



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

(21) **PI0900612-5 A2**

(22) Data de Depósito: 13/02/2009
(43) Data da Publicação: 28/06/2011
(RPI 2112)



* B R P I 0 9 0 0 6 1 2 A 2 *

(51) *Int.Cl.:*
G01N 33/50 2006.01

(54) Título: **MÉTODO DE DETECÇÃO DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS E KIT DE DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSE**

(73) Titular(es): Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde FEEPS, Leonides Rezende Júnior, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

(72) Inventor(es): Arnaldo Zaha, Leonides Rezende Júnior, Maria Lucia Rosa Rosetti, Rosa Dea Sperhacke

(57) Resumo: MÉTODO DE DETECÇÃO DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS E KIT DE DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSE. A presente invenção consiste em um método para detecção de M. tuberculosis e um kit para o diagnóstico de tuberculose. Particularmente, o referido processo e kit são baseados na detecção em amostras clínicas pulmonares e extrapulmonares de pacientes com tuberculose.



PI0900612-5

Relatório Descritivo de Patente de Invenção

MÉTODO DE DETECÇÃO DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* E KIT DE DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSE

5 Campo da Invenção

A presente invenção consiste em um método de detecção de *Mycobacterium tuberculosis* e um kit para o diagnóstico de tuberculose. Particularmente, o referido processo e kit são baseados na detecção em amostras clínicas pulmonares e extrapulmonares de pacientes com tuberculose. A presente invenção é particularmente útil em setores médicos (oncologia clínica e laboratorial), laboratórios de biologia molecular e biotecnologia, laboratórios de análises clínicas, laboratórios de citopatologia, hospitais, instituições de pesquisa, universidades e na indústria farmacêutica.

15 Antecedentes da Invenção

Mycobacterium tuberculosis

Estimativas da Organização Mundial de Saúde (WHO) mostram que cerca de um terço da população está infectada com *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), sendo que 9,2 milhões de novos casos e cerca de 3 milhões de mortes ocorrem por ano.

A interação inicial entre o microorganismo e o hospedeiro influencia o andamento da infecção, sendo que o estudo da expressão gênica do microorganismo é fundamental para o conhecimento aprofundado do mesmo e, conseqüentemente, a criação de novos métodos de diagnóstico/tratamento da tuberculose.

Diagnóstico

Os diagnósticos realizados em laboratório da tuberculose são ainda insatisfatórios, e isso prejudica a rápida intervenção terapêutica, uma vez que os kits de diagnóstico atuais, baseados em métodos bioquímicos ou meios de cultura, não garantem o tratamento médico em tempo hábil, e que as colônias de *M. tuberculosis* só são visíveis após 10-24 dias de cultura e a baciloscopia é

inespecífica. A bactéria cresce lentamente *in vitro* e o método tem as desvantagens de ser muito demorado e de difícil execução, uma vez que necessita de procedimentos especiais de biosegurança. Recentemente, algumas técnicas de biologia molecular também foram desenvolvidas, como
5 análise de PCR de fragmentos específicos para detectar a presença do genoma de MTB, ou hibridização usando sondas de DNA, que são técnicas que requerem seqüências espécies-específicas para a identificação de microorganismos e diagnóstico de tuberculose.

A literatura patentária analisada não antecipa e nem sugere, ainda que
10 indiretamente, qualquer dos objetos da presente invenção.

O documento WO 07/140545 descreve métodos de diagnóstico e tratamento de *M. tuberculosis* compreendendo a identificação de proteínas isoladas ou recombinantes putativas EFTu (Fator de Elongamento Tu) utilizando, por exemplo, ELISA. A presente invenção difere desse documento
15 por não identificar especificamente EFTu.

O documento WO 06/008760 descreve métodos de diagnóstico de tuberculose compreendendo a detecção de anticorpos isocitrato desidrogenase, anti-*Mycobacterium tuberculosis*. A presente invenção difere desse documento por não compreender a detecção de anticorpos anti-
20 *Mycobacterium tuberculosis*.

O documento WO 05/021790 descreve o uso de seqüências gênicas específicas, que pertenciam a uma região de deleção de *M. bovis* BCG para a detecção de *M. tuberculosis* utilizando técnicas conhecidas, como PCR e/ou ELISA. A presente invenção difere desse documento por não identificar BCG.

A presente invenção difere dos documentos citados acima por
25 compreender uma sonda específica, aminada, não descrita nos referidos documentos. Essa sonda é capaz de hibridizar especificamente no material biológico de *Mycobacterium tuberculosis*, permitindo a sua detecção e, conseqüentemente, o diagnóstico de pacientes infectados com esse
30 microorganismo, como no caso da tuberculose.

Do que se depreende da literatura pesquisada, não foram encontrados documentos antecipando ou sugerindo os ensinamentos da presente invenção, de forma que a solução aqui proposta possui novidade e atividade inventiva frente ao estado da técnica.

5

Sumário da Invenção

A presente invenção um método novo e melhorado para detecção de *Mycobacterium tuberculosis* (bacilo causador da tuberculose).

É, portanto, um objeto da presente invenção um método para detecção de *Mycobacterium tuberculosis* compreendendo as etapas de:

- a) identificar e/ou extrair e/ou purificar o material biológico de uma amostra;
- b) amplificar o material biológico de a) referente à *Mycobacterium tuberculosis*;
- 15 c) hibridizar os produtos amplificados de b) com uma sonda específica de SEQ N°1, aminada na porção 5', e/ou materiais biológicos com mais que 95% de identidade com a sonda, imobilizada em uma placa de ELISA;
- d) detectar o produto amplificado.

20 Em uma realização preferencial, o método para detecção de *Mycobacterium tuberculosis* compreende as etapas de:

- a) identificar e/ou extrair e/ou purificar um material biológico de uma amostra clínica utilizando resina de sílica;
- b) produzir amplicons a partir da amplificação de uma região alvo utilizando PCR;
- 25 c) hibridizar o material biológico de b), compreendendo:
 - c1) desnaturação dos amplicons;
 - c2) ligar os amplicons às sondas aminadas reconhecedoras específicas de SEQ N°1, aminadas na porção 5', e/ou materiais biológicos com mais que 95% de identidade com a sonda,
 - 30 imobilizada em uma placa de ELISA;

d) detectar o material biológico compreendendo as etapas de:

d1) utilizar um material biológico de detecção que se ligue no complexo formado entre os amplicons e as sondas fixadas na placa de ELISA;

5 d2) adicionar um substrato químico;

d3) adicionar uma solução de parada.

Em uma realização opcional, o referido método compreende a etapa adicional de leitura do material detectado utilizando um leitor de ELISA com filtro de 450 nm.

10 Em uma realização preferencial, a região alvo é uma região de 245 pb do elemento IS 6110 de *M. tuberculosis*.

Em uma realização preferencial, o material biológico de detecção é a streptavidina peroxidase.

15 Em uma realização preferencial, o substrato químico é o 3,3', 5, 5'tetrametilbenzidina (TMB).

É um adicional objeto da presente invenção um kit para diagnóstico de tuberculose compreendendo:

a) meios para identificar e/ou extrair e/ou purificar o material biológico de uma amostra;

20 b) meios para amplificar o material biológico de a) referente à *Mycobacterium tuberculosis*;

25 c) meios para hibridizar os produtos amplificados de b) com uma sonda específica de SEQ Nº1, aminada na porção 5', e/ou materiais biológicos com mais que 95% de identidade com a sonda, imobilizada em uma placa de ELISA em uma placa de ELISA;

d) meios para detectar o produto amplificado.

Em uma realização preferencial, os meios para amplificar o material biológico de uma amostra compreendem a técnica de PCR.

30 Em uma realização preferencial, os meios para detectar o produto amplificado compreendem materiais biológicos de detecção, substratos químicos e/ou soluções de parada.

Estes e outros objetos da invenção serão imediatamente valorizados pelos versados na arte e pelas empresas com interesses no segmento, e serão descritos em detalhes suficientes para sua reprodução na descrição a seguir.

5 Descrição Detalhada da Invenção

A presente invenção será exposta a seguir em detalhes. Os exemplos descritos a seguir são meras concretizações preferenciais da invenção, não devendo ser compreendidos como limitantes de invenção. Variações ou concretizações similares devem ser consideradas como dentro do escopo da invenção.

Material Biológico

O material biológico útil na presente invenção inclui, mas não se limita aos elementos como DNA, RNAs e/ou proteínas, inteiros ou parciais, encontrados em células e/ou tecidos e/ou órgãos de um organismo eucarioto. Em especial, o material biológico utilizado na presente invenção para a detecção é o DNA.

Em especial, o material biológico de *Mycobacterium tuberculosis* utilizado é uma região de 245 pb do elemento IS6110 deste microorganismo.

Método para detecção

O método para detecção de *Mycobacterium tuberculosis* compreende as etapas de:

a) identificar e/ou extrair e/ou purificar o material biológico de uma amostra;

b) amplificar o material biológico de a) referente à *Mycobacterium tuberculosis*;

c) hibridizar os produtos amplificados de b) com uma sonda específica aminada de SEQ N° 1 e/ou materiais biológicos com mais que 95% de identidade com a sonda, imobilizada em uma placa de ELISA;

d) detectar o produto amplificado.

Em uma realização preferencial, o método para detecção de *Mycobacterium tuberculosis* compreende as etapas de:

- a) identificar e/ou extrair e/ou purificar um material biológico de uma amostra clínica utilizando resina de sílica;
- 5 b) produzir amplicons a partir da amplificação de uma região alvo utilizando PCR;
- c) hibridizar o material biológico de b), compreendendo:
 - c1) desnaturação dos amplicons;
 - c2) ligar os amplicons às sondas aminadas reconhecedoras específicas de SEQ Nº 1 imobilizadas em placas de ELISA;
- 10 d) detectar o material biológico compreendendo as etapas de:
 - d1) utilizar um material biológico de detecção que se ligue no complexo formado entre os amplicons e as sondas fixadas na placa de ELISA;
 - 15 d2) adicionar um substrato químico;
 - d3) adicionar uma solução de parada.

Resina de Sílica

A Resina de Sílica, que será utilizada no protocolo de extração de DNA de *M. tuberculosis* de amostras clínicas, será preparada como descrito por Boom e colaboradores (1990). Para tanto, os reagentes necessários serão: Dióxido de Silício (SiO_2), Ácido Clorídrico (HCl) e água desmineralizada.

Primeiramente, 60g de Dióxido de Silício serão colocados em 500mL de água desmineralizada. Após agitação vigorosa, o preparado será deixado sedimentando por 24 horas a temperatura ambiente. O sobrenadante (430mL) então deverá ser retirado por sucção e novamente deverá ser adicionado o volume para completar 500mL de água desmineralizada. O *pellet* de sílica deverá ser ressuspenso através de vigorosa agitação e deixado novamente sedimentando por 24 horas a temperatura ambiente. O sobrenadante deverá ser novamente retirado (440mL) e o pH ajustado para 2,00 adicionando-se

600 μ L de HCl. Depois de pronta, a resina deverá ser autoclavada e poderá ser estocada em geladeira, no escuro por até seis meses (BOOM *et.al*, 1990).

Kit para Diagnóstico

- 5 O referido kit compreende, preferencialmente:
- a) meios para identificar e/ou extrair e/ou purificar o material biológico de uma amostra;
 - b) meios para amplificar o material biológico de a) referente à *Mycobacterium tuberculosis*;
 - 10 c) meios para hibridizar os produtos amplificados de b) com uma sonda específica imobilizada de SEQ Nº 1 em uma placa de ELISA;
 - d) meios para detectar o produto amplificado.

15 Em uma realização preferencial, o material celular é o DNA e os meios para a obtenção do dito DNA podem ocorrer por um grande número de variações metodológicas. Em uma de suas concretizações, pode ser utilizado reativos/técnicas como PCR, ambos já conhecidos do estado da técnica.

20 A etapa de extração e/ou identificação e/ou purificação útil na presente invenção inclui qualquer técnica já utilizada direcionada ao material biológico de escolha.

Exemplos de técnicas incluem, mas não se limitam, técnicas corriqueiras de biologia molecular como PCR.

25 Na técnica de PCR, amplamente conhecida do meio científico, o material genético é desnaturado e primers se ligam à eles, permitindo a amplificação do material genético, como DNA previamente extraído e purificado. Após essa amplificação, é possível verificar e comparar a expressão dessa molécula pela análise de géis.

Exemplo 1 – Processo *in vitro* para diagnóstico de *Mycobacterium*

30 O processo revelado nesta concretização preferencial da invenção compreende as seguintes etapas:

- 1) Extração do DNA do *M. tuberculosis* do material clínico utilizando uma primeira etapa de lise celular que rompe a célula bacteriana com posterior liberação do DNA de seu interior. A segunda etapa na preparação da amostra consiste em purificar o DNA, que possivelmente esteja presente, removendo substâncias encontradas usualmente em materiais clínicos, que podem atuar como inibidores da *Taq* DNA polimerase no processo subsequente de amplificação.
5
- 2) Amplificação pela PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) de uma região "alvo" de 245 pb (pares de bases) correspondente ao elemento IS6110 do DNA genômico do *Mycobacterium tuberculosis*. A mistura de reagentes da PCR, que contém a amostra de DNA, é aquecida, expondo as seqüências alvo do iniciador específico. À medida que a mistura vai arrefecendo, os iniciadores biotinilados ligam-se aos seus alvos. A enzima polimerase estende os iniciadores a partir do molde alvo, produzindo uma seqüência de DNA biotinilado denominada de *amplicon*. Este processo é repetido por uma série de ciclos, em que cada ciclo duplica efetivamente a quantidade de DNA alvo.
10
15
- 3) Reação de Hibridização: após o processo de amplificação por PCR, os *amplicons* são desnaturados e adicionados a uma placa de ELISA que contém uma sonda específica da seqüência IS6110. Os *amplicons* se ligam a sonda que contém uma seqüência alvo complementar, sendo assim "capturados" na placa. Etapas de lavagens asseguram a especificidade da reação, removendo todo *amplicon* não ligado.
20
- 4) Reação de Detecção: o complexo da sonda com o *amplicon* é visualizado por intermédio de uma reação colorimétrica. O conjugado streptavidina peroxidase (SP) é adicionado à placa, ligando-se aos amplicons marcados pela biotina e capturados pela sonda. A adição do substrato TMB resulta na formação de um complexo de cor azul, na presença do conjugado SP. Posteriormente, uma Solução de parada é adicionada, conferindo uma coloração amarelada à reação.
25
30

Tabela 1 – Descrição Detalhada dos Componentes

| Nº Produtos | Quantidade |
|--|-------------------|
| 1 Resina de sílica | 250 µL |
| Solução tampão (ST)* | |
| 2 (Contém TRIS e EDTA)* | 20 mL |
| 3 Solução de Lise | 12 mL |
| 4 Solução Mix-PCR 4 frascos com 1 mL cada | 4 mL |
| 5 Reagente de Lavagem A (LVA) | 50 mL |
| 6 Reagente de Lavagem B (LVB) | 25 mL |
| 7 Reagente de Hibridização (RH)* | 12 mL |
| 8 Reagente de Lavagem 1 (RL1)* | 250 mL |
| 9 Reagente de Lavagem 2 (RL2)* | 250 mL |
| 10 Solução de Parada (Ácido Sulfúrico 0,1M) -não fornecido pelo kit | 12 mL |
| 11 Conjugado Enzimático – Streptavidina Peroxidase (SP) | 12 mL |
| 12 TMB (3,3',5,5' Tetramethylbenzidine) | 12 mL |
| 13 Placas (12 <i>strips</i> para 8 análises cada) | 12 <i>strips</i> |
| Controle positivo da reação estoque (CPR) (10 fg/reação) | |
| 14 DNA de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> | 100 µL |
| Controle positivo da extração (CPE). 10 frascos com 100 µL cada | |
| Cada 100 µL contém uma suspensão bacteriana inativada DNA de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> correspondendo a 50 | |
| 15 UFC (unidades formadoras de colônias) | 1 mL |
| 16 Controle negativo da reação (CNR) | 1000 µL |
| 17 Tween 20 (Polyoxyethylene sorbitan mono-laurate) | 500 µL |
| * formulação exclusiva do fornecedor | |

Exemplo 1.1 - Extração de DNA

1. Preparar o controle CNE.
2. Calcular o volume de ST e Soluções de Lavagens a serem utilizadas de acordo com o número de amostras (não esquecer CNE) e separar em frasco estéril.

3. Colocar o tubo do controle CNE, CPE e amostras na centrífuga e centrifugar por 10 minutos a 13.000 rpm (orientar o tubo na centrífuga com relação ao material a ser sedimentado).
- 5 4. Em cabine de fluxo laminar, retirar o sobrenadante de cada amostra e dos controles com micropipeta com ponteira com filtro
5. Adicionar a todos os tubos 100 μ L de Solução de Lise (SL) usando ponteira com filtro. Colocar as amostras a 100°C por 10 min.
6. Homogeneizar a resina de sílica e adicionar 2,5 μ L desta em cada um dos microtubos novos previamente numerados. (usar ponteira com filtro)
- 10 7. Centrifugar todos os tubos por 1 minuto a 13.000 rpm (etapa 5).
8. Retirar o sobrenadante e transferir para o microtubo contendo a resina, homogeneizar com a ponteira.
9. Centrifugar todos os tubos por 1 minuto a 13.000 rpm.
- 15 10. Retirar o sobrenadante com ponteiras novas com filtro, trocando a ponteira para cada amostra.
11. Adicionar 200 μ L de Solução de Lavagem A, homogeneizar em vortex.
12. Repetir o passo 9 e 10 e 11.
- 20 13. Repetir os passos 9 e 10.
14. Adicionar 200 μ L de Solução de Lavagem B, homogeneizar em vórtex.
15. Centrifugar todos os tubos por 1 minuto a 13.000 rpm.
16. Retirar o sobrenadante, e colocar os tubos fechados a 56°C por
- 25 10 min.
17. Abrir os tubos dentro da capela de fluxo laminar e deixar secar por 5 min.
18. Adicionar 33 μ L de solução tampão em cada tubo. Homogeneizar em vortex, colocar em banho 56°C por 10 min.
- 30 19. Centrifugar 1 minuto a 13.000 rpm.

20. Transferir o sobrenadante (usando ponteira com filtro) para microtubos de 0,5 mL previamente identificados. (cuidar para não misturar o sobrenadante com a resina)

5 21. Armazenar os DNAs extraídos a -20°C até o momento de processar a PCR.

Exemplo 1.2 - Reação de PCR

1. Descongelar o CNR e a MIX-PCR, em local apropriado.
- 10 2. Identificar os microtubos de reação de acordo com as amostras, incluindo os controles CPR e CNR.
3. Aliquotar 40 μ L da MIX-PCR em todos os microtubos, previamente identificados.
4. Adicionar 10 μ L de controle negativo de reação no microtubo denominado CNR.
- 15 5. Transportar os microtubos fechados até a área de pipetagem do DNA na MIX-PCR

Exemplo 1.3 - Adição das amostras na MIX-PCR (em câmara de fluxo laminar/ ou capela com UV (local diferente de onde foi realizada a extração))

- 20 1. Adicionar 10 μ L de amostra (DNA previamente extraído) em cada microtubo contendo a MIX-PCR, previamente identificados, bem como 10 μ L do CPR.
- 25 2. Colocar os tubos no termociclador e programar as condições de amplificação descritas abaixo. Optar pelo uso da placa de aquecimento (*hot bonnet*).
- 30 3. Após o término da PCR, guardar os microtubos em freezer até o momento da hibridização e detecção.

30 Tabela 2 – Condições de Amplificação

Desnaturação

94 °C, 2 minutos

| | |
|----------------------------------|------------------|
| Anelamento | 68 °C, 2 minutos |
| Extensão | 72 °C, 2 minutos |
| Número de ciclos | 35 |
| Estabilização e parada de reação | 4°C |

Exemplo 1.4 - Hibridização e Detecção

1. Numerar os *strips* da placa a ser utilizada e fazer um mapa das amostras que serão detectadas.
- 5 2. Desnaturar o produto amplificado de cada amostra durante 5 minutos a 100°C, após colocar as amostras diretamente no gelo.
3. Preparar a solução de hibridização (SH) - Colocar o volume de 100 µL de solução em cada poço da placa (identificar os locais).
4. Adicionar 30 µL do produto amplificado correspondente, previamente
10 desnaturado.
5. Selar a placa, manter a 50°C, durante 45 minutos.
6. Aspirar a solução da placa.
7. Lavar a placa 3 vezes com 300µL solução de lavagem 1.
8. Adicionar 300µL da Solução de Lavagem 1 pré-aquecida a 50°.
- 15 9. Cobrir a placa e colocar a 50°C por 15 minutos.
10. Lavar a placa 3 vezes com 300µL solução de lavagem 1.
11. Adicionar 100 µL do conjugado Streptavidina Peroxidase (SP).
12. Cobrir a placa e incubar a 37°C por 30 min.
13. Lavar a placa 3 vezes com 300µL Solução de Lavagem 2.
- 20 14. Adicionar 300µL de Solução de Lavagem 2 e deixar por 5 minutos a temperatura ambiente.
15. Lavar a placa 3 vezes com 300µL Solução de Lavagem 2.
16. Adicionar 100 µL do substrato TMB.
17. Incubar por 15 min a temperatura ambiente.
- 25 18. Adicionar 100 µL de Solução de Parada e ler a placa em Leitora de ELISA utilizando comprimento de onda de 450 nm e refiltro 620nm.

Exemplo 1.5 - Análise dos resultados

Inicialmente o método de extração de DNA das amostras clínicas era realizado conforme descrito por ROSSETTI *et al.*, (1997), utilizando-se na etapa de purificação do DNA uma resina comercial (SephaglasTM, Band –Prep Kit, Amersham Pharmacia Biotech). Atualmente este foi aperfeiçoado, a etapa de extração do DNA do *Mycobacterium tuberculosis* passou a ser realizada através da lise da parede celular por fervura com o auxílio de uma Solução de Lise. Após, o DNA extraído, é purificado com a utilização da resina de sílica preparada conforme Boom *et al.*, (1990), para posterior amplificação utilizando a PCR.

Tabela 3 - Verificação dos controles e Amostras

CPE / CPR / Amostras positivas

Presença de coloração inicialmente azul posteriormente amarela (após colocação da solução de parada). A leitura em ELISA filtro 450 nm e refiltro 620 nm deverá ser observada (10% acima do valor do "cut off" (0,250)/ >0,275)

CNE CNR Amostras negativas

Ausência de coloração. A leitura em ELISA filtro 450 nm e refiltro 620 nm deverá ser observada (10% abaixo do valor do "cut off" (0,250)/ < 0,225)

Zona Cinza (Amostras que deverão ser repetidas com leitura entre 0,225 e 0,275)

O experimento referente ao teste com o protocolo padronizado e os resultados referentes, seguem abaixo:

Tabela 4 – Experimentos realizados com a resina e reagentes – Protocolos para teste

| |
|--|
| 1- Utilizar o 500 µL de amostra (diluições de <i>M.tuberculosis</i>) |
| 2- Centrifugar 10 min 13.000 rpm, retirar o sobrenadante |
| 3- Ressuspender em 100 µL de Solução de Lise (utilizar vortex) e colocar a 100°C por 10 min |

| |
|--|
| 4- Centrifugar 1 min, 13.000 rpm, transferir o sobrenadante para novo tubo contendo 2,5µL de Resina de Sílica e homogeneizar |
| 5- Centrifugar 1 min a 13.000 rpm, retirar o sobrenadante |
| 6- Ressuspender em 200µL de Solução de Lavagem 1 (utilizar vortex) |
| 7- Repetir os passos 5 e 6 |
| 8- Centrifugar 1 min a 13.000 rpm, retirar o sobrenadante |
| 9- Ressuspender em 200µL de Solução de Lavagem 2 (utilizar vortex) |
| 10- Centrifugar 1 min a 13.000 rpm, retirar o sobrenadante |
| 11- Colocar os tubos a 56°C com tampas fechadas por 10 min |
| 12- Deixar os tubos com as tampas abertas por 5 min a temperatura ambiente |
| 13- Adicionar 33 µL do tampão TE e deixar 10 min 56°C |
| 14- Centrifugar por 1min a 13.000 rpm |
| 15- Retirar os 30 µL do sobrenadante e transferir para novo tubo |

Soluções:

- (1). Resina (pó) Dióxido de Sílica / SIGMA – preparado segundo Boom *et al.* (1990)*
- (2). Solução de Lavagem 1 Gu HCl 8M/ Tris 0,08N
- 5 (3). Solução de Lavagem 2 EtOH 70%
- (4). Solução de Lise Gu HCl 8M/ Tris 0,08N / EDTA + Triton

Resultados observados:

- 10 Após a eletroforese em gel de agarose 1,5%, os controles negativos da extração e reação não apresentaram nenhum sinal de amplificação, sendo que os controles positivos da extração e reação apresentaram um sinal de amplificação conforme esperado. O mesmo ocorrendo com as amostras correspondendo às diluições -1 a -5. Portanto a sensibilidade analítica da
- 15 técnica correspondeu a 50 UFC (unidades formadoras de colônias).

Experimentos realizados com diferentes quantidades de resina

O protocolo referente à extração foi testado com diferentes quantidades de resina: 2,5 µL, 5 µL e 7,5 µL (etapa 4/protocolo para teste).

20

Resultados observados:

A eletroforese em gel de agarose demonstrou que a quantidade de 2,5 µL apresentou melhores resultados, pois o sinal de amplificação estava presente até a diluição -5, limite da sensibilidade analítica (50UFC).

Posteriormente, a extração padronizada foi conduzida em amostras clínicas, positivas, negativas e contaminadas com as diluições seriadas.

Protocolo de detecção em microplacas de Elisa

5 Para a padronização do protocolo colorimétrico, foram utilizadas diluições seriadas de DNA de *M. tuberculosis* amplificado por PCR. O protocolo será desenvolvido conforme descrito pelo fabricante das placas que serão utilizadas no procedimento (Nunc™, NucleoLink™).

10 A detecção do DNA amplificado de *M. tuberculosis* será feita conforme protocolo NucleoLink™ (Nunc™, NucleoLink™). Para tanto, as soluções a serem utilizadas são: Solução de Hibridização (SSC 5x, BSA e Tween 20), Solução de Lavagem 1 (SSC 0,5X e Tween 20), Solução de Lavagem 2 (Tris HCl, NaCl e Tween 20), Conjugado Estreptavidina Peroxidase, Substrato TMB e Solução de Parada (H₂SO₄).

15 Para a detecção, os DNAs amplificados são desnaturados por 5 minutos a 100°C, e posteriormente mantidos no gelo. É adicionado 100µL da solução de hibridização no poço da microplaca, e mais 30µL do DNA amplificado desnaturado. A placa então deverá ser fechada com adesivo e colocada a 50°C por 45 minutos. Posteriormente, a placa será lavada três vezes com a Solução de Lavagem 1 (0,1% Tween 20, 0,5X SSC) deixada por 15 minutos a 50° com a Solução de Lavagem 1 pré aquecida a 50°C e lavada mais três vezes com a mesma solução. O Conjugado Enzimático deverá ser adicionado e a placa colocada a 37°C por 30 minutos. A placa deverá ser lavada três vezes com a Solução de Lavagem 2 (100 mM Tris HCl, 150 mM NaCl, 0,1% Tween),
25 deixada a temperatura ambiente por 5 minutos com a mesma solução e posteriormente lavada mais 3 vezes. O substrato TMB (3,3',5,5'tetramethylbenzidine) deverá ser adicionado e deixado a temperatura ambiente por 15 minutos. Então deverá ser adicionada a Solução de Parada (0,1M H₂SO₄). Posteriormente a microplaca estará pronta para ser lida em
30 Leitora de ELISA no comprimento de onda de 450nm com refiltro de 620nm.

Resultados observados:

Foram testadas amostras negativas para presença de *Mycobacterium tuberculosis*. A tabela abaixo apresenta a interpretação das leituras (controles e amostras) realizadas em equipamento "Leitor de ELISA" no comprimento de onda de 450 nm e refiltro 620 nm:

Os versados na arte valorizarão imediatamente os importantes benefícios decorrentes do uso da presente invenção. Variações nas formas de concretizar o conceito inventivo aqui exemplificado devem ser compreendidas como dentro do espírito da invenção e das reivindicações anexas.

Listagem de Seqüências

Dados do requerente:

- (a) Nome: Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)
- (b) Endereço: Av. Paulo Gama, 110, Porto Alegre, RS, 90046-900.
- (c) Nome: Fundação Estadual de Proteção e Pesquisa em Saúde (FEPPS)
- (d) Endereço: Av. Ipiranga, 5400, Porto Alegre, RS, 90610-000.
- (e) Nome: Leonides Rezende Junior
- (f) Endereço: Rua Francisco Deslandes, 680, Apto. 1201, Belo Horizonte, MG, 30310-530.

Título da Invenção: MÉTODO DE DETECÇÃO DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* E KIT DE DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSE

Número de seqüências constantes do pedido: 1

Seq. nº 1

Tamanho: 28 pares de bases

Tipo: DNA

Função: Sonda molecular (5'-3')

tttttttttt gcccgtoccg cogatctc 28

Reivindicações

MÉTODO DE DETECÇÃO DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* E KIT DE DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSE

- 5 1. Método para detecção de *Mycobacterium tuberculosis* caracterizado por compreender as etapas de:
- a) identificar e/ou extrair e/ou purificar o material biológico de uma amostra;
 - b) amplificar o material biológico de a) referente à *Mycobacterium*
10 *tuberculosis*;
 - c) hibridizar os produtos amplificados de b) com pelo menos uma sonda específica de SEQ N° 1, aminada na porção 5', e/ou materiais biológicos com mais que 95% de identidade com a sonda, imobilizada em uma placa de ELISA;
 - d) detectar o produto amplificado.
- 15 2. Método para detecção, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela extração e/ou purificação do material biológico de uma amostra clínica utilizar resina de sílica.
- 20 3. Método para detecção, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela amplificação do material biológico compreender a produção de amplicons a partir da amplificação de uma região alvo utilizando PCR.
4. Método para detecção, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pela região alvo ser uma região de 245 pb do elemento IS 6110 de *M. tuberculosis*.
- 25 5. Método para detecção, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela hibridização do material biológico compreender as etapas de:
- a) desnaturação dos amplicons;
 - b) ligar os amplicons às sondas aminadas reconhecedoras
30 específicas de SEQ N° 1, aminadas na porção 5', e/ou materiais

biológicos com mais que 95% de identidade com a sonda, imobilizada em uma placa de ELISA.

6. Método para detecção, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela detecção do material biológico compreender as etapas de:

5 a) utilizar um material biológico de detecção que se ligue no complexo formado entre os amplicons e as sondas fixadas na placa de ELISA;

b) adicionar um substrato químico;

c) adicionar uma solução de parada.

10 7. Método para detecção, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo material biológico de detecção ser a enzima estreptavidina peroxidase.

8. Método para detecção, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo substrato químico ser 3,3', 5, 5'tetrametilbenzidina (TMB).

15 9. Método para detecção, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por opcionalmente compreender a etapa adicional de leitura do material detectado utilizando um leitor de ELISA com filtro de 450 nm e refiltro em 620 nm.

10. Kit para diagnóstico de tuberculose caracterizado por compreender:

20 a) meios para identificar e/ou extrair e/ou purificar o material biológico de uma amostra;

b) meios para amplificar o material biológico de a) referente à *Mycobacterium tuberculosis*;

25 c) meios para hibridizar os produtos amplificados de b) com pelo menos uma sonda específica de SEQ Nº 1, aminada na porção 5', e/ou materiais biológicos com mais que 95% de identidade com a sonda, imobilizada em uma placa de ELISA;

d) meios para detectar o produto amplificado.

30 11. Kit para diagnóstico, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelos meios para amplificar o material biológico de uma amostra compreender a técnica de PCR.

12. Kit para diagnóstico, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelos meios para detecção do produto amplificado compreenderem materiais biológicos de detecção, substratos químicos e/ou soluções de parada.

5 13. Kit para diagnóstico, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pela extração e/ou purificação do material biológico de uma amostra clínica utilizar resina de sílica.

14. Kit para diagnóstico, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pela amplificação do material biológico compreender a produção de amplicons a partir da amplificação de uma região alvo utilizando PCR.

15 15. Kit para diagnóstico, de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pela região alvo ser uma região de 245 pb do elemento IS 6110 de *M. tuberculosis*.

16. Kit para diagnóstico, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pela hibridização do material biológico compreender as etapas de:

a) desnaturação dos amplicons;

20 b) ligar os amplicons às sondas aminadas reconhecedoras específicas de SEQ Nº 1, aminadas na porção 5', e/ou materiais biológicos com mais que 95% de identidade com a sonda, imobilizada em uma placa de ELISA.

17. Kit para diagnóstico, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pela detecção do material biológico compreender as etapas de:

25 a) utilizar um material biológico de detecção que se ligue no complexo formado entre os amplicons e as sondas fixadas na placa de ELISA;

b) adicionar um substrato químico;

c) adicionar uma solução de parada.

30 18. Kit para diagnóstico, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo material biológico de detecção ser a enzima estreptavidina peroxidase.

19. Kit para diagnóstico, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo substrato químico ser 3,3', 5, 5'tetrametilbenzidina (TMB).

20. Kit para diagnóstico, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado por opcionalmente compreender a etapa adicional de leitura do material detectado utilizando um leitor de ELISA com filtro de 450 nm e refiltro de 620 nm.

P10900612-5

Resumo

**MÉTODO DE DETECÇÃO DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* E KIT DE
DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSE**

5

A presente invenção consiste em um método para detecção de *M. tuberculosis* e um kit para o diagnóstico de tuberculose. Particularmente, o referido processo e kit são baseados na detecção em amostras clínicas pulmonares e extrapulmonares de pacientes com tuberculose.