmente presente na amostra. O técnico no assunto sabe como realizar dita etapa. Por exemplo, isto pode ser realizada usando padrões de calibração e/ou controles internos. Preferivelmente, esta etapa inclui a determinação do chamado *cycle threshold* (CT) para cada amostra, que correlaciona com o número de cópias do alvo molde inicialmente presente em cada amostra.

[000112] Em uma concretização preferida, pelo menos uma etapa, preferencialmente várias etapas, mais preferencialmente a maioria das etapas, é realizada em uma placa de PCR, incluindo aquelas com 24 poços, 48 poços, 96 poços e 384 poços. O uso de placas garante, de forma vantajosa, que as amostras possam ser processadas em paralelo durante a reação. Além disto, permite que o método seja realizado em larga escala, o que economiza tempo.

[000113] Em outra forma preferida, pelo menos uma etapa, preferivelmente várias etapas, mais preferivelmente a maioria das etapas é realizada em um termociclador. Dito termociclador pode ser equipado com um espectrofluorofotômetro, por exemplo, Mx3000p (Stratagene), Chromo 4 (BioRad), RocheLightcycler 480, ABI 7900, 7500 e 7300r Real-time PCR Systems (Applied Biosystems).

[000114] Os iniciadores da presente invenção para a detecção e diferenciação de HTLV-1 e HTLV-2 estão identificados na Tabela 1 como SEQ ID Nos: 1-2 e 4-6, respectivamente. Estes iniciadores foram desenhados de forma a anelarem em uma região localizada no gene *pol* de HTLV-1 e HTLV-2 (vide figura 2).

[000115] A presente invenção é ilustrada pelos exemplos abaixo, que têm o intuito somente de exemplificar uma das inúmeras maneiras de se realizar a

invenção, contudo, sem limitar o escopo da mesma. As várias modificações ou sugestões à luz dos mesmos que podem ser sugeridas por um técnico no assunto estão incluídas no espírito e no escopo das reivindicações. Em particular, apesar de serem adequados para a detecção via protocolos *multiplex* e/ou em tempo real, os métodos, oligonucleotídeos, conjuntos de oligonucleotídeos e *kits* da presente invenção são, obviamente, também adequados para protocolos *singleplex*, *duplex*, *tríplice* e similares, qualitativo, quantitativo, PCR convencional e combinações dos mesmos.

EXEMPLOS

Exemplo 1: Análise *in silico* para definição da região alvo – Desenho dos iniciadores e sondas

[000116] Para definição da região gênica viral foram realizados alinhamentos múltiplos com as sequências do genoma total do HTLV-1 e HTLV-2 disponíveis em um banco de dados público com auxílio do software BioEdit (versão 7.0.5.3), e Mega (versão 5-1993/2011), os quais utilizam o algoritmo Clustal W. Os números de acesso das sequências utilizadas estão descritos na Figura 1.

[000117] Todos os genomas completos depositados no *GenBank* até a data do depósito foram utilizados para o alinhamento.

[000118] Os iniciadores e sondas foram confeccionados com base nas recomendações descritas a seguir. Para os iniciadores, a temperatura de *melting* (T_m) foi entre 58 e 60°C, além de ser aproximadamente 10°C abaixo da T_m das sondas, a fim de garantir que a sonda se ligue ao molde antes dos iniciadores. As últimas bases da extremidade 3' foram compostas com o menor número possível de bases citosina (C) e/ou guanina(G), o que reduz a formação de produtos não específicos. O conteúdo de G/C ficou ente 61 e 71%, dentro da faixa recomendada (30 a 80%). As sondas foram desenhadas o

mais próximo possível da região de ligação dos iniciadores *forward* ou reverso para melhorar a eficiência das reações. A T_m foi definida entre 68°C e 70°C e o conteúdo de G/C ficou entre 47 e 69%. Com a finalidade de evitar o efeito *quencher*, sondas que continham G na extremidade 5' foram descartadas. O sistema *minor groove binder* (MGB) foi utilizado para desenho das sondas. Este sistema permite o aumento da T_m da sonda sem aumentar o tamanho da mesma, o que permitiu a obtenção de sondas mais curtas (13 a 20 bases).

[000119] Um total de quatro conjuntos de iniciadores desenhados para a metodologia de SYBR™ Green dirigidos para as regiões *tax* e *env*, e seis conjuntos de iniciadores e sondas confeccionados para metodologia TaqMan™ com alvo nas regiões *tax*, *gag*, *pol*, e *env* foram avaliados. Esses ensaios foram padronizados, no entanto, apresentaram resultados insatisfatórios no processo de validação (dados não mostrados).

[000120] Os iniciadores e sondas TaqMan™ dirigidos para a região viral *pol* mostraram-se adequados. As sequências nucleotídicas dos iniciadores e sondas aqui usados são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1. Iniciadores e sondas para a detecção do HTLV-1 e HTLV-2.

SEQ ID	Iniciador/sonda	Sequência (5' - 3')	T_m °C
1	HTLV-1 For_ <i>pol</i>	CAGCCCCTTCACAGTCTCTACTG	59
2	HTLV-1 Rev_ <i>pol</i>	AGAAGGATTTAAATATATTTGGTCTCGG	58,5
3	Sonda HTLV-1	CCTTACAAAGGCATACTGAT	69
4	HTLV-2 For_ <i>pol</i>	CAAGGTGATGTAACCCATTATAAGTACAA	58,8
5	HTLV-2 Rev_ <i>pol</i>	AACCGCACCGGAGAAGGT	59,1
6	HTLV-2 Rev'_ <i>pol</i>	AGAAACCAGCTGTGAGACTATCAGC	59,1
7	Sonda HTLV-2	AAATACAAATACTGCCTCCACGT	68

[000121] Na Tabela 1, a sonda de SEQ ID NO: 3 foi marcada com FAM na extremidade 5' e MGB na extremidade 3', e a sonda de SEQ ID NO: 7 foi marcada com VIC na extremidade 5' e MGB na extremidade 3'. O amplicon

gerado para HTLV-1 tem 75 pares de bases e para HTLV-2, 81 pares de bases.

Exemplo 2: Cultivo e expansão das linhagens celulares MT-2 e Gu (controles positivos)

[000122] A linhagem celular MT-2 consiste em linfoblastos isolados a partir de um indivíduo portador de ATLL (número de catálogo 93121518/ECACC). Esta linhagem contém o HTLV-1 integrado ao seu genoma, apresentando 2,1 cópias virais por células (Albrecht *et al.*, J Virol Methods, v. 75, n. 2, p. 123-40, 1998). A linhagem Gu, originada a partir da infecção *in vitro* da linhagem celular BJAB, contém 8,3 cópias do HTLV-2 integrado ao seu genoma (Moens *et al.*, J Clin Microbiol, v. 47, n. 11, p. 3682-91, 2009). Esta linhagem foi cedida gentilmente pelo *Rega Institute for Medical Research - Katholieke Universiteit*, Leuven, Bélgica. As linhagens celulares MT-2 e Gu foram cultivadas em garrafas de 15 cm² (Greiner Bio One) com 15 mL de meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640 (Sigma-Aldrich) suplementado com soro fetal bovino inativado a 10 % (Hyclone); 100 U/mL de penicilina e 100 U/mL de estreptomicina (Invitrogen). As culturas foram mantidas em incubadoras Steri-cult 200 Thermoform (Forma Scientific) à temperatura de 37°C, 5% CO₂ e 85% de umidade relativa do ar. Após a expansão, as células foram coletadas em tubos de polipropileno de 15 mL, lavadas com tampão PBS (1X) por centrifugação a 200 x g durante 10 minutos, ressuspensas em PBS (1X) e contadas em câmara de Neubauer.

Exemplo 3: Extração de DNA a partir das linhagens celulares e produção de controles positivos

[000123] Para a extração de DNA, foram utilizadas aproximadamente 2 x 10⁷ células ressuspensas em 1 mL de PBS (1X). As células foram transferidas

para um tubo de polipropileno de 1,5 mL e submetidas à centrifugação durante 5 minutos a 300 x g. Após centrifugação, retirou-se o sobrenadante, permanecendo 200 µL no tubo, que em seguida foi transferido para um tubo de polipropileno de 15 mL.

[000124] A extração do DNA foi realizada utilizando-se o *kit Genra Puregene cell* (Genra Systems), seguindo as instruções do fabricante. Adicionou-se 3 mL de solução de lise de células e, homogeneizou-se em vortex por 10 segundos. Foram adicionados 15 µL de RNase, homogeneizando-se por inversão cerca de 25 vezes. Essa mistura foi incubada a 37°C durante 5 minutos e rapidamente resfriada em gelo durante 3 minutos. Em seguida, 1 mL de solução precipitante de proteínas foi adicionado seguida de agitação vigorosa em vortex durante 20 segundos e posterior centrifugação a 2000 x g durante 10 minutos. Após centrifugação, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo de polipropileno de 15 mL, ao qual foram adicionados 3 mL de isopropanol e homogeneizado por inversão cerca de 50 vezes para a precipitação do DNA. As amostras foram centrifugadas durante 3 minutos a 2000 x g e os sobrenadantes foram descartados. Para a lavagem do pellet de DNA, foi acrescentado 3 mL de etanol a 70% e o sistema foi homogeneizado várias vezes para uma eficiente lavagem. O DNA foi coletado e transferido para tubo de 1,5 mL estéril. Após a evaporação do etanol, o DNA foi ressuspensão em 300 µL de água deionizada e incubado a 65°C por 1 hora para completa eluição do DNA. Após a extração, o DNA foi quantificado por meio de espectrofotometria (UV) em comprimento de onda de 260 nm e 280 nm no equipamento Nanodrop 2000c spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific).

[000125] Os controles positivos foram preparados a partir do DNA extraído das linhagens celular MT-2 e Gu, de acordo com o descrito acima.

[000126] Para tanto, quatro alíquotas contendo 200 µL de DNA da linhagem celular MT-2 foram transferidas para um tubo de polipropileno,

livre de DNase, RNase e pirógenos, para obtenção de uma alíquota única. A concentração de DNA foi ajustada para aproximadamente 500 ng/ μ L. Devido à heterogeneidade e viscosidade elevada da amostra, a mesma foi transferida para uma coluna composta por uma membrana de sílica e submetida à centrifugação a 16.900 x g durante 3 minutos. Após a centrifugação, a amostra foi quantificada por meio de espectrofotometria (UV) em comprimento de onda de 260 nm e 280 nm no equipamento Nanodrop 2000c *spectrophotometer* (Thermo Fisher Scientific). Os mesmos procedimentos foram adotados para a linhagem celular Gu. As alíquotas, únicas, obtidas a partir das linhagens MT-2 e Gu foram misturadas para a composição de um *pool* de controles positivos (MT-2+Gu). A partir deste *pool* foram preparadas 192 alíquotas de 15 μ L e 192 alíquotas de 50 μ L do controle positivo contendo 10^3 cópias virais a cada 5 μ L, e 60 alíquotas de 50 μ L do controle positivo contendo 10^5 cópias virais a cada 5 μ L. As alíquotas foram armazenadas a -20°C até o momento do uso.

Exemplo 4: Produção de controles negativos

[000127] Para o controle negativo das reações de qPCR, cinco amostras de sangue total obtidas a partir de candidatos à doação de sangue foram misturadas (*pool*) e homogeneizadas durante 5 minutos em homogeneizador circular de sangue durante 5 minutos. Essas amostras não apresentaram reatividade sorológica ao teste imunoenzimático (EIA) para HTLV-1/2.

[000128] Após homogeneização, foram feitas alíquotas do *pool* negativo em tubos de polipropileno de 1,5 mL de maneira que cada tubo permanecesse com 200 μ L de *pool*, totalizando 20 tubos. A cada alíquota dispensada, o *pool* foi homogeneizado durante 30 segundos a fim de manter a homogeneidade do controle. As alíquotas foram armazenadas a -20°C . A cada extração de DNA das amostras, o controle negativo foi incluído no processo.

Exemplo 5: Controle interno de amplificação (CI)

[000129] O controle interno (CI) é uma sequência de DNA que está presente na mesma reação de qPCR, na qual as amostras teste são amplificadas. Esta sequência é co-amplificada simultaneamente com a sequência alvo e tem como objetivo monitorar todo o processo, desde a extração de ácidos nucleicos até a análise final dos dados, validando as reações negativas e demonstrando a presença de inibidores ou falhas nos processos pré-analíticos e analíticos das amostras. O gene da beta-globina foi utilizado como CI nas reações de qPCR.

[000130] Baseado na sequência do gene da beta-globina humana com o número de acesso GU324922 e com o auxílio do *software* Primer Express™3.0 (Applied Biosystems), foram desenhados um par de iniciadores e uma sonda no sistema TaqMan™MGB. As mesmas recomendações descritas no exemplo 1 foram utilizadas para a confecção destes oligonucleotídeos. As sequências dos iniciadores e da sonda do controle interno estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2. Iniciadores e sondas para a detecção do controle interno beta-globina humana.

SEQ ID	Iniciador/sonda	Sequência (5'- 3')	Tm°C
8	Globina_For	TGAAGGCTCATGGCAAGAAA	58
9	Globina_Rev	GGTGAGCCAGGCCATCAC	59
10	Sonda Globina	TGCTCGGTGCCTTT	69

[000131] Na Tabela 2, a sonda de SEQ ID NO: 10 foi marcada com NED na extremidade 5'e MGB na extremidade 3'. O amplicon gerado para o controle interno beta-globina tem 54 pares de base.

Exemplo 6: Padronização das reações de qPCR no formato singleplex - Preparo da curva padrão a partir dos controles positivos

[000132] Considerando que o genoma humano haplóide pesa 3,3 pg e que a linhagem celular MT-2 possui aproximadamente uma cópia do HTLV-1 integrada ao seu genoma, procederam-se aos cálculos para obtenção de uma solução estoque contendo 10^5 cópias virais a cada 5 μ L de solução. Da mesma maneira, foram realizados os cálculos para a linhagem celular Gu, no entanto, esta linhagem possui aproximadamente quatro cópias do HTLV-2 integradas ao seu genoma. Estes cálculos foram baseados na constante de Avogadro e na concentração de DNA das amostras avaliadas por espectrofotometria. As soluções estoques foram armazenadas a -20°C até o momento do uso.

[000133] Com o objetivo de avaliar a cinética de reação e a qualidade dos iniciadores e sondas, as eficiências e correlações lineares (R^2) das reações de amplificação foram avaliadas no formato *singleplex* (uma sonda e um alvo por reação). Para tanto, foram construídas curvas padrão por meio de diluições decimais seriadas (10^5 a 10^0 cópias virais/reação) dos controles positivos MT-2 (HTLV-1) e Gu (HTLV-2). As eficiências para o conjunto de sondas e iniciadores para o HTLV-1, HTLV-2 e controle interno (CI) foram superiores a 95% e as correlações (R^2) mostraram-se superiores a 0,99 (Figura 3).

Exemplo 7: Padronização das reações de qPCR nos formatos *singleplex* e *multiplex* (*biplex* e *tríplice*)

[000134] Para avaliar a eficiência e correlação linear (R^2) das reações de qPCR no formato *singleplex* (presença de um alvo e uma sonda por reação) e *multiplex* (presença de mais de um alvo e mais de uma sonda por reação), foram realizadas diluições decimais seriadas (10^5 a 10^0 cópias virais/reação) dos controles positivos MT-2 (HTLV-1) e Gu (HTLV-2). Estas diluições foram utilizadas nas reações de PCR em tempo real no formato de curva padrão. As reações apresentavam como alvo somente HTLV-1 ou HTLV-2 ou controle interno (CI) (*singleplex*), HTLV-1 e IC ou HTLV-2 e ICI (*biplex*) ou

HTLV-1, HTLV-2 e CI co-amplificados simultaneamente (*triplex*). As reações de PCR em tempo real foram padronizadas utilizando o *kit* TaqMan™ Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) e a amplificação e aquisição dos dados foram realizadas no ABI 7500 Real-Time PCR system (Applied Biosystems). Assim, cada reação de amplificação consistiu em 5µL de DNA dos controles positivos e 12,5µL TaqMan™ Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems). A concentração utilizada das sondas foi 100 nM e a dos iniciadores 250 nM. O volume de água foi ajustado a cada reação para um volume final de 25 µL/reação. As condições térmicas de ciclagem consistiram em um primeiro passo de ativação a 50°C por 2 minutos seguidos de 45 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto.

[000135] As reações foram realizadas nos seguintes formatos: i) *biplex* contendo alvos e sondas para HTLV-1 ou HTLV-2 e CI; ii) *triplex* contendo alvos e sondas para HTLV-1, HTLV-2 e CI. As reações no formato *biplex* (HTLV-1 e CI) mostraram-se adequadas (Figura 4). As curvas para HTLV-2 das reações *biplex* (HTLV-1 e HTLV-2; HTLV-2 e CI) sofreram uma mudança em seu formato, tornando-se mais linear que sigmoide (Figura 4). No formato *triplex* (HTLV-1, HTLV-2 e CI), as curvas para HTLV-1 e CI mostraram-se adequadas, no entanto, as curvas para HTLV-2 sofreram acentuada mudança em sua forma e redução sensível da fluorescência como observado na figura 4.

[000136] O *cycle threshold* (Ct) das reações nos formatos *singleplex* e *multiplex* (*triplex*) foram similares (Tabela 3).

Tabela 3. Comparação das reações de qPCR nos formatos *singleplex* e *triplex* (*multiplex*). Valores de *cycle threshold* e desvio padrão das diluições dos controles positivos MT-2 (HTLV-1) e Gu (HTLV-2). As diluições variaram de 10⁵ a 10⁰ cópias/reação.

Alvo	Valor de Ct
------	-------------

	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ¹	10 ⁰
HTLV-1						
<i>Singleplex</i>	20.362	23.894	27.318	31.067	34.041	36.705
<i>Triplex</i>	20.422	23.992	27.402	31.256	35.233	37.015
DP	0.042	0.069	0.059	0.133	0.842	0.2194
HTLV-2						
<i>Singleplex</i>	23.765	27.042	30.761	34.041	37.67032	ND
<i>Triplex</i>	23.629	27.243	30.766	35.07	36.53651	ND
DP	0.096	0.142	0.003288	0.728	0.801726	ND

HTLV: vírus linfotrófico de células T humanas; DP: desvio padrão; Ct: *cycle threshold*; ND: não detectado.

Exemplo 8: Padronização das concentrações de sondas e iniciadores utilizadas nas reações de qPCR

[000137] As reações de PCR em tempo real no formato *singleplex* foram padronizadas utilizando o kit *TaqMan™ Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems) e as condições térmicas de ciclagem, amplificação e aquisição dos dados foram realizadas de acordo com o exemplo 7. Cada reação de amplificação consistiu em 5µL de DNA obtido a partir dos controles positivos MT-2 e Gu, 12,5µL *TaqMan™ Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems). A concentração das sondas para HTLV-1 (marcada com o fluorocromo FAM™) e HTLV-2 (marcada com o fluorocromo VIC™) variou de 100 a 300 nM, já para o controle interno (CI) (marcada com o fluorocromo NED™), variou de 50 a 200 nM. As concentrações dos *iniciadores* variaram de 250 a 500 nM para HTLV-1 e HTLV-2 e 125 a 250 nM para o CI. O volume de água foi ajustado a cada reação para um volume final de 25 µL/reação. Posteriormente, as concentrações de reagentes que apresentaram melhor desempenho foram avaliadas no formato *multiplex*.

[000138] Ainda, diferentes concentrações de sondas foram testadas visando aprimorar as curvas e fluorescência no formato *multiplex*, com foco na curva para HTLV-2. As diluições dos controles positivos MT-2 (HTLV-1)

e Gu (HTLV-2) contendo 10^5 , 10^3 , e 10^1 cópias virais/reação foram utilizadas nas reações de qPCR. As reações foram realizadas nos formatos *singleplex* e *multiplex* (*biplex* e *triplex*). A figura 5 demonstra as concentrações de sondas avaliadas, que foram 100, 200 e 300 nM.

Exemplo 9: Desenho de um iniciador reverso extra (reverso') para HTLV-2

[000139] Ainda, foi testada a possibilidade de utilização de mais de um iniciador reverso em adição ao iniciador de SEQ ID NO: 5, com vistas à verificação de aumento de sensibilidade da reação para HTLV-2. Dito iniciador está apresentado sob SEQ ID NO: 6.

[000140] Assim, dois amplicons de tamanhos diferentes são gerados (Figura 6) aumentando os alvos para ligação da sonda, o que gera um aumento na fluorescência e redução de Ct, como pode ser observado na Figura 7.

Exemplo 10: Teste de concentração de iniciadores e sondas para as reações de qPCR no formato *singleplex*

[000141] Utilizando o formato *singleplex*, diferentes condições das reações de qPCR foram testadas. Como controle positivo as diluições das linhagens celulares MT-2 (HTLV-1) e Gu (HTLV-2) contendo 10^5 , 10^3 , e 10^1 cópias virais/reação foram utilizadas. A concentração dos iniciadores testados para as reações HTLV-1 e HTLV-2 foram 250 e 500 nM e sondas 100 e 200 nM e, para CI, 125 e 250 nM de iniciadores e 50 e 100 nM de sonda. As melhores condições observadas para HTLV-1 foram 500 nM de iniciadores e 200 nM de sondas, para HTLV-2 500 nM de iniciador *forward*, 250 nM dos iniciadores reversos e 200 nM de sonda e para o CI, 250 nM de iniciadores e 100 nM de sonda (Figura 8).

Exemplo 11: Teste de concentração de iniciadores e sondas para as reações de

qPCR no formato *multiplex*

[000142] Utilizando o formato *multiplex*, diferentes condições das reações de qPCR foram testadas. Para tanto, os iniciadores para HTLV-1 foram utilizados nas concentrações de 250 e 500 nM e a sonda 100, 125, 150, 175, e 200 nM, para HTLV-2, iniciadores nas concentrações de 250 e 500 nM e sonda 200, 225 e 250 nM e para o CI, iniciadores na concentração de 250 e sonda 100, 125, 150 e 200 nM. A melhor condição observada foi ao utilizar para HTLV-1, 500 nM de iniciadores e 200 nM de sonda; para HTLV-2, 500 nM de iniciador *forward*, 250 nM dos iniciadores reversos e 225 nM de sonda, e para o CI, 250 nM de iniciadores e 200 nM de sonda como pode ser observado na figura 9.

[000143] Assim, a partir das concentrações ideais de sondas e iniciadores definidas, foram avaliadas as eficiências e correlações lineares das reações de qPCR por meio de curvas padrão a partir dos controles positivos para HTLV-1 e HTLV-2. As eficiências para o conjunto de sondas e iniciadores para o HTLV-1, HTLV-2 e controle interno (CI) foram superiores a 95% e as correlações (R^2) mostraram-se superiores a 0,99 (Figura 10).

Exemplo 12: Produção de lote de *mix* (iniciadores + sondas) para as reações de qPCR

[000144] Uma mistura composta por todas as sondas e iniciadores (*mix*) utilizados nas reações de qPCR foi produzida. Para tanto, os iniciadores *forward* e reverso para HTLV-1 foram diluídos para a concentração de 25 μ M. O iniciador *forward* para HTLV-2 foi diluído para a concentração de 25 μ M, enquanto os iniciadores reverso e reverso' foram diluídos para 12,5 μ M. Os iniciadores *forward* e reverso para o controle interno (CI) foram diluídos para a concentração de 12,5 μ M. As sondas para HTLV-1 e IC foram diluídas para 10 μ M e a sonda para HTLV-2 foi diluída para 11,25 μ M. Todos os oligonucleotídeos foram misturados em um tubo de polipropileno de 12 mL

livre de DNase, RNase e pirógenos a fim de constituir um *mix* único. Foi utilizada uma quantidade de água ultrapura para que as concentrações finais dos oligonucleotídeos fossem 500 nM dos iniciadores *forward* e reverso para HTLV-1, 500 nM do iniciador *forward* para HTLV-2, 250 nM dos iniciadores reverso e reverso' para HTLV-2 e 250 nM dos iniciadores *forward* e reverso para o CI, 200 nM da sonda para HTLV-1 e IC e 225 nM da sonda para HTLV-2. O *mix* de oligonucleotídeos foi distribuído em alíquotas. A cada alíquota dispensada, o *mix* foi homogeneizado em vortex durante 10 segundos. As alíquotas foram envolvidas por papel alumínio e acondicionadas a -20°C até o momento do uso. O descongelamento dos oligonucleotídeos estoque, utilizados para a preparação do *mix*, foi realizado sobre gelo, e os mesmos foram homogeneizados durante 10 segundos antes dos procedimentos de diluição.

Exemplo 13: Avaliação da homogeneidade do *mix* (sondas+inciadores)

[000145] Para a avaliação da homogeneidade do *mix* (sondas+inciadores), cinco alíquotas foram escolhidas aleatoriamente e avaliadas em reações de qPCR contendo 10³ cópias virais do controle positivo, em que os valores de *cycle threshold* (Ct) para HTLV-1 e HTLV-2 foram analisados.

[000146] Para tanto, cinco de 20 alíquotas dos controles positivos contendo 10³ cópias virais/reação foram escolhidas aleatoriamente e avaliadas nas reações de qPCR. A média, desvio padrão e o coeficiente de variação (CV) entre as alíquotas estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4. Avaliação da homogeneidade do *mix* (iniciadores+sondas).

HTLV-1 (alíquotas)	Média dos Ct	HTLV-2 (alíquotas)	Média dos Ct
1	31,942	1	31,723
5	31,968	5	31,839
2	32,084	2	31,750

7	31,989	7	31,805
3	31,893	3	31,707
Média	31,975	Média	31,765
DP	0,071	DP	0,056
CV%	0,2	CV %	0,2

DP: desvio padrão; CV: coeficiente de variação; Ct: *cycle threshold*; HTLV: vírus linfotrópico de células T humanas.

[000147] O baixo valor de desvio padrão dos Ct entre as alíquotas avaliadas demonstra que o processo de produção e alíquotagem do *mix* foram homogêneos.

Exemplo 14: Avaliação da estabilidade do *mix* (sondas+iniciadores)

[000148] Para avaliar a degradação ou degeneração do *mix*, uma alíquota foi submetida a processos de descongelamento e congelamento por 18 vezes em um intervalo de 120 dias. A cada descongelamento, o *mix* foi avaliado por reações de qPCR nas quais foram analisadas os Ct dos controles positivos. Como controle, paralelamente, 18 alíquotas do *mix* foram descongeladas, utilizadas e descartadas a cada dia. Os valores de Ct para HTLV-1 e HTLV-2 obtidos foram submetidos ao cálculo da média, desvio padrão e CV. Não houve diferenças significativas a média dos Ct dos controles e das alíquotas avaliadas. Portanto, o *mix* mostrou-se estável, sem alterações significativas durante toda a avaliação (Tabela 5).

Tabela 5. Avaliação da estabilidade do *mix* (iniciadores+sondas).

Data do qPCR	Média dos Ct do controle (HTLV-1)	Estabilidade do <i>mix</i> (Ct HTLV-1)	Média dos Ct do controle (HTLV-2)	Estabilidade do <i>mix</i> (Ct HTLV-2)
Dia 01	30,334	30,235	31,017	30,834
Dia 02	30,311	30,236	30,894	30,89
Dia 03	30,817	30,688	31,507	31,374
Dia 04	30,106	30,13	30,629	30,7

Dia 05	30,236	29,922	30,795	30,576
Dia 06	29,894	30,32	30,525	30,921
Dia 07	30,397	30,348	30,885	30,788
Dia 08	30,157	29,985	30,686	30,743
Dia 09	30,106	30,045	30,504	30,694
Dia 10	30,461	30,362	30,843	31,004
Dia 11	30,159	30,219	30,699	30,847
Dia 12	30,082	30,058	30,58	30,655
Dia 13	30,573	30,365	30,94	31,001
Dia 14	30,361	30,287	30,955	30,847
Dia 15	30,653	30,494	31,272	31,178
Dia 16	30,28	30,154	30,845	30,929
Dia 17	30,21	30,209	30,731	30,743
Dia 18	30,559	30,518	31,217	31
Média	30,316	30,254	30,862	30,873
DP	0,231	0,195	0,266	0,194
CV%	0,762	0,645	0,862	0,628

DP: desvio padrão; CV: coeficiente de variação; Ct: *cycle threshold*; HTLV: vírus linfotrópico de células T humanas.

Exemplo 15: Processo de validação aplicado a testes diagnósticos: precisão

[000149] Nos testes de precisão são avaliados os parâmetros de repetibilidade (intra-ensaio) e reprodutibilidade (inter-ensaio). A repetibilidade refere-se à máxima concordância entre testes repetidos da mesma amostra sob as mesmas condições operacionais. Este teste foi realizado a partir de três diluições do controle positivo (MT-2+Gu) contendo 10^5 , 10^4 , 10^3 cópias virais/reação com cinco réplicas de cada diluição. Três corridas de qPCR foram realizadas no mesmo dia, utilizando o mesmo lote de reagentes e preparadas por um único operador.

[000150] A reprodutibilidade avalia a máxima concordância entre resultados sucessivos do mesmo analito sob diferentes condições operacionais. Este teste foi realizado a partir de três diluições do controle positivo (MT-2+Gu) contendo 10^5 , 10^4 , 10^3 cópias virais/reação com cinco réplicas de cada diluição. Três corridas foram realizadas em dias alternados,

utilizando o mesmo lote de reagentes e preparadas por três operadores distintos.(Tabelas 6 e 7).

Tabela 6. Intra-ensaio para HTLV-1 e HTLV-2.

Diluição	HTLV-1		HTLV-2		
	Média dos Ct	CV%	Média dos Ct	CV%	
Corrida 1	10 ⁵	24,496	0,113	24,179	0,181
	10 ⁴	27,847	0,150	27,593	0,331
	10 ³	31,076	0,131	30,970	0,370
Corrida 2	10 ⁵	24,445	0,254	24,129	0,219
	10 ⁴	27,791	0,137	27,539	0,192
	10 ³	31,008	0,225	30,887	0,240
Corrida 3	10 ⁵	24,428	0,157	24,172	0,177
	10 ⁴	27,687	0,181	27,538	0,343
	10 ³	30,969	0,033	30,942	0,408

HTLV: vírus linfotrópico de células T humanas; Ct: *cycle threshold*; CV: coeficiente de variação

Tabela 7. Inter-ensaio para HTLV-1 e HTLV-2.

diluição	HTLV-1		HTLV-2	
	Média dos Ct	CV (%)	Média dos Ct	CV (%)
10 ⁵	24,404	0,643	24,176	0,475
10 ⁴	27,722	0,553	27,593	0,340
10 ³	31,020	0,478	30,996	0,408

HTLV: vírus linfotrópico de células T humanas; Ct: *cycle threshold*; CV: coeficiente de variação.

[000151] Os coeficientes de variação (CV) dos testes não ultrapassaram 0,653%, resultado dentro do limite proposto pelo *National Virus Reference Laboratory*, Irlanda (Moens *et al.*, J Clin Microbiol, v. 47, n. 11, p. 3682-91, 2009; Waters *et al.*, J Clin Virol, v. 52, n. 1, p. 38-44, 2011).

Exemplo 16: Processo de validação aplicado a testes diagnósticos: robustez

[000152] A robustez de um teste refere-se ao potencial de contaminação cruzada das amostras negativas com amostras positivas por *carry-over*. Este parâmetro foi avaliado pelo método de “mesa de xadrez” (Figura 11), no qual uma amostra positiva é pipetada ao lado de uma amostra negativa ao longo da placa de reações de qPCR. As reações foram pipetadas tanto manualmente quanto por uma estação de trabalho autimatizada de pipetagem (*liquid handling*).

[000153] Em uma placa foram pipetadas amostras positivas para HTLV-1 lado a lado com amostras sem alvo (branco de reação). Nenhum branco de reação apresentou curva de amplificação, indicando que não houve contaminação cruzada durante o preparo das reações.

Exemplo 16: Processo de validação aplicado a testes diagnósticos: Sensibilidade analítica

[000154] A sensibilidade analítica ou limite mínimo de detecção avalia a menor concentração ou quantidade que um método diagnóstico é capaz de detectar. Para atender a este parâmetro foram realizadas diluições do controle positivo (MT-3+Gu). A diluição estoque do controle positivo (MT-2+Gu) contendo 10^5 cópias viras foi submetida a uma primeira diluição de razão 10 para a obtenção de uma solução contendo 10^4 cópias virais, seguida de uma diluição de razão cinco, resultando em uma solução contendo 2000 cópias virais. A partir dessa solução, foram realizadas 11 diluições seriadas de razão dois, até a obtenção de uma solução contendo 0,976 cópias virais. A cada diluição realizada, a amostra foi homogeneizada em vortex durante 10 segundo, seguida de rápida centrifugação para minimizar a formação de aerossóis. Durante o processo das diluições, as ponteiros utilizados nos pipetadores automáticos não foram trocadas. As diluições contendo 62,5,

31,25, 15,625, 7,81, 3,9, 1,95 e 0,975 cópias virais, em oito réplicas de cada diluição, foram submetidas às reações de qPCR as quais foram pipetadas por três operadores distintos em um único dia. Os resultados obtidos foram utilizados para o cálculo da sensibilidade analítica pelo método estatístico de regressão linear Probit em um intervalo de confiança de 95%, com o auxílio do *Software Statistical Package for Social Science (SPSS)* versão 17.0 (SPSS Inc.). Dois lotes diferentes de iniciadores e sondas foram submetidos à análise.

[000155] Assim, com o objetivo de avaliar o limite de detecção mínima do teste, sete níveis de diluições seriadas, de razão dois, (controles positivos para HTLV-1 e HTLV-2) foram testados, variando de 62,5 a 0,975 cópias virais/reacção. Todas as reações foram realizadas no formato *multiplex*, em oito réplicas de cada diluição. Dois testes foram realizados em dias distintos utilizando lotes diferentes de iniciadores e sondas, pipetados por três diferentes operadores (Tabela 8 e 9). A sensibilidade analítica (lote 01) obtida pela média entre os operadores foi 4,64 cópias/reacção para HTLV-1 (variando de 3,83 a 5,54 cópias/reacção) e 10,77 cópias/reacção para HTLV-2 (variando de 7,02 a 17,21 cópias/reacção). A sensibilidade analítica (lote 02) foi 3,06 cópias/reacção para HTLV-1 (variando de 2,81 a 3,55 cópias/reacção) e 10,99 cópias/reacção para HTLV-2 (variando de 8,62 a 13,53 cópias/reacção). A média de detecção entre os experimentos foi 3,85 cópias/reacção para HTLV-1 (variando de 2,81 a 5,54 cópias/reacção) e 10,88 cópias/reacção para HTLV-2 (variando de 7,02 a 17,21 cópias/reacção).

Tabela 8. Avaliação da Sensibilidade analítica para HTLV-1 e HTLV-2 (lote 01) utilizando o método de regressão linear Probit (IC 95%).

Cópias/reacção	n° de réplicas detectadas			Limite de detecção (IC 95%)
	OP 01	OP 02	OP 03	
HTLV-1				
62,5	8/8	8/8	8/8	4,64 (3,83 - 5,54)

31,25	8/8	8/8	8/8	
15,625	8/8	8/8	8/8	
7,81	8/8	8/8	8/8	
3,9	7/8	8/8	7/8	
1,95	4/8	3/8	6/8	
0,975	5/8	3/8	3/8	
HTLV-2				
62,5	8/8	8/8	8/8	
31,25	8/8	8/8	8/8	
15,625	8/8	7/8	8/8	
7,81	8/8	5/8	7/8	10,77 (7,02 - 17,21)
3,9	5/8	6/8	7/8	
1,95	3/8	3/8	3/8	
0,975	3/8	0/8	2/8	

HTLV: vírus linfotrópico de células T humanas; n°: número; OP: operador; IC: intervalo de confiança.

Tabela 9. Avaliação da Sensibilidade analítica para HTLV-1 e HTLV-2 (lote 02) utilizando o método de regressão linear Probit (IC de 95%)

Cópias/reação	n° de réplicas detectadas			Limite de detecção (IC 95%)
	OP 01	OP 02	OP 03	
HTLV-1				
62,5	8/8	8/8	8/8	
31,25	8/8	8/8	8/8	
15,625	8/8	8/8	8/8	
7,81	8/8	8/8	8/8	3,06 (2,81 - 3,55)
3,9	7/8	8/8	8/8	
1,95	6/8	5/8	4/8	
0,975	1/8	1/8	3/8	
HTLV-2				
62,5	8/8	8/8	8/8	
31,25	8/8	8/8	8/8	
15,625	7/8	8/8	8/8	
7,81	8/8	7/8	6/8	10,99 (8,62 - 13,53)
3,9	5/8	6/8	6/8	
1,95	1/8	2/8	2/8	

0,975	1/8	2/8	1/8
-------	-----	-----	-----

HTLV: vírus linfotrópico de células T humanas; n°: número; OP: operador; IC intervalo de confiança.

Exemplo 17: Processo de validação aplicado a testes diagnósticos:

Especificidade analítica

[000156] A especificidade analítica corresponde à habilidade do teste em identificar exclusivamente a substância alvo ou organismo ao invés de substâncias ou organismos semelhantes em uma amostra. Para tanto, testes *in vitro* e *in silico* foram realizados. Para a validação *in vitro*, reações de qPCR contemplando os vírus HAV, HBV, HCV, HIV-1, HIV-2, B19 foram realizados com painéis adquiridos do *National Institute for Biological Standards and Control* (NIBSC). Além do painel testado, 30 amostras de indivíduos infectados pelo HIV, 30 amostras de indivíduos infectados pelo HBV e 30 amostras de indivíduos infectados pelo HCV foram avaliadas em reações de qPCR. A validação *in silico* foi realizada pelo confronto das sequências dos iniciadores e sondas contra um banco de dados público BLAST, a fim de verificar possíveis homologias com outros organismos.

[000157] Os conjuntos de iniciadores e sondas TaqMan® com alvo na região viral *pol* do HTLV-1, HTLV-2 e controle interno (IC) foram testados *in vitro*, a partir de ácidos nucleicos extraídos de um painel adquirido do *National Institute for Biological Standards and Control* (NIBSC) que contempla os vírus HAV, HBV, HCV, HIV e B19. Ainda, 30 amostras de pacientes portadores do vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), 30 amostras de pacientes portadores do vírus da Hepatite B (HBV) e 30 amostras de pacientes portadores do vírus da Hepatite C (HCV) também foram analisadas em reações de qPCR. A avaliação *in silico* foi realizada por meio da comparação das sequências de sonda e primers com o banco de dados público BLAST, para a verificação de homologia com outros microrganismos. As reações não apresentaram reatividade cruzada com os tipos virais testados e as sequências de primers e sondas apresentaram 100%

de similaridade com HTLV e beta globina (CI), portanto adequados para o ensaio.

Exemplo 18: Processo de validação aplicado a testes diagnósticos:

Sensibilidade diagnóstica

[000158] A sensibilidade diagnóstica de um método refere-se à probabilidade de um resultado positivo na presença da infecção, ou seja, avalia a capacidade do teste em detectar como positivo um indivíduo infectado (verdadeiro positivo). As amostras utilizadas para este teste mostraram-se reagentes na sorologia, *Western Blot* e/ou *nested* PCR positivas. Assim, 320 amostras de indivíduos infectados pelo HTLV-1/2 foram testadas, dentre elas, 278 amostras HTLV-1 e 42 amostras HTLV-2. A fórmula para o cálculo da sensibilidade diagnóstica está descrita abaixo:

$$\text{Sensibilidade diagnóstica} = \frac{\text{Indivíduos verdadeiros positivos}}{\text{Indivíduos falsos negativos} + \text{Indivíduos verdadeiros positivos}}$$

[000159] As amostras que apresentaram *cycle threshold* (Ct) superior a 40 ou amplificação em somente uma das duplicatas foram consideradas negativas.

[000160] Para avaliar este parâmetro, 278 amostras de pacientes infectados pelo HTLV-1 e 42 amostras de pacientes infectados pelo HTLV-2 foram testadas. O teste, executado no formato *multiplex*, apresentou de 94,6% de sensibilidade para HTLV-1, e 78,6% para HTLV-2. Todas as reações foram realizadas em duplicata.

Exemplo 19: Processo de validação aplicado a testes diagnósticos:

Especificidade diagnóstica

[000161] A especificidade diagnóstica de um método refere-se à probabilidade de um resultado negativo na ausência de infecção, ou seja,

avalia a capacidade do teste em identificar como negativo um indivíduo sadio (verdadeiro negativo). Para tanto, 288 amostras de indivíduos que apresentaram perfil sorológico não reagente para HTLV-1/2 pelo teste imunoenzimático (EIA), foram submetidas às reações de qPCR. A fórmula para o cálculo da sensibilidade diagnóstica está descrita abaixo:

$$\text{Especificidade diagnóstica} = \frac{\text{Indivíduos verdadeiros negativos}}{\text{Indivíduos falsos positivos} + \text{Indivíduos verdadeiros negativos}}$$

[000162] As amostras que apresentaram *cycle threshold* superior a 40 foram consideradas negativas.

[000163] As condições de ciclagem, amplificação e aquisição dos dados de todo o processo de validação foram realizadas de acordo com o Exemplo 7. A concentração utilizada das sondas para HTLV-1 (FAM) e CI foi 200 nM e HTLV-2 (VIC) 225 nM. As concentrações dos iniciadores para HTLV-1 foram 500 nM, HTLV-2 250 nM e IC 250 nM, com exceção do iniciador reverso' para HTLV-2 que foi utilizado na concentração de 500 nM. Todas as reações foram realizadas em duplicata e no formato *multiplex*.

[000164] Todas as reações de PCR em tempo real (qPCR) realizadas no processo de validação continham de 80 a 500 ng de DNA, com valor médio de aproximadamente 200 ng por reação.

[000165] O conjunto de iniciadores e sondas foi submetido ao teste de especificidade diagnóstica. Para tanto, 288 amostras não reagentes para sorologia para HTLV-1/2 foram submetidas à reação de qPCR no formato *multiplex*. Não foi observado amplificação das amostras, exibindo 100% de especificidade diagnóstica. Todas as reações foram realizadas em duplicata.

Exemplo 20: Resolução de casos sem definição de tipo viral e indeterminados no teste de *Western Blot* (WB)

[000166] O teste de *Western Blot* em alguns casos não permite discriminar a infecção pelo HTLV-1 do HTLV-2. Ainda, existem ocasiões em que o padrão de bandas não define o *status* de infecção, permanecendo com resultado indeterminado. Um total de 11 amostras avaliadas pelo WB permaneceram sem definição do tipo viral e 14 amostras mostraram-se indeterminadas. A plataforma desenvolvida, foi capaz de definir o tipo viral em 10 de 11 amostras não tipadas e concluir o estado de infecção em seis, de 14 amostras avaliadas (Tabela 10).

Tabela 10. Amostras que apresentaram padrão indeterminado e não tipadas no método de WB avaliadas pela plataforma de PCR em tempo real desenvolvida.

<i>Classificação</i>	<i>Western Blot</i> n° de amostras	<i>Plataforma qPCR</i>	
		HTLV-1	HTLV-2
Indeterminadas	14	4	2
Não tipadas	11	10	0

qPCR: PCR em tempo real; HTLV: vírus linfotrópico de células T humana.

[000167] Uma amostra apresentou um padrão de bandas referente à dupla infecção pelo HTLV-1 e HTLV-2, a qual foi corretamente identificada pelo teste de qPCR desenvolvido.

Exemplo 21: Definição do *Threshold* para as reações de qPCR

[000168] O *threshold* das reações de qPCR foi definido com base na escolha automática dos *threshold* pelo *software* 7500 versão 2.0.5 (Applied Biosystems), obtidos a partir dos controles positivos para HTLV-1 e HTLV-2, em 21 corridas de qPCR realizadas em dias alternados. Após o cálculo da mediana, o *threshold* para HTLV-1 foi definido em 0,518759 e para o HTLV-

2 0,409368. Estes valores foram utilizados durante todo o processo de validação.

Exemplo 22: Definição do *cut off* para as reações de qPCR

[000169] Todas as corridas de qPCR foram realizadas em por meio de 45 ciclos de amplificação. Após o teste das amostras e controles negativos, observou-se raras amplificações tardias (*cycle threshold* > 40). Desta forma, amplificações acima deste valor de Ct foram consideradas negativas.

Exemplo 23: Análises estatísticas

[000170] A análise da precisão e a comparação dos formatos *singleplex* e *multiplex* das reações de PCR em tempo real (qPCR) foi realizada por meio do cálculo da média, o desvio padrão e o coeficiente de variação dos *cycle threshold* (Ct). A definição do *threshold* foi realizada por meio da avaliação da mediana dos Ct. O teste one-way ANOVA com pós teste de Bonferroni foi utilizado para avaliar a eficiência dos métodos de extração, enquanto o teste *t* foi utilizado para avaliar a estabilidade dos controles e reagentes. Além disso, o método de regressão linear Probit foi utilizado para avaliar a sensibilidade analítica desta plataforma. O *software GraphPad Prism 5* e o SPSS foram utilizados nas análises estatísticas.

[000171] É evidente que os exemplos acima foram apresentados apenas em caráter ilustrativo, e que modificações e variações dos mesmos, óbvias para os técnicos no assunto, são consideradas como inclusas no escopo da presente invenção, tal como definida nas reivindicações a seguir.

REIVINDICAÇÕES

1. Oligonucleotídeo, caracterizado pelo fato de ser capaz de se ligar à região *pol* de HTLV e ser adequado como iniciador, dito oligonucleotídeo compreendendo pelo menos de 10 a 15 nucleotídeos consecutivos das sequências selecionadas de SEQ ID Nos: 1, 2, 4, 5 e 6.

2. Oligonucleotídeo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de compreender as sequências de SEQ ID Nos: 1, 2, 4, 5 e 6.

3. Oligonucleotídeo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de consistir nas SEQ ID Nos: 1, 2, 4, 5 e 6.

4. Oligonucleotídeo, caracterizado pelo fato de ser capaz de se ligar à região *pol* de HTLV e ser adequado como sonda, dito oligonucleotídeo sonda compreendendo pelo menos de 8 a 15 nucleotídeos consecutivos das sequências selecionadas de SEQ ID Nos: 3 e 7.

5. Oligonucleotídeo de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de compreender as sequências de SEQ ID Nos: 3 e 7.

6. Oligonucleotídeo de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de consistir nas sequências de SEQ ID Nos: 3 e 7.

7. Oligonucleotídeo de acordo com qualquer uma das reivindicações 4 a 6, caracterizado pelo fato de ser marcado com uma marcação detectável, preferencialmente, um grupamento fluorescente.

8. Oligonucleotídeo de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato e que o grupamento fluorescente compreende um par de fluoróforo doador e um *quencher*.

9. Conjunto de oligonucleotídeos, caracterizado pelo fato de compreender pelo menos dois oligonucleotídeos selecionados de sequências compreendendo SEQ ID Nos: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7.

10. Método para detecção de pelo menos um alvo de HTLV, caracterizado pelo fato de compreender as etapas de:

a) produzir pelo menos um amplicon usando pelo menos dois oligonucleotídeos, ditos oligonucleotídeos sendo iniciadores adequados para a amplificação de pelo menos um alvo de referência selecionado do grupo que consiste da sequência localizada entre as posições 3340 e 3414 da SEQ ID NO: 11 e sequência localizada entre as posições 4483 e 4563 da SEQ ID NO: 12, e

b) detectar o amplicon através de pelo menos uma sonda.

11. Método de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que dito método é realizado com pelo menos um iniciador como definido na reivindicação 1, 2 ou 3.

12. Método de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que dito método é realizado com os iniciadores de SEQ ID Nos: 1 e 2.

13. Método de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que é realizado com os conjuntos de iniciadores selecionados de SEQ ID Nos: 4 e 5, SEQ ID Nos: 4 e 6 ou SEQ ID Nos: 4, 5 e 6.

14. Método de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que a dita etapa de detectar o amplicon é realizada com pelo menos uma sonda como definida em qualquer uma das reivindicações 4 a 8.

15. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 10 a 14, caracterizado pelo fato de que a dita etapa de produzir pelo menos um amplicon compreende pelo menos um de amplificação por PCR *multiplex*, *singleplex*, quantitativo, qualitativo, convencional ou em tempo real.

16. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 10, 11, 14 ou 15, caracterizado pelo fato de permitir discriminar entre infecções por HTLV-1 e HTLV-2.

17. *Kit* para diagnóstico e discriminação de infecção por HTLV-1/2, caracterizado pelo fato de compreender: a) pelo menos um oligonucleotídeo como definido em qualquer uma das reivindicações 1-3;

e/ou b) pelo menos um conjunto de oligonucleotídeos como definido em qualquer uma das reivindicações 4-8; e c) opcionalmente, instruções para uso.

18. *Kit* de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de ainda incluir um controle negativo e/ou um controle positivo de reação.

19. Polinucleotídeo adequado para uso como alvo de referência para o desenho de iniciadores e sondas para detecção e diferenciação de HTLV-1 e HTLV-2, caracterizado pelo fato de ser selecionado do grupo que consiste da sequência localizada entre as posições 3340 e 3414 da SEQ ID NO: 11 e sequência localizada entre as posições 4483 e 4563 da SEQ ID NO: 12.

20. Amplicon, caracterizado pelo fato de ser obtível pelo método de acordo com qualquer uma das reivindicações 10 a 16 em uma amostra contendo HTLV.

21. Amplicon de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de ser obtido com um par de iniciadores selecionado de: um iniciador de SEQ ID No: 1 e um iniciador de SEQ ID NO: 2; ou um iniciador de SEQ ID NO: 4 e um iniciador de SEQ ID NO: 5, ou um iniciador de SEQ ID NO: 4 e um iniciador de SEQ ID NO: 6.

Isolado	Origem	Número de Acesso (<i>GenBank</i>)	Tipo viral
B1033-2009	Japão	AB513134	HTLV-1
RK13-Ger	Alemanha	AF042071	HTLV-1
-	América do Norte	NC_001436	HTLV-1
-	América do Norte	AF139170	HTLV-1
-	América do Norte	AF033817	HTLV-1
WHP	China	AF259264	HTLV-1
-	Japão	J02029	HTLV-1
-	Caribe	D13784	HTLV-1
BRRP438	Brasil	AY563954	HTLV-1
-	Brasil	AY563953	HTLV-1
-	América do Norte	L03561	HTLV-1
ATL-YS	América do Norte	U19949	HTLV-1
-	França	L36905	HTLV-1
-	-	M86840	HTLV-1
Tan90	África	AF074966	HTLV-1
Mel5	Melanésia	L02534	HTLV-1
Pygmy 550602	África	GU212854	HTLV-2
-	-	NC_001488	HTLV-2
-	Brasil	AF139382	HTLV-2
G2	Venezuela	AF074965	HTLV-2
-	-	AF412314	HTLV-2
K96	Brasil	AF326584	HTLV-2
G12	Panamá	L11456	HTLV-2
-	-	M10060	HTLV-2
RP329	Brasil	AF326583	HTLV-2
HTLV-II-Gab	África	Y13051	HTLV-2
-	-	L20734	HTLV-2
PatientGu	Itália	X89270	HTLV-2
pygmy2	África	Y14365	HTLV-2

FIGURA 1

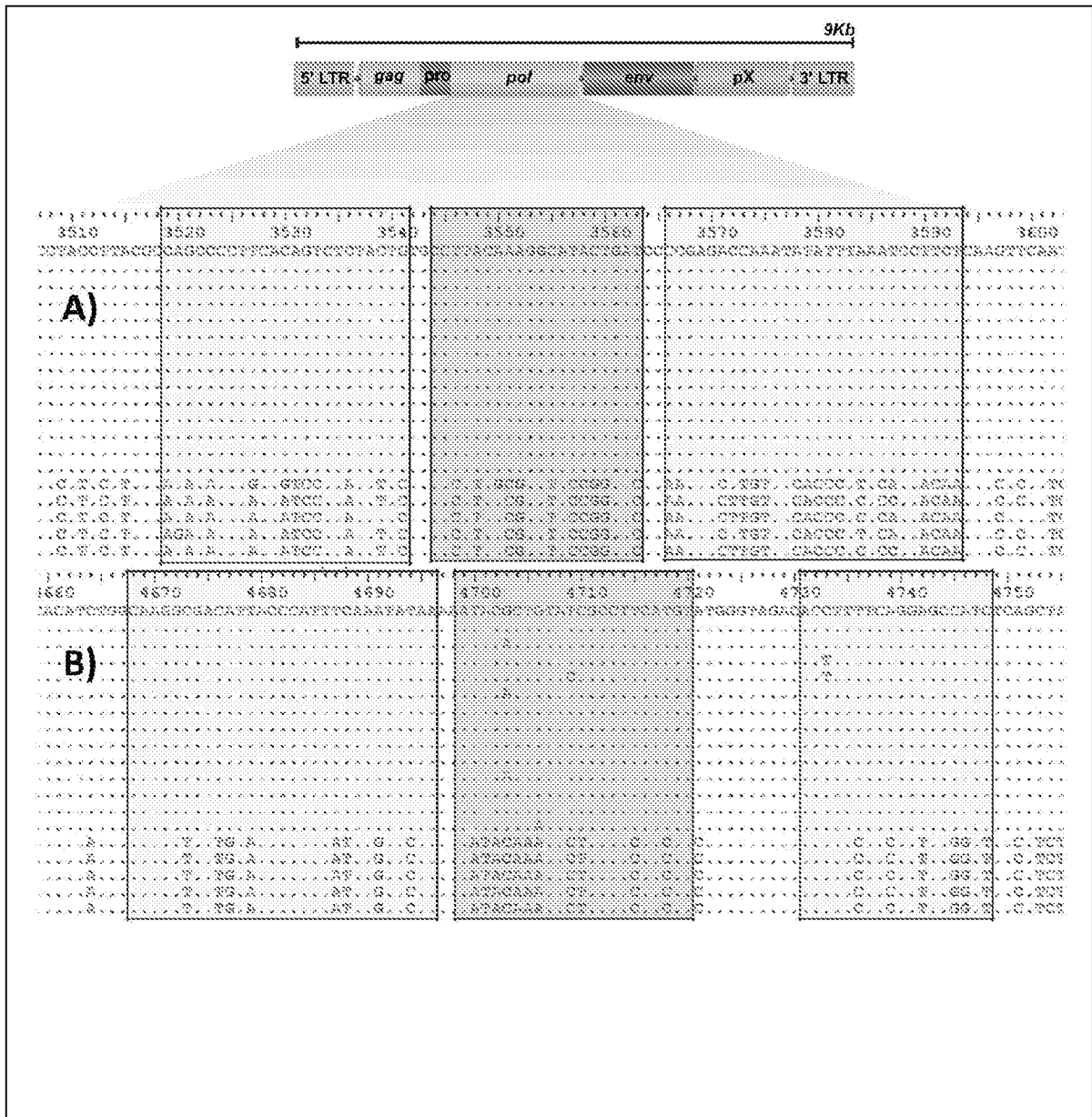


FIGURA 2

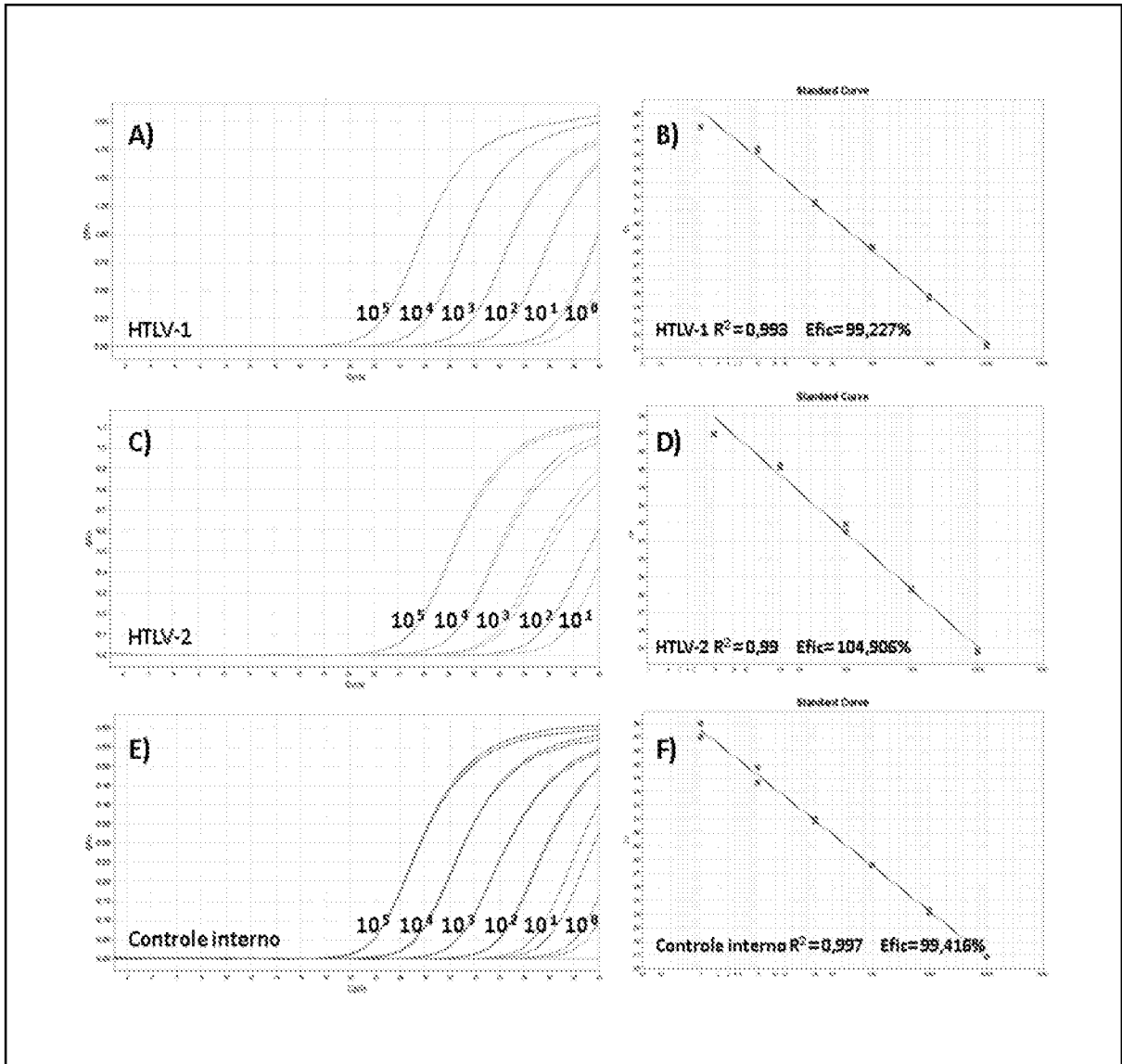


FIGURA 3

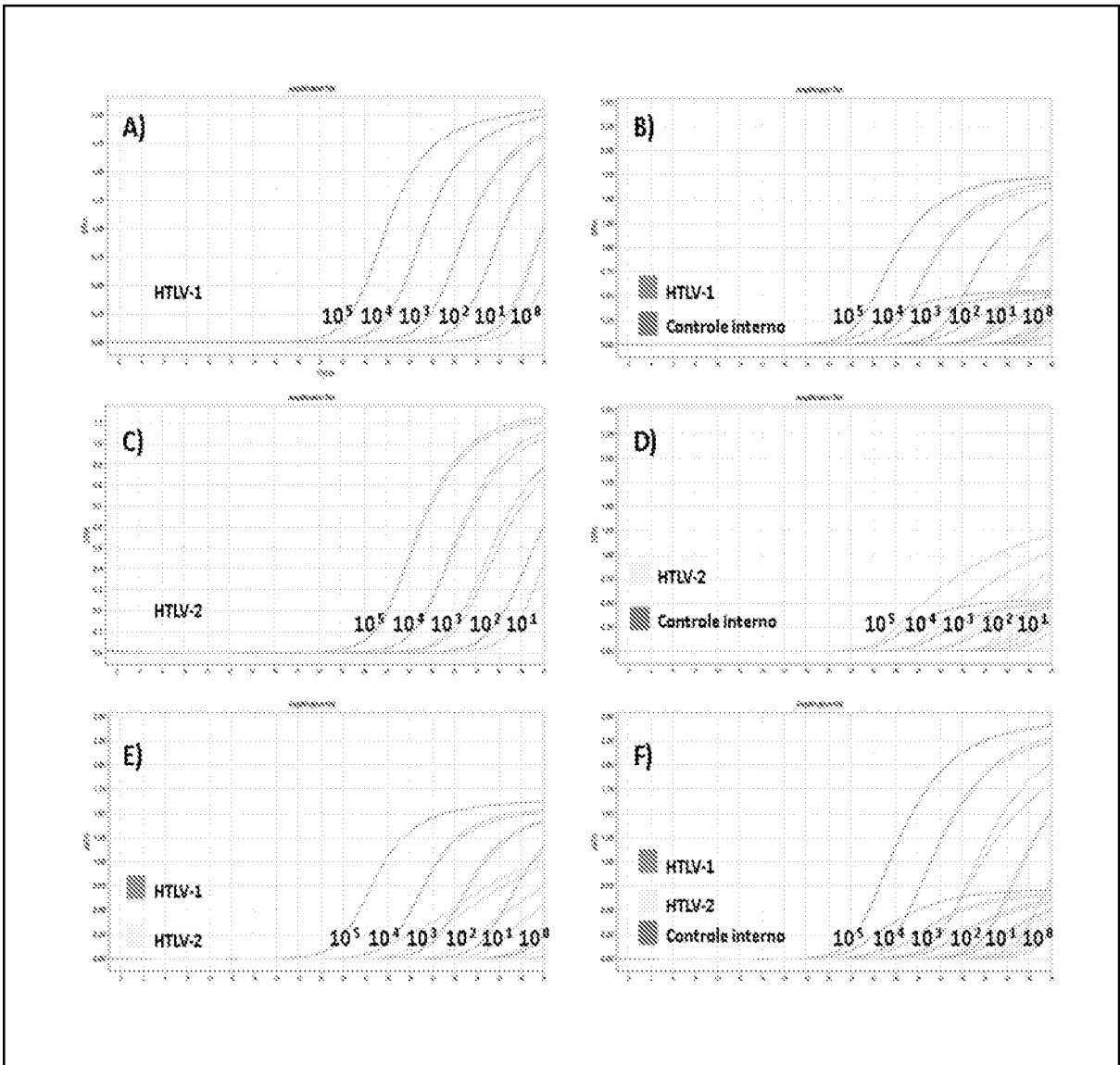


FIGURA 4

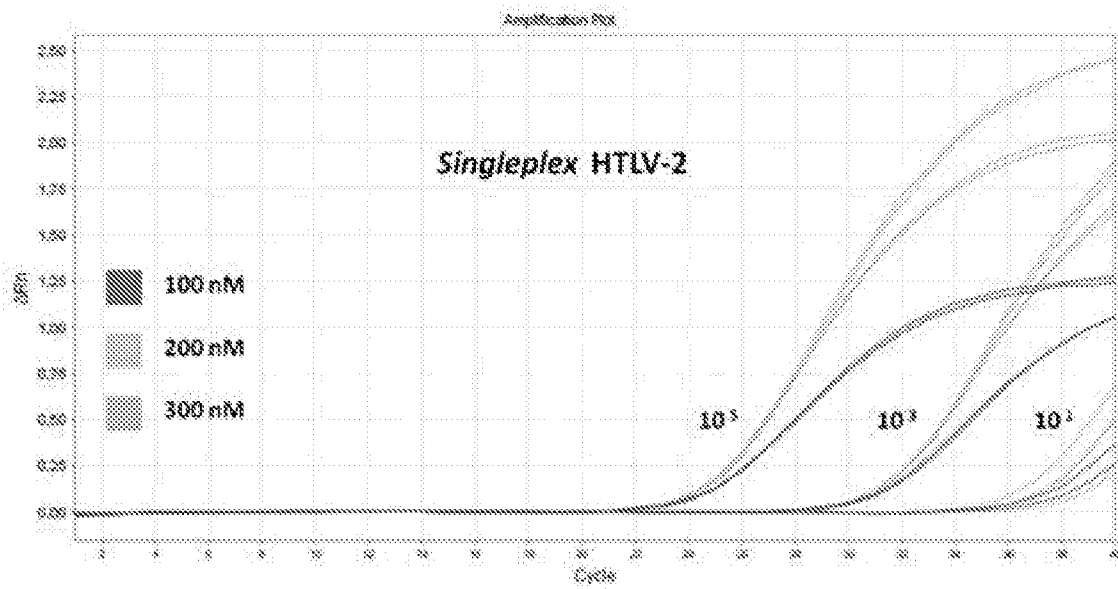


FIGURA 5

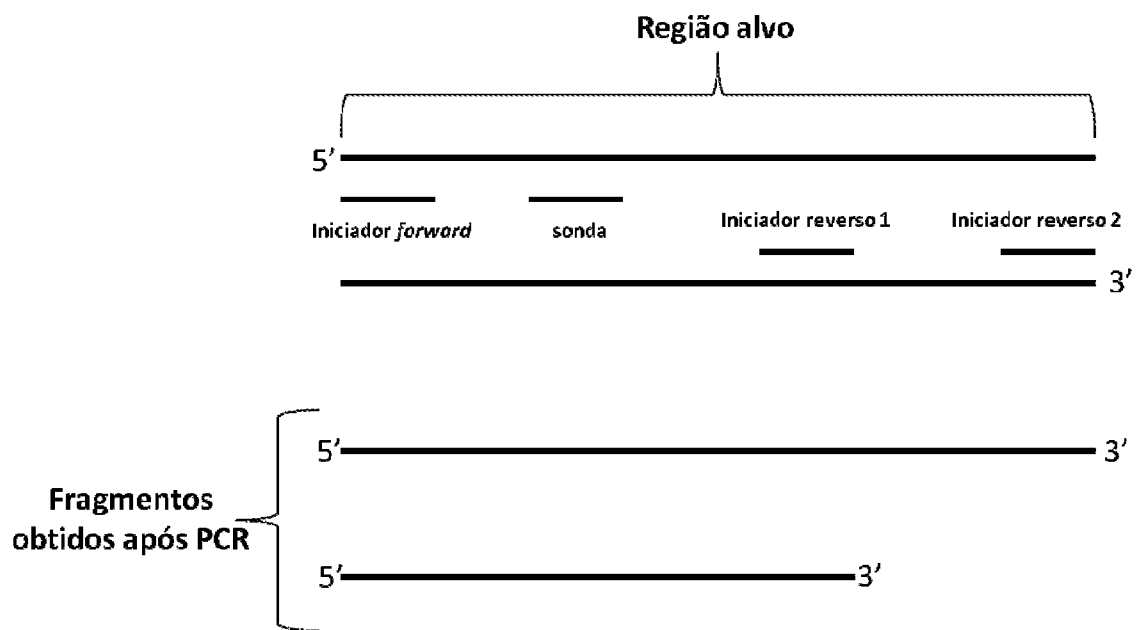


FIGURA 6

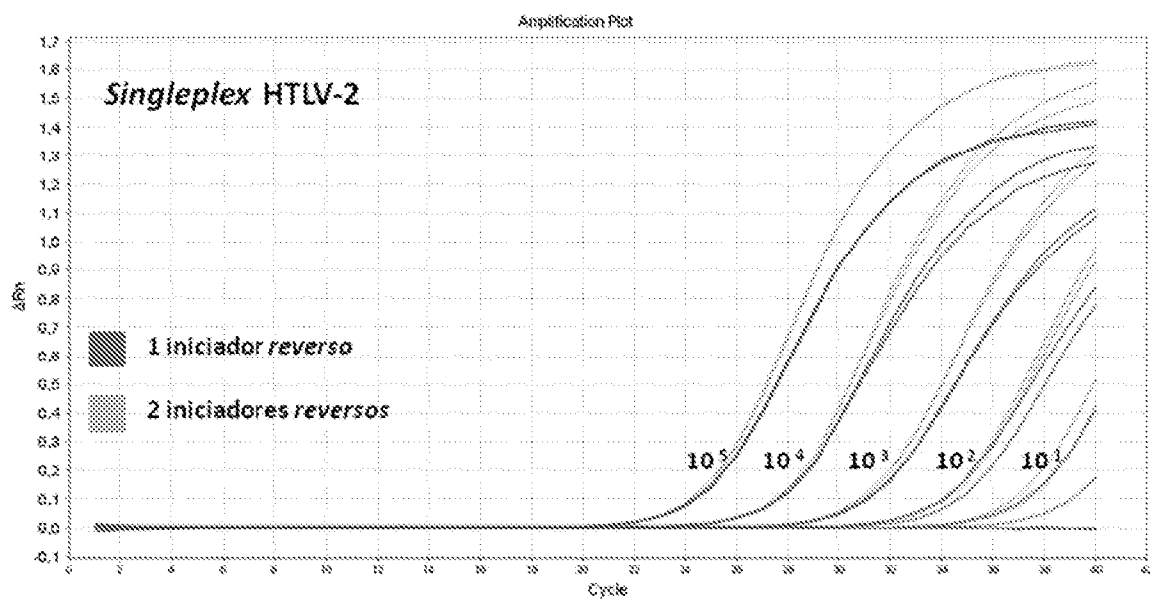


FIGURA 7

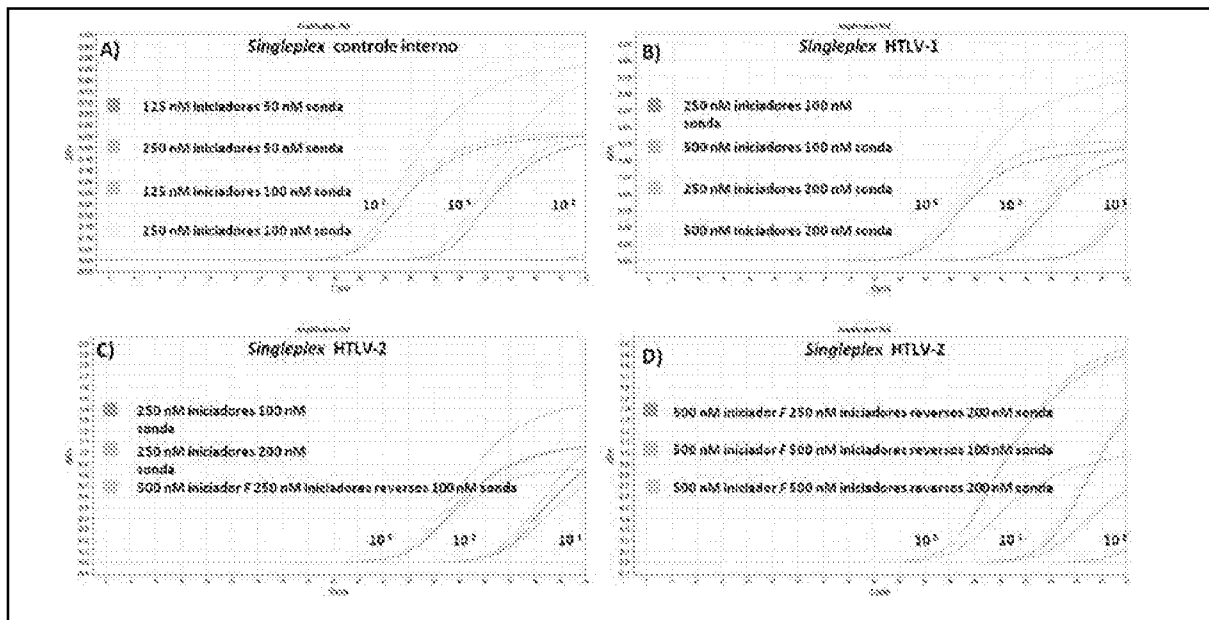


FIGURA 8

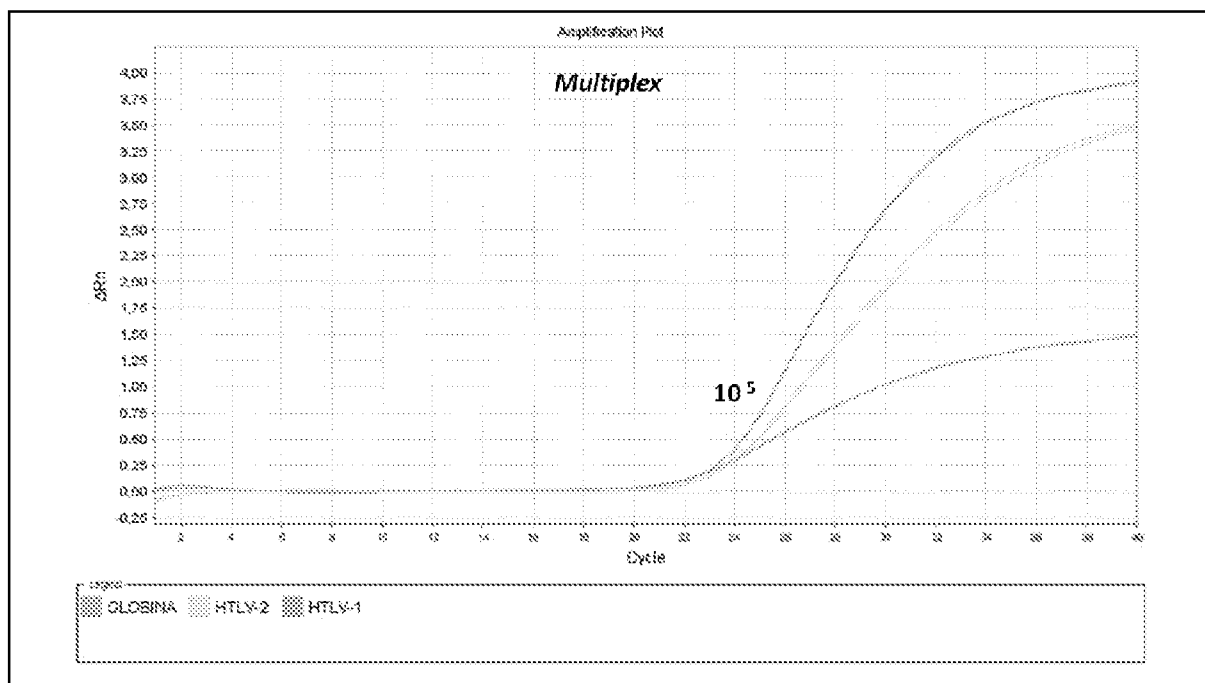


FIGURA 9

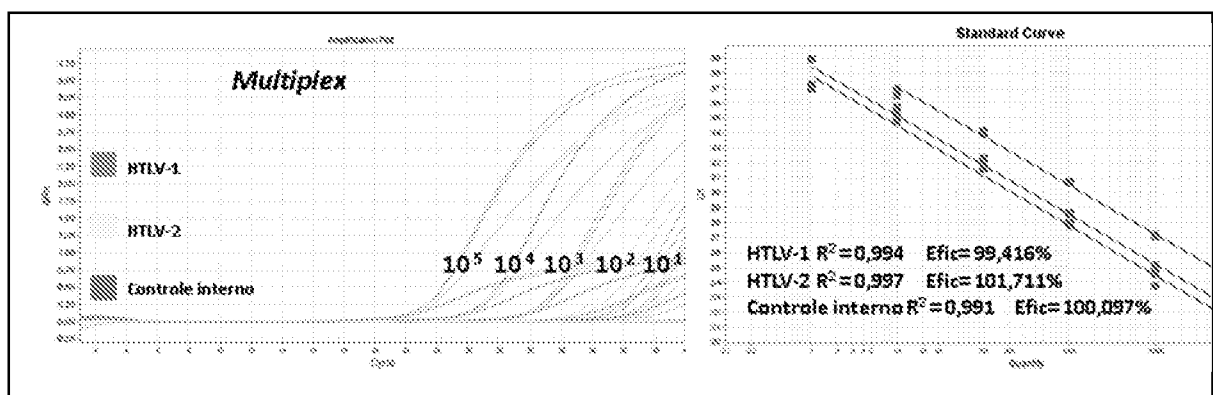


FIGURA 10

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
B	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
C	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
D	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
E	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
F	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
G	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
H	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+

FIGURA 11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/BR2015/050161

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q 1/68 (2006.01), C12N 15/11 (2006.01), C12N 15/33 (2006.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, NPL, MEDLINE, GENESEQ, USGENE, WOGENE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 7566532 B1 (QUEST DIAGNOSTICS INVEST INC [US]) 28 July 2009 (2009-07-28) SEQ ID n° 11.	1, 2, 4, 5, 17
A	-----	3, 6 to 16, 18 to 21
X	US 6218522 B1 (SHIONOGI CO [US]) 17 April 2001 (2001-04-17) SEQ ID n° 1.	1, 2, 17
A	-----	3 to 16, 18 to 21
X	US 6406841 B1 (ABBOTT LAB [US]) 18 June 2002 (2002-06-18) SEQ ID n° 1.	1, 2, 4, 5, 17
A	-----	3, 6 to 16, 18 to 21
X	KWOK, S. <i>et al.</i> Characterization of a sequence of human T cell leukemia virus type I from a patient with chronic progressive myelopathy. <i>J Infect Dis.</i> 1988, Vol. 158. N° 6, páginas 1193-1197. ISSN: 1537-6613. Abstract, page 1195 (second column), Table 1, Figure 2.	1 to 21



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

25/11/2015

Date of mailing of the international search report

08/12/2015

Name and mailing address of the ISA/ BR

INSTITUTO NACIONAL DA
PROPRIEDADE INDUSTRIAL
Rua Sao Bento n° 1, 17° andar
cep: 20090-010, Centro - Rio de Janeiro/RJ

Facsimile No.

+55 21 3037-3663

Authorized officer

Flávia Riso Rocha

Telephone No.

+55 21 3037-3493/3742

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/BR2015/050161

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>TAMEGÃO-LOPES, B. P. <i>et al.</i> Carga proviral do HTLV-1 e HTLV-2: um método simples através da PCR quantitativa em tempo real. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2006, Vol.39, n.6, pages 548-552. ISSN 1678-9849.</p> <p>Abstract, page 549 (second column), Table 1.</p>	1 to 21
X	<p>DEHÉE, A. <i>et al.</i> Quantitation of HTLV-I proviral load by a TaqMan real-time PCR assay. J. Virol. Methods. 2002. Vol. 102, n° 1-2, páginas 37-51. ISSN: 0166-0934.</p> <p>Abstract, page 38 (first paragraph from (second column), página 39 (subitem 2.3, 2.4, 2.5), first paragraph from subitem 3.1, page 47 (first column), Figure 1.</p>	1 to 21
X	<p>WATERS, A. <i>et al.</i> Multiplex real-time PCR for the detection and quantitation of HTLV-1 and HTLV-2 proviral load: addressing the issue of indeterminate HTLV results. J Clin Virol. 2011, Vol. 52, No. 1, pages 38-44. doi: 10.1016/j.jcv.2011.05.022.</p> <p>mentioned in description.</p> <p>Abstract, Table 1, Figure 3.</p>	1 to 21
X	<p>ALTAMIRANO, N. A. <i>et al.</i> Quantitation of HTLV-I proviral load by a real-time PCR assay using SYBR Green: comparison of two methods for DNA isolation. J Virol Methods. 2010, Vol. 170, páginas 160-164. doi: 10.1016/j.jviromet.2010.08.021.</p> <p>Abstract, page 161 (second paragraph), page 162 (first paragraph).</p>	1 to 21
X	<p>COSTA, E. A. <i>et al.</i> (2011) The best algorithm to confirm the diagnosis of HTLV-1 and HTLV-2 in at-risk individuals from São Paulo, Brazil. J Virol Methods. 2011, Vol. 173, No. 2, páginas 280-6. doi: 10.1016/j.jviromet.2011.02.018.</p> <p>mentioned in description.</p> <p>page 281 (subitem 2.3.3), page 285 (first paragraph).</p> <p>Tabela 1.</p>	1 to 21
X	<p>WO 9108308 A1 (PHARMACIA GENETIC ENG [US]) 13 junho 1991 (1991-06-13)</p> <p>Abstract, claims 28 to 31, table 1 (page31), page 52 to 54.</p>	1 to 21
X	<p>US H1825 H (AKZO NOBEL NV [NL]) 07 dezembro 1999 (1999-12-07)</p> <p>Abstract, Table 1.</p>	1 to 21
X	<p>ZUCKER-FRANKLIN, D. <i>et al.</i> Reexamination of human T cell lymphotropic virus (HTLV-I/II) prevalence. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997, Vol. 94, N° 12, páginas 6403-6407. ISSN 1091-6490.</p> <p>Abstract, Table 1.</p>	1 to 21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/BR2015/050161

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>PANCAKE, B. A. <i>et al.</i> The cutaneous T cell lymphoma, mycosis fungoides, is a human T cell lymphotropic virus-associated disease. A study of 50 patients. J. Clin. Invest. 1995, Vol. 95, páginas 547-554. ISSN:1558-8238.</p> <p>Abstract, page 548 (last paragraph), Figure 1.</p> <p>-----</p>	1 to 21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/BR2015/050161

US 7566532 B1	2009-07-28	None	
US 6218522 B1	2001-04-17	AU 699275 B2 AU 4956596 A CA 2216428 A1 CN 1184506 A EP 0818536 A1 US 6090783 A WO 9630522 A1	1998-11-26 1996-10-16 1996-10-03 1998-06-10 1998-01-14 2000-07-18 1996-10-03
US 6406841 B1	2002-06-18	US 2002042045 A1 AU 7320594 A AU 7868998 A CA 2166291 A1 EP 0710295 A1 JP H08511954 A WO 9501457 A1	2002-04-11 1995-01-24 1998-10-22 1995-01-12 1996-05-08 1996-12-17 1995-01-12
WO 9108308 A1	1991-06-13	AT 147792 T DE 69029740 D1 EP 0504278 A1 JP H05504475 A	1997-02-15 1997-02-27 1992-09-23 1993-07-15
US H1825 H	1999-12-07	None	

A. CLASSIFICAÇÃO DO OBJETO
C12Q 1/68 (2006.01), C12N 15/11 (2006.01), C12N 15/33 (2006.01)

De acordo com a Classificação Internacional de Patentes (IPC) ou conforme a classificação nacional e IPC

B. DOMÍNIOS ABRANGIDOS PELA PESQUISA

Documentação mínima pesquisada (sistema de classificação seguido pelo símbolo da classificação)

C12Q

Documentação adicional pesquisada, além da mínima, na medida em que tais documentos estão incluídos nos domínios pesquisados

Base de dados eletrônica consultada durante a pesquisa internacional (nome da base de dados e, se necessário, termos usados na pesquisa)

EPODOC, NPL, MEDLINE, GENESEQ, USGENE, WOGENE

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoria*	Documentos citados, com indicação de partes relevantes, se apropriado	Relevante para as reivindicações Nº
X A	US 7566532 B1 (QUEST DIAGNOSTICS INVEST INC [US]) 28 julho 2009 (2009-07-28) SEQ ID nº 11.	1, 2, 4, 5, 17 3, 6 a 16, 18 a 21
X A	US 6218522 B1 (SHIONOGI CO [US]) 17 abril 2001 (2001-04-17) SEQ ID nº 1.	1, 2, 17 3 a 16, 18 a 21
X A	US 6406841 B1 (ABBOTT LAB [US]) 18 junho 2002 (2002-06-18) SEQ ID nº 1.	1, 2, 4, 5, 17 3, 6 a 16, 18 a 21
X	KWOK, S. <i>et al.</i> Characterization of a sequence of human T cell leukemia virus type I from a patient with chronic progressive myelopathy. J Infect Dis. 1988, Vol. 158. Nº. 6, páginas 1193-1197. ISSN: 1537-6613. Resumo, página 1195 (segunda coluna), Tabela 1, Figura 2.	1 a 21

Documentos adicionais estão listados na continuação do quadro C

Ver o anexo de famílias das patentes

* Categorias especiais dos documentos citados:

"A" documento que define o estado geral da técnica, mas não é considerado de particular relevância.

"E" pedido ou patente anterior, mas publicada após ou na data do depósito internacional

"L" documento que pode lançar dúvida na(s) reivindicação(ões) de prioridade ou na qual é citado para determinar a data de outra citação ou por outra razão especial

"O" documento referente a uma divulgação oral, uso, exibição ou por outros meios.

"P" documento publicado antes do depósito internacional, porém posterior a data de prioridade reivindicada.

"T" documento publicado depois da data de depósito internacional, ou de prioridade e que não conflita como depósito, porém citado para entender o princípio ou teoria na qual se baseia a invenção.

"X" documento de particular relevância; a invenção reivindicada não pode ser considerada nova e não pode ser considerada envolver uma atividade inventiva quando o documento é considerado isoladamente.

"Y" documento de particular relevância; a invenção reivindicada não pode ser considerada envolver atividade inventiva quando o documento é combinado com outro documento ou mais de um, tal combinação sendo óbvia para um técnico no assunto.

"&" documento membro da mesma família de patentes.

Data da conclusão da pesquisa internacional

25/11/2015

Data do envio do relatório de pesquisa internacional:

08/12/2015

Nome e endereço postal da ISA/BR



INSTITUTO NACIONAL DA
 PROPRIEDADE INDUSTRIAL
 Rua Sao Bento nº 1, 17º andar
 cep: 20090-010, Centro - Rio de Janeiro/RJ

Nº de fax:

+55 21 3037-3663

Funcionário autorizado

Flávia Riso Rocha

Nº de telefone:

+55 21 3037-3493/3742

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoria*	Documentos citados, com indicação de partes relevantes, se apropriado	Relevante para as reivindicações N°
X	<p>TAMEGÃO-LOPES, B. P. <i>et al.</i> Carga proviral do HTLV-1 e HTLV-2: um método simples através da PCR quantitativa em tempo real. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2006, Vol.39, n.6, páginas 548-552. ISSN 1678-9849.</p> <p>Resumo, página 549 (segunda coluna), Tabela 1.</p>	1 a 21
X	<p>DEHÉE, A. <i>et al.</i> Quantitation of HTLV-I proviral load by a TaqMan real-time PCR assay. J. Virol. Methods. 2002. Vol. 102, n° 1-2, páginas 37-51. ISSN: 0166-0934.</p> <p>Resumo, página 38 (primeiro parágrafo da segunda coluna), página 39 (subitem 2.3, 2.4, 2.5), primeiro parágrafo do subitem 3.1, página 47 (primeira coluna), Figura 1.</p>	1 a 21
X	<p>WATERS, A. <i>et al.</i> Multiplex real-time PCR for the detection and quantitation of HTLV-1 and HTLV-2 proviral load: addressing the issue of indeterminate HTLV results. J Clin Virol. 2011, Vol. 52, No. 1, páginas 38-44. doi: 10.1016/j.jcv.2011.05.022.</p> <p>Citado na descrição.</p> <p>Resumo, Tabela 1, Figura 3.</p>	1 a 21
X	<p>ALTAMIRANO, N. A. <i>et al.</i> Quantitation of HTLV-I proviral load by a real-time PCR assay using SYBR Green: comparison of two methods for DNA isolation. J Virol Methods. 2010, Vol. 170, páginas 160-164. doi: 10.1016/j.jviromet.2010.08.021.</p> <p>Resumo, página 161 (segundo parágrafo), página 162 (primeiro parágrafo).</p>	1 a 21
X	<p>COSTA, E. A. <i>et al.</i> (2011) The best algorithm to confirm the diagnosis of HTLV-1 and HTLV-2 in at-risk individuals from São Paulo, Brazil. J Virol Methods. 2011, Vol. 173, No. 2, páginas 280-6. doi: 10.1016/j.jviromet.2011.02.018.</p> <p>Citado na descrição.</p> <p>Resumo, página 281 (subitem 2.3.3), página 285 (último parágrafo), Tabela 1.</p>	1 a 21
X	<p>WO 9108308 A1 (PHARMACIA GENETIC ENG [US]) 13 junho 1991 (1991-06-13)</p> <p>Resumo, reivindicações 28 a 31, Tabela 1 (página 31), páginas 52 a 54.</p>	1 a 21
X	<p>US H1825 H (AKZO NOBEL NV [NL]) 07 dezembro 1999 (1999-12-07)</p> <p>Resumo, Tabela 1.</p>	1 a 21
X	<p>ZUCKER-FRANKLIN, D. <i>et al.</i> Reexamination of human T cell lymphotropic virus (HTLV-I/II) prevalence. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997, Vol. 94, N° 12, páginas 6403-6407. ISSN 1091-6490.</p> <p>Resumo, Tabela 1.</p>	1 a 21

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoria*	Documentos citados, com indicação de partes relevantes, se apropriado	Relevante para as reivindicações Nº
X	<p>PANCAKE, B. A. <i>et al.</i> The cutaneous T cell lymphoma, mycosis fungoides, is a human T cell lymphotropic virus-associated disease. A study of 50 patients. J. Clin. Invest. 1995, Vol. 95, páginas 547-554. ISSN:1558-8238.</p> <p>Resumo, página 548 (último parágrafo), Figura 1.</p> <p>-----</p>	1 a 21

RELATÓRIO DE PESQUISA INTERNACIONAL
 Informação relativa a membros da família de patentes

Depósito internacional Nº

PCT/BR2015/050161

Documentos de patente citados no relatório de pesquisa	Data de publicação	Membro(s) da família de patentes	Data de publicação
US 7566532 B1	2009-07-28	Nenhum	
US 6218522 B1	2001-04-17	AU 699275 B2 AU 4956596 A CA 2216428 A1 CN 1184506 A EP 0818536 A1 US 6090783 A WO 9630522 A1	1998-11-26 1996-10-16 1996-10-03 1998-06-10 1998-01-14 2000-07-18 1996-10-03
US 6406841 B1	2002-06-18	US 2002042045 A1 AU 7320594 A AU 7868998 A CA 2166291 A1 EP 0710295 A1 JP H08511954 A WO 9501457 A1	2002-04-11 1995-01-24 1998-10-22 1995-01-12 1996-05-08 1996-12-17 1995-01-12
WO 9108308 A1	1991-06-13	AT 147792 T DE 69029740 D1 EP 0504278 A1 JP H05504475 A	1997-02-15 1997-02-27 1992-09-23 1993-07-15
US H1825 H	1999-12-07	Nenhum	