



República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial



* B R 1 0 2 0 2 1 0 1 5 9 1 0 A 2 *

(21) BR 102021015910-3 A2

(22) Data do Depósito: 12/08/2021

(43) Data da Publicação Nacional:
22/02/2023

(54) Título: KIT DIAGNÓSTICO PARA O VÍRUS DA ZIKA

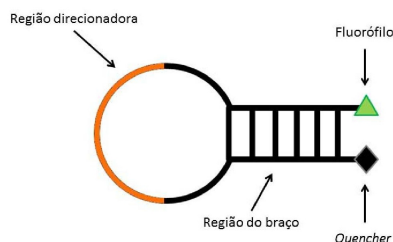
(51) Int. Cl.: C12Q 1/70; C12Q 1/6816.

(52) CPC: C12Q 1/701; C12Q 1/6816.

(71) Depositante(es): UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO.

(72) Inventor(es): PAOLA JOCELAN SCARIN PROVAZZI TRABULSI; PAULA RAHAL; BRUNO MOREIRA CARNEIRO; CINTIA BITTAR OLIVA; CAROLINE MEASSO DO BONFIM.

(57) Resumo: KIT DIAGNÓSTICO PARA O VÍRUS DA ZIKA. A presente invenção se insere no campo da Medicina, mais precisamente na área de diagnóstico de doenças e descreve um kit para o diagnóstico molecular, sem amplificação do material genético viral, específico, capaz de identificar a infecção pelo vírus da Zika (ZIKV) em larga escala e diferenciá-la das infecções causadas pelos demais arbovírus. A metodologia baseia-se na utilização de sondas do tipo molecular beacons complementares ao RNA viral.



KIT DIAGNÓSTICO PARA O VÍRUS DA ZIKA**CAMPO DA INVENÇÃO**

[001] A presente invenção se insere no campo da Medicina, mais precisamente na área de diagnóstico de doenças e descreve um kit para o diagnóstico molecular, sem amplificação do material genético viral, específico, capaz de identificar a infecção pelo vírus da Zika (ZIKV) em larga escala e diferenciá-la das infecções causadas pelos demais arbovírus. A metodologia baseia-se na utilização de sondas do tipo *molecular beacons* complementares ao RNA viral.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[002] O vírus ZIKA (ZIKV) é um arbovírus pertencente à família *Flaviviridae* e ao gênero *Flavivirus* assim como os vírus da Dengue (DENV), Febre Amarela (YFV), Encefalite de Saint Louis (SLEV), Nilo Ocidental (WNV) e Encefalite Japonesa (JEV).

[003] Em humanos foi isolado pela primeira vez em 1952, em Uganda e na Tanzânia. Em 2007 foi o causador de uma epidemia na Micronésia, no Pacífico Sul, no Gabão, na África Central e em 2013, na Polinésia Francesa. No Brasil, a infecção pelo ZIKA foi primeiramente reportada em 2015 no Nordeste do país. Recentemente, um aumento inesperado no diagnóstico de microcefalia fetal e pediátrica foi relatado pela imprensa brasileira. Até o momento, os casos foram diagnosticados em nove estados brasileiros, mesma região na qual o vírus foi primeiramente identificado no Brasil. Até Novembro de 2015, 646 casos haviam sido relatados somente no estado de Pernambuco e apesar de uma associação direta não ter sido encontrada até então, o Ministério da Saúde confirmou

haver uma relação entre a febre ZIKA e casos de microcefalia.

[004] Atualmente, a confirmação da infecção pelo vírus ZIKA é baseada principalmente na detecção do RNA viral no soro sanguíneo do paciente por meio da metodologia de PCR (RT-PCR). No entanto, a PCR possui como desvantagens o alto custo e alto risco de contaminação, principalmente quando se avalia muitas amostras como, por exemplo, na investigação de surtos. Embora os anticorpos contra o ZIKV do tipo IgM possam ser detectados por Elisa, poucos laboratórios obtêm sucesso na sua realização. O diagnóstico laboratorial é um desafio devido à sua baixa viremia e reatividade cruzada entre anticorpos contra ZIKV e outros *Flavivírus* (incluindo DENV). A confirmação por ensaios de neutralização é necessária tornando difícil um rápido diagnóstico por testes sorológicos.

[005] Considerando o exposto, se justifica a urgência no desenvolvimento de um kit diagnóstico simples, rápido e altamente específico baseado em biotecnologia, reduzindo as possibilidades de diagnóstico cruzado com outros vírus ou contaminação amostral que são os maiores problemas encontrados nas técnicas de detecção disponíveis no mercado atualmente. Assim, o problema técnico resolvido na presente invenção foi o desenvolvimento de um kit para o diagnóstico molecular para a detecção do RNA do Zika vírus sem a necessidade de amplificação do material genético e/ou sequenciamento. Isto confere especificidade e confiabilidade ao diagnóstico uma vez que, a sonda do tipo *molecular beacon*, desenvolvida na invenção, é complementar a sequência alvo no genoma viral, permitindo a detecção do ZIKV.

ESTADO DA TÉCNICA

[006] Alguns trabalhos relacionados a kits/métodos para diagnósticos do vírus Zika são encontrados no estado da técnica, por exemplo:

[007] O documento intitulado "*Abordagem sobre os kits empregados no diagnóstico laboratorial da zika nas diferentes metodologias- um estudo de revisão*" realiza uma revisão integrativa da literatura científica, referente à qualidade dos kits utilizados no diagnóstico da infecção pelo ZIKV em suas diferentes metodologias, frente aos parâmetros de sensibilidade e especificidade. Os ensaios disponíveis para diagnóstico laboratorial de Zika são PCR em transcriptase reversa em tempo real (rRT-PCR), amplificação mediada por transcrição (TMA), detecção de anticorpos neutralizantes de ZIKV via teste de neutralização de redução de placa (PRNT), imuno-histoquímica, imunofluorescência, teste rápido (imunocromatográfico) e ensaio imunoenzimático (ELISA).

[008] Como resultado da revisão bibliográfica os autores descrevem os resultados encontrados para os kits baseados nas seguintes metodologias: PCR em transcriptase reversa em tempo real (rRT-PCR), amplificação mediada por transcrição (TMA), detecção de anticorpos neutralizantes de ZIKV via teste de neutralização de redução de placa (PRNT), imuno-histoquímica, imunofluorescência, teste rápido (imunocromatográfico) e ensaio imunoenzimático (ELISA). Nenhuma destas metodologias foi a empregada para o desenvolvimento do sistema de detecção proposto na invenção. No sistema proposto, o material genético viral é identificado por meio do pareamento com uma sonda fluorescente do tipo

molecular beacon. Esta sonda possui em sua extremidade 5' um corante fluorescente (fluoróforo) e na extremidade 3' possui um *quencher*. Devido à característica de sua sequência, o *molecular beacon* assume a forma de um grampo e, conseqüentemente as extremidades 5' e 3' estão fisicamente unidas. O *quencher* quando está fisicamente próximo de uma molécula fluorescente captura os fótons emitidos por esta última e conseqüentemente inibe a emissão de luz pelo fluoróforo. Entretanto, quando ocorre a hibridização entre a região direcionadora do *molecular beacon* e a sequência alvo, estes dois compostos se afastam, o que permite a emissão de luz fluorescente pelo fluoróforo. O desenho da sonda *molecular beacon* foi feito utilizando a região alvo do genoma viral a ser identificada como molde, ou seja, a sonda é específica para o genoma do vírus. A execução e análise empregados na metodologia dependem da utilização de um equipamento do tipo termociclador, capaz de variar a temperatura e detectar a fluorescência emitida a partir da hibridização do RNA alvo com a sequência da sonda *molecular beacon*. Portanto, a metodologia proposta dispensa o uso de anticorpos ou PCR em transcriptase reversa em tempo real (rRT-PCR) para identificação do vírus Zika, que são as metodologias descritas no trabalho de Martins e colaboradores.

[009] Além disso, como resultado do trabalho, os autores relataram que um total de sete artigos foram avaliados: quatro empregando o teste ELISA (abordando IgM; IgM/IgG; IgM, IgG e IgM/IgG), dois RT-PCR e um TMA. A sensibilidade dos kits ELISA variou de 23,7% a 88,2% para IgG; 20,7% a 58,8% para IgM; 39,5% a 100,0% para IgM/IgG. A

especificidade foi de 95,2% a 100,0% para IgG; 95,7% a 100,0% para IgM; 92,5% a 99,8% para IgM/IgG. O limite de detecção para RT-PCR foi de 7 a 140 cópias/reação e 100% de especificidade. Para TMA foi observado 94,7% de sensibilidade e 94,8% de especificidade. A partir desses dados a revisão mostrou valores aceitáveis ou até abaixo do limite de sensibilidade e especificidade dos kits analisados quando comparados aos parâmetros sugeridos pela OMS, o que pode levar a um diagnóstico incorreto colocando a saúde da população em risco. Os autores ainda ressaltam o baixo número de artigos que abordam os valores dos atributos de sensibilidade e especificidade em relação ao vasto número de artigos sobre a infecção pelo ZIKV. Desta forma, se justifica a necessidade do desenvolvimento de uma nova metodologia de detecção do ZIKV. Considerando o exposto, o problema técnico resolvido foi o desenvolvimento de uma metodologia molecular para a detecção do RNA do Zika vírus sem a necessidade de amplificação do material genético e/ou sequenciamento. Isto confere especificidade e confiabilidade ao diagnóstico uma vez que, a sonda do tipo *molecular beacon*, desenvolvida no projeto, é complementar a sequência alvo no genoma viral, permitindo a detecção do ZIKV.

[010] O documento EP3229024 propõe um teste confirmatório da infecção pelo Zikv. Descrevem dispositivos e métodos para realizar experimentos para detectar interações específicas entre a sonda e as moléculas alvo indicativas de infecção pelo vírus Zika. Tecnicamente, trata-se de um teste imunológico composto por pelo menos dois antígenos virais diferentes que possam abranger possíveis variantes do Zikv. O método de detecção consiste

na incubação da amostra biológica, que possivelmente contém anticorpos anti-Zikv, com um carreador contendo pelo menos dois antígenos virais. A presença do vírus é confirmada pela formação de pelo menos um complexo antígenos-anticorpo.

[011] Diferentemente do descrito acima, a presente invenção baseia-se em um teste molecular com o objetivo de identificar o RNA do Zikv na amostra biológica obtida a partir do soro do paciente, sem amplificação do material genético viral. Portanto, a invenção propõe um teste imunológico confirmatório e não diagnóstico.

[012] O documento KR20190002245 sugere um teste diagnóstico no qual utiliza quatro sequências nucleotídicas para duas regiões diferentes do genoma do vírus Zika. De acordo com o relatado, quando a reação ocorre a partir de dois sítios diferentes, é considerado positivo minimizando falsos negativos e proporcionado um diagnóstico mais preciso. Os autores descrevem quatro sequências de nucleotídeos para serem utilizadas como iniciadores (*primers*) em um sistema de amplificação material genético viral por PCR. Diferentemente do descrito acima pelos autores, a presente invenção baseia-se em um teste molecular cujo objetivo é identificar o RNA do Zikv na amostra biológica obtida a partir do soro do paciente, sem amplificação do material genético viral. Percebe-se que a principal desvantagem técnica do referido documento é a dependência de amplificação de duas regiões genômicas simultaneamente para o resultado do teste ser positivo. Adicionalmente, a PCR possui como desvantagens o alto custo e o risco de contaminação, principalmente quando se avalia muitas amostras como, por exemplo, na investigação de surtos.

[013] O documento KR20180056119 descreve um método para detecção de um anticorpo contra o Zika vírus para diagnosticar a infecção pelo Zikv e um kit de diagnóstico rápido para detectar o anticorpo contra o Zika vírus. A invenção em questão fornece um método para a produção de um conjugado de antígeno-anticorpo de Zika vírus em uma amostra biológica. Neste contexto, a presente invenção fornece um método para a produção de um conjugado de antígeno-anticorpo em uma amostra biológica do sujeito sob investigação. A presente invenção também se refere a uma membrana absorvente um anticorpo IgG ou IgM anti-humano imobilizado a qual deve ser submetida a teste com a amostra biológica. Neste sentido, nesta invenção, os autores descrevem um teste imunológico para diagnóstico do Zikv. Em contrapartida, a invenção proposta se refere a um teste molecular que representa uma alternativa para o diagnóstico viral frente a reatividade cruzada entre anticorpos contra ZIKV e outros *Flavivírus* (incluindo DENV).

[014] O documento CN106841601 descreve um método na detecção do Zika Vírus. Considerando a reatividade cruzada existente entre anticorpos contra ZIKV e outros *Flavivírus* (incluindo DENV), observada nos exames imunológicos, o sistema de detecção proposto pelos autores desta invenção é desenvolver um kit diagnóstico rápido que garanta especificidade na detecção do Zika vírus. O kit proposto pelos autores tem o objetivo de detectar os anticorpos IgG/IgM na amostra biológica, a partir da infecção pelo Zika vírus, pois trata-se de um teste imunológico. Diferentemente deste sistema, a invenção proposta descreve uma metodologia molecular para a detecção do RNA do Zika vírus sem a

necessidade de amplificação do material genético e/ou sequenciamento.

[015] O documento intitulado "*Molecular Beacons: A New Approach to Plant Virus Detection*" descreve um sistema de detecção viral baseado em sondas do tipo sonda *molecular beacons*. No referido documento foram desenvolvidas 4 sondas moleculares do tipo *molecular beacons* específicas para a RNA polimerase dependente de RNA e genes das proteínas de revestimento de dois vírus de orquídea, a saber, *Cymbidium mosaic virus* (CgmMV) e *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV). A sonda para o CgmMV foi desenhada contendo o fluoróforo FAM na extremidade 5' da molécula e o *quencher* TAMRA foi adicionado a extremidade 3' da molécula. A sonda para o ORSV foi desenhada contendo o fluoróforo TET na extremidade 5' da molécula e o *quencher* TAMRA foi adicionado a extremidade 3' da molécula. Para as análises, os tubos de reação foram colocados no termociclador ABI Prism 7700 (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA) e submetidos a 40 ciclos de amplificação por PCR em Tempo Real (RT-PCR) (sob as condições descritas). Os produtos de RT-PCR (10 µl) foram adicionados a 50 µl de das sondas do tipo *molecular beacons* (200 nM) e os tubos de reação foram aquecidos a 80°C e a temperatura diminuída para 20°C a uma taxa de 1°C/min.

[016] Na proposta de invenção foi descrito um sistema de detecção do viral que conta com sondas do tipo *molecular beacons* específicas para o genoma do Zikv. Foram descritas duas sondas contendo o fluoróforo 6FAM na extremidade 5' da molécula e o *quencher* BHQ1 na extremidade 3' da molécula. Também foram descritas sequências referências utilizadas como controle positivo para os testes. Para as

análises, os tubos de reação continham 100nM da sonda, 25 mM MOPS (pH 6,5), 2,0 mM MgCl₂, 250nM dos controles positivo e negativo e 200ng de RNA em um volume final de 25µL. As reações foram processadas no termociclador QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), em um único ciclo que compreendeu um passo inicial de 10 minutos a 95°C para desnaturação das cadeias, seguido por 15 minutos a 65°C para o anelamento das sondas na sequência alvo. Portanto, os testes não contam com etapas de amplificação por PCR em Tempo Real como no documento descrito acima, que descreve a utilização da metodologia de sondas do tipo *molecular beacons* após uma etapa inicial de amplificação do material genético alvo por PCR em Tempo Real.

[017] O documento WO2017124054 descreve métodos e reagentes utilizados no desenvolvimento de ensaios de diagnóstico baseados em ácido nucleico e sondas moleculares do tipo *molecular beacon* para a detecção de vírus Chikungunya e Zika em amostras biológicas de indivíduos potencialmente infectados. Os ensaios permitem a detecção rápida de todas as linhagens do vírus Chikungunya e do vírus Zika e podem distinguir o vírus Chikungunya e o vírus Zika entre si, bem como de outros patógenos arbovírus. Os métodos também podem ser usados para quantificar a quantidade de vírus que está presente em uma amostra biológica. Verifica-se que os métodos descritos utilizam iniciadores (*primers*) e sondas moleculares (*molecular beacon*) para amplificar e/ou detectar sequências alvo de um ou mais genótipos do vírus Chikungunya, vírus Zika ou vírus da dengue, para permitir a detecção de um único genótipo viral ou vários genótipos simultaneamente em um único ensaio. Em certas condições, as sequências de

vírus são detectadas por meio da amplificação do material genético por PCR em tempo real (RT-PCR) e/ou RT-PCR multiplex. Os métodos usam iniciadores e sondas oligonucleotídicas em uma combinação de fluoróforos e *quenchers* com o objetivo de detectar um ou mais linhagens de Chikungunya e/ou Zika vírus em um único ensaio. Neste sentido, pares de iniciadores e sondas são desenhados para as regiões mais conservadas dos vírus e, portanto, capazes de detectar mais de uma linhagem específica de vírus patogênico na amostra biológica. Quando o objetivo é individualizar o diagnóstico, os pares de iniciadores e são desenhados tendo como alvo sequências pouco conservadas do genoma viral intimamente relacionadas a diferentes isolados do vírus. Como se trata de um ensaio de amplificação do material genético por PCR em Tempo Real, a plataforma ainda permite o ensaio do tipo multiplex, que proporciona a identificação da presença de mais de um tipo de vírus na amostra biológica desde que sejam utilizadas combinações de *primers* e sondas marcadas com diferentes fluoróforos e *quenchers*, específicos para a sequência genômica de cada vírus que se deseja investigar.

[018] Em contrapartida aos resultados descritos acima, a proposta de invenção não descreve uma metodologia baseada em PCR, e sim na investigação da presença direta do ZIKV na amostra biológica por meio da utilização de sondas moleculares do tipo *molecular beacon*. Neste contexto, os resultados mostram que a ferramenta é eficaz e específica na identificação da linhagem brasileira (ZIKV_BR) do Zika vírus. Esta metodologia pode ser aplicada para o diagnóstico de outros arbovírus à medida que combinações de *primers* e

sondas sejam desenhados com especificidade para cada vírus alvo da investigação. Cabe ressaltar ainda que a metodologia baseada na amplificação do material genético por PCR em Tempo Real alvo de investigação (RT-PCR) possui como desvantagens o alto custo e o risco de contaminação, principalmente quando se avalia muitas amostras como, por exemplo, na investigação de surtos.

[019] Assim, diferente do estado da técnica, a presente invenção propõe um kit diagnóstico para o ZIKA vírus, apresentando uma metodologia molecular de detecção do RNA viral sem etapas de amplificação do material genético e/ou sequenciamento conferindo, desta forma, especificidade e confiabilidade ao diagnóstico uma vez que, a sonda do tipo *molecular beacon*, desenvolvida na invenção, é complementar a sequência alvo no genoma viral, permitindo a detecção do ZIKV.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[020] A presente invenção tem por objetivo propor um kit de diagnóstico que possa facilitar e tornar ágil a detecção de vírus ZIKA, permitindo uma maior rapidez e confiabilidade nos resultados. Assim, uma região específica do genoma viral será selecionada como alvo para diagnóstico, levando em consideração especificidade para o ZIKV. Sondas foram construídas do tipo *molecular beacons* com as sequências nucleotídicas complementares à região alvo. Estas sondas apresentam um fluoróforo que produz um sinal facilmente detectável ao sofrer hibridização.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[021] Para obter uma total e completa visualização do objetivo desta invenção, são apresentadas as figuras as

quais se faz referências, conforme segue.

[022] A Figura 1 mostra a Estrutura básica do *molecular beacon* (MB). A região direcionadora é complementar a sequência alvo do genoma viral.

[023] A Figura 2 mostra um gráfico da Padronização da *beacon*. Sondas A e B testadas nas concentrações de 100nM e 250nM. (+) e (-) = controles: positivo e negativo, respectivamente. noRNA = *well* sem RNA. As reações foram preparadas contendo 25 mM MOPS (pH 6,5), 2,0 mM MgCl₂, 250nM dos controles positivo e negativo e 200ng de RNA em um volume final de 25µL. O eixo Y representa quantas vezes a sonda é mais específica que o controle sem o RNA viral. *p≤0.001. Resultados analisados no *GraphPad Prism 5* (One sample t test).

[024] A Figura 3 mostra um gráfico da Padronização da *beacon*. (+) e (-) = controles: positivo e negativo testados para *beacon* A nas concentrações de 100nM e 250nM. noRNA = *well* sem RNA. As reações foram preparadas em duplicata contendo 25 mM MOPS (pH 6,5), 2,0 mM MgCl₂, 250nM dos controles positivo e negativo e 200ng de RNA em um volume final de 25µL. O eixo Y representa quantas vezes a sonda é mais específica que o controle sem o RNA viral e os resultados expressam a média (±SD) das duplicatas. ***p<0.001 e *p<0.05. Resultados analisados no *GraphPad Prism 5* (Two-way ANOVA, seguido pelo teste de Bonferroni).

[025] A Figura 4 mostra um gráfico da Padronização da temperatura ideal para o anelamento da sonda (+) e (-) = controles: positivo e negativo testados para *beacon* A na concentração de 250nM. noRNA = *well* sem RNA. As reações foram preparadas em duplicata contendo 25 mM MOPS (pH 6,5), 2,0 mM

MgCl₂, 250nM dos controles positivo e negativo e 200ng de RNA em um volume final de 25µL. Anelamento avaliado por 10 min a 60°C, 65°C ou 70°C. O eixo Y representa quantas vezes a sonda é mais específica que o controle sem o RNA viral e os resultados expressam a média (±SD) das duplicatas. ***p<0.001. Resultados analisados no *GraphPad Prism 5* (Two-way ANOVA, seguido pelo teste de Bonferroni).

[026] A Figura 5 mostra um gráfico da Zikv/A_100nM. A_100nM = Zikv. (+) e (-) = controles: positivo e negativo testados para *beacon A* na concentração de 100nM. noRNA = *well* sem RNA. As reações foram preparadas em duplicata contendo 25 mM MOPS (pH 6,5), 2,0 mM MgCl₂, 250nM dos controles positivo e negativo e 200ng de RNA em um volume final de 25µL. O eixo Y representa quantas vezes a sonda é mais específica que o controle sem o RNA viral e os resultados expressam a média (±SD) das duplicatas. *p<0.05. Resultados analisados no *GraphPad Prism 5* (One sample t test).

[027] A Figura 6 mostra um gráfico da Especificidade da sonda A ao RNA do ZIKV_BR. ZIKV_BR = RNA da linhagem brasileira do vírus Zika, CHIKV = RNA do vírus Chikungunya, HCV = RNA do vírus da Hepatite C, Human = RNA humano, DENV1 e DENV2 = RNA dos vírus Dengue sorotipos 1 e 2 e YFV = RNA do vírus Febre Amarela. (-) = controle negativo. noRNA = *well* sem RNA. As reações foram preparadas em duplicata contendo 25 mM MOPS (pH 6,5), 2,0 mM MgCl₂, *beacon A* na concentração de 250nM e 200ng de RNA em um volume final de 25µL. O eixo Y representa quantas vezes a sonda é mais específica do que o controle sem o RNA viral e os resultados expressam a média (±SD) das duplicatas. *p<0.05. Resultados

analisados no *GraphPad Prism 5* (One-way ANOVA, seguido pelo teste de Bonferroni).

[028] A Figura 7 mostra um gráfico da Quantificação absoluta obtida por Real Time PCR. A reação foi realizada em quadruplicata, seguindo o protocolo de *Lanciotti* e colaboradores. 1.3×10^5 partículas virais/ml foram diluídas em oito pontos (100, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7}) e submetidos a 40 ciclos de amplificação com oligonucleotídeos iniciadores específicos para o ZIKV. Os pontos 10^{-6} e 10^{-7} foram indetectáveis. Os resultados analisados no *GraphPad Prism 5* expressam a média (\pm SD) das quadruplicatas para cada ponto.

[029] A Figura 8 mostram gráficos de três eventos do teste de sensibilidade do sistema de detecção. (A): Primeiro evento. (B): Segundo evento. (C) Terceiro evento. Em um volume final de 25 μ l, as reações foram preparadas em triplicata contendo 25 mM MOPS (pH 6,5), 2,0 mM $MgCl_2$, 250nM da sonda MB A e 1,0 μ l do RNA viral nas diferentes concentrações, que variaram de 100 a 10^{-6} . Controle positivo = 200ng de RNA. O eixo Y representa quantas vezes a sonda é mais específica que o controle sem o RNA viral e os resultados expressam a média (\pm SD) das triplicatas. * $p < 0.05$. Resultados analisados no *GraphPad Prism 5* (One-way ANOVA, seguido pelo teste de Bonferroni).

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[030] A presente invenção refere-se a um kit para o diagnóstico molecular, sem amplificação do material genético viral, específico, capaz de identificar a infecção pelo ZIKV em larga escala e diferenciá-la das infecções causadas pelos demais arbovírus. A metodologia baseia-se na utilização de

sondas do tipo *molecular beacons* complementares ao RNA viral.

[031] O referido kit compreende um conjunto de reagentes constituídos por duas sondas do tipo *molecular beacon* com sequências nucleotídicas especialmente desenvolvidas para identificar o genoma do Zika vírus. Também fazem parte duas sequências nucleotídicas utilizadas como controle positivo para a reação, dois pares de oligonucleotídeos iniciadores com sequências nucleotídicas específicas para amplificação do genoma do ZIKV e uma sequência nucleotídica utilizada como controle negativo para a reação.

[032] Estas sondas do tipo *molecular beacons* foram desenvolvidas contendo sequências específicas para identificar por complementariedade de bases o genoma do ZIKV. Neste contexto, foram descritas duas sondas contendo o fluoróforo 6FAM na extremidade 5' da molécula e o *quencher* BHQ1 na extremidade 3' da molécula; o interior da molécula contém a sequência nucleotídica alvo.

[033] Também foram descritas sequências referências utilizadas como controle positivo para os testes. Para as análises, os tubos de reação continham 100nM da sonda, 25 mM MOPS (pH 6,5), 2,0 mM MgCl₂, 250nM dos controles positivo e negativo e 200ng de RNA em um volume final de 25µL. As reações foram processadas no termociclador QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), em um único ciclo que compreendeu um passo inicial de 10 minutos a 95°C para desnaturação das cadeias, seguido por 15 minutos a 65°C para o anelamento das sondas na sequência alvo. Portanto, o kit consiste em um conjunto de reagentes associados a um método de análise específico

para detecção do ZIKV.

[034] Neste sistema, uma molécula de DNA de fita simples é acoplada a um composto fluorescente (fluoróforo) na sua posição 5' e uma molécula *quencher* na região 3'. Devido à característica de sua sequência, o *molecular beacon* assume a forma de um grampo e, conseqüentemente as extremidades 5' e 3' estão fisicamente unidas. O *quencher* quando está fisicamente próximo de uma molécula fluorescente captura os fótons emitidos por esta última e conseqüentemente inibe a emissão de luz pelo fluoróforo. Entretanto, quando ocorre a hibridização entre a região direcionadora do *molecular beacon* e a sequência alvo, estes dois compostos se afastam, o que permite a emissão de luz fluorescente pelo fluoróforo. A estrutura básica do *molecular beacon* (MB) está descrita na figura 1.

[035] Para que um *molecular beacon* (MB) seja eficiente, diversas características de sua sequência devem avaliadas. Parâmetros como o tamanho da região direcionadora, a quantidade de nucleotídeos e sequência do braço, homologias do braço com a sequência alvo e tamanho total da molécula influenciam drasticamente a eficiência da sonda. Para o desenho básico do MB utilizado na presente invenção foi utilizado um software que considera todos os parâmetros acima mencionados e prediz a melhor sequência a ser utilizada a partir da sequência alvo que for inserida no programa. software *Beacon Designer 8.20* disponível em http://www.premierbiosoft.com/molecular_beacons/. O desenho da sonda foi feito utilizando a região alvo do genoma viral a ser identificada como molde. Foi escolhida a molécula que obteve os melhores resultados de predição pelo *software*.

Após o desenho da sonda, sua sequência foi avaliada quanto a uma possível homologia com o genoma de outros vírus e/ou genes humanos, e para isto foi utilizada a ferramenta *BLAST*, amplamente descrita na literatura. Confirmada a homologia exclusiva com o genoma do ZIKA vírus, a sonda foi enviada para a síntese.

[036] Para determinar a região alvo no genoma do ZIKV a ser identificada foi realizada uma análise de similaridade utilizando o software Simplot 3.5.1. A análise foi realizada a partir de um alinhamento baseado em códon de sequências do *Open Reading Frame* (ORF) de vírus do gênero *Flavivirus*. Foram incluídas na análise sequências dos vírus da Dengue (DENV1, DENV2, DENV3 e DENV4), vírus do Oeste do Nilo (WNV), vírus da Encefalite Japonesa (JEV), vírus da Encefalite de Saint Louis (SLV), vírus da Febre Amarela (YFV) e vírus Spondweni (SPOV).

Material e métodos utilizados para o desenvolvimento do kit

[037] O material foi composto pelo RNA dos vírus Zika_BR (ZIKV), Chikungunya (CHIKV) e vírus da Hepatite C (HCV) que foram obtidos a partir de infecção e cultivo celular; e pelo RNA Humano que foi obtido a partir de uma amostra de *swab* cervical. Também fizeram parte sondas moleculares do tipo *molecular beacons* que foram desenvolvidas seguindo a complementaridade ao RNA alvo.

Cultivo celular

[038] Amostras do vírus ZIKV_BR e CHIKV foram inoculadas em células C3/36 de *Aedes albopictus* e incubadas por 7 a 12 dias até a observação dos efeitos citopáticos na célula.

[039] Células C6/36 (provenientes do banco de células do Rio de Janeiro) foram semeadas em garrafa de cultura de 75 cm² em confluência 95-100% e mantidas em estufa a 28°C em meio Leibovitz's - L15 suplementado com 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB) inativado. No dia seguinte o meio de cultura foi removido, as células foram lavadas com PBS e foram adicionados aproximadamente 1x10⁶ partículas do vírus de interesse (ZIKV ou CHIKV) diluídas em meio de cultura fresco livre de antibióticos e SFB. Após incubação por uma hora em estufa a 28°C para adsorção, o sobrenadante foi removido e substituído por meio de cultura fresco suplementado com antibióticos e SFB. As culturas foram mantidas por 7 a 12 dias até a observação de efeitos citopáticos na célula em comparação às células controle não infectadas. Após o período desejado as células infectadas foram lavadas com PBS e submetidas à extração de RNA utilizando-se o Trizol.

[040] O plasmídeo pS52/SG-Feo (AII) pertencente ao genótipo 3a do vírus HCV foi transfectado em células 2 x 10⁶ Huh-7.5 células (Hepatoma Humano). As células foram cultivadas em meio de cultura DMEM e suplementadas com 10% de soro fetal bovino, 1% de aminoácidos não essenciais, 100 unidades/ml penicilina e 100 µg/ml de streptomina a 37°C e 5% de CO₂. O sobrenadante celular foi coletado e armazenado a -80°C para posterior utilização e extração do RNA viral.

Extração de RNA

[041] O RNA foi extraído utilizando-se o *TRIZOL*® Reagent. Inicialmente, foram adicionados 300µL de Trizol as amostras biológicas provenientes da cultura de células.

Em seguida, a solução foi incubada em gelo por 5 minutos. Na sequência, foram adicionados 60µL de clorofórmio, seguido de homogeneização por 3 minutos e centrifugação à 12.000 g por 15 minutos, a 4°C. Em seguida, a fase aquosa foi transferida para um novo microtubo contendo 150µL de Isopropanol e 1,5µL de glicogênio. A solução foi invertida e incubada à temperatura ambiente por 10 minutos. Posteriormente, o material foi centrifugado à 12.000 g por 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado foram adicionados 300µL de álcool 75% seguindo centrifugação à 7.500 g por 5 minutos a 4°C e posterior descarte da fase aquosa. Ao precipitado, após etapa de secagem foram adicionados 20 µL de água tratada com DEPC para eluição do RNA. As amostras foram estocadas a -80°C.

[042] Para confirmação da sequência nucleotídica do Zika vírus, o RNA extraído a partir da cultura celular foi submetido à reação de cDNA e sequenciamento direto pelo método de Sanger.

Desenho das beacons

[043] As sondas do tipo *molecular beacons* foram desenvolvidas por meio da utilização do software *Beacon Designer* 8.20 disponível em http://www.premierbiosoft.com/molecular_beacons/.

[044] Para determinar a região alvo foi realizada uma análise de similaridade utilizando o software Simplot 3.5.1. A análise foi realizada a partir de um alinhamento baseado em códon de sequências do *Open Reading Frame* (ORF) de vírus do gênero *Flavivirus*. Foram incluídas na análise sequências dos vírus da Dengue (DENV1, DENV2, DENV3 e DENV4), vírus do Oeste do Nilo (WNV), vírus da Encefalite Japonesa

(JEV), vírus da Encefalite de Saint Louis (SLV), vírus da Febre Amarela (YFV) e vírus Spondweni (SPOV).

Testes

[045] O delineamento dos ensaios para padronização das *beacons*, que envolveram testar diferentes concentrações de sonda, assim como a composição e as condições para as reações foram realizados seguindo valores de referência descritos na literatura.

[046] Para execução dos testes, são utilizadas placas ópticas de 96 poços, de qualquer fabricante, desde que sejam compatíveis com o equipamento termociclador a ser utilizado no ensaio para leitura da fluorescência emitida pela sonda. Portanto, a placa para análise não faz parte do conjunto da invenção. Dessa maneira, os reagentes para execução da reação não são previamente dispostos em uma plataforma (placa) de análise combinados em quantidades e proporções definidas. Contrariamente, os reagentes armazenados em tubos individuais são diluídos, misturados de acordo com a quantidade necessária e distribuídos nos tubos de reação (presentes na placa de 96 poços) ao qual são adicionadas as amostras a serem testadas. Esta placa contendo a mistura de reação mais as amostras é colocada no termociclador que, a partir de variações na temperatura, permite o anelamento das sondas na sequência alvo (genoma viral). Como consequência, ocorre a emissão da fluorescência que é captada pelo equipamento.

Padronização da concentração das sondas

[047] Foram realizados testes iniciais para definir a concentração das *beacons* a ser utilizada nos ensaios. Para isso, dois tipos de sondas moleculares, A e B, nas

concentrações de 100nM e 250nM, foram avaliadas, como em uma matriz, em uma placa de 96 orifícios. As reações continham 25 mM MOPS (pH 6,5), 2,0 mM MgCl₂ e 250nM da *beacon* e controles positivo e negativo em um volume final de 25µL. As reações foram processadas no termociclador *7300 Real-Time PCR System*, em um único ciclo que compreendeu um passo inicial de 10 minutos a 95°C para desnaturação das cadeias. Os resultados foram analisados no *GraphPad Prism 5*. Para a análise estatística o valor de $P \leq 0.05$ foi considerado significativo.

[048] Além das duas sondas, A e B, do tipo *Molecular Beacon* (MB), também foram desenhados um oligonucleotídeo, complementar a sequência nucleotídica das moléculas, para atuar como controle positivo das reações; um segundo oligonucleotídeo não complementar a sequência nucleotídica, para atuar, neste caso, como controle negativo das reações; e um par de *primers* que foram utilizados para o sequenciamento direto e confirmação da linhagem ZIKV_BR. A sequência de nucleotídeo das moléculas desenvolvidas está descrita na tabela 1.

Tabela 1: Sequência de nucleotídeo das moléculas desenvolvidas na invenção. Beacon = Sonda do tipo *Molecular Beacon*. CP = Controle Positivo. NC = Controle Negativo.

	Sequência
Sonda A: Beacon 3599-3762	5' - [6FAM]CGCGATCACTGCCATTGATGTGCTTATGAGATCGCG[BHQ1] -3'
CP 3599-3762	5' -GAGAATGACCACAAAGATCATCATAAGCACATCAATGGCAGTGCTGGTAGCTATGATCCT-3'
Primer F 3599-3762	5' -AAGGGCTGAAGAAGAGAA-3'
Primer	5' -TTAGCCAGGTCACCTCATT-3'

R 3599-3762	
Sonda B: Beacon 3500-4000	5' - [6FAM]CGCGATCTGAGCAGAATCACAAGCACTCGATCGCG [BHQ1] -3'
CP 3500-4000	5' -ATGGATCACTTCTCCCTTGGAGTGCTTGTGATTCTGCTCATGGTGCAGGAAGGGCTGAAG-3'
Primer F 3500-4000	5' -ACTTAGTAAGGTCAATGG-3'
Primer R 3500-4000	5' -TGATGTGCTTATGATGAT-3'
NC	5' -AGCAACATGGCGGAGGTAAGATCCTACTGCTATGAGGCATCAATATCAGACATGGCTTCG-3'

[049] Após a confirmação da correta utilização da sequência viral, foram iniciados os testes com as sondas. O primeiro deles avaliou as concentrações de 100nM e 250nM das duas moléculas, A e B, desenvolvidas. Os resultados podem ser vistos na figura 2. A especificidade da sonda foi medida pela emissão de fluorescência e, uma vez que, cada reação continha um *well* sem RNA, os resultados expressam a razão entre a fluorescência emitida pela amostra teste e a fluorescência emitida pelo controle sem RNA. Os resultados mostram que a sonda A, na concentração de 250nM, apresentou complementaridade e, portanto, especificidade em relação ao RNA alvo (ZIKV_BR) ($p=0.0009$).

[050] Um segundo ensaio, realizado em duplicata, na qual foram novamente testadas as concentrações de 250nM e 100nM nos controles positivo e negativo evidenciou que as duas condições avaliadas são estatisticamente significantes em relação ao controle livre de RNA, com $p<0.001$ para 250nM e $p<0.05$ para 100nM (Figura 3). Neste experimento foram utilizados apenas os controles, positivo e negativo, com o objetivo de conter os gastos com a utilização das sondas.

Padronização da temperatura de anelamento

[051] Na sequência, foram realizados testes para definir a temperatura de anelamento da sonda na sequência alvo. As reações foram realizadas em triplicata contendo 25 mM MOPS (pH 6,5), 2,0 mM MgCl₂ e 250nM da *beacon* e controles positivo e negativo em um volume final de 25µL. As reações foram processadas no termociclador *7300 Real-Time PCR System*, em um único ciclo que compreendeu um passo inicial de 10 minutos a 95°C para desnaturação das cadeias, seguido por 15 minutos às temperaturas variáveis de 60°C, 65°C e 70°C, para o anelamento das sondas na sequência alvo. Os resultados foram analisados no *GraphPad Prism 5*. Para a análise estatística o valor de $P \leq 0.05$ foi considerado significativo, e podem ser vistos na Figura 3, que evidencia que a temperatura de 60°C foi a que resultou na melhor especificidade da sonda ao alvo ($p < 0.001$). Portanto, a partir deste resultado, a temperatura de 60°C ficou estabelecida como a ideal para seguir com os estudos ($p < 0.001$) (Figura 4).

[052] Com o objetivo de encontrar a condição ideal para as reações, outros fatores foram avaliados, como o tempo de desnaturação inicial e a concentração do RNA alvo. Os testes para desnaturação inicial foram executados a 95°C por 10 segundos, 5 minutos, 10 minutos, 15 minutos ou 20 minutos, e como não apresentaram diferenças, foi mantida a condição inicial: um único ciclo a 95°C por 10 minutos seguidos por 15 minutos a 60°C para o anelamento das sondas na sequência alvo. A concentração do RNA alvo também foi testada, variando de 100ng/µl a 400ng/ µl e da mesma forma que a desnaturação inicial, não apresentou diferença

significativa. A partir dos testes realizados, foi observada que a única condição que provoca alterações significativas nas reações é a concentração das *beacons*, como evidenciado nos resultados apresentados acima.

[053] As reações foram realizadas em triplicata contendo 25 mM MOPS (pH 6,5), 2,0 mM MgCl₂ e 250nM da sonda MB e controles positivo e negativo em um volume final de 25µL. As reações foram processadas no termociclador *7300 Real-Time PCR System*, em um único ciclo que compreendeu um passo inicial de 5 minutos ou 10 segundos a 95°C para desnaturação das cadeias, seguido por 15 minutos a 60°C para o anelamento das sondas na sequência alvo. Os resultados foram analisados no *GraphPad Prism 5*. Para a análise estatística o valor de $P < 0.05$ foi considerado significativo.

[054] Estabelecidas as condições para as reações, foram iniciados os ensaios com as demais cepas viras. Foram testadas ZIKV_BR, HCV, CHIKV, DENV1, DENV2, YFV e RNA Humano, além do controle negativo. As reações foram realizadas em duplicata contendo 25 mM MOPS (pH 6,5), 2,0 mM MgCl₂, 250nM da sonda MB A, 200ng/µL do RNA alvo além do controle negativo em um volume final de 25µL. As reações foram processadas em duplicata no termociclador *7300 Real-Time PCR System*, em um único ciclo que compreendeu um passo inicial de 10 minutos a 95°C para desnaturação das cadeias, seguido por 15 minutos a 60°C para o anelamento das sondas na sequência alvo. Os resultados foram analisados no *GraphPad Prism 5*. Para a análise estatística o valor de $P \leq 0.05$ foi considerado significativo.

[055] Os próximos testes foram para estabelecer a

sensibilidade do método. Para isto, 1.3×10^5 partículas virais/ml da cepa ZIKV_BR foram utilizados para construir uma curva de quantificação absoluta seguindo o protocolo de *Lanciotti* e colaboradores; que constitui o protocolo preconizado para o diagnóstico do ZIKV. A partir do valor de 1.3×10^5 vírus/ml, oito pontos de diluição (10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7}) foram submetidos a 40 ciclos de amplificação, em quadruplicata, com oligonucleotídeos iniciadores específicos para o ZIKV. O número de CTs (*Cycle Threshold*) para cada ponto foi utilizado como referência para a quantificação viral nas reações com as *beacons*.

[056] Após esta etapa, para determinar a sensibilidade de detecção do método, os oito pontos de diluição, cujos CTs foram determinados na curva de quantificação absoluta, foram utilizados nos experimentos com as *beacons*. Inicialmente, para padronização, as reações foram realizadas em triplicata, contendo 25 mM MOPS (pH 6,5), 2,0 mM $MgCl_2$, concentrações de sonda MB A que variaram de 20nM a 250nM, 1,0 μ l do RNA de cada ponto da diluição e 200ng/ μ L do RNA alvo como controle positivo, além do controle negativo, em um volume final de 25 μ L. As reações foram processadas no termociclador QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR System, em um único ciclo que compreendeu um passo inicial de 10 minutos a 95°C para desnaturação das cadeias, seguido por 15 minutos a 65°C para o anelamento das sondas na sequência alvo. Os resultados foram analisados no *GraphPad Prism 5*. Para a análise estatística o valor de $P \leq 0.05$ foi considerado significativo.

[057] Uma vez que os resultados obtidos com a padronização das sondas revelaram que tanto a concentração

de 250nM quanto a concentração de 100nM são estatisticamente significativas (Figura 3) (Figura 5), e visando reduzir os custos para a realização dos ensaios e produção dos kits comercialmente, os próximos testes para avaliar a especificidade da sonda A ao RNA do vírus Zika, em relação ao genoma humano e aos vírus relacionados foram repetidos em duplicata utilizando-se, inicialmente, 100nM da sonda A.

Avaliação da Especificidade

[058] Uma vez concluídas as padronizações, foi verificada a especificidade da sonda A ao RNA do vírus Zika em relação ao genoma humano e aos vírus causadores da febre Chikungunya (CHIKV), Hepatite C (HCV), Dengue (DENV1 e DENV2) e Febre Amarela (YFV). Os resultados estão ilustrados na figura 5 e confirmam a especificidade da *beacon* A ao genoma do ZIKV_BR. A partir de análises anteriores, os testes iniciais foram realizados com 100nM da MB A; mas, neste caso, a concentração de 250nM foi a que apresentou resultados estatisticamente significativos. Neste âmbito, os resultados mais expressivos foram obtidos nos testes com o CHIKV e o HCV, no qual a especificidade do Zika vírus foi estatisticamente significativa ($p < 0.05$) (Figura 6A). Destaca-se o resultado obtido com o genoma humano. A não especificidade da sonda ao genoma humano confirma que esta *beacon* pode ser utilizada como ferramenta para o diagnóstico de infecção pelo Zika vírus em humanos. Os experimentos com os demais vírus analisados não apresentaram diferença estatística (Figura 6B) e, embora, sinalizem para o esperado e se apresentem promissores, precisam ser melhorados e permanecem em análise.

Avaliação da Sensibilidade do Método

[059] A avaliação da quantificação viral foi realizada por PCR em Tempo Real seguindo o protocolo de *Lanciotti* e colaboradores, no qual, oito pontos de diluição (10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7}), partindo de 1.3×10^5 partículas virais/ml, foram submetidos a 40 ciclos de amplificação com oligonucleotídeos iniciadores específicos para o ZIKV em quadruplicata. Como observado na Figura 6, o último valor detectado, após 37 ciclos de amplificação, foi 1.3 partículas virais/ml, correspondendo à diluição 10^{-5} . As últimas diluições 10^{-6} e 10^{-7} foram indetectáveis. Os valores de quantificação viral e os CTs (*Cycle Threshold*) correspondentes foram usados como referência para os testes de sensibilidade das sondas (Figura 7).

[060] Uma vez determinada a quantificação viral e com o objetivo avaliar a sensibilidade de detecção da MB A, sete pontos de diluição (10^{-7} foi descartado) foram utilizados nos experimentos com as *beacons*. A partir dos testes realizados com diferentes concentrações de sonda, resultados estatisticamente significativos foram obtidos com 250nM da MB A como observados na figura 8. Os resultados mostram que o sistema é capaz de detectar o vírus nas quantidades de 10^{-5} e 10^{-6} , o que corresponde a 1.3 partículas virais/ml e 0.13 partículas virais/ml, respectivamente ($p < 0.05$).

[061] Quanto aos resultados obtidos, quando comparamos os limites detectados pela *molecular beacon* desenvolvida para a presente invenção com os limites detectados por PCR em tempo real, notamos que, a sonda mostrou-se tão sensível quanto à metodologia desenvolvida

por *Lanciotti* e colaboradores em 2008, uma vez que, que na curva de quantificação absoluta o menor valor detectado após 37 ciclos de amplificação (CT=37) foi 10^{-5} correspondendo a 1.3 partículas virais/ml ($p < 0.05$). O mesmo valor foi identificado pela a sonda que ainda foi capaz de detectar 0.13 partículas virais/ml na diluição 10^{-6} ($p < 0.05$).

[062] Em seu trabalho, que identificou oligonucleotídeos iniciadores para amplificação do ZIKV e estabeleceu o protocolo para o seu diagnóstico, os autores detectaram no mínimo 930 partículas virais/ml no sangue de pacientes infectados com vírus Zika. Na presente invenção, não foi possível avaliar amostras de pacientes sabidamente positivos para o vírus, mas isto não invalida a metodologia. A partir dos promissores resultados obtidos, no qual foi identificada a sensibilidade do teste, mesmo tendo finalizada a vigência do projeto, pretendemos entrar em contato com colaboradores que possuem uma coorte de pacientes infectados pelo ZIKV para avaliarmos em amostras clínicas o sistema de detecção desenvolvido na proposta.

[063] Assim, a partir dos objetivos propostos e resultados obtidos, foi desenvolvida um kit para o diagnóstico molecular não sorológico, baseado em Biologia Molecular no qual não foi necessária à amplificação do material genético viral, mediante a utilização de sondas moleculares do tipo *molecular beacons*, que por conter um fluoróforo e um *quencher*, emite um sinal detectável ao sofrer hibridização com o RNA do ZIKV. A metodologia de detecção mostrou-se específica para o ZIKV quando testada para os vírus relacionados HCV, CHIKV e também em relação ao genoma humano. Com relação aos demais vírus avaliados, DENV1, DENV2

e YFV, embora os resultados sinalizem para especificidade, necessitam de padronizações e permanecem em análise. Ainda, a partir dos resultados encontrados na presente invenção, este mesmo método apresentou sensibilidade de detecção quando comparado ao método diagnóstico preconizado para o diagnóstico do ZIKV, apontando ser uma ferramenta promissora para o diagnóstico de infecção pelo Zika vírus em humanos.

[064] Os versados na arte valorizarão os conhecimentos aqui apresentados e poderão reproduzir a invenção nas modalidades apresentadas e em outras variantes, abrangidas no escopo das reivindicações anexas.

REIVINDICAÇÕES

1. Kit diagnóstico caracterizado pelo fato de que compreende:

- duas sondas do tipo molecular *beacon*;
- três sequências nucleotídicas referências;
- dois pares de oligonucleotídeos iniciadores com sequências nucleotídicas específicas;

2. Kit, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que as sondas do tipo molecular *beacon* apresentam sequências específicas para identificar por complementariedade de bases o genoma do ZIKV.

3. Kit, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que as sondas contêm o fluoróforo 6FAM na extremidade 5' da molécula e o *quencher* BHQ1 na extremidade 3' da molécula, em que o interior da molécula contém a sequência nucleotídica alvo.

4. Kit, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que o *molecular beacon* assume a forma de um grampo, unindo fisicamente as extremidades 5' e 3'.

5. Kit, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que o *quencher* quando está fisicamente próximo de uma molécula fluorescente captura os fótons emitidos por esta última e inibe a emissão de luz pelo fluoróforo.

6. Kit, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que duas das sequências nucleotídicas referências são utilizadas como controle positivo e uma das sequências nucleotídicas referências é utilizada como controle negativo.

7. Kit, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que os pares de oligonucleotídeos iniciadores apresentam sequências nucleotídicas específicas para amplificação do genoma do ZIKV.

8. Uso do kit conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 7, **caracterizado** pelo fato de ser para identificar a infecção pelo vírus da Zika (ZIKV) em larga escala e diferenciá-la das infecções causadas pelos demais arbovírus.

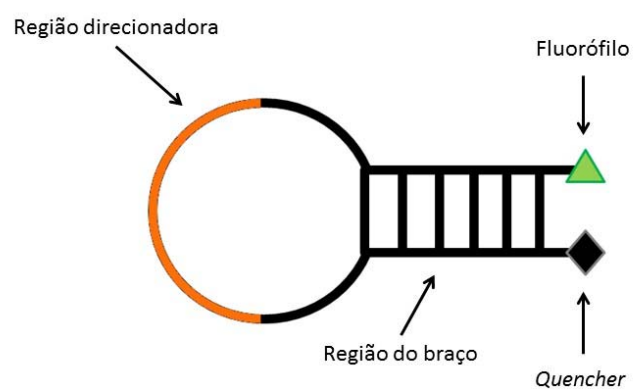


Figura 1

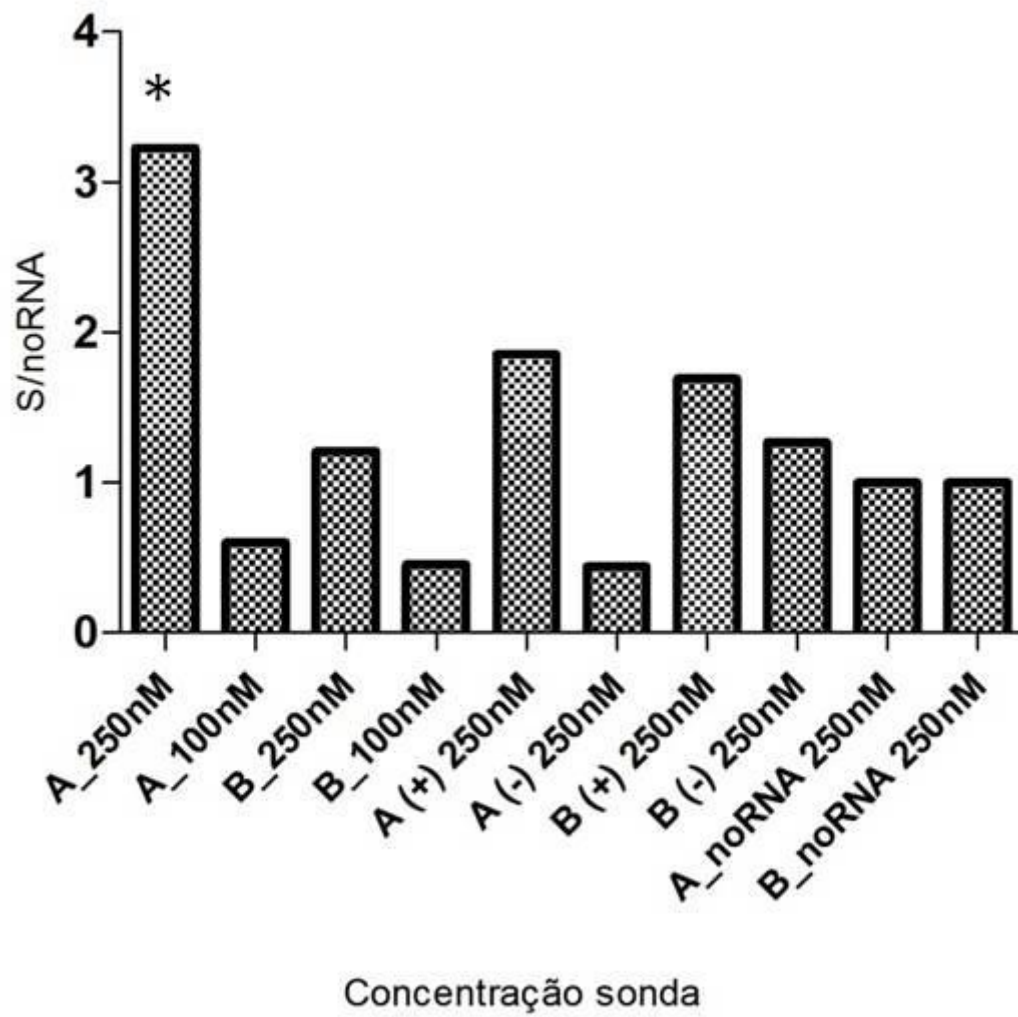


Figura 2

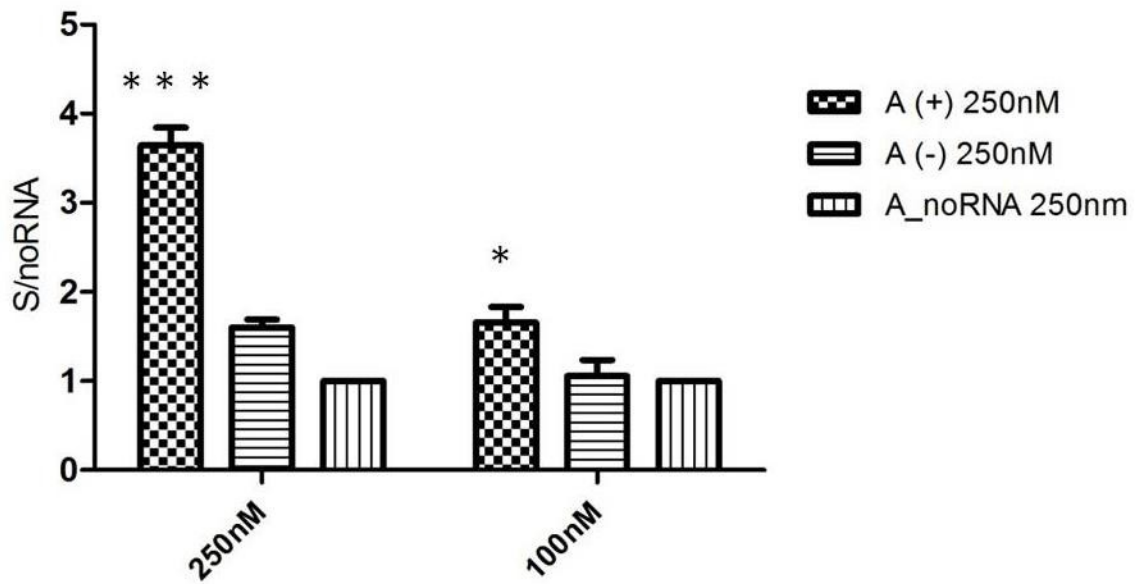


Figura 3

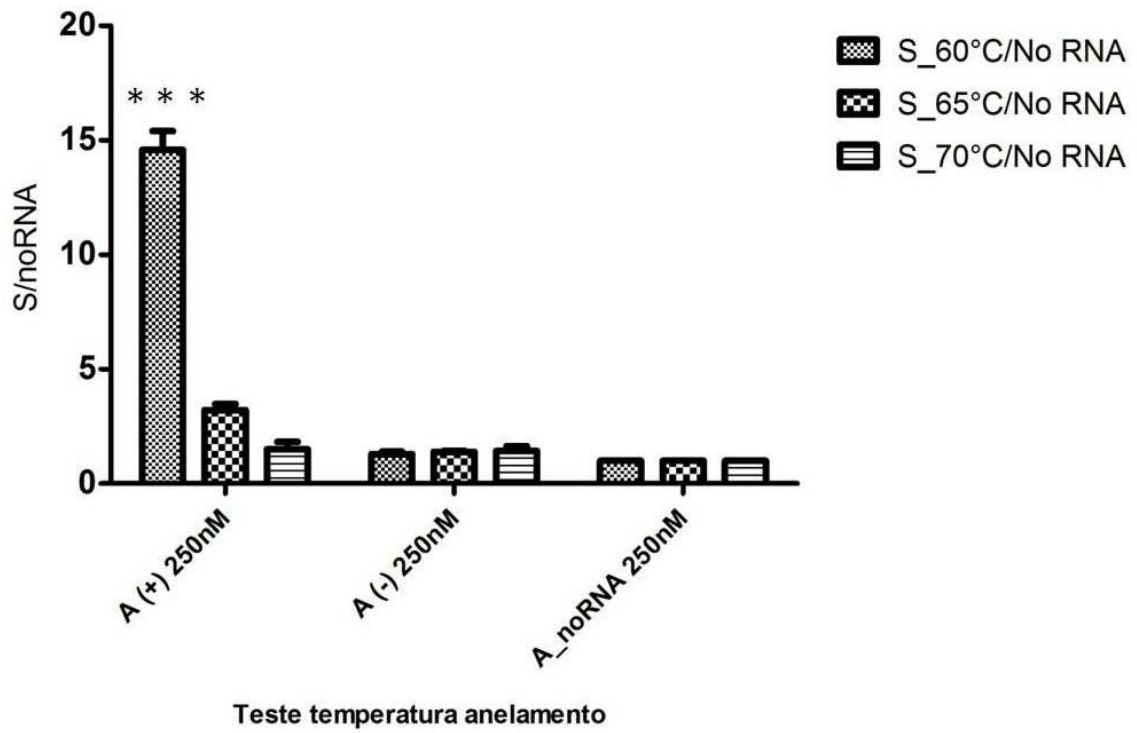


Figura 4

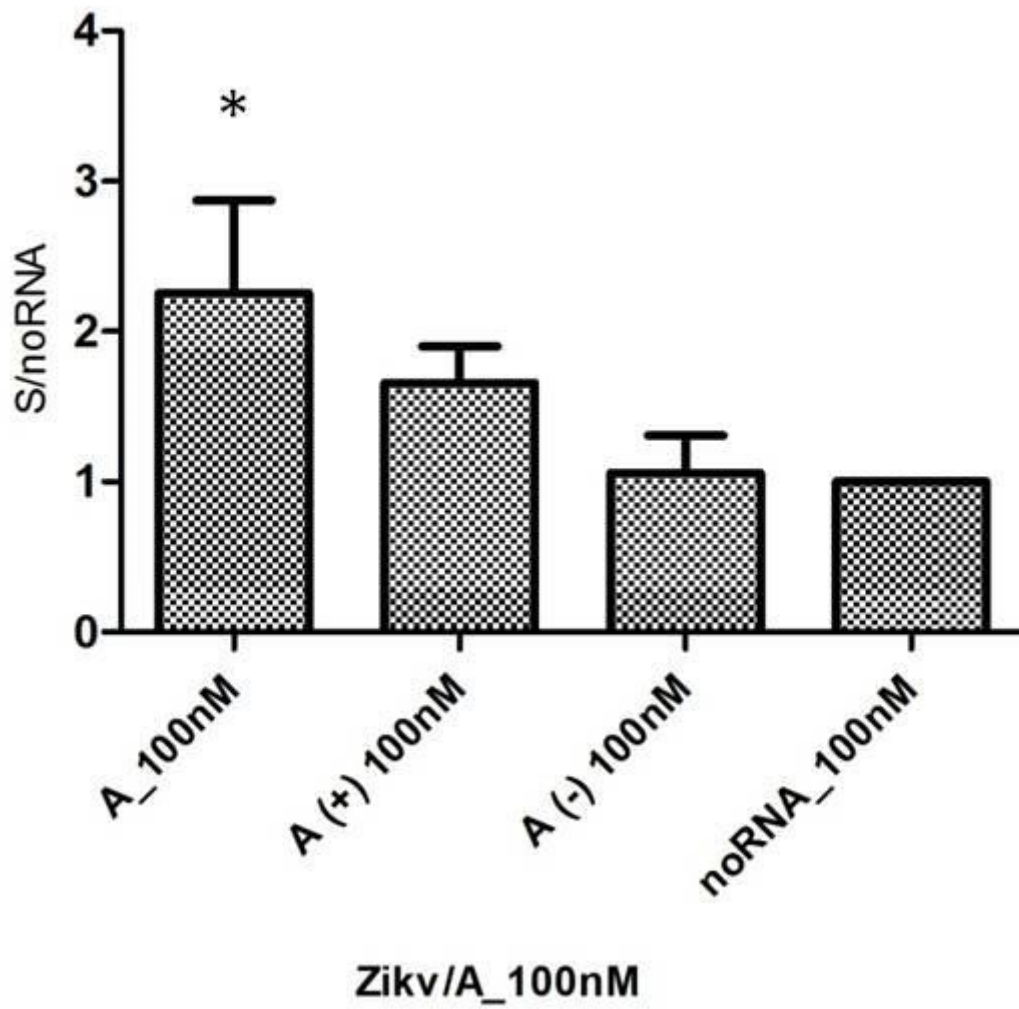


Figura 5

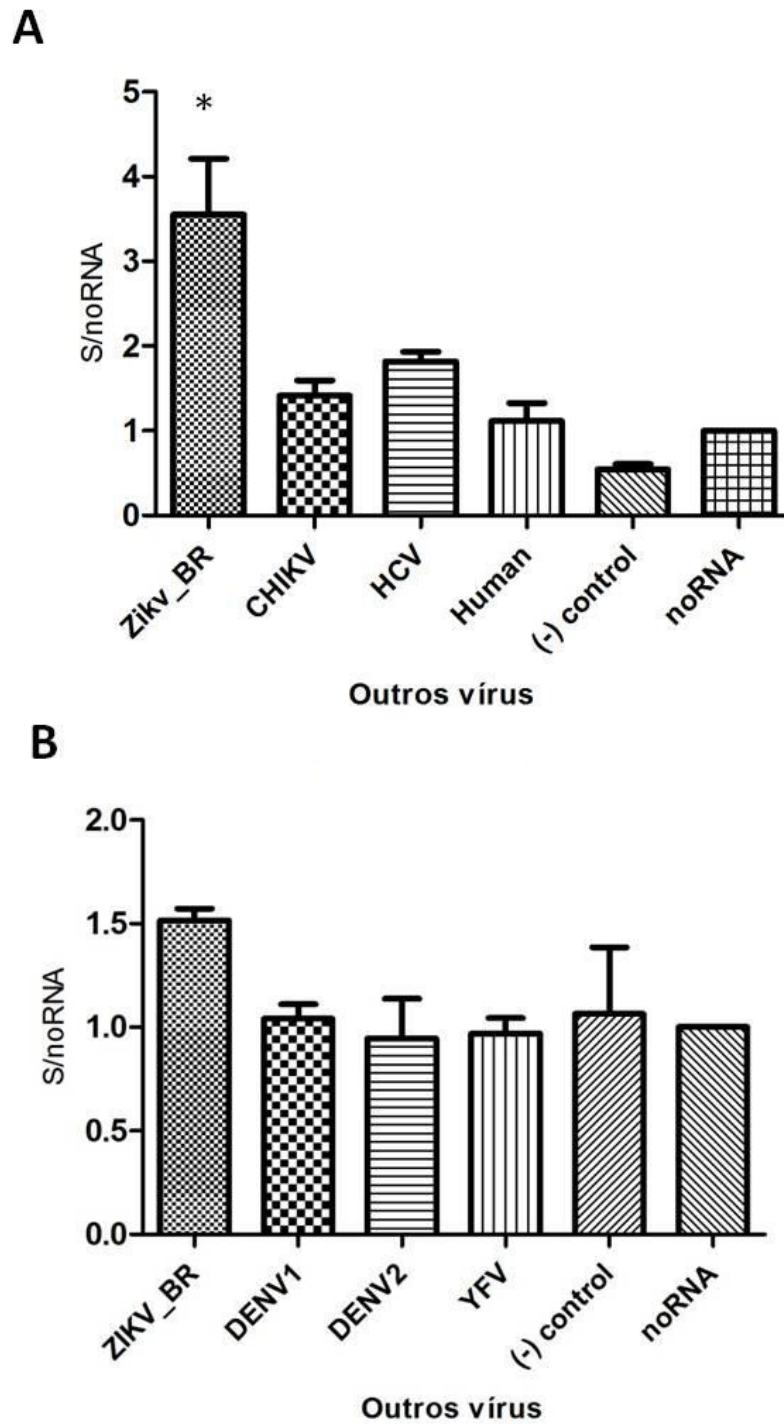


Figura 6

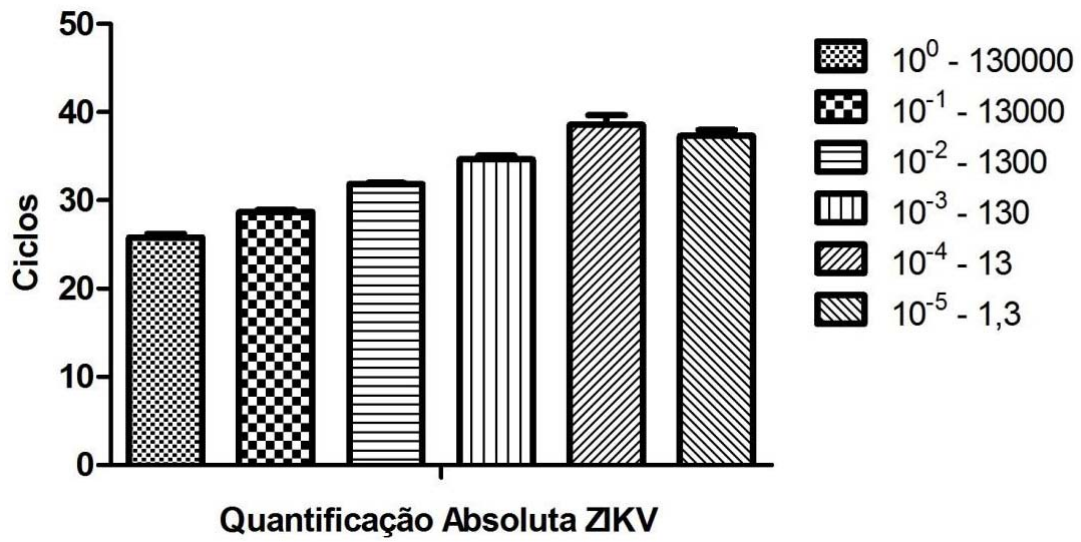


Figura 7

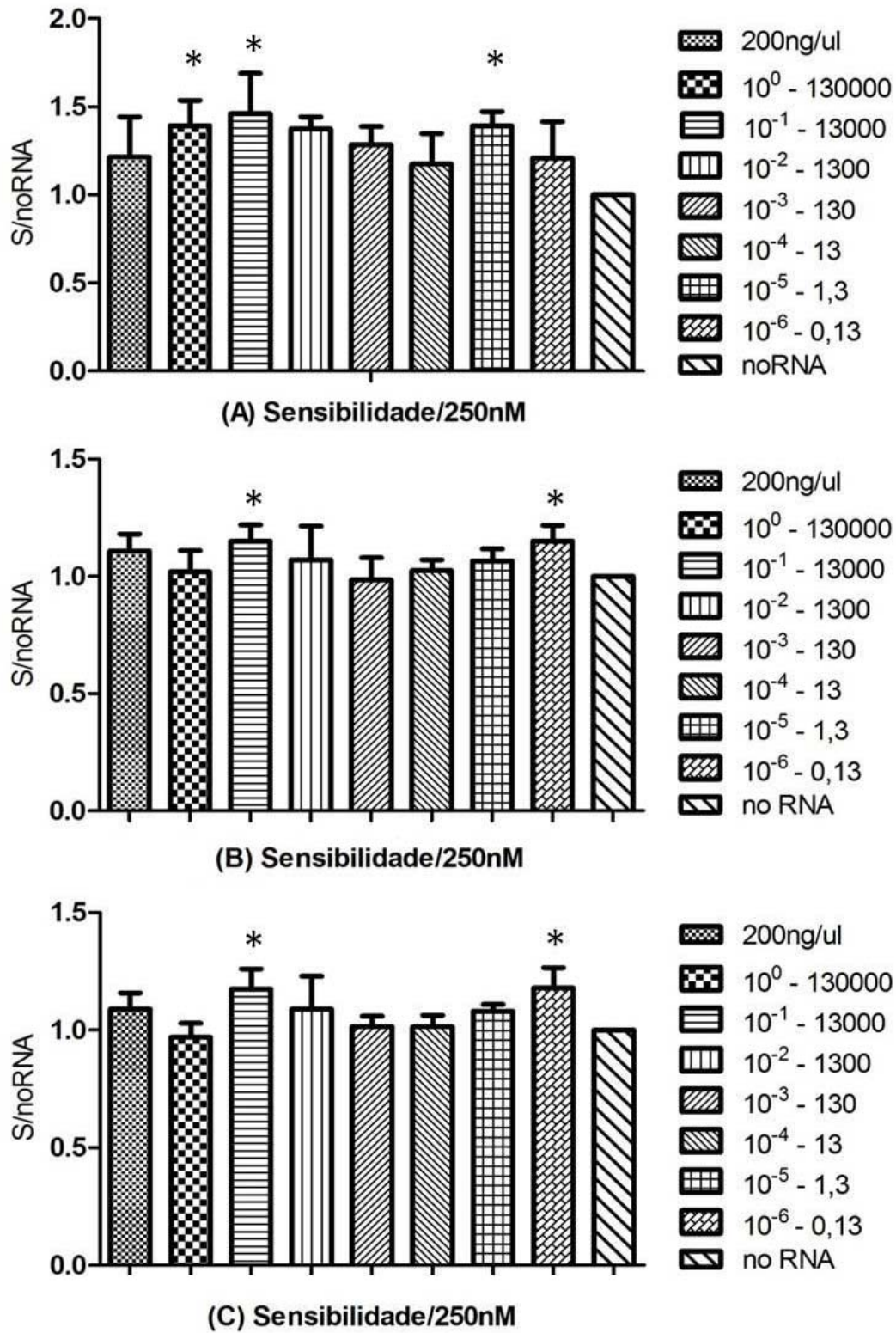


Figura 8

RESUMO

KIT DIAGNÓSTICO PARA O VÍRUS DA ZIKA

A presente invenção se insere no campo da Medicina, mais precisamente na área de diagnóstico de doenças e descreve um kit para o diagnóstico molecular, sem amplificação do material genético viral, específico, capaz de identificar a infecção pelo vírus da Zika (ZIKV) em larga escala e diferenciá-la das infecções causadas pelos demais arbovírus. A metodologia baseia-se na utilização de sondas do tipo molecular beacons complementares ao RNA viral.