



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

(11) PI 0312342-1 B1



(22) Data do Depósito: 03/07/2003

(45) Data de Concessão: 11/02/2020

(54) Título: MÉTODO PARA DETECTAR E QUANTIFICAR UM ÁCIDO NUCLEICO DE HIV EM PELO MENOS UMA AMOSTRA DE SANGUE

(51) Int.Cl.: C12Q 1/68.

(30) Prioridade Unionista: 04/07/2002 EP 02077697.7.

(73) Titular(es): PRIMAGEN HOLDING B.V..

(72) Inventor(es): ESTHER REGINA DE ROOIJ; MARINUS PETRUS DE BAAR.

(86) Pedido PCT: PCT NL2003000491 de 03/07/2003

(87) Publicação PCT: WO 2003/080869 de 02/10/2003

(85) Data do Início da Fase Nacional: 30/12/2004

(57) Resumo: "MÉTODO PARA DETECTAR UM ÁCIDO NUCLEICO DE INTERESSE EM PELO MENOS UMA AMOSTRA, USO DE UM VEÍCULO SÓLIDO SECO PROVIDO COM UMA AMOSTRA, KIT DE PARTES PARA DETECTAR, IDENTIFICAR E/OU QUANTIFICAR UM ÁCIDO NUCLEICO DE INTERESSE EM UMA AMOSTRA, E, VEÍCULO SÓLIDO" A invenção provê um método para detectar um ácido nucleico de interesse em pelo menos uma amostra, compreendendo administrar a referida amostra a um veículo sólido capaz de pelo menos em parte absorver a referida amostra, secar o referido veículo, prover pelo menos uma parte representativa do referido veículo para uma solução de isolamento de ácido nucleico de modo que uma quantidade representativa de referido ácido nucleico é extraída do referido veículo, e detectar a referida quantidade representativa do referido ácido nucleico. Com o método da invenção, uma amostra, como uma amostra de fluido corporal, é estabilizada de tal modo que ela pode ser expedida do sítio da coleta (por exemplo, o hospital ou laboratório local em um país menos desenvolvido) e ser enviada para um laboratório de testes por serviço postal em algum outro lugar no mundo por meios logísticos normais. Preferivelmente, pelo menos 100 109>l, mais preferivelmente pelo menos 250 109>l de amostra são administrados ao referido (...).

“MÉTODO PARA DETECTAR E QUANTIFICAR UM ÁCIDO NUCLEICO DE HIV EM PELO MENOS UMA AMOSTRA DE SANGUE”

5 A invenção refere-se ao campo da medicina. Mais particularmente, a invenção refere-se a diagnóstico. A invenção refere-se especialmente à detecção e/ou quantificação de um ácido nucleico de interesse em uma amostra.

10 As infecções com patógenos são comumente observadas no mundo todo. Estas infecções, por exemplo, incluem infecções virais, bacterianas, fúngicas e parasíticas. O diagnóstico prematuro de uma infecção é com frequência preferido para um tratamento eficaz, que pode evitar severos sintomas patológicos. Às vezes, o diagnóstico prematuro é um pré-requisito para uma possibilidade de tratamento, para prolongar o tempo de vida e/ou para melhorar a qualidade de vida. Os exemplos destas infecções
15 compreendem vírus de hepatite C, vírus de hepatite B, tuberculose, malária e HIV, como HIV-1.

A epidemia de HIV-1 se espalha rapidamente no mundo todo e com a difusão do vírus, os subtipos circulantes do vírus HIV-1 não são mais limitados a uma área geográfica no mundo. Este desenvolvimento requer a
20 aplicação de testes diagnósticos (ácido nucleico) que possam detectar todos os subtipos de vírus HIV com igual acurácia e precisão.

A globalização da epidemia e especialmente a severidade em países de poucos recursos (África sub-saariana, e sudeste da Ásia) tem levado os países desenvolvidos a auxiliar no combate à infecção nos países menos
25 desenvolvidos com programas de acesso a fármacos. No entanto, a fim de ajudar de modo eficaz às pessoas infectadas com HIV-1 no mundo menos

desenvolvido, é necessário desenvolver no local um diagnóstico apropriado, por exemplo para monitorar a eficácia de um tratamento. Estes diagnósticos apropriados são especialmente os testes de carga viral que medem a quantidade de RNA de HIV-1 em um fluido corporal, como sangue, plasma de sangue, leite materno, sêmen, fluido linfático, cuspe, líquidos, saliva e/ou urina de indivíduos infectados. Do mesmo modo, os testes de carga de ácido nucleico apropriados são desejados para outras doenças relacionadas com infecção.

O estado atual de testes de carga de ácido nucleico apropriados é de tal elevado padrão técnico que estes não são facilmente transferidos para áreas localizadas em distância considerável dos recursos tecnológicos, como na África sub-saariana e sudeste da Ásia. Isto requer um investimento significativo em infra-estrutura que é impossível no ambiente destas regiões. Uma solução alternativa é uma análise das amostras de pacientes em laboratórios no mundo desenvolvido (por exemplo Europa e América do Norte). Esta alternativa é, no entanto, impossível de colocar em prática devido aos problemas logísticos. As amostras de fluido corporal, como amostras de sangue ou plasma de sangue, de indivíduos precisam ser expedidas para o laboratório em condições congeladas em temperaturas bem abaixo de 0°C, geralmente em uma caixa com gelo seco. Este modo de enviar material clínico é muito caro e requer a disponibilidade de gelo seco no local da expedição. O último não é com frequência o caso em países do mundo menos desenvolvido. Devido aos custos e a falta de disponibilidade de gelo seco, o teste remoto de amostras em laboratórios (“testes por serviço postal”) não é uma opção para estes países e para as pessoas infectadas nestes países. Os programas de acesso a fármacos para países menos desenvolvidos podem somente alcançar sucesso se o diagnóstico for otimizado.

A invenção provê um método para detectar um ácido nucleico de interesse em pelo menos uma amostra, compreendendo:

- administrar a referida amostra a um veículo sólido capaz de pelo menos em parte absorver referida amostra,

- secar o referido veículo,

5 - prover pelo menos uma parte representativa de referido veículo a uma solução de isolamento de ácido nucleico de modo que uma quantidade representativa de referido ácido nucleico é extraída do referido veículo; e

- detectar a referida quantidade representativa de referido ácido nucleico.

10 Com um método da invenção, uma amostra, como uma amostra de fluido corporal, é estabilizada em tal modo que ela pode ser expedida do sítio da coleta (por exemplo o hospital local ou laboratório em um país menos desenvolvido) e ser enviada a um laboratório de testes por serviço postal em qualquer lugar do mundo por meios logísticos normais, por
15 exemplo correio normal. O referido método torna possível a expedição de uma amostra seca via correio terrestre para um laboratório remoto para a detecção de um ácido nucleico de interesse presente em uma amostra.

20 Um método da invenção pode ser realizado com técnicas conhecidas na técnica. Por exemplo, uma quantidade definida de amostra líquida pode ser administrada a um veículo sólido usando uma pipeta. O referido veículo sólido não é crítico e pode compreender qualquer veículo sólido conhecido na técnica, contanto que ele seja capaz de, pelo menos em parte, absorver referida amostra. Por exemplo, a referida amostra sólida pode compreender sílica. Preferivelmente, no entanto, o referido veículo sólido
25 compreende papel de filtro. Um papel de filtro é bem capaz de absorver uma amostra líquida, apesar de ser de peso leve. Isto é muito importante para serviços postais. O referido papel de filtro pode compreender nivelar o papel de filtro não tratado como o papel 903 de Schleicher & Schuell, ou papel de filtro tratado que imobiliza ácido nucleico para uma purificação rápida. Os

dois exemplos no campo são papéis IsoCode de Schleicher & Schuell ou papel tratado FTA de Whatman, os quais são bactericidas, fungicidas e virucidas, inibem o crescimento de bactérias e fungos e exterminam vírus que entram em contacto com a matriz, permitindo um manuseio da amostra seguro e a estabilidade da amostra. Outro exemplo de um veículo apropriado para armazenar e transportar amostras secas de fluido é um dispositivo projetado por Lifestock (US 5139742). Este dispositivo contém uma lâmina pequena com um tubo capilar diretamente fixado à mesma, que possibilita a coleta, a armazenagem e o transporte de sangue que seca no tubo capilar, desse modo comparável ao método com o papel de filtro.

O referido veículo pode ser secado por diferentes técnicas conhecidas na técnica. Preferivelmente a referida amostra é secada ao ar. Isto é barato e eficaz.

Por uma parte representativa de um veículo entende-se uma parte que é indicativa para a quantidade de amostra administrada ao referido veículo sólido. Por exemplo referida parte representativa também pode compreender metade da quantidade de referida amostra. Neste caso, a outra metade pode ser usada para realizar uma segunda experiência. A referida segunda experiência pode ser uma experiência diferente ou pode ser uma experiência similar. No último caso, certo resultado pode ser obtido *in duplo*, que é mais exato.

Por uma quantidade representativa de ácido nucleico entende-se uma quantidade que é indicativa para a quantidade de ácido nucleico presente em referida amostra. A referida quantidade representativa pode compreender a quantidade total de referido ácido nucleico presente em referida amostra. Alternativamente, a referida quantidade representativa pode compreender uma parte de referido ácido nucleico presente em referida amostra.

Preferivelmente, provê-se um método da invenção em que pelo

menos 100 µl de amostra são administrados ao referido veículo. Mais preferivelmente, pelo menos 250 µl de amostra são administrados ao referido veículo. Mais preferivelmente, pelo menos 500 µl de amostra são administrados ao referido veículo. Com um volume elevado de amostra, títulos baixos de ácido nucleico de interesse podem ser detectados. Um inconveniente maior nos métodos de detecção atuais é que somente ácido nucleico com uma concentração acima de certo valor limiar pode ser detectado. Isto significa que os indivíduos infectados com uma baixa carga de ácido nucleico patogênico não são diagnosticados como estando infectados e, assim, não obtêm tratamento em um momento inicial apropriado. Até a presente invenção, quantidades elevadas de amostras de fluidos do corpo, como amostras de sangue ou plasma, não eram apropriadas para teste porque eram observados efeitos inibitórios. Por exemplo, descreve-se que hemoglobina e anidrase carbônica presentes no sangue total interferem com a reação de cadeia de polimerase (4). Misturas de PCR tornaram-se de cor marrom profundo por causa da eluição de hemes e seus produtos de degradação dos mata-borrões de filtro (5). Para melhorar a amplificação PCR, as amostras foram tratadas com metanol antes da reação PCR (6). Isto envolve uma etapa extra, com risco de contaminações e resultados de teste menos confiáveis. Além disso, íons metal quelantes são descritos como atuando como catalisadores para a ruptura de DNA em uma temperatura elevada com baixa resistência iônica (7).

Surpreendentemente, com um método da invenção, quantidades elevadas de amostra podem ser armazenadas em um veículo sólido seco e subsequente analisadas. Nenhum dos efeitos inibitórios acima mencionados é observado e o tratamento com metanol como uma medida preventiva não é necessário. Com um método da invenção é agora possível analisar amostras grandes para a presença de um ácido nucleico de interesse. Conseqüentemente, baixas concentrações de um ácido nucleico de

interesse em uma amostra podem ser agora detectadas. Um método da invenção é apropriado para triar indivíduos para a presença de um ou mais patógenos específicos, como HIV-1. Alternativamente, um indivíduo sofrendo de uma doença, ou em risco de sofrer de uma doença, pode ser investigado com um método da invenção. Uma vez que um ou mais ácido (s) nucleico (s) estranhos são encontrados, pode ser determinado a que tipo de microorganismo ele pertence. Isto pode, por exemplo, ser feito por protocolos de hibridização usando diferentes tipos de sondas. Alternativamente, técnicas para determinar a sequência do ácido nucleico e analisar esta sequência para homologia com quaisquer outras sequências podem ser realizadas. Em uma forma de realização, a invenção conseqüentemente provê um método da invenção, compreendendo identificar o referido ácido nucleico de interesse.

Ainda em outra forma de realização, provê-se um método da invenção em que referido ácido nucleico é quantificado. Surpreendentemente, não somente é possível com um método de a invenção detectar um ácido nucleico de interesse, mas também determinar a quantidade de referido ácido nucleico em referida amostra. Com um método da invenção, nenhuma quantidade significativa de ácido nucleico é perdida/ rompida durante a armazenagem e/ou durante o processo de isolamento e/ou detecção. No exemplo mostra-se que, se se usar um método da invenção, uma quantidade medida de um ácido nucleico de interesse de uma amostra seca armazenada em um veículo sólido é comparável à quantidade medida de referido ácido nucleico de interesse quando referida amostra é diretamente submetida à análise.

Amostras secas em um veículo sólido podem ser agora investigadas para a quantidade de ácido nucleico patogênico presente. Assim, não somente a presença, mas também o estágio de uma doença, podem ser agora determinados. Agora é possível diagnosticar indivíduos de regiões com instalações insuficientes, como habitantes de países de poucos recursos. Uma

amostra de fluido do corpo, como uma amostra de sangue, pode ser coletada em um veículo sólido como um papel de filtro. O referido papel de filtro pode ser enviado a um laboratório, por exemplo na Europa Ocidental. Subseqüentemente, a quantidade de um ácido nucleico de interesse pode ser determinada e, assim, o estado da doença. Também pode ser determinado se um tratamento é eficaz determinando se a quantidade de referido ácido nucleico declina com o passar do tempo.

Em um aspecto, a invenção fornece um método da invenção em que referido veículo sólido é provido com pelo menos duas amostras.

Preferivelmente, as referidas amostras são obtidas do mesmo indivíduo. Mais preferivelmente, as referidas amostras são obtidas do mesmo fluido do corpo de referido indivíduo. As referidas amostras podem, por exemplo, compreender duas alíquotas de sangue. Cada uma de referidas amostras de sangue pode ser testada independentemente por um método da invenção.

Deste modo, a presença e/ou a quantidade de um ácido nucleico de interesse no sangue de referido indivíduo pode ser testada *in duplo*. Isto resulta em resultados mais exatos. Além disso, cada amostra pode ser testada por pessoas diferentes/ institutos diferentes. Erros feitos pelos indivíduos e/ou erros por causa de equipamento não confiável podem ser revelados por uma segunda medição independente.

Em uma forma de realização alternativa, a referidas duas amostras são usadas para fins diferentes. Por exemplo, uma amostra pode ser testada para a quantidade de ácido nucleico viral, enquanto a outra amostra pode ser testada para a quantidade de ácido nucleico bacteriano. Ambas as amostras podem ser usadas para obter relações entre ácido nucleico viral e DNA cromossômico (como é importante para CMV), ou para relação entre DNA/RNA mitocondrial versus celular ou para determinar relações envolvendo mRNA's ou RNA's rebossômicos. Muitos destes testes, no entanto, também podem ser realizados usando somente uma amostra.

Em uma forma de realização, o referido veículo sólido compreende uma série de pelo menos duas amostras, coletadas em pontos de tempo diferentes. Deste modo, o curso de uma doença pode ser acompanhado com o passar do tempo. Esta forma de realização também é particularmente

5 apropriada para determinar se um tratamento é eficaz. Por exemplo, uma amostra pode ser administrada ao referido veículo sólido no início de um tratamento, e em intervalos regulares depois. Deste modo, o referido veículo sólido não somente serve para o fim de dispositivo de transporte, mas também para armazenagem apropriada em temperaturas ambientes sem degradação do

10 ácido nucleico de interesse. O veículo sólido pode ser enviado a um instituto apropriado após uma determinada quantidade de tempo. Pode, então, ser estabelecido se um tratamento é eficaz quantificando-se a quantidade de ácido nucleico patogênico em cada amostra por um método da invenção. Pode-se assim ser estabelecido se a referida quantidade declina com o tempo.

15 Do mesmo modo, amostras podem ser coletadas de indivíduos doentes em intervalos regulares. A quantidade de ácido nucleico patogênico em cada amostra pode, subseqüentemente, ser quantificada. Isto provê uma visão mais profunda do curso de referida doença; por exemplo, se a quantidade de ácido nucleico patogênico aumenta com o passar do tempo, etc.

20 Não é necessário enviar cada amostra separadamente ao referido instituto. Um número das mesmas pode ser coletado com passar do tempo e enviado de uma só vez. Isto economiza tempo e dinheiro. Além disso, devido às referidas amostras serem enviadas juntas, nenhuma armazenagem e classificação de amostras enviadas separadamente é

25 necessária. Um risco de perda de amostras é diminuído.

Para ainda quantificar mais exatamente uma quantidade de ácido nucleico de interesse com um método da invenção, uma quantidade conhecida de um ácido nucleico de referência pode ser administrada ao referido veículo sólido. O referido ácido nucleico de referência pode ser

quantificado, bem como um ácido nucleico de interesse. A exatidão de uma quantificação de um ácido nucleico de interesse pode ser determinada comparando-se uma quantidade medida de referido ácido nucleico de referência com a quantidade administrada de referido ácido nucleico de referência. Se a referida quantidade medida difere levemente da quantidade administrada, o mesmo provavelmente deve ser verdadeiro para o referido ácido nucleico de interesse. Assim, uma quantidade medida de referido ácido nucleico de interesse pode ser corrigida para obter um resultado ainda mais exato.

5

10

Além disso, com um ácido nucleico de referência, uma parte representativa compreendendo uma parte de uma amostra pode ser determinada. Se uma parte representativa compreendendo uma parte de referida amostra é provida ao referido tampão de isolamento de ácido nucleico, e a quantidade medida de ácido nucleico de referência parece ser um

15 terço da quantidade administrada, indica que a quantidade medida de um ácido nucleico de interesse também é de aproximadamente um terço da quantidade presente em referida amostra. Assim, um ácido nucleico de referência mostra com qual fator uma quantidade medida de ácido nucleico da invenção deve ser multiplicada se uma parte de referida amostra for provida

20 ao referido tampão de isolamento de ácido nucleico. Prefere-se um ácido nucleico de referência que se espalha junto com referido veículo sólido essencialmente do mesmo modo como referido ácido nucleico de interesse.

15

20

25

Neste caso, não se nota nenhuma diferença significativa que parte de referido veículo sólido seja usada em um método da invenção. Outro modo de quantificação exata do ácido nucleico de interesse é relacionando a mesma à quantidade de outros ácidos nucleicos. Deste modo é possível, tanto na mesma reação como em reações separadas, tanto na mesma amostra como em uma das outras amostras, estabelecer uma relação entre qualquer DNA e DNA, qualquer RNA e DNA ou vice-versa, e qualquer RNA e marcação de

RNA. A invenção pode compreender aplicações para determinar a relação entre ácidos nucleicos do hospedeiro, por exemplo a quantidade de DNA mitocondrial versus DNA nuclear, como uma medida de resposta a certa terapia de HIV, ou entre ácidos nucleicos de um patógeno versus os do hospedeiro, por exemplo, a quantidade de DNA CMV versus DNA nuclear do hospedeiro. Outras aplicações podem compreender a quantidade de mRNA por célula no campo de traçado do perfil de expressão de genes.

10 A invenção ainda provê um método da invenção em que referida parte representativa compreende essencialmente o total de referida pelo menos uma amostra. Mostra-se pela presente invenção que, mesmo com uma amostra grande, uma quantificação e/ou detecção confiável de um ácido nucleico de interesse é possível com um método da invenção. Se o total de uma amostra grande for usado, concentrações ainda mais baixas de ácido nucleico podem ser detectadas e quantificadas.

15 Uma parte representativa de referido veículo pode ser provida cortando-se um ponto visível de um veículo sólido tal como um papel de filtro. Este corte pode ser feito usando uma tesoura normal, mas também pode ser completamente automático, por exemplo, usando equipamento de Wallack para perfurar superfícies iguais do veículo sólido. Outro modo de facilitar este

20 tipo de perfuração manual, pode ser pré-perfurar referido veículo sólido, após o que a amostra é aplicada e secada. Na chegada ao laboratório para análise, esta parte pré-perfurada pode ser facilmente perfurada completamente tanto por dispositivos especialmente projetados, como por dispositivos existentes como um tubo Safelock de Eppendorf. Também, uma parte representativa de

25 referido ponto pode ser usada. No entanto, prefere-se usar o veículo completo, uma vez que é então assegurada a medida da amostra completa. De acordo com a presente invenção, um veículo sólido como papel de filtro não influencia significativamente uma detecção e/ou quantificação de um ácido nucleico de interesse. Conseqüentemente, prefere-se um método da invenção

em que referida parte representativa compreenda essencialmente o total de referido veículo sólido.

Se, em um método da invenção, o referido veículo sólido for provido com pelo menos duas amostras, a referida parte representativa compreende preferivelmente uma de referidas amostras. A referida parte representativa pode ser usada para detectar e/ou quantificar um ácido nucleico de interesse. Como se explica acima, uma parte representativa compreendendo referida segunda amostra pode ser usada para uma medição *in duplo*. Alternativamente, uma outra medição pode ser realizada.

Em um aspecto, provê-se um método da invenção em que referida solução de isolamento de ácido nucleico compreende um tampão de lise de isolamento de ácido nucleico caotrópico. Mais preferivelmente, é usado um tampão de isolamento de ácido nucleico, como descrito por Boom et al. Preferivelmente, o referido veículo sólido compreende um papel de filtro, uma vez que papel de filtro é barato, tem capacidade de absorver uma amostra líquida e peso leve, o que facilita o transporte. Tipicamente, a eluição de referido ácido nucleico leva pelo menos 30 minutos em temperatura ambiente ou ainda menos em temperaturas elevadas, enquanto ácido nucleico de um fluido corporal que é aplicado diretamente ao tampão de lise é tipicamente liberado em 10 minutos. Temperaturas elevadas facilitarão a eluição eficaz e rápida do ácido nucleico do veículo sólido.

Um método da invenção é particularmente apropriado para detectar ácido nucleico viral, especialmente ácido nucleico retroviral. Ácido nucleico viral pode estar presente em um estágio latente, que pode durar um tempo considerável. Além disso, um vírus como HIV, HTLV e HHV está freqüentemente presente durante um tempo considerável dentro de um indivíduo antes de referido indivíduo experimentar quaisquer sintomas significativos. Durante este tempo, o referido vírus já é transmissível a outras pessoas. Além disso, tratamento em um estágio inicial pode melhorar uma

chance de recuperação, prolongar um tempo de vida e/ou melhorar a qualidade de vida. Assim, é particularmente importante verificar um indivíduo para a presença de ácido nucleico viral com um método da invenção. Ácidos nucleicos virais a serem detectados incluem seqüências de

5 hepatite A, B, C, parvovírus, etc. Preferivelmente, o referido ácido nucleico viral compreende HIV e/ou HTLV. Mais preferivelmente, o referido ácido nucleico viral compreende HIV-1.

Em uma forma de realização provê-se um método da invenção, em que o referido método compreende genotipar um mutante. Isto é especialmente utilizável para organismos com um genoma de mudança rápida, como (retro) vírus. Genotipagem é, por exemplo, utilizável para determinar se certo tratamento é provável de ser apropriado para um paciente individual. Além disso, se um novo mutante for encontrado, uma preparação farmacêutica existente pode ser adaptada, ou um novo medicamento pode ser

10 desenvolvido.

Um método da invenção é particularmente apropriado para detectar um ácido nucleico de interesse em um fluido do corpo, como sangue, plasma, leite materno, sêmen, fluido linfático, soro, cuspe, líquidos, saliva e/ou urina. Uma amostra deste fluido do corpo é fácil de obter. A obtenção da

15 amostra não causa muito inconveniente a um indivíduo, o que pode ser o caso se, por exemplo, for realizada uma biópsia. Além disso, a obtenção de uma amostra de fluido do corpo não requer equipamento especial, que freqüentemente está em falta em países menos desenvolvidos e em áreas remotas. Preferivelmente, provê-se um método da invenção em que referida

20 amostra compreende uma gotícula de sangue total de uma punção no dedo ou no calcanhar. A punção no dedo ou no calcanhar é comumente coletada de recém-nascidos, de modo que referido material se encontra muitas vezes disponível sem outro incômodo aos indivíduos. Em outra forma de realização preferida, a referida amostra é uma amostra de plasma. Uma amostra de

plasma permite a medição mais exata de uma quantidade de partículas isentas de vírus, enquanto, por exemplo, uma amostra de sangue também inclui ácido nucleico viral integrado nas células. A medição de partículas isentas de vírus, essencialmente sem ácido nucleico viral integrado nas células, é particularmente indicativa para características como virulência viral, difusão viral, etc. Assim, uma amostra de plasma é especialmente preferida se estas características precisarem ser determinadas.

Para certificar-se de que pelo menos a quantidade minimamente necessária de fluidos do corpo é coletada, uma superfície predeterminada pode ser impressa ou aplicada de qualquer outro modo ao veículo sólido. O significado é que a superfície será totalmente carregada com o fluido corporal requerido. Uma vez que um volume igual de sangue total resultará em uma superfície coberta menor do que uma quantidade similar de fluidos do corpo, por exemplo, soro, ou leite materno, pode ser necessário ter várias superfícies impressas para vários fluidos do corpo no mesmo veículo sólido, ou ter veículos especificamente projetados para certos fluidos do corpo. Deste modo, assegura-se que, no mínimo, a quantidade correta de fluido do corpo é coletada.

Para detecção de um ácido nucleico de interesse, freqüentemente uma etapa de amplificação (como PCR ou NASBA) é necessária. Ácido nucleico amplificado pode, subsequente, ser detectado usando métodos conhecidos na técnica. Um método da invenção, conseqüentemente, compreende preferivelmente uma etapa de amplificação. Preferivelmente, a referida amplificação compreende amplificação monitorada em tempo real. Ácido nucleico produzido é tornado diretamente visível durante a reação de amplificação. Isto pode, por exemplo, ser obtido por sondas moleculares ou outros tipos de sondas. Uma vez que estas sondas recombinaem em um gabarito, um sinal fluorescente pode ser gerado, que pode ser monitorado durante uma reação de amplificação. A intensidade de

fluorescência é indicativa para a quantidade de ácido nucleico gerada. Uma curva de calibragem pode ser criada usando quantidades conhecidas de ácido nucleico. Um sinal fluorescente de uma amostra com uma quantidade desconhecida de ácido nucleico pode então ser comparada com a referida

5 curva de calibragem. Deste modo, a quantidade de referido ácido nucleico na referida amostra pode ser determinada, porque a intensidade de fluorescência e a quantidade de ácido nucleico estão correlacionadas.

Em outra forma de realização, a referida detecção e/ou quantificação de ácido nucleico é realizada com um sistema de leitura de

10 ponto extremo. Este sistema compreende, por exemplo, uma detecção colorimétrica, um teste enzimático, e/ou um bastão de imersão.

A invenção também provê um uso de um veículo sólido seco provido com uma amostra para detectar, identificar e/ou quantificar um ácido nucleico de interesse na referida amostra. Como descrito anteriormente, o

15 referido veículo sólido seco pode ser armazenado e transportado facilmente, após o que detecção e quantificação de ácido nucleico confiável podem ser realizadas. Preferivelmente, o referido veículo sólido compreende pelo menos o equivalente de 100 µl de sangue ou um derivado do mesmo na forma secada. O referido veículo compreende mais preferivelmente 250 µl, mais

20 preferivelmente pelo menos 500 µl de sangue ou um derivado do mesmo em uma forma seca. Com um uso da invenção, um volume grande de amostra pode ser investigado, permitindo detecção e/ou quantificação de uma baixa concentração de ácido nucleico. Com um derivado de sangue entende-se pelo menos parte de um componente de sangue, como soro e/ou plasma. Sangue

25 que foi modificado artificialmente também está dentro do escopo de um derivado de sangue. O modo como se projeta o veículo sólido, ele pode bem conter o veículo propriamente dito que pode absorver o fluido do corpo, ligado a uma parte de papel ou superfície em que a informação pode ser escrita ou impressa, por exemplo, informação sobre o paciente, data de

amostragem ou mais datas de amostragem, regime de terapia, códigos de barra, números ID, etc. Tal superfície especificamente para este tipo de informação é sem dúvida ligada ao veículo com amostra, assegurando, assim, que a informação não será perdida. Tipicamente, este tipo de superfície pode
5 conter muito mais informação do que um tubo. Logicamente, qualquer variação neste tema é possível.

A invenção também compreende um kit de partes para detectar, identificar e/ou quantificar um ácido nucleico de interesse em uma amostra, compreendendo:

10 - um veículo sólido capaz de, pelo menos em parte, absorver referida amostra; e

- uma solução de isolamento de ácido nucleico.

Preferivelmente, o referido kit compreende ainda meios para amplificação de ácido nucleico. Referidos meios, compreendem, por exemplo,
15 meios para amplificação monitorada em tempo real e/ou meios para amplificação com detecção/ quantificação de ponto extremo. Um kit de partes da invenção é utilizável, por exemplo, em países com poucos recursos e hospitais. Estes hospitais podem distribuir os referidos veículos sólidos, como papéis de filtro, entre os habitantes de áreas remotas. Uma vez que as
20 amostras foram coletadas, elas podem ser armazenadas e transportadas para estes hospitais. Se o referido hospital for equipado apropriadamente, as referidas amostras podem ser investigadas usando a referida solução de isolamento de ácido nucleico. Naturalmente, também os hospitais dos países desenvolvidos podem usar um kit de partes da invenção para coletar e testar
25 uma amostra. Um kit de partes para detecção, identificação e/ou quantificação pode bem conter um conjunto de materiais necessários para extrair, com segurança, o fluido do corpo do paciente. Logicamente com fluidos corporais externos como urina, leite materno ou saliva, outras precauções de segurança deverão ser tomadas do que quando fluidos corporais internos são amostras

como sangue, plasma, soro, ou dreno linfático. Para os fluidos corporais internos, pode-se compor um kit que contém um veículo sólido capaz de, pelo menos em parte, absorver a referida amostra, e uma solução de isolamento de ácido nucleico, junto de um par de luvas para exame, um chumaço de álcool para limpar a pele, um dispositivo de punção de dedo ou calcanhar, uma bandagem, um envelope, por exemplo, com o endereço do laboratório destinatário, bem como com um espaço para um número de identificação ou código do paciente, e o interior revestido para um transporte seguro pelo correio, e um dessecador para manter a amostra seca e para evitar o crescimento fúngico ou bacteriano. Outras possibilidades para o dispositivo de coleta podem compreender dispositivos especialmente projetados para uso único, como um dispositivo descrito na patente número US 5139742: Disposable liquid testing device by Livestock Control Holding B.V. in Amersfoort, Países Baixos. É possível qualquer combinação destes itens, ou substituídos por qualquer outro tipo de itens/ dispositivos a serem usados para armazenagem e/ou transporte de qualquer ácido nucleico contendo fluidos corporais.

Um veículo sólido compreendendo pelo menos o equivalente a 500 µl de sangue ou um derivado do mesmo na forma seca também é provido aqui. Preferivelmente, o referido veículo sólido compreende pelo menos duas amostras. Se referidas amostras forem do mesmo tipo, as referidas amostras podem ser, ambas, testadas separadamente, resultando em um teste *in duplo*. Além disso, um resultado de um primeiro teste pode ser controlado testando-se independentemente a outra amostra. Alternativamente, as referidas amostras são usadas para diferentes fins.

Um veículo sólido da invenção compreendendo uma série de amostras obtidas em diferentes datas é também provido aqui. Como descrito acima, o veículo sólido é apropriado de modo a permitir acompanhar uma doença com o passar do tempo, e/ou para testar se um determinado tratamento

é eficaz. Preferivelmente, um veículo sólido da invenção compreende uma quantidade conhecida de um ácido nucleico de referência.

A invenção é ainda explicada no exemplo seguinte. O exemplo serve somente para elucidar a invenção. Ele não limita o escopo da invenção de nenhum modo. Formas de realização alternativas também estão dentro do escopo da presente invenção.

Exemplos

Exemplo 1

Sangue e plasma do sangue foram colocados em pontos em gotículas de 50 µl sobre papel 903 S&S (Schleicher & Schull) e secos ao ar. Simultaneamente, 200 µl das mesmas amostras de sangue e plasma foram diretamente adicionados ao tampão de lise, como descrito por Boom et al. (1990). Após secar, os pontos no papel de filtro foram mantidos em temperatura ambiente durante até 3 semanas e podem ser provavelmente mantidos em temperatura ambiente durante meses. Os pontos sobre o papel de filtro foram excisados com tesoura normal e administrados em um tubo contendo tampão de lise, como descrito por Boom et al. (1990). Os pontos no filtro de 50 µl de sangue ou plasma foram adicionados a três tubos diferentes: 1) um tubo de 50 ml contendo 9 ml de tampão de lise, 2) um tubo de 15 ml contendo 15 ml de tampão de lise ou 3) um tubo eppendorf de 1,5 ml contendo 1 ml de tampão de lise.

Os tubos foram agitados suavemente em uma plataforma de agitação, durante 3 horas, em temperatura ambiente. Durante esta incubação, o ponto de sangue ou plasma dissolve do papel de filtro no tampão de lise. Subseqüentemente, os filtros foram removidos dos tubos com pinças limpas. Entre os tubos, as pinças foram subseqüentemente limpas com água quente-cloro-água quente – 70% de álcool.

Aos tubos com tampão de lise e as amostras, cópias $1,10^6$ de uma molécula de RNA de controle de sistema foram adicionadas para

permitir a identificação de reações falso-negativas em um estágio posterior. O RNA de controle de sistema é amplificado com os mesmos iniciadores como o HIV-1 do tipo selvagem e detectado com uma sonda distinguível na reação. Devido a uma diferença, o RNA de controle de sistema pode somente ser amplificado e detectado na ausência (ou quantidades muito baixas) do RNA de HIV-1 do tipo selvagem.

O ácido nucleico agora presente no tampão de lise foi ainda purificado com o método descrito por Boom *et al.* (1990) ou com kits de isolamento dedicados obtidos de Qiagen (Qiagen GmbH, Max Volmer Strasse 4, 40724 Hilden, Alemanha) ou Biomerieux (anteriormente Organon Teknika, Boseind 15, 5281 RM Boxtel, Países Baixos) e usado de acordo com os protocolos do fabricante. O ácido nucleico isolado foi armazenado a -80°C até outra análise. Geralmente, 5 μl foram usados como material de entrada em reações de amplificação de NASBA determinando a quantidade de RNA de HIV-1, como descrito por De Baar *et al.* (1, 2).

Reações de amplificação de ácido nucleico de NASBA padrão foram realizadas em um volume de reação de 20 μl e continham: Tris 40 mM – pH 8,5, KCl 70 mM, MgCl_2 12 mM, ditioneitol 5 mM, dNTP's 1 mM (cada), rNTP's (cada) 2 mM, iniciador 2 μM (cada), (P1: AAT TCT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GAG AGG GGC GCC ACT GCT AGA GA e P2: CTC AAT AAA GCT TGC CTT GA), indicador molecular 0,05 μM para a sequência de HIV-1 do tipo selvagem (MB045: FAM-CGA CGT AGT AGT GTG TGC CCG TCT GTA CGT CG-dabcil), indicador molecular 0,05 μM para o RNA de controle de sistema (MB054: ROX-CCG ACT CTC TAC ACA CCA GAC AAA AAA CGA GTC GG-dabcil), indicador molecular 0,05 μM para a sequência de HIV-1 do tipo selvagem, indicador molecular 0,05 μM para o RNA de controle de sistema, 375 mM de sorbitol, 0,105 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de albumina de soro bovino, 6,4 unidades AMV RT, 32 unidades de polimerase de RNA T7, 0,08 unidades de H Rnase e ácido nucleico de

entrada. A mistura completa, exceto as enzimas, foi, antes de adicionar as enzimas, aquecida a 65°C a fim de desnaturar qualquer estrutura secundária no RNA e permitir que os iniciadores recombinem. Após resfriar a mistura a 41°C, as enzimas foram adicionadas. A amplificação é realizada a 41°C durante 90 min em um fluorímetro com termostato (CytoFluor 2000 ou EasyQ Reader) e o sinal fluorescente da sonda indicadora molecular foi medido a cada minuto.

Para obter a quantificação, uma série de diluições da sequência de marcação para um conjunto de iniciadores particular foi amplificada e os pontos de tempo no qual as reações tornaram-se positivas (o tempo para positividade, TTP) foram traçados em gráfico contra as quantidades de entrada de ácido nucleico. Assim, uma curva de calibragem foi criada, que pode ser usada para ler valores TTP de reações com quantidades desconhecidas de entrada e deduzir a quantidade de entrada.

Os resultados das determinações no exemplo 1 são mostrados na tabela 1 abaixo. Pelos resultados do RNA de controle de sistema, nota-se que não houve nenhum resultado falso negativo e todos os dados negativos descritos na tabela 1 são dados verdadeiros negativos resultantes da ausência de sequência de HIV-1 ou presença em concentrações abaixo do limite de detecção dos testes.

Paciente #	200 µl de plasma direto para tampão de lise	200 µl de sangue direto para tampão de lise	50 µl de plasma em pontos ^A	200 µl de plasma em pontos ^A	50 µl de sangue em pontos ^B	200 µl de sangue em pontos ^B
R02-05195	Neg.	Pos.	Neg.	Neg.	Neg.	LQL
R02-05260	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
R02-05179	3,84	Pos.	Pos.	3,86	Pos.	3,86
R02-05183	LQL	Pos.	Pos.	3,74	Pos.	LQL
R02-05240	3,79	Pos.	Pos.	3,86	Pos.	3,77
R02-05244	3,79	Pos.	Pos.	3,59	Pos.	LQL
R02-05265	3,20	Pos.	Neg.	LQL	Pos.	LQL
R02-05175	5,18	Pos.	Pos.	4,79	Pos.	4,76

A. Os resultados foram determinados quantitativamente como descrito no texto com medições de TTP. Os resultados são dados como o número Log. Neg. indica um resultado negativo, LQL indica um resultado positivo, mas muito baixo para quantificação exata.

B. As determinações de 200 µl de sangue direto para tampão de lise, 50 µl de plasma

em pontos e 50 µl de sangue em pontos não foram realizadas quantitativamente, somente qualitativamente, com tanto um resultado positivo (Pos.) como um negativo (Neg.).

Os dados na tabela 1 indicam claramente uma boa correlação entre os resultados obtidos com a admissão direta da amostra no tampão de lise comparado com os primeiros pontos da amostra no papel, secagem e depois admissão no tampão de lise.

Exemplo 2

Leite materno de 1 mulher, salpicado com vírus de 6 isolados diferentes em 4 concentrações foi colocado em pontos em 4 vezes em gotículas de 50 µl em papel 903 S&S (Schleicher & Schuell), seco ao ar e armazenado durante um mínimo de uma semana em temperatura ambiente. Após secar, os pontos no papel de filtro foram mantidos em temperatura ambiente durante até 3 semanas e podem ser provavelmente mantidos em temperatura ambiente durante meses. Simultaneamente, 200 µl das mesmas amostras de leite materno foram diretamente adicionados ao tampão de lise, como descrito por Boom et al. (1990). Os pontos sobre o papel de filtro foram excisados com tesoura normal e administradas a um tubo contendo 4 ml de tampão de lise, como descrito por Boom et al. (1990).

Os tubos foram agitados suavemente em uma plataforma de agitação, durante a noite, em temperatura ambiente. Durante esta incubação, o ponto seco dissolve do papel de filtro no tampão de lise. Subseqüentemente, os filtros foram removidos dos tubos com pinças limpas. Entre os tubos, as pinças foram subseqüentemente limpas com cloro-água quente – 70% de álcool.

Aos tubos com tampão de lise e amostra, 1.000.000 cópias de uma molécula de RNA de controle de sistema foram adicionadas para permitir identificação de reações falso-negativas em um estágio posterior. O RNA de controle de sistema é amplificado com os mesmos iniciadores como o HIV-1 do tipo selvagem e detectado com uma sonda distinguível na reação. Devido a uma diferença de comprimento, o RNA de controle de sistema pode

somente ser amplificado e detectado na ausência (ou quantidades muito baixas) do RNA de HIV-1 do tipo selvagem. O ácido nucleico agora presente no tampão de lise foi ainda purificado com o método descrito por Boom et al. (1990) ou com kits de isolamento dedicados obtidos de Qiagen (Qiagen GmbH, Max Volmer Strasse 4, 40724 Hilden, Alemanha) ou Biomerieux (anteriormente Organon Teknika, Boseind 15, 5281 RM Boxtel, Países Baixos) e usado de acordo com os protocolos do fabricante. O ácido nucleico isolado foi armazenado a -80°C até outra análise. Geralmente, 5 μl foram usados como entrada em reações de amplificação de NASBA determinando a quantidade de RNA de HIV-1, como descrito por De Baar et al.

Reações de amplificação de ácido nucleico NASBA padrão foram realizadas em um volume de reação de 20 μl e continham: Tris 40 mM – pH 8,5, KCl 70 mM, MgCl_2 12 mM, ditiotretol 5 mM, dNTP's (cada) 1 mM, rNTP's (cada) 2 mM, iniciador 0,2 μM (cada) (P1: AAT TCT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GAG AGG GGC GCC ACT GCT AGA GA e P2: CTC AAT AAA GCT TGC CTT GA), 0,05 μM de indicador molecular para a sequência de HIV-1 do tipo selvagem (MB045: FAM-CGA CGT AGT AGT GTG TGC CCG TCT GTA CGT CG-dabcil), 0,05 μM de indicador molecular para o RNA de controle de sistema (MB054: ROX-CCG ACT CTC TAC ACA CCA GAC AAA AAA CGA GTC GG-dabcil), sorbitol 375 mM, 0,105 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de albumina de soro bovino, 6,4 unidades de AMV RT, 32 unidades de polimerase de RNA T7, 0,08 unidades de H RNase e ácido nucleico de entrada. A mistura completa, exceto as enzimas foi, antes de adicionar as enzimas, aquecida a 65°C a fim de desnaturar qualquer estrutura secundária no RNA e permitir que os iniciadores recombinem. Após resfriar a mistura a 41°C , as enzimas foram adicionadas. A amplificação se realiza a 41°C durante 60 min em um fluorímetro com termostato (CytoFluor 2000 ou EasyQ Reader) e o sinal fluorescente da sonda indicadora molecular foi medido a cada minuto.

Para obter quantificação, uma série de diluições da sequência de marcação para um conjunto de iniciadores particular foi amplificada e os pontos de tempo no qual as reações tornaram-se positivas (o tempo para positividade, TTP) foram traçados em gráfico contra as quantidades de entrada de ácido nucleico. Assim, uma curva de calibragem foi criada, que

5 pode ser usado para ler os valores TTP de reações com quantidades desconhecidas de material de entrada e deduzir a quantidade de entrada.

Os resultados das determinações das mesmas amostras colocadas em pontos e adicionadas diretamente ao tampão de lise foram comparados e a análise é mostrada na figura 1 abaixo. Pelos resultados do RNA de controle de sistema parece que não houve nenhum resultado falso

10 negativo e todos os dados negativos descritos na figura 1 são dados verdadeiros negativos resultantes da ausência de sequência de HIV-1 ou presente em concentrações abaixo do limite de detecção dos testes.

15 Exemplo 3

Plasma de 88 indivíduos infectados com HIV-1 foi colocado em pontos em gotículas de 200 µl em papel 903 S&S (Schleiger & Schull) e seco ao ar e armazenado durante um mínimo de 24 horas em temperatura ambiente. Simultaneamente, 200 µl das mesmas amostras de plasma foram

20 diretamente adicionados ao tampão de lise, como descrito por Boom et al. (1990). Os pontos no papel de filtro foram retirados e administrados a um tubo contendo 4 ml de tampão de lise, como descrito por Boom et al. (1990). Os tubos foram agitados suavemente em uma plataforma de agitação, durante 3 horas, em temperatura ambiente. Durante esta incubação, o ponto seco

25 dissolve do papel de filtro no tampão de lise. Subseqüentemente, os filtros foram removidos dos tubos com pinças limpas. Entre os tubos, as pinças foram subseqüentemente limpas com água quente- cloro- água quente – 70% de álcool.

O ácido nucleico agora presente no tampão de lise foi ainda

purificado com o método descrito por Boom et al. (1990) ou com kits de isolamento dedicados obtidos de Qiagen (Qiagen GmbH, Max Volmer Strasse 4, 40724 Hilden, Alemanha) ou Biomerieux (anteriormente Organon Teknika, Boseind 15, 5281 RM Boxtel, Países Baixos) e usado de acordo com os protocolos do fabricante. O ácido nucleico isolado foi armazenado a -80°C até outra análise. Geralmente, 5 μl foram usados como entrada em reações de amplificação de NASBA determinando a quantidade de RNA de HIV-1, como descrito por De Baar et al. [2, 3].

Reações de amplificação de ácido nucleico de NASBA padrão foram realizadas em um volume de reação de 20 μl e continham: Tris 40 mM – pH 8,5, KCl 70 mM, MgCl_2 12 mM, ditioneitol 5 mM, dNTP's 1 mM (cada), rNTP's (cada) 2 mM, iniciador 2 μM (cada), 0,05 μM de indicador molecular para a sequência de HIV-1 do tipo selvagem, 0,05 μM de indicador molecular para o RNA de controle de sistema, sorbitol 375 mM, 0,105 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de albumina de soro bovino, 6,4 unidades de AMV RT, 32 unidades de polimerase de RNA T7, 0,08 unidades de H RNase e ácido nucleico de entrada. A mistura completa, exceto as enzimas, foi, antes de adicionar as enzimas, aquecida a 65°C a fim de desnaturar qualquer estrutura secundária no RNA e permitir que os iniciadores recombinem. Após resfriar a mistura a 41°C , as enzimas foram adicionadas. A amplificação se realiza a 41°C durante 90 min em um fluorímetro com termostato (CytoFluor 2000 ou EasyQ Reader) e o sinal fluorescente da sonda indicadora molecular foi medido a cada minuto.

Para obter quantificação, uma série de diluições da sequência de marcação para um conjunto de iniciadores particular foi amplificada e os pontos de tempo no qual as reações tornaram-se positivas (o tempo para positividade, TTP) foram traçados em gráfico contra as quantidades de entrada de ácido nucleico. Assim, uma curva de calibragem foi criada, que pode ser usada para ler valores TTP de reações com quantidades

desconhecidas de entrada e deduzir a quantidade de entrada.

Os resultados das determinações das mesmas amostras distribuídas em pontos e adicionadas diretamente ao tampão de lise foram comparados e a análise é mostrada na figura 2.

5 Os dados na figura 2 indicam claramente uma correlação muito boa entre os resultados obtidos com a admissão direta de amostra ao tampão de lise comparado à primeira colocação em pontos da amostra no papel, secagem e depois admissão ao tampão de lise. Quando analisado com o teste de correlação de Pearson, verificou-se um coeficiente de correlação (r) de 0,919 para plasma direto e 0,959 para plasma seco.

Legendas da figura

15 **Figura 1.** Comparação de dados de HIV-1 quantitativo obtidos em amostras de leite materno que foram analisadas diretamente ou foram primeiro colocadas em pontos e depois secadas em papel de filtro. O corte de teste é em log2, indicado por linhas sólidas no gráfico. Os números dos eixos indicam o número de cópias log de moléculas de RNA de HIV-1 encontradas no teste.

20 Os dados na figura 1 indicam claramente uma correlação muito boa entre os resultados obtidos com a admissão direta da amostra ao tampão de lise comparado à primeira colocação em pontos da amostra no papel, secagem e depois admissão ao tampão de lise.

25 **Figura 2.** Comparação de dados de HIV-1 quantitativos obtidos em amostras de plasma que foram analisadas diretamente ou foram primeiro colocadas em pontos e secas no papel de filtro. O limite de detecção mais baixo do teste é em log2, indicado por linhas sólidas no gráfico. Os números no eixo indicam o número de cópias log de moléculas de RNA de HIV-1 encontradas no teste.

Referências

1. Boom, R, Sol CJ Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, van der Noordaa J, 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol*; 28 (3): 495-503.
- 5 2. de Baar MP, van Dooren MW, de Rooij E, Bakker M, van Gemen B, Goudsmit J, de Ronde A. Single rapid real-time monitored isothermal RNA amplification assay for quantification of human immunodeficiency virus type 1 isolates from groups M, N and O. *J. Clin. Microbiol.*, abril de 2001; 39 (4): 1378-84.
- 10 3. de Baar MP, Timmermans EC, Bakker M, de Rooij E, van Gemen B, Goudsmit J. One-tube real-time isothermal amplification assay to identify and distinguish human immunodeficiency virus type 1 subtypes A, B, and C and circulating recombinant forms AE and AG. *J. Clin. Microbiol.* Maio de 2001; 39 (5): 1895-902.
- 15 4. Caggana M, Conroy J, Pass K. Rapid, efficient method for multiplex amplification from filter paper. *Human mutation* 1998; 11: 404-409.
5. Romppanen E, Mononen I. PCR-oligonucleotide ligation assay from dried blood spots. *Clinical Chemistry* 1999; 45 (11): 2022-2025.
- 20 6. Romppanen E. Oligonucleotide ligation assay: applications to molecular diagnosis of inherited disorders. *Scand J Clin Lab Invest* 2001; 61: 123-130.
7. Tzeng CC, Lin SJ, Chen YJ, Kuo PL, Jong YJ, Tsai LP, Chen RM. An effective strategy of using molecular testing to screen mentally retarded individuals for fragile X syndrome. *Diagnostic Molecular Pathology* 2001; 10: 34-40.
- 25

REIVINDICAÇÕES

1. Método para detectar e quantificar a quantidade de ácido nucleico de HIV em pelo menos uma amostra de sangue, caracterizado pelo fato de compreender:

- 5 - administrar 100 µl a 500 µl da referida amostra de sangue a um pedaço de papel de filtro capaz de absorver referida amostra, resultando em pelo menos um ponto;
- secar referido veículo;
- armazenar o pedaço de papel de filtro por pelo menos uma
- 10 semana;
- excisar um ou mais pontos do referido pedaço de papel de filtro, referido um ou mais pontos juntos compreendendo pelo menos 100 µl da referida amostra;
- administrar referido um ou mais pontos excisados para uma
- 15 solução de isolamento de ácido nucleico de modo que o ácido nucleico é extraído do referido papel de filtro, em que a referida solução de isolamento de ácido nucleico é um tampão de lise de isolamento de ácido nucleico caotrópico;
- amplificar o ácido nucleico extraído por reação de cadeia de
- 20 polimerase (PCR) ou NASBA;
- detectar ácido nucleico de HIV e, se presente
- quantificar a quantidade do referido ácido nucleico de HIV, em que o referido método não compreende tratamento com metanol antes da PCR ou NASBA.

25 2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que pelo menos 250 µl de amostra são administrados ao referido pedaço de papel de filtro.

 3. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o referido pedaço de papel de filtro é provido com pelo

menos duas amostras.

4. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-3, caracterizado pelo fato de compreender a administração ao referido pedaço de papel de filtro de uma quantidade conhecida de um ácido nucleico de referênci

5. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-4, caracterizado pelo fato de que o referido ácido nucleico de HIV é ácido nucleico de HIV-1.

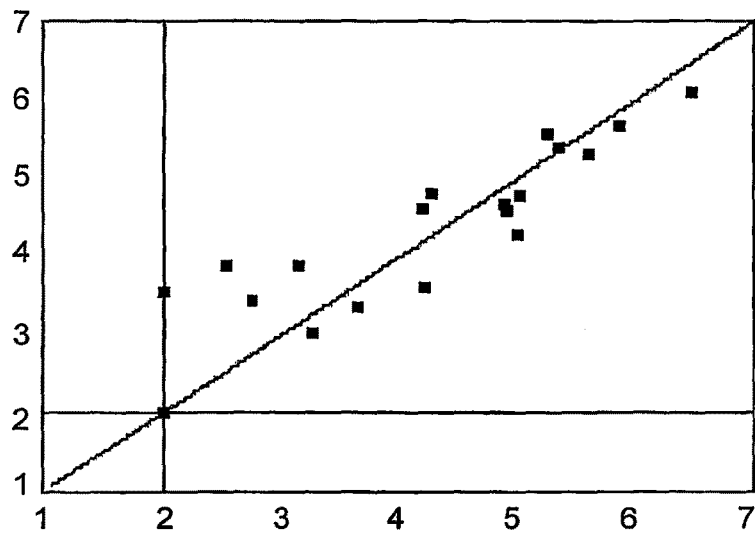
6. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-5, caracterizado pelo fato de que a referida amostra compreende uma gotícula de sangue total de uma punção do dedo ou calcanhar.

7. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-6, caracterizado pelo fato de que a referida amplificação compreende amplificação monitorada em tempo real.

8. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-7, caracterizado pelo fato de que a referida quantificação de ácido nucleico é realizada com um sistema de leitura de ponto extremo.

9. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-8, caracterizado pelo fato de que uma relação entre diferentes ácidos nucleicos é determinada.

Amostra diretamente em tampão de lise antes do isolamento



Amostra 1 semana em papel de filtro antes do isolamento

Fig. 1

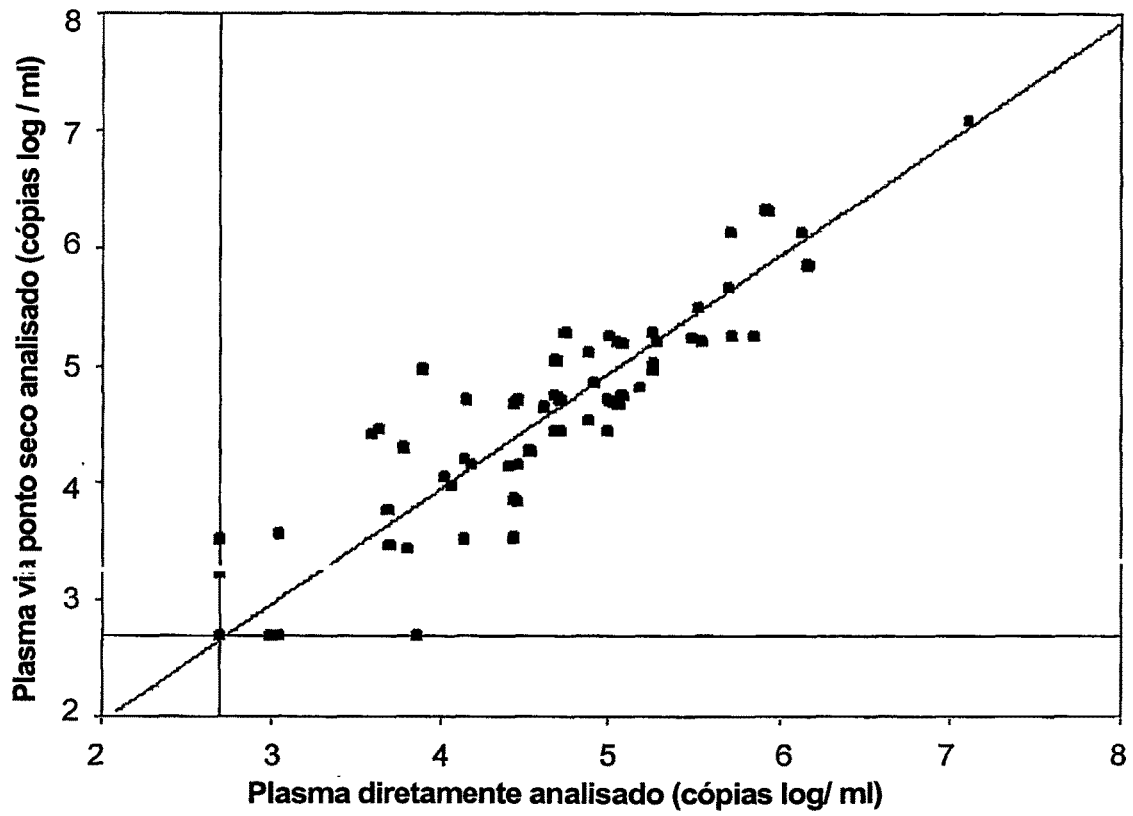


Fig. 2