



(19) INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
PORTUGAL

(11) Número de Publicação: PT 760005 E

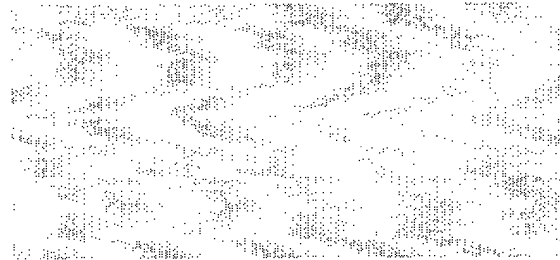
(51) Classificação Internacional: (Ed. 6)
C12Q001/68 A

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de depósito: 1994.05.16	(73) Titular(es): DE STAAT NL. VERTEG. DOOR. MIN. WELZIJN. VOLKSG. CULTUU P.O. BOX 5406 NL-2280 HK RIJSWIJK NL
(30) Prioridade:	
(43) Data de publicação do pedido: 1997.03.05	(72) Inventor(es): JOHANNES DIRK ANTHONIE VAN EMBDEN NL LEENDERT MARINUS SCHOOLS NL JUDITH KAMERBEEK NL
(45) Data e BPI da concessão: 2000.08.23	(74) Mandatário(s): JOSÉ EDUARDO LOPES VIEIRA DE SAMPAIO RUA DO SALITRE, 195 R/C DTO 1250 LISBOA PT

(54) Epígrafe: DETACÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DE BACTÉRIAS DO COMPLEXO DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS POR OLIGOTIPIFICAÇÃO DA REPETIÇÃO DE VARIANTE DIRECTA

(57) Resumo:





258

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
MINISTÉRIO DA ECONOMIA

* Campo das Cebolas - 1149 - 035 LISBOA
Telefs.: 01 888 51 51 / 2 / 3
Linha azul: 01 888 10 78
Fax: 01 837 53 08 - 886 00 66
E-mail: inpi @ mail. telepac. pt

FOLHA DO RESUMO

PAT. INV. <input checked="" type="checkbox"/>	MOD. UTI. <input type="checkbox"/>	MOD. IND. <input type="checkbox"/>	DES. IND. <input type="checkbox"/>	TOP. SEMIC. <input type="checkbox"/>	CLASSIFICAÇÃO INTERNACIONAL (51)
N.º 760.005 (11)		N.º Objectos <input type="checkbox"/> N.º Desenhos <input type="checkbox"/>		DATA DO PEDIDO ____/____/____ (22)	

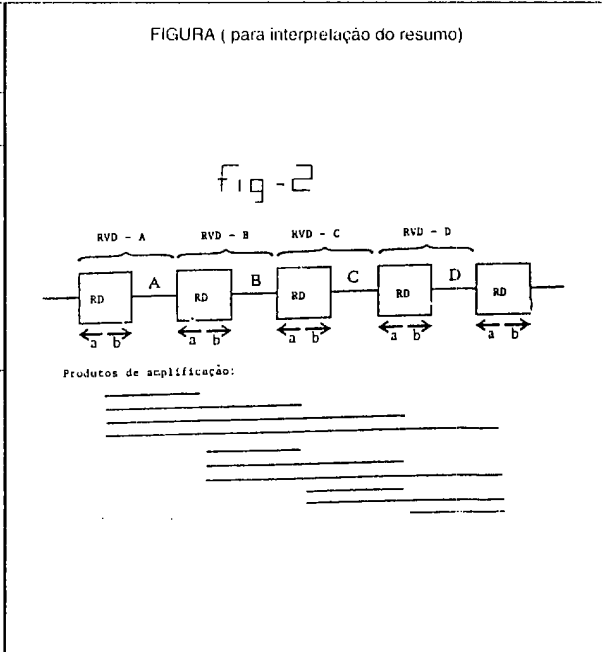
REQUERENTE (71)
(NOME E MORADA) DE STAAT DER NEDERLANDEN VERTEGENWOORDIGD DOOR DE MINISTER VAN WELZIJN, VOLKSGEZONDHEID EN CULTUUR, holandesa, com sede em P.O. Box 5406, NL-2280 HK Rijswijk, Holanda

CÓDIGO POSTAL _____

INVENTOR(ES) / AUTOR(ES) (72)
VAN EMBDEN, Johannes, Dirk, Anthonie; SCHOOLS, Leendert, Marinus e KAMERBEEK, Judith

REIVINDICAÇÃO DE PRIORIDADE(S) (30)

DATA DO PEDIDO	PAÍS DE ORIGEM	N.º DO PEDIDO



EPIGRAFE (54)
"Detecção e diferenciação de bactérias do complexo de mycobacterium tuberculosis por oligotipificação da repetição de variante directa"

RESUMO (max 150 palavras) (57)

A invenção descreve um método de amplificação de ácido nucleico *in vitro*, utilizando iniciadores de amplificação, em que se utiliza um par de iniciadores que compreendem sequências oligonucleotídicas suficientemente complementares para uma parte da sequência de Repetição Directa de um microrganismo pertencente ao complexo de microrganismos de *M. tuberculosis*, para que ocorra a hibridação com uma Repetição Directa e subsequentemente tenha lugar o alongamento do iniciador hibridado, sendo esses iniciadores tais que o alongamento na

NÃO ESCREVER NAS ZONAS SOMBREADAS



258

Campo das Cebolas - 1149 - 035 LISBOA
Telefs.: 01 888 51 51 / 2 / 3
Linha azul: 01 888 10 78 • Fax: 01 887 53 08 - 886 00 66
E-mail: Inpi @ mail. telepac. pt

INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
MINISTÉRIO DA ECONOMIA

FOLHA DO RESUMO (Continuação)

PAT. INV. <input type="checkbox"/>	MOD. UTI. <input type="checkbox"/>	MOD. IND. <input type="checkbox"/>	DES. IND. <input type="checkbox"/>	TOP. SEMIC. <input type="checkbox"/>	CLASSIFICAÇÃO INTERNACIONAL (51)
N.º _____ (11)		N.º Objectos _____ N.º Desenhos _____		DATA DO PEDIDO ____/____/____ (22)	

RESUMO (continuação) (57)

reacção de amplificação ocorra com um iniciador no sentido de 5' e com o outro iniciador no sentido de 3'. A invenção descreve também um método de detecção de um microrganismo pertencente ao complexo de microrganismos de *M. tuberculosis*, o qual consiste em levar à prática o método de amplificação anteriormente referido, seguindo-se a realização de um teste de hibridação de uma forma conhecida *per si*, utilizando uma sonda oligonucleotídica que seja suficientemente homóloga com uma parte de um separador da Região Directa de um microrganismo pertencente ao complexo de *M. Tuberculosis*, para que ocorra a hibridação, detectando-se todos os produtos hibridados de uma forma conhecida *per si*. Também são divulgadas sondas particulares. A invenção descreve ainda um método para diferenciar o tipo de microrganismo pertencente ao complexo de *M. tuberculosis* numa amostra, o qual consiste em levar à prática o método de detecção anteriormente referido, seguindo-se uma comparação entre o padrão de hibridação obtido e um padrão de referência.

NÃO ESCREVER NAS ZONAS SOMBREADAS

258

Descrição

“Detecção e diferenciação de bactérias do complexo de *Mycobacterium tuberculosis* por oligotipificação da repetição de variante directa”

INTRODUÇÃO

A tuberculose é uma doença infecciosa que mata anualmente mais pessoas do que qualquer outra doença infecciosa por si só. A OMS presume que anualmente haja cerca de 10 milhões de pessoas que contraem tuberculose e que há três milhões de pessoas que morrem em consequência desta doença (37). Depois de um longo período de diminuição lenta da incidência, a tuberculose está novamente a aumentar na maior parte dos países ocidentais. Além disso, o aparecimento de estirpes de *M. tuberculosis* multirresistentes aos fármacos e a contracção de tuberculose por indivíduos infectados com o vírus da imunodeficiência humana estão a piorar a situação de forma dramática (1, 2, 4, 6, 7, 10, 37).

Um dos factores essenciais no combate à tuberculose é o diagnóstico rápido da doença e a identificação das fontes infecciosas. Comprovou-se já que a tipificação das estirpes de *M. tuberculosis* era extremamente útil nas investigações de surtos epidémicos (6, 14, 33) e tem estado a ser aplicada a diversas questões epidemiológicas em muitos laboratórios. Tradicionalmente, o diagnóstico laboratorial é feito ao microscópio, criando em cultura os microrganismos, fazendo testes na pele e por radiografia. Infelizmente, estes métodos nem sempre são rigorosos nem específicos e são muito morosos devido à lenta velocidade de crescimento de *M. tuberculosis*. Assim sendo, foram desenvolvidas novas técnicas, tais como a amplificação *in vitro* do ADN de *M. tuberculosis* para se detectar rapidamente os microrganismos em amostras clínicas (14). A capacidade para diferenciar os isolados de *M. tuberculosis* por técnicas do ADN revolucionou

o potencial para identificar as fontes infecciosas e para definir as vias principais de transmissão e os factores de risco de contracção de tuberculose por infecção (1,3-10, 14, 16, 19-22, 25, 26, 29-36). A utilização de um sistema eficaz e universal de tipificação vai permitir comparar estirpes oriundas de zonas geográficas diferentes e seguir o rasto de cada estirpe. Os dados assim obtidos podem proporcionar um conhecimento importante e a identificação de estirpes com problemas particulares, tais como uma infecciosidade elevada, alta virulência e/ou multirresistência aos fármacos. A análise de um grande número de isolados pode levar à obtenção de respostas a perguntas persistentes relacionadas com a eficácia da vacinação com o inóculo de BCG e relativas à frequência de reactivação ou reinfeção.

Uma vez que as bactérias complexas de *M. tuberculosis* constituem um grupo de bactérias notavelmente homogéneas em termos genéticos, foram estudados elementos de ADN repetitivos e elementos transponíveis, associados aos rearranjos genéticos do ADN cromossómico, para a diferenciação das estirpes de *M. tuberculosis*. Dois desses elementos são sequências de inserção e os restantes são sequências de ADN repetitivas e curtas sem nenhuma função ou fenótipo conhecido.

O elemento mais vulgarmente utilizado para a diferenciação das estirpes é o IS6110, que é uma sequência de inserção de 1355 pb, inicialmente identificado em *M. tuberculosis* e para o qual se verificou depois que se encontrava distribuído por todas as bactérias complexas de *M. tuberculosis*, incluindo *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum*, *M. microti* e *bovis* BCG (11, 14, 15). Os outros elementos para diferenciar potencialmente as estirpes de *M. tuberculosis* são a Repetição em tandem Polimórfica Principal (RTPP, o mesmo que MPTR), a sequência Repetitiva rica em GC polimórfica (SRGP, o mesmo que PGRS) e a sequência repetitiva directa (RD, o mesmo que DR) (15, 16, 26).

A maior parte dos métodos descritos para a diferenciação das estirpes de *M. tuberculosis* depende do chamado Polimorfismo do Comprimento do Fragmento de Restrição (PCFR, o mesmo que RFLP), observado pela técnica das autorradiografias de Southern. Esta técnica exige a purificação do ADN cromossómico retirado de bactérias de *M. tuberculosis* criadas em cultura. Além disso, este método não é adequado para a detecção de um grande número de estirpes, isto é, as que contenham apenas uma cópia de IS6110 ou que não contenham nenhuma cópia de IS6110 (35) ao ser feita uma identificação de IS6110, uma vez que é necessária a presença de múltiplas unidades de IS6110 para o PCFR. Virtualmente todas as estirpes de *M. bovis* BCG e também um grande número de estirpes provenientes da Índia (35) contêm apenas uma única cópia de IS. No entanto, a maior parte das estirpes poderia ser diferenciada fazendo identificações com a Repetição Directa de 36 pb ou com o elemento de ADN repetitivo rico em GC polimórfico. Foi conseguido um poder menos discriminativo com a repetição polimórfica em andem e com o elemento de inserção IS1081. Por outro lado, as técnicas conhecidas de identificação são proibitivas em termos de custos, conhecimentos técnicos e tempo necessário para se ter êxito (32). Assim sendo, este modo de “identificar ADN” não pode ser vulgarmente praticado na maior parte dos laboratórios.

Embora tenham sido desenvolvidos métodos que assentam na reacção em cadeia com polimerase (RCP) para aumentar a velocidade de identificação de *M. tuberculosis*, tais métodos ainda exigem a purificação do ADN proveniente das células criadas em cultura e/ou são tecnicamente exigentes (12, 13, 23, 24, 27).

Groenen *et al.*, (12) descrevem um método de diferenciação de estirpes que tem por base a natureza do polimorfismo do ADN no aglomerado da RD que possibilita a tipificação de estirpes individuais de *M. tuberculosis* numa única RCP. O método descrito baseou-se na

variação genética da região da RD e no método de RCP foram utilizados os iniciadores SP24-R (proveniente da região 24 do separador) e IS-L (proveniente da cópia de IS), com base na sequência parcial previamente definida da região RD da estirpe BCG P3 de *M. bovis* (15). Os tamanhos dos produtos amplificados variam aproximadamente entre 300 e 550 pb. Utilizando este método, concluiu-se que a estirpe 42 de *M. bovis* difere da estirpe BCG P3 de *M. bovis* pela ausência de uma RVD discreta, designadamente a RVD 26. As estirpes H37Ra e H37Rv de *M. tuberculosis* diferem da estirpe P3 pela ausência de duas RVD contíguas discretas, a saber a RVD 25 e a RVD 26. Os três restantes isolados 1430 de *M. tuberculosis* em 31 são diferentes da estirpe de BCG P3 de *M. bovis* pela ausência de um segmento de 262 pb de ADN localizado directamente à esquerda da repetição invertida de IS6110 que compreende as regiões desde a RVD 27 até à RVD 29, 15 pb do separador único na RVD 26 e 18 pb da RD na RVD 30. No ensaio por RCP-RVD (o mesmo que DVR-PCR), utilizou-se o método modificado de Jeffreys *et al.*, 1991 (17). No método de Jeffreys *et al.*, designado por RCP-RVM (o mesmo que RVM-PCR), ou tipificação digital, tira-se partido de um polimorfismo, que ocorre frequentemente, de um único par de bases na repetição MS 32 minissatélite de 29 pb. Na RCP-RVM são utilizados dois pares iniciadores, tais que cada um deles permite a amplificação de múltiplos de MS 32 em que qualquer um deles possui um resíduo adenina (A) ou um resíduo guanina (G) no terminal 5'. A separação, por electroforese, dos produtos amplificados permite a leitura da sequência das RVM que contenham quer um resíduo A quer um resíduo G na extremidade 5'. No método de RCP-RVD, o polimorfismo na região de RD compreende principalmente a presença ou a ausência das RVD que são constituídas, tal como o minissatélite MS 32, por uma parte não variante (RD) e por uma parte variante (a sequência do separador). Modificou-se o método de RCP-RVM para permitir a amplificação selectiva

dos multímeros das RVD que continham um resíduo A, C, G ou T na extremidade 5' do separador na junção com a RD. Para tal, foram preparadas 4 combinações de iniciadores para comandar as quatro RCP específicas dos separadores. Cada combinação continha o iniciador reverso IS-L e qualquer dos quatro iniciadores baseados na sequência da RD. Estes quatro iniciadores, designados por DRA-R, DRC-R, DRG-R e DRT-C, continham uma sequência de 19 resíduos provenientes da sequência da RD conservada mais uma qualquer das quatro bases do terminal 3'. O princípio do método está ilustrado na figura 3 da referência 12. Cada um dos quatro iniciadores específicos da RVD dá origem a uma cadeia de multímeros de RVD que aumenta interiormente desde baixo até cima. Isto dá origem à chamada sequência do primeiro resíduo separador ou sequência do PRS (o mesmo que FSR).

Apesar da excelente diferenciação que o método da RCP-RVD permite estabelecer entre as quatro estirpes analisadas em (12) o método apresenta alguns inconvenientes. A técnica da sequenciação do ADN na versão adaptada, conforme descrito por Jeffreys *et al.*, é extremamente difícil sob o ponto de vista técnico. Normalmente não é possível ler a cadeia muito bem e a cadeia fica frequentemente incompleta, uma vez que os pequenos fragmentos são amplificados melhor do que os fragmentos de maiores dimensões. Além disso, o teste não pode ser executado de uma forma prática num laboratório vulgar, por exemplo, num laboratório hospitalar. Assim sendo, em testes hospitalares práticos, não é possível utilizar tal método. Para além dos problemas de sequenciação, também é necessário obter uma autorradiografia de Southern, o que é muito trabalhoso. Entre os problemas práticos associados à técnica de hibridação à Southern está a natureza relativamente complexa do método que exige a execução de vários passos durante vários dias e o período prolongado que decorre desde o isolamento do organismo até se obter o resultado de tipificação do ADN, essencialmente devido à criação dos organismos

em cultura em meios líquidos, para a extracção do ADN. Um método rápido e simples de tipificação das estirpes, com base na amplificação por RCP permitiria resolver o problema dos atrasos na obtenção de um resultado tipificador e proporcionar um ensaio relativamente simples que poderia ser executado em muitos laboratórios. Para se dispor de ADN genómico, em quantidade suficiente para efeitos de identificação, é necessário criar o isolado em subcultura durante 2 a 4 semanas após a identificação. Ao procurar estabelecer um surto epidémico, especialmente no caso da tuberculose multirresistente aos fármacos (TBMRF), a rápida identificação das estirpes pode aumentar os esforços de combate mediante a detecção e a interrupção das cadeias de transmissão.

Na referência 27, Ross e Dwyer divulgam a utilização das extremidades da sequência de inserção IS6110 como iniciadores oligonucleotídicos, numa tentativa para amplificar o ADN entre aglomerados deste elemento no genoma. Este teste baseia-se no pressuposto de que a sequência de inserção IS6110 está presente em 1 a 19 cópias no genoma e está localizada em diferentes locais para diversas estirpes. Esses autores ilustram o facto de o método de amplificação por RCP descrito não produzir nenhum produto nítido para as duas estirpes sem a IS6110, concluindo conseqüentemente pela inconveniência deste método. Além do mais, Ross e Dwyer concluem no seu artigo que a amplificação por RCP, utilizando as extremidades da sequência de inserção IS6110, originou bandas de diversas intensidades, ilustrando pois a falta de fiabilidade nos resultados deste teste.

Na referência 13 está descrita uma variante sobre a tipificação do PCFR (o mesmo que RFLP), utilizando a reacção em cadeia com polimerase com um iniciador específico para a IS6110, em que se utiliza um segundo iniciador complementar para um ligador unido ao ADN genómico restringido. Numa das cadeias o ligador contém uracilo em vez de timidina e a

amplificação específica é conseguida por eliminação da cadeia com uracil-N-glicosilase. Os mesmos inconvenientes deste método podem ser também apontados ao método anterior de RCP-RVD.

Na referência 25, Palittapongarnpim *et al.* descrevem a utilização da RCP com iniciadores arbitrários. Neste artigo afirma-se que os padrões de associação por RCP das estirpes H37Rv e H37Ra são idênticos. Os autores concluíram que a RCP desencadeada arbitrariamente pode distinguir estirpes de *M. tuberculosis*, embora a inaptidão da RCPDA (o mesmo que APPCR) para distinguir entre as estirpes H37Rv e H37RA demonstre a existência de uma limitação da RCPDA para estirpes mais afins.

A presente invenção descreve um método para diferenciar microrganismos pertencentes ao complexo de *M. tuberculosis*, através de um método bastante fiável, rápido e simples. O método pode ser praticado num laboratório sem equipamento complexo e pode ser levado a cabo por técnicos que não sejam especialistas em técnicas sofisticadas da biologia molecular. Além disso, tal método é adequado para detectar simultaneamente *M. tuberculosis* directamente em amostras clínicas e para tipificar (caracterizar) os microrganismos, sem que seja necessário criar em cultura bactérias do complexo de *M. tuberculosis* de crescimento lento. Finalmente, ao contrário de outros métodos de diferenciação de *M. tuberculosis* até agora utilizados, a invenção permite uma classificação fácil e bastante fiável de diferentes tipos de ADN, sem que seja necessário recorrer a sofisticadas aplicações informáticas de processamento de imagens.

DESCRIÇÃO MINUCIOSA DA INVENÇÃO

A invenção baseia-se no polimorfismo do ADN existente num *locus* cromossómico único, a região de “Repetição Directa” (RD), que apenas existe nas bactérias complexas de *M.*

tuberculosis. Este locus foi descoberto por Hermans *et al.*, (15), em *M. bovis* BCG, a estirpe utilizada universalmente para vacinação contra a tuberculose. A região de RD em *M. bovis* é constituída por sequências de 36 pares de bases repetidas directamente, entre as quais são intercalados separadores de ADN não repetitivos, cada um deles com um comprimento de 35 a 41 pares de bases (15). Determinou-se que o número de cópias da sequência de RD em *M. Tuberculosis* era igual a 49. Noutras estirpes do complexo de *M. tuberculosis* comprovou-se que o número de elementos de RD variava (15). A grande maioria das estirpes de *M. tuberculosis* contém um ou vários elementos de IS6110 na região do genoma que contém a RD.

O estudo recente (12) anteriormente descrito demonstrou que a diversidade genética na região de RD é gerada pela diferença no número de cópias de RD, sugerindo tal facto que a recombinação homóloga entre as sequências de RD possa ser eventualmente uma das principais forças responsáveis pelo polimorfismo do ADN associado à RD (12).

O elevado grau de polimorfismo do ADN numa parte relativamente pequena do cromossoma faz com que esta região seja particularmente adequada para a prática da técnica de identificação de vestígios à base da RCP.

A invenção adiante descrita tem por base um método exclusivo de amplificação, efectuado *in vitro*, de sequências de ADN dentro da região de RD e a hibridação do ADN amplificado com sequências curtas de ADN oligomérico de síntese, com base em sequências dos ADN do separador exclusivo dentro da região de RD (figura 2). Isto difere dos métodos anteriores de RCP pelo facto de se utilizar um conjunto de iniciadores em que ambos os iniciadores possuem locais de iniciação múltiplos, em contraposição à metodologia em que um dos iniciadores se liga a um local de iniciação fixo, tal como uma parte de IS6110. Uma vez que as estirpes do complexo de *M. tuberculosis* diferem entre si pela presença destas sequências separadoras,

25/9

então tais estirpes podem ser diferenciadas pelos diferentes padrões de hibridação com um conjunto de diversas sequências de ADN separadoras.

Determinação das sequências de ADN da região de RD completa em *M. tuberculosis*.

A figura 1 representa a estrutura da região de RD de *M. bovis* BCG conforme determinada anteriormente por Hermans *et al.* e Groenen *et al.* (12, 15). Por razões de conveniência designaremos uma RD mais a sua sequência do separador adjacente em 3' pela expressão "repetição de variante directa" (RVD). Assim, a região de RD é constituída por um número discreto de RVD em que cada uma destas é constituída por uma parte constante (RD) e por uma parte variável (o separador).

A parte sequenciada da região de RD em *M. bovis* BCG está impressa a negro e é constituída por 21 RVD, estando 7 localizadas para 5' do elemento IS6110 e estando 14 RVD para 3' do elemento IS6110 (incluindo aquela em que está localizado o elemento IS6110). A parte não sequenciada está representada a cinzento.

Para se determinar a sequência de mais separadores, realizou-se a sequenciação, na presente invenção, da sequência da região cromossómica que contém toda a região de RD de *M. tuberculosis* H37Rv e também as sequências que flanqueiam a região de RD. Para o efeito utilizou-se o cosmídeo T211 (fornecido pelo Dr. Cole, Institut Pasteur, Paris), portador de toda a região de RD. Este cosmídeo contém uma inserção com cerca de 35 kb proveniente da estirpe H37Rv de *M. tuberculosis*. Construiu-se um mapa físico e localizou-se o segmento que contém a região de RD por hibridação à Southern. Procedeu-se à preparação de subclones e sequenciou-se o ADN que flanqueia o elemento IS6110 residente no agregado de RD. A sequência obtida está indicada na figura 3, sendo designada por sequência id. nº 1.

Conforme ilustrado esquematicamente na figura 1, o número das RD na estirpe H37Rv é de 41. Tal como anteriormente verificado em *M. bovis* BCG, mais uma vez se comprovou que a seguir a cada DR estava interposta uma única sequência separadora, com um tamanho variável entre 29 e 41 pares de bases. As sequências de 13 RVD da estirpe H37Rv são idênticas às sequências de 13 RVD na região cromossômica homóloga previamente sequenciada de *M. bovis* BCG. Atribuiu-se às RVD da estirpe H37Rv a numeração desde 1 até 41, começando a contagem na RVD do terminal 5'. As RVD idênticas são os separadores desde 12 a 32.

A invenção descreve um método de amplificação de ácido nucleico *in vitro*, utilizando iniciadores de amplificação de um modo conhecido *per se* nas reacções de amplificação, tais como RCP, RCL ou 'NASBA', em que se utiliza um par de iniciadores constituído por sequências oligonucleotídicas suficientemente complementares para uma parte da sequência de Repetição Directa de um microrganismo pertencente ao complexo de microrganismos de *M. tuberculosis*, para que ocorra a hibridação com uma Repetição Directa para que subsequentemente tenha lugar ao alongamento do iniciador hibridado, sendo tais iniciadores tais que o alongamento na reacção de amplificação ocorra, com um dos iniciadores, no sentido de 5' e ocorra, com o outro iniciador, no sentido de 3'. Devido à presença múltipla de repetições directas nos microrganismos que se pretende detectar, a utilização de tais iniciadores implica que todas as regiões separadoras sejam amplificadas de forma eficiente. Em particular, não é necessário produzir sequências extremamente compridas com a finalidade de se obter a amplificação dos separadores localizados a uma certa distância do iniciador. Com a presente selecção de iniciadores, obtém-se pares de um produto heterogéneo que compreende um conjunto de fragmentos menores, possuindo todos eles ácido nucleico da região separadora. Seguidamente, pode ocorrer a detecção do produto amplificado, utilizando simplesmente uma

sonda oligonucleotídica dirigida a uma ou a várias regiões separadoras que se pretenda detectar. Com a finalidade de se evitar a obstrução nas reacções de amplificação, os iniciadores podem ter sequências oligonucleotídicas complementares de partes não sobrepostas da sequência de Repetição Directa, de tal modo que os dois iniciadores, ao hibridarem com a mesma Repetição Directa e ao ter lugar o seu alongamento, não vão estorvar-se um ao outro. Em particular, para se evitar qualquer obstrução durante as reacções de alongamento, quando um iniciador RDa (o mesmo que DRa) puder alongar-se no sentido de 5' e o outro iniciador RDb (o mesmo que DRb) puder alongar-se no sentido de 3', então o RDa é escolhido por forma a ser complementar para uma sequência da Repetição Directa localizada do lado de 5' da sequência da Repetição Directa de que o iniciador RDb é complementar. Segundo um método de acordo com a invenção, o iniciador utilizado deve possuir uma sequência oligonucleotídica capaz de hibridar com a sequência de consenso da Repetição Directa, de uma forma suficiente para que a amplificação tenha lugar nas condições da reacção de amplificação particular. Um especialista no domínio das reacções de amplificação não terá dificuldade em determinar qual o comprimento e qual o grau de homologia que são necessários para que haja boas reacções de amplificação. A sequência de consenso da Repetição Directa de microrganismos pertencentes ao complexo de *M. tuberculosis* é a sequência id. nº 2 ilustrada na figura 1.

A presente invenção também visa um método para a detecção de um microrganismo pertencente ao complexo de microrganismos de *M. tuberculosis*, o qual compreende os passos seguintes:

1) amplificar ácido nucleico de uma amostra, em conformidade com o método descrito *supra*, em qualquer dos casos divulgados, e depois

2) efectuar um teste de hibridação, de uma forma conhecida *per si*, em que o produto de amplificação é hibridado com uma sonda oligonucleotídica ou com um conjunto de sondas oligonucleotídicas diferentes, sendo cada sonda oligonucleotídica suficientemente homóloga de uma parte de um separador da Região Directa de um microrganismo pertencente ao complexo de *M. tuberculosis*, para que tenha lugar a hibridação do produto amplificado se tal ácido nucleico separador estiver presente na amostra antes da amplificação, sendo o referido passo de hibridação executado facultativamente sem uma anterior electroforese ou uma separação do produto amplificado, e finalmente

3) detectar, de uma forma conhecida *per si*, todos os produtos hibridados.

O método de detecção de acordo com a invenção pode ser praticado segundo um grande número de variantes que irão depender do objectivo do método de detecção. Por exemplo, o método pode ser executado utilizando diversas sondas oligonucleotídicas no teste de hibridação, havendo no conjunto dessas sondas oligonucleotídicas algumas que são específicas para o espectro total dos microrganismos que se pretenda detectar. Por exemplo, é possível utilizar sondas oligonucleotídicas de regiões separadoras sobre as quais se sabe que existem em todos os microrganismos pertencentes ao complexo de *M. tuberculosis*. A utilização de uma dessas sondas oligonucleotídicas irá ser suficiente para detectar se ocorreu uma infecção com um microrganismo de *M. tuberculosis*. Também é possível utilizar uma combinação de sondas oligonucleotídicas específicas para determinados tipos de microrganismos do complexo de *M. tuberculosis*. Por exemplo, foram identificadas 13 regiões separadoras da estirpe H37Rv de *M. tuberculosis* que também existem nos microrganismos de *M. bovis* BCG. No entanto, há um grande número de separadores diferentes nos dois tipos de microrganismos. Assim sendo, é possível seleccionar combinações específicas de sondas oligonucleotídicas para estabelecer a

diferenciação entre as diversas estirpes. Atendendo a que a maior parte das infecções de tuberculose são infecções provocadas por microrganismos pertencente aos grupos de *M. tuberculosis*, *M. bovis* e *M. africanum*, um método para a detecção de um microrganismo, de acordo com a invenção, deve ser orientado preferencialmente para a detecção da presença de tais microrganismos. Foram já determinadas as sequências separadoras da estirpe H37Rv de *M. tuberculosis* e a sequência separadora de *M. Bovis* BCG. A estirpe H37Rv de *M. tuberculosis* possui 41 sequências separadoras que são apresentadas algures no texto com as designações de sequências id. nºs 3 a 43. As sequências separadoras de *M. bovis* BCG estão descritas na publicação (15) por Hermans *et al.*. Na figura 2 da obra citada estão descritas as repetições directas 24 a 43 da estirpe 44 de *M. bovis* BCG que contém o IS987. Também estão ilustradas na figura as sequências da região separadora intermédia. Os dados sobre as sequências, indicados na obra citada, constam do banco de dados 'EMBL Genbank' e dos bancos de dados 'DDBJ Nucleotids Sequence Databases' com o número de acesso X57835. As regiões separadoras para as quais se conclui que eram comuns à estirpe H37Rv de *M. tuberculosis* e ao microrganismo *M. bovis* BCG são os separadores 20 a 32 da estirpe H37Rv de *M. tuberculosis*.

É possível levar a cabo um método de acordo com a invenção, tal como descrito em qualquer dos casos anteriores, utilizando uma sonda oligonucleotídica que seja uma sequência complementar para qualquer das sequências separadoras da estirpe H37Rv de *M. tuberculosis* ou para qualquer das sequências separadoras de *M. bovis* BCG ou que seja uma sequência complementar para fragmentos ou derivados das referidas sequências separadoras, sendo tais sondas oligonucleotídicas capazes de hibridar com um a tal sequência separadora e possuindo pelo menos 7 nucleótidos consecutivos homólogos de uma tal sequência separadora e/ou manifestando uma homologia pelo menos igual a 60% e manifestando preferencialmente uma

homologia pelo menos igual a 80% com tal sequência separadora e possuindo um comprimento pelo menos de 7 nucleótidos. Em particular, no caso de se pretender detectar a presença quer da estirpe H37Rv de *M. tuberculosis* quer o microrganismos *M. bovis* BCG, é possível utilizar todas as sequências separadoras comuns para a preparação de uma sonda oligonucleotídica adequada para a prática de um método de acordo com a invenção.

A presente invenção também tem por objecto proporcionar um método para diferenciar o tipo de microrganismos pertencentes ao complexo de *M. tuberculosis* numa amostra e em particular tem por objecto proporcionar um método em que tal amostra é um espécime clínico. O método pode ser praticado com uma amostra, sem que as células dessa amostra tenham de ser criadas em cultura para a realização da análise. Um tal método consiste em levar à prática o método de detecção de acordo com a invenção, conforme descrito *supra*, seguindo-se a comparação entre o padrão de hibridação obtido e o modelo de referência. O modelo de referência pode ser o padrão de hibridação obtido com uma ou várias estirpes de microrganismos pertencentes ao complexo de microrganismos de *M. tuberculosis*, de uma forma análoga à da amostra. Uma outra possibilidade consiste em examinar o resultado em que o modelo de referência é uma fonte que permita obter uma listagem de sequências separadoras e as suas fontes correspondentes, por exemplo, uma base de dados. Através da análise predeterminada de uma tal base de dados e por selecção específica das sondas oligonucleotídicas é possível realizar um teste de diferenciação especificamente adequado para a estirpe ou estirpes de microrganismos que se pretenda diferenciar. No exemplo ilustrativo da invenção, foram analisadas 77 amostras clínicas utilizando um grande número de sondas oligonucleotídicas e apresenta-se uma ilustração dos tipos dos padrões de hibridação que é possível obter com a prática de um método de acordo com a invenção. Devido à natureza específica das regiões

separadoras e à combinação específica das regiões separadoras em diversas estirpes, tais regiões separadoras são especialmente adequadas para testes de diferenciação. É por esse motivo que tais sequências separadoras provenientes da matriz para concepção das sondas oligonucleotídicas são adequadas num método de detecção ou num método de diferenciação de acordo com a invenção. Assim sendo, a invenção também tem por objecto sondas oligonucleotídicas que possuam pelo menos 7 nucleótidos e de preferência mais de 12 nucleótidos e em particular possuam entre 12 e 40 nucleótidos, sendo tal conda suficientemente homóloga com qualquer das sequências separadoras seguintes: sequências separadoras 1-23 de *M. bovis* BCG, sequências separadoras 44-49 de *M. bovis* BCG e regiões separadoras 1-43 da estirpe H37Rv de *M. tuberculosis*, com a excepção das sequências da estirpe H37Rv de *M. tuberculosis* que sejam comuns ao microrganismos *M. bovis* BCG, isto é a com a excepção de todas as regiões separadoras correspondentes aos números 20 - 32 de *M. bovis* BCG. Em particular, estão no âmbito da presente invenção as sequências id. n^{os} 3 - 21 e 35 - 43. A invenção também tem por objecto fragmentos ou derivados de tais sequências separadoras capazes de hibridarem com uma dessas sequências separadoras, possuindo a referida sonda oligonucleotídica um comprimento de 7 nucleótidos pelo menos e de preferência mais de 12 nucleótidos e possuindo em particular entre 12 e 40 nucleótidos e dispendo pelo menos de 7 nucleótidos consecutivos homólogos de uma tal sequência separadora e/ou manifestando uma homologia pelo menos de 60%, manifestando de preferência uma homologia pelo menos de 80% e manifestando mais preferencialmente uma homologia pelo menos de 90% com a parte correspondente da sequência separadora.

A invenção também diz respeito a um veículo que compreenda sondas oligonucleotídicas em que haja pelo menos uma sonda oligonucleotídica que seja específica para uma região

separadora de um microrganismo do grupo pertencente ao complexo de *M. tuberculosis*. Em particular, a invenção diz respeito a um veículo que compreenda uma sonda oligonucleotídica de acordo com a invenção, conforme descrito *supra*.

A invenção também tem por objecto um par de iniciadores em que os dois iniciadores contêm sequências oligonucleotídicas suficientemente complementares de uma parte da sequência de Repetição Directa de um microrganismo pertencente ao complexo de microrganismos de *M. tuberculosis* para que ocorra a hibridação e subsequentemente tenha lugar o alongamento do iniciador hibridado, sendo esses iniciadores tais que o alongamento na reacção de amplificação ocorra com um iniciador no sentido de 5' e ocorra com outro iniciador no sentido de 3' e em que a expressão 'suficientemente complementar' significa que essa sequência oligonucleotídica possui pelo menos 7 nucleótidos consecutivos homólogos da sequência de Repetição Directa, em particular a sequência de consenso de uma Repetição Directa (sequência id. nº 2) e/ou manifesta pelo menos uma homologia de 60%, de preferência manifeste pelo menos uma homologia de 80% e mais preferencialmente manifeste uma homologia superior a 90% com a parte correspondente da sequência de Repetição Directa e tenha um comprimento de 7 nucleótidos pelo menos. Em particular, o par de iniciadores RDa e RDb descritos no exemplo constitui um par de iniciadores adequado para a prática da presente invenção. Considera-se abrangido no âmbito da presente invenção um par de iniciadores, do tipo descrito, constituído por um iniciador RDa capaz de aumentar de comprimento no sentido de 5' e pelo outro iniciador RDb capaz de aumentar de comprimento no sentido de 3', sendo o RDa complementar para uma sequência da Repetição Directa localizada do lado de 5' da sequência da Repetição Directa para a qual o RDb seja complementar, estando a Repetição Directa presente na Região Directa de um microrganismo pertencente ao grupo do complexo de *M. tuberculosis*.

Também constitui um objecto da presente invenção proporcionar um estojo para executar um método para amplificar *in vitro* ácido nucleico utilizando iniciadores de amplificação de uma forma conhecida *per se*, em reacções de amplificação tais como RCP, RCL ou 'NASBA', em que se utiliza um par de iniciadores que possuam sequências oligonucleotídicas suficientemente complementares para uma parte da sequência de Repetição Directa de um microrganismo pertence ao complexo de microrganismos de *M. tuberculosis* para que ocorra a hibridação para uma Repetição Directa e para que subsequentemente tenha lugar o alongamento do iniciador hibridado, sendo esses iniciadores tais que o alongamento na reacção de amplificação ocorra com um iniciador no sentido de 5' e com outro iniciador no sentido de 3'. Um estojo deste tipo pode conter um par adequado de iniciadores, conforme descrito ao abrigo da presente invenção. O estojo da invenção também pode ser adequado para levar à prática um método de detecção de um microrganismo pertencente ao complexo de microrganismos de *M. tuberculosis*, conforme descrito. Um tal estojo compreende um par de iniciadores do tipo descrito para o método de amplificação e uma sequência oligonucleotídica do tipo descrito que seja suficientemente homóloga para uma sequência separadora de uma Região Directa de um microrganismo pertencente ao complexo de *M. tuberculosis* ou um veículo que compreenda tal sequência oligonucleotídica em qualquer dos casos divulgados na descrição sobre detecção e diferenciação.

EXEMPLO

Amplificação *in vitro* da região que contém a RD em isolados clínicos de *M. tuberculosis*

Amplificou-se a região cromossómica de RD de 74 isolados clínicos diferentes de *M. tuberculosis*, recorrendo à técnica de reacção em cadeia com polimerase (RCP), utilizando o

par de iniciadores RDa (com a sequência id. nº 50) e RDb (com a sequência id. nº 51). Conforme ilustrado na figura 4, obteve-se um produto de reacção a partir de todas as estirpes investigadas e concluiu-se que o ADN amplificado era heterogéneo em termos dimensionais. Esta heterogeneidade era previsível, uma vez que os iniciadores RDa e RDb podem iniciar a RCP em qualquer das RVD na região de RD. Assim sendo, é de prever que cada RVD esteja presente no produto amplificado por RCP. Em particular, obtém-se uma boa amplificação para regiões separadoras nos terminais da Região Directa comparativamente com a reacção de amplificação conhecida por RCP em que se utiliza como iniciador o ácido nucleico do fragmento IS (15 e 34).

Hibridação da região de RD amplificada, com sequências separadoras individuais da estirpe

H37Rv

Realizou-se a hibridação dos produtos obtidos por RCP a partir das 74 estirpes anteriormente enunciadas, com 47 sequências separadoras, as quais foram ligadas de forma covalente a papel 'Biodyne C', conforme descrito (18). Uma vez que os produtos da RCP continham um marcador biotinado, que tinha sido incorporado durante a RCP, foi possível visualizar o ADN hibridante, utilizando combinadamente um conjugado de peroxidase que continha estreptavidina e um ensaio enzimático. O resultado está indicado na figura 5. O ADN amplificado da RVD de todas as estirpes hibridou pelo menos com 9 dos 47 oligonucleótidos. Consoante a combinação de oligonucleótido separadores que hibridam com o ADN amplificado por RCP, assim foram distinguidos 39 "tipos de RVD" diferentes de *M. tuberculosis*. Esta experiência demonstra que é possível tipificar por este método qualquer estirpe de *M. tuberculosis*, sem que seja necessário separar por electroforese o ADN amplificado de *M. tuberculosis*. As 74 estirpes também foram tipificadas (caracterizadas) pelo método clássico de identificação do IS6110,

conforme descrito (32), tendo sido distinguidos 66 tipos diferentes de IS6110. Isto indica que o nível de diferenciação da estirpe, utilizando o método de identificação do IS6110, é ligeiramente superior quando comparado com o método descrito na presente invenção. Este método será designado por “oligotipificação de RVD”. No entanto, o método de oligotipificação de RVD é suficientemente específico para permitir discernir um grande número de estirpes pertencentes a um grupo como *M. bovis* BCG e as estirpes H37Rv e H37Ra de *M. tuberculosis*.

Especificidade do Método de oligotipificação de RVD

Para se determinar se o método de amplificação e de hibridação é específico para as bactérias pertencentes ao complexo de *M. tuberculosis*, submeteu-se 40 amostras de ADN, provenientes de uma grande variedade de espécies micobacterianas e de outros géneros bacterianos, ao método de oligotipificação de RVD. Entre os ADN estudados estavam os das seguintes espécies bacterianas: *E. coli*, *Bordetella pertussis*, *Afipia felis*, *Rochalimea lenselae* e *Mycobacterium avium*. Em nenhum destes casos houve uma reacção detectável de hibridação positiva com nenhum dos oligonucleótidos separadores, o que ilustra consequentemente a especificidade do método em causa.

Detecção de *M. tuberculosis* em Espécimens clínicos por oligotipificação de RVD

Testou-se a sensibilidade para se detectar *M. tuberculosis* pelo método descrito *supra*, efectuando uma oligotipificação de RVD com diversas quantidades de ADN cromossómico das estirpes H37Rv, *M. bovis* BCG e dois isolados clínicos de *M. tuberculosis*. A sensibilidade para a detecção de ADN de cada uma destas estirpes foi no mínimo de 64 femtogramas (fg) de ADN. Faz-se observar que 1 fg de ADN cromossómico corresponde aproximadamente à

quantidade existente numa única bactéria e presume-se que o método de oligotipificação de RVD permite a detecção e a tipificação simultâneas de ADN proveniente de uma única bactéria.

Além disso, foram utilizadas amostras clínicas de saliva fornidas pelo Dr. A. Kolk (Royal Tropical Institute, Amsterdão) que foram submetidas a uma oligotipificação de RVD, isto é, aos métodos de detecção e de diferenciação de acordo com a invenção. Todas as amostras positivas em cultura foram positivas por oligotipificação de RVD e o tipo de RVD correspondeu ao mesmo tipo e foi determinado a partir de ADN purificado extraído de microrganismos de *M. tuberculosis* criados em cultura a partir das correspondentes amostras de saliva.

Materiais e Métodos

Determinação da sequência de ADN da região de RD na estirpe H37Rv

O cosmídeo T211, que contém um segmento intercalar de 35 kb portador da região completa de RD da estirpe H37Rv, foi fornecido pelo Dr. S. Cole (Institut Pasteur, Paris). Na figura 6 está indicado um mapa físico do cosmídeo T211. Efectuou-se a subclonagem de fragmentos Mlul deste cosmídeo em ADN do plasmídeo pUCBM21 clivado com Mlul, daí tendo resultado os plasmídeos pPG11, pPG17 e pPG33 (figura 6). Estes três últimos plasmídeos foram utilizados para sequenciar a região que contém a RD completa da estirpe H37Rv. Efectuou-se a sequenciação em conformidade com o método de Sanger *et al.* (28) de terminação de cadeia didesoxi utilizando para tal um sequenciador de ADN de modelo 373A (Applied Biosystems, Forest City, Cal., EUA) e procedendo em conformidade os protocolos fornecidos pelo fabricante.

Extracção de ADN de células micobacterianas

Purificou-se o ADN conforme anteriormente descrito (33).

Estirpes bacterianas utilizadas neste estudo

Utilizou-se a estirpe DH5a da *Escherichia coli* K12 (BRL, Maryland, EUA) como hospedeiro para a propagação do plasmídeo pUCBM21 e derivados. A estirpe P3 de *M. bovis* BCG e a estirpe H37Rv de *M. tuberculosis* foram já anteriormente descritas (12, 15). Todas as outras estirpes bacterianas eram isolados clínicos que foram enviados para o RIVM.

Oligotipificação de RVD

Amplificação de ADN *in vitro*

Juntou-se 10 nanogramas de ADN purificado de *M. tuberculosis* a uma mistura que continha 0,5 unidades de polimerase 'Super Tth' (HT Biotechnology, Cambridge, RU), 5 µL de tampão concentrado 10 vezes de 'Super Rth' (HT Biotechnology, Cambridge, RU), 20 nMol de cada DNTP e 20 pMol de cada um dos iniciadores RDa e RDb. Ajustou-se o volume final para 50 µL e submeteu-se a mistura assim obtida a 30 ciclos de amplificação de acordo com o esquema seguinte: 1 minuto a 96°C, 1 minuto a 55°C e 30 segundos a 72°C.

Hibridação reversa por transferência do padrão linear

Foram utilizados oligonucleótidos com um grupo amino no terminal 5' que foram ligados de forma covalente a uma membrana activada de 'Biodyne C' (18, 38). A membrana de 'Biodyne C' (Pall Biosupport, Glen Cove, NY, EUA) foi activada por incubação durante 10 minutos em 10 mL de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida a 16% (p/v) recém-preparada. Enxaguou-se a autorradiografia com água e colocou-se imediatamente um minitransferidor autorradiográfico (Immunitics, ITK Diagnostics, Uithoorn, Holanda). Encheu-se cada fenda do minitransferidor autorradiográfico com 150 µL de uma solução oligonucleotídica 0,125 µM em NaHCO₃ 500 mM a pH 8,4. Decorrido 1 minuto de incubação à temperatura ambiente,

efectuou-se a remoção das soluções oligonucleotídicas por aspiração. Retirou-se o filtro do minitransferidor autorradiográfico, tratou-se com uma solução de NaOH de 100 mM durante 10 minutos para inactivar a membrana e lavou-se com SSPE 2 x (NaCl 360 mM, NaH₂PO₄ 20 mM, EDTA 2 mM a pH 7,2), enriquecido com DSS (o mesmo que SDS) a 0,1%, durante 5 minutos a 54°C. Montou-se o filtro no minitransferidor autorradiográfico, de modo a que as fendas fossem perpendiculares ao padrão linear dos oligonucleótidos aplicados. Efectuou-se o enchimento das fendas do minitransferidor autorradiográfico com 150 µL de produtos da RCP marcados com biotina, diluídos e desnaturados termicamente (20 µL de produto da RCP diluído em 130µL de SSPE 2 x contendo DSS a 0,1%) e hibridou-se durante 45 minutos a 54°C. Depois de se ter esvaziado as fendas por aspiração, lavou-se o filtro com 150 mL de SSPE 2 x e DSS a 0,5% durante 10 minutos a 54°C e realizou-se a incubação em 10 mL de conjugado de espectravídina-peroxidase (Boehringer, Mannheim) diluído a 1:400 em SSPE 2 x contendo DSS a 0,5%, durante 30 minutos a 42°C. Lavou-se o filtro com 150 mL de SSPE 2x contendo DSS a 0,5%, durante 10 minutos a 42°C, e enxaguou-se rapidamente à temperatura ambiente com 150 µL de SSPE 2 x. Para a detecção quimioluminescente do ADN hibridante realizou-se a incubação do filtro em 10 mL de líquido de detecção ECL (Amersham's Hertogenbosh, Holanda) e colocou-se em presença de uma película de raios X durante 1 minuto (Hyperfilm, Amersham).

Legenda da figura 1

Estrutura da região de RD de *M. bovis* BCG e da estirpe H37Rv de *M. tuberculosis*. Os retângulos indicam sequências de RD de 36 pb entre as quais estão intercalados separadores únicos com um tamanho variável entre 29 e 41 pb. Está indicado o local de inserção do elemento IS6110 na região de RD. Uma parte da região de RD de *M. bovis* BCG já tinha sido sequenciada anteriormente (15), estando esta parte representada a negro. A parte não sequenciada está a cinzento. Realizou-se a sequenciação de toda a região de RD da estirpe H37Rv, o que faz parte da presente invenção. Os espaços vazios na sequência da estirpe H37Rv indicam a ausência das RVD que estão presentes em *M. bovis* BCG.

Legenda da figura 2

Princípio da amplificação de ADN *in vitro* dentro da região de RD das bactérias do complexo de *M. tuberculosis*. As unidades repetitivas dentro do agregado de RD são as RVD. Cada RVD é constituída por uma sequência constante de 36 pares de bases, designada por RD, e por uma parte variável, designada por separador (respectivamente A, B, C e D). Estão representadas quatro RVD sequenciais designadas por RVD-A, RVD-B, RVD-C e RVD-D. A utilização dos dois iniciadores RDa e RD_b (setas a e b), que possuem sequências baseadas na sequência da RD, para a amplificação do ADN *in vitro*, irá permitir a amplificação de qualquer RVD ou de um segmento constituído por um número discreto de RVD próximas.

Legenda da figura 3

Sequência nucleotídica da região de RD na estirpe H37Rv de *M. tuberculosis* e regiões que flanqueiam a região de RD. As sequências homólogas da sequência de RD estão sublinhadas e as sequências utilizadas como oligonucleótidos na experiência estão impressas a negro.

Legenda da figura 4

Electroforese em gel do ADN de *M. tuberculosis* amplificado *in vitro* por RCP utilizando os iniciadores RDa e RDb. Cada pista foi carregada com um quinto da quantidade total de ADN amplificado proveniente dos diferentes isolados clínicos de *M. tuberculosis*. A quantidade utilizada de ADN para amplificação por RCP foi de 10 nanogramas.

Legenda da figura 5

Padrões de hibridação de produtos de RVD amplificados de 72 isolados diferentes de *M. tuberculosis* e de 5 isolados diferentes de *M. bovis* BCG com 40 oligonucleótidos diferentes. Os oligonucleótidos utilizados foram obtidos a partir das sequências separadoras 1 a 41, conforme descrito em 'Materiais e Métodos'. Foram utilizados os iniciadores RDa e RDb (ver a figura 2) para desencadear a amplificação *in vitro* das RVD com a região de RD.

Os oligonucleótidos separadores foram ligados de forma covalente a um filtro de 'Biodyne C', segundo um padrão de linhas paralelas, e a hibridação com ADN das RVD, amplificado *in vitro*, foi realizada em canais paralelos perpendiculares ao padrão de oligonucleótidos separadores, conforme descrito em 'Materiais e Métodos'. Estirpe 1: H37Rv; estirpe 41: H37Ra; estirpes 44-46: diferentes isolados de *M. bovis* BCG; estirpe 77: estirpe P3 de *M. bovis* BCG; todas as outras estirpes: isolados clínicos de *M. tuberculosis*.

Legenda da figura 6

Mapa de restrição do segmento intercalar do cosmídeo T211 que contém a região completa de RD da estirpe H37Rv; localização dos fragmentos de MluI subclonados dentro dos plasmídeos pPG17, pPG11 e pPG33.

REFERÊNCIAS

1. **Beck-Sagué, C., S.W. Dooley, M.D. Hutton, J. Otten, A. Breeden, J.T. Crawford, A.E. Pitchenik, C. Woodley, G. Cuathen, W.R. Jarvis,** '1992 Hospital Outbreak of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* infections'. JAMA. 268: 1280-1286.
2. **Brudney, K., Dobkin J.** 1991. 'Resurgent tuberculosis in New York City: Human immunodeficiency virus, homelessness and the decline of tuberculosis control programs. Am. Rev. Resp. Dis.' 144: 745-749.
3. **CDC.** 1992. 'Transmission of multidrug-resistant tuberculosis among immunocompromised persons in a correctional system'. Nova Iorque 1991. MMWR 41: 507-509
4. **CDC** 1991. 'Nosocomial transmission of multidrug resistant tuberculosis among HIV-infected persons'. Florida e Nova Iorque, 1988-1991. MMWR 40: 585-591.
5. **Cave, M.D., K.D. Eisenach, P.F. McDermott, J.H. Bates e J.T. Crawford.** 1991. 'IS6110: Conservation of sequence in the *Mycobacterium tuberculosis* complex and its utilization in DNA fingerprinting. Mol. Cell. Probes 5: 73-80.
6. **Daley, C.L. P.M. Small, G.F. Schecter, G.K. Schoolnik, R.A. McAdam, W.R. Jacobs, Jr. E P.C. Hopewell.** 1992. 'An outbreak of tuberculosis with accelerated progression among persons infected with the human immunodeficiency virus: an analysis using restriction fragment length polymorphisms'. N. Engl. J. Med. 326: 231-235.
7. **Dooley, S.W., M.E. Villarino, M. Lawrence, et al.** 1992. 'Nosocomial transmission of tuberculosis on a hospital unit for HIV-infected patients'. JAMA. 267: 2632-2634.
8. **Dwyer, B., K. Jackson, K. Raios, A. Sievers, E. Wilshire e B. Ross.** 1993. 'DNA Restriction fragment analysis to define an extended cluster of tuberculosis in homeless men and their associates. J. Inf. Diseases', 167: 490-494.

9. **Edlin, B.R., J.I. Tokars, M.H. Grieco, J.T. Crawford, J. Williams, E.M. Sordillo, K.R. Ong, J.O. Kilburn, S.W. Dooley, K.G. Castro, W.R. Jarvis e S.D. Holmberg.** 1992. 'An outbreak of multidrug-resistant tuberculosis among hospitalized patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *N. Engl. J. Med.* 326: 1514-1521.
10. **Fischl, M.A, R.B. Uttamchandani, G.L. Daikos, et al.** 1992. 'An outbreak of tuberculosis caused by multiple-drug resistant tubercle bacilli among patients with HIV infection'. *Ann. Intern. Med.* 117: 177-183.
11. **Fomukong, N.G., J.W. Osborn e J.M. Grange.** 1992. 'Use of gene probes on insertion sequence IS986 to differentiate between BCG vaccine strains'. *J.Appl. Bacteriol.* 72: 125-133.
12. **Groenen, P.M.A., A.E. van Bunschoten, D. van Soolingen e J.D.A. van Embden.** 'Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of *Mycobacterium tuberculosis*; Application for strain differentiation by a novel method.' *Mol. Microbiol.* (1993) 10 (5) 1057-1065.
13. **Haas, W.H., W.R. Butler, Ch.L. Woodley and J.T. Crawford.** 1993. 'Mixed-linker polymerase chain reaction: a new method for rapid fingerprinting of isolates of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. *J. Clin. Microbiol.*' 31:1293-1298.
14. **Hermans, P.W.M., D. van Soolingen, J.W. Dale, A.R. Schuitema, R.A. McAdam, D. Catty e J.D.A. van Embden.** 1990. 'Insertion element IS986 from *Mycobacterium tuberculosis*: a useful tool for diagnosis and epidemiology of tuberculosis.' *J.Clin. Microbiol.* 28: 2051-2058.
15. **Hermans, P.W.M., D. van Soolingen, E.M. Bik, P.E.W. de Haas, J.W. Dale e J.D.A. van Embden.** 1991. 'The insertion element IS987 from *M. bovis* BCG is located in a

- hot spot integration region for insertion elements in *M. tuberculosis* complex strains.' *Infect. Immun.* 59: 2695-2705.
16. **Hermans, P.W.M., D. van Soolingen e J.D.A. van Embden.** 1992. 'Characterization of a major polymorphic tandem repeat in *Mycobacterium tuberculosis* and its potencial use in the epidemiology of *Mycobacterium kansasii* and *Mycobacterium gordonae*.' *J. Bacteriol.* 174: 4157-4165.
 17. **Jeffreys, A.J., A. Macleod, K. Tamaki, D.L. Neil e D. G. Moonckton.** 1991. 'Minisatellite repeat coding as a digital approach to DNA typing'. 354: 204-209.
 18. **Kaufholt, A., A. Podbielski, G. Baumgarten, M. Blokspoel, J. Top e L. Schouls.** 1994. 'Rapid typing of group A streptococci by the use of DNA amplification and non-radioactive allele specific oligonucleotide probes.' *FEMS Microbiology Letters*, no prelo.
 19. **Mazurek, G.H., M.D. Cave, K.D. Eisenach, R.J. Wallace JR, J.H. Bates e J.T. Crawford.** 1991. 'Chromosomal DNA fingerprint patterns produced with IS6110 as strain specific markers for epidemiologic study of tuberculosis'. *J. Clin. Microbiol.* 29: 2030-2033.
 20. **McAdam, R.A., P.W.M. Hermans, D. van Soolingen, Z.F. Zainuddin, D.Catty, J.D.A. van Embden e J.W. Dale.** 1990. 'Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence belonging to the IS3 family.' *Mol. Microbiol.* 4: 1607-1613.
 21. **Mendiola, M.V., C., Martin, I. Otal e B. Gicquel.** 1992. 'Analysis of regions responsible for IS6110 RPLF in a single *Mycobacterium tuberculosis* strain.' *Res. Microbiol.* 143: 767-772.

22. **Otal, I., C. Martin, V. Vincent-Lévy-Frébault, D. Thierry e B. Gicquel.** 1991. 'Restriction fragment length polymorphism analysis using IS6110 as an epidemiological marker in tuberculosis.' *J. Clin. Microbiol.* 29: 1252-1254.
23. **Palittapongarnpim, P., S. Chomic, A. Fanning e D. Kunimoto.** 1993. 'DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* by ligation-mediated polymerase chain reaction.' *Nucl. Ac. Res.* 3: 761-762.
24. **Palittapongarnpim, P., S. Chomic, A. Fanning e D. Kunimoto.** 1993. 'DNA fragment length polymorphism analysis of *M. tuberculosis* isolating by arbitrarily primed polymerase chain reaction.' *J. Inf. Diseases* 167: 975-978.
25. **Palittapongarnpim, P.S., S. Rienthong e W. Panbangred.** 1993. 'Comparison of restriction fragment length polymorphism of *M. tuberculosis* isolated from cerebrospinal fluid and sputum: a preliminary report. *Tubercle and lung disease* 1993.' 74: 204-207.
26. **Ross, C., K. Raios, K. Jackson e B. Dwyer.** 1992. 'Molecular cloning of a highly repeated element from *Mycobacterium tuberculosis* and its use as an epidemiological tool.' *J. Clin. Microbiol.* 30: 942-946.
27. **Ross, B.C. e B. Dwyer.** 1993. 'Rapid, simple method for typing isolates of *Mycobacterium tuberculosis* by using the polymerase chain reaction.' *J. Clin. Microbiol.* 31: 329-334.
28. **Sanger, F., Nicklen, S. e Coulson, A.R.** (1977) 'DNA Sequencing with chain-termination inhibitors.' *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74: 5463-5467.
29. **Small, P.M., R.W. Schafer, P.C. Hopewell, S.P. Singh, M.J. Murphy, E. Desmond, M.F. Sierra e G.K. Schoolnik.** 1993. 'Exogenous reinfection with multidrug-resistant

- M. tuberculosis* in patients with advanced HIV infection.' N. Eng. J. Med. 328: 1137-1144.
30. **Thierry, D., M.D. Eisenach, J.T. Crawford, J.H. Bates, B. Gecquel e J.L. Guesdon.** 1990. 'IS6110, an IS-like element of *M. tuberculosis* complex.' Nucleic Acids Res. 18: 188.
 31. **Van Embden, J.D.A., D. van Soolingen, P.M. Small e P.W.M. Hermans.** 1992. 'Genetic markers for the epidemiology of tuberculosis.' Res. Microbiol. 143: 385-391.
 32. **Van Embden, J.D.A., M.D. Cave, J.T. Crawford, J.W. Dale, K.D. Eisenach, B. Gicquel, P.W.M. Hermans, C. Martín, R. McAdam, T.M. Shinnick e P.M. Small.** 1993. 'Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting; Recommendations for a standardized Methodology.' J. Clin. Microbiol. 31: 406-409.
 33. **Van Soolingen, D., P.W.M. Hermans, P.E.W. de Haas, D. R. Soll e J.D.A. van Embden.** 1991. 'The occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains; evaluation of IS-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis.' J. Clin. Microbiol. 29: 2578-2586.
 34. **Van Soolingen, D., P.W.M. Hermans, P.E.W. de Haas e J.D.A. van Embden.** 1992. 'Insertion element IS1081-associated Restriction Fragment Length Polymorphism in *Mycobacterium tuberculosis* complex species: a reliable tool for recognizing *Mycobacterium bovis* BCG.' J. Clin. Microbiol.30: 1772-1777.
 35. **Van Soolingen, D., P.E.W. de Haas, P.W.M. Hermans, P.M.A. Groenen e J.D.A. van Embden.** 1993. 'Comparison of various repetitive DNA elements as genetic markers for strain differentiation and epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis*.' J. Clin: Microbiol. 31: 1987-1995.

36. **Yuen L.K. Ross, K.M. Jackson e B. Dwyer.** 1992. 'Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* strains from Vietnamese patients by Southern blot hybridization.' *J. Clin Micro.* 31: 1615-1618.
37. **O.M.S.** 1993. 'Tuberculosis in the present time: A global overview of the tuberculosis situation.' Tuberculosis Unit, Division of Communicable Diseases. Geneva.
38. **Y. Zhang, M.Y. Coyne, S.G. Will, C.H. Levenson e E. Kawasaki.** 1991. 'Single-base mutational analysis of cancer and genetic diseases using membrane bound modified oligonucleotides.' *Nucl. Acids Res.* 19: 3929-3933.

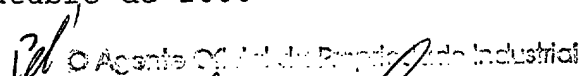
Oligonucleótidos utilizados para a oligotipificação da RVD referidos na enumeração das sequências

<u>Separador n.º:</u>	<u>Sequência id. n.º:</u>			
01	3	5'	TTG TAC TGC AAC CCG GAA TTC TTG A	3'
02	4	5'	ATA GAG GGT CGC CGG TTC TGG ATC A	3'
03	5	5'	CCT CAT AAT TGG GCG ACA GCT TTT G	3'
04	6	5'	CCG TGC TTC CAG TGA TCG CCT TCT A	3'
05	7	5'	ACG TCA TAC GCC GAC CAA TCA TCA G	3'
06	8	5'	TTT TCT GAC CAC TTG TGC GGG ATT A	3'
07	9	5'	CGT CGT CAT TTC CGG CTT CAA TTT C	3'
08	10	5'	GAG GAG AGC GAG TAC TCG GGG CTG C	3'
09	11	5'	CGT GAA ACC GCC CCC AGC CTC GCC G	3'
10	12	5'	ACT CGG AAT CCC ATG TGC TGA CAG C	3'
11	13	5'	TCG ACA CCC GCT CTA GTT GAC TTC C	3'
12	14	5'	GTG AGC AAC GGC GGC GGC AAC CTG G	3'
13	15	5'	ATA TCT GCT GCC CGC CCG GGG AGA T	3'
14	16	5'	GAC CAT CAT TGC CAT TCC CTC TCC C	3'
15	17	5'	GGT GTG ATG CGG ATG GTC GGC TCG G	3'
16	18	5'	CTT GAA TAA CGC GCA GTG AAT TTC G	3'
17	19	5'	CGA GTT CCC GTC AGC GTC GTA AAT C	3'
18	20	5'	GCG CCG GCC CGC GCG GAT GAC TCC G	3'
19	21	5'	CAT GGA CCC GGG CGA GCT GCA GAT G	3'
20	22	5'	TAA CTG GCT TGG CGC TGA TCC TGG T	3'
21	23	5'	ACC GCA GAC GGC ACG ATT GAG ACA A	3'
22	24	5'	AGC ATC GCT GAT GCG GTC CAG CTC G	3'
23	25	5'	CCG CCT GCT GGG TGA GAC GTG CTC G	3'
24	26	5'	GAT CAG CGA CCA CCG CAC CCT GTC A	3'
25	27	5'	CTT CAG CAC CAC CAT CAT CCG GCG C	3'
26	28	5'	GGA TTC GTG ATC TCT TCC CGC GGA T	3'
27	29	5'	TGC CCC GGC GTT TAG CGA TCA CAA C	3'
28	30	5'	AAA TAC AGG CTC CAC GAC ACG ACC A	3'
29	31	5'	GGT TGC CCC GCG CCC TTT TCC AGC C	3'
30	32	5'	TCA GAC AGG TTC GCG TCG ATC AAG T	3'
31	33	5'	GAC CAA ATA GGT ATC GGC GTG TTC A	3'

32	34	5'	CGC GAA CTC GTC CAC AGT CCC CCT T	3'
33	35	5'	CGT GGA TGG CGG ATG CGT TGT GCG C	3'
34	36	5'	GAC GAT GGC CAG TAA ATC GGC GTG G	3'
35	37	5'	CGC CAT CTG TGC CTC ATA CAG GTC C	3'
36	38	5'	GGA GCT TTC CGG CTT CTA TCA GGT A	3'
37	39	5'	ATG GTG GGA CAT GGA CGA GCG CGA C	3'
38	40	5'	CGC AGA ATC GCA CCG GGT GCG GGA G	3'
39	41	5'	ATA TCG CCC GCC ACA CCA CAG CCA C	3'
40	42	5'	CGC CGA TGA CAG CTA TGT CCG AGT G	3'
41	43	5'	TTC GCG CGG TGT TTC GGC CGT GCC C	3'
B1	44	5'	TTG ACC TCG CCA GGA GAG AAG ATC A	3'
B2	45	5'	TCG ATG TCG ATG TCC CAA TCG TCG A	3'
B3	46	5'	GAC ATG ACG GCG GTG CCG CAC TTG A	3'
B4	47	5'	AAG TCA CCT CGC CCA CAC CGT CGA A	3'
B5	48	5'	TCC GTA CGC TCG AAA CGC TTC CAA C	3'
B6	49	5'	CGA AAT CCA GCA CCA CAT CCG CAG C	3'
DRa	50	5'	CCG AGA GGG GAC GGA AAC	3'
DRb	51	5'	GGT TTT GGG TCT GAC GAC	3'

Todas as sequências oligonucleotídicas foram obtidas a partir das sequências da região de RDn na estirpe H37Rv de *M. tuberculosis*, com a exceção dos oligonucleótidos impressos a negrito. Estes foram obtidos a partir da sequência de *M. bovis* BCG (15). Os terminais 5' dos oligonucleótidos separadores foram ligados a um grupo amino para permitir uma ligação covalente às membranas de 'Biodyne C'. Todos os oligonucleótidos foram fornecidos por "Applied Biosystems Incorporated", Perkin Elmer B.V., Gouda, Holanda.

Lisboa, 4 de Outubro de 2000

 O Agente Oficial da Propriedade Industrial

JOSÉ DE SÁEZ
A.C.P.I.

Rua do Salitre, 125, r/c-Drt.
1251 LISBOA

Reivindicações

1. Método para detectar um microrganismo pertencente ao complexo de microrganismos de *M. tuberculosis*, o qual compreende os passos seguintes:
 - 1) amplificar o ácido nucleico de uma amostra, por meio de um método de amplificação de ácido nucleico *in vitro*, utilizando iniciadores de amplificação de uma forma conhecida *per si*, em reacções de amplificação tais como RCP, RCL ou 'NASBA', em que se utiliza um par de iniciadores que compreendem sequências oligonucleotídicas suficientemente complementares para uma parte da sequência de Repetição Directa de um microrganismo pertencente ao complexo de microrganismos de *M. tuberculosis*, para que ocorra a hibridação com uma Repetição Directa e tenha lugar o subsequente alongamento do iniciador hibridado, sendo os referidos iniciadores tais que o alongamento na reacção de amplificação ocorra com um iniciador no sentido de 5' e com o outro iniciador no sentido de 3', e depois
 - 2) efectuar um teste de hibridação de uma forma conhecida *per si*, em que o produto de amplificação é hibridado com uma sonda oligonucleotídica ou com um conjunto de sondas oligonucleotídicas diferentes, sendo cada sonda oligonucleotídica suficientemente homóloga de uma parte de um separador da Região Directa de um microrganismo pertencente ao complexo de *M. tuberculosis*, para que tenha lugar a hibridação do produto amplificado se tal ácido nucleico separador estiver presente na amostra antes da amplificação, sendo o referido passo de hibridação executado facultativamente sem uma anterior electroforese ou separação do produto amplificado, e finalmente
 - 3) detectar, de uma forma conhecida *per si*, todos os produtos hibridados.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, em que os referidos iniciadores possuem sequências oligonucleotídicas complementares de partes não sobrepostas da sequência de Repetição Directa e são tais que as reacções de alongamento a partir de cada iniciador possam ter lugar sem estorvar o outro, quando os dois iniciadores hibridarem com a mesma Repetição Directa e aumentarem de comprimento.
3. Método de acordo com uma qualquer das reivindicações anteriores, em que um iniciador RDa é capaz de aumentar de comprimento no sentido de 5' e o outro iniciador RDb é capaz de aumentar de comprimento no sentido de 3' e em que o RDa é complementar para uma sequência da Repetição Directa localizada do lado de 5' da sequência de Repetição Directa da qual o RDb é complementar.
4. Método de acordo com uma qualquer das reivindicações anteriores, em que o microrganismo é seleccionado entre *M. tuberculosis*, *M. bovis* ou *M. africanum*.
5. Método de acordo com uma qualquer das reivindicações anteriores, em que o iniciador possui uma sequência oligonucleotídica capaz de hibridar com a sequência de consenso (sequência id. nº 2 e figura 1) da Repetição Directa de um modo suficiente para que tenha lugar a amplificação nas condições da reacção de amplificação particular.
6. Método de acordo com uma qualquer das reivindicações anteriores, em que se utiliza o par de iniciadores RDa com a sequência id. nº 50 e RDb com a sequência id. nº 51.

7. Método de acordo com uma qualquer das reivindicações anteriores, em que o teste de hibridação é realizado utilizando um conjunto de sondas oligonucleotídicas, havendo entre esse conjunto pelo menos diversas sondas oligonucleotídicas específicas para o espectro total de microrganismos que se pretenda detectar.
8. Método de acordo com uma qualquer das reivindicações anteriores, em que o microrganismo pertence a um do grupos seguintes: *M. tuberculosis*, *M. bovis* e *M. africanum*.
9. Método de acordo com uma qualquer das reivindicações anteriores, em que a sonda oligonucleotídica tem um comprimento que é pelo menos de 7 nucleótidos e é uma sequência complementar para uma sequência seleccionada entre quaisquer das sequências separadoras 1 a 43 da estirpe H37Rv de *M. tuberculosis* ou para qualquer das sequências separadoras 1 a 49 de *M. bovis* BCG, ou então é uma sequência complementar para fragmentos ou derivados das referidas sequências separadoras, sendo a referida sonda oligonucleotídica capaz de hibridar com uma tal sequência separadora e compreendendo pelo menos 7 nucleótidos consecutivos homólogos de tal sequência separadora e/ou manifestando uma homologia pelo menos igual a 60% e de preferência manifestando uma homologia pelo menos igual a 80% com tal sequência separadora, por exemplo, qualquer das sequências id. n^{os} 3 a 49.
10. Método de acordo com uma qualquer das reivindicações anteriores, em que a sonda oligonucleotídica tem um comprimento que é pelo menos de 7 nucleótidos e é uma sequência complementar para uma sequência seleccionada entre todas as sequências

separadoras comuns da estirpe H37Rv de *M. tuberculosis* e de *M. bovis* BCG, isto é, as sequências separadoras 20 a 32 ou as sequências id. n^{os} 22 a 34, ou então é uma sequência complementar para os fragmentos ou derivados das referidas sequências separadoras, sendo a referida sonda oligonucleotídica capaz de hibridar com uma tal sequência separadora e compreendendo pelo menos 7 nucleótidos consecutivos homólogos de tal sequência separadora e/ou manifestando uma homologia pelo menos igual a 60% e de preferência manifestando uma homologia pelo menos igual a 80%.

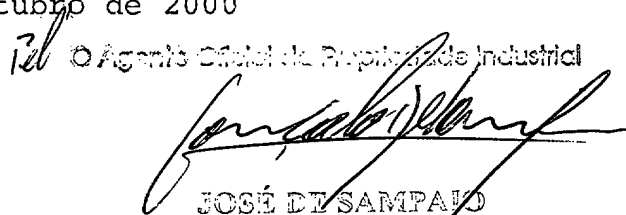
11. Método para diferenciar o tipo de microrganismos pertencentes ao complexo de *M. tuberculosis* numa amostra, o qual consiste em executar o método de acordo com uma qualquer das reivindicações anteriores, seguindo-se a comparação do padrão de hibridação obtido com um padrão de referência.
12. Método para diferenciar o tipo de microrganismo pertencente ao complexo de *M. tuberculosis* numa amostra, de acordo com a reivindicações 11, em que o padrão de referência é o padrão de hibridação obtido com uma ou várias estirpes conhecidas de microrganismos pertencentes ao complexo de microrganismos de *M. tuberculosis*, de um modo análogo.
13. Método para diferenciar o tipo de microrganismo pertencente ao complexo de *M. tuberculosis* numa amostra, de acordo com a reivindicações 12, em que o padrão de referência é uma fonte que permite obter uma listagem de sequências separadoras e as suas fontes, por exemplo, um banco de dados.

14. Estojo para levar à prática um método de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 13, o qual contém um par de iniciadores e uma sonda oligonucleotídica ou um veículo, em que os dois iniciadores possuem sequências oligonucleotídicas que têm pelo menos 7 nucleótidos e são suficientemente complementares para uma parte da sequência de Repetição Directa de um microrganismo pertencente ao complexo de microrganismos de *M. tuberculosis*, para que a hibridação ocorra e subsequentemente tenha lugar o alongamento do iniciador hibridado, sendo esses iniciadores tais que o alongamento na reacção de amplificação ocorre com um iniciador no sentido de 5' e em que a expressão 'suficientemente complementar' significa que a sequência oligonucleotídica referida possui pelo menos 7 nucleótidos homólogos consecutivos para tal sequência de Repetição Directa, em particular a sequência de consenso (sequência id. nº 2) e/ou manifesta uma homologia pelo menos igual a 60%, de preferência manifesta uma homologia pelo menos igual a 80% e mais preferencialmente manifesta uma homologia superior a 90% com a parte correspondente da sequência de Repetição Directa, possuindo o referido veículo pelo menos uma sonda oligonucleotídica específica para uma região separadora de um microrganismo do grupo pertencente ao complexo de *M. tuberculosis*, sendo a sonda oligonucleotídica de preferência, tal como definida, uma sonda oligonucleotídica que possua pelo menos 7 nucleótidos e de preferência possua mais de 12 nucleótidos, possuindo em particular entre 12 e 40 nucleótidos, sendo essa sonda suficientemente homóloga com qualquer das sequências separadoras a seguir indicadas (sequências id. nºs 1 a 23 e 44 a 49 de *M. bovis* BCG, sequências id. nºs 35 a 43 da estirpe H37Rv de *M. tuberculosis*, ou com os fragmentos ou os derivados de tais sequências separadoras, para hibridar com uma dessas sequências separadoras, compreendendo a referida sonda

oligonucleotídica pelo menos 7 nucleótidos consecutivos homólogos com essa sequência separadora e/ou manifestando um homologia pelo menos igual a 60%, manifestando de preferência uma homologia pelo menos igual a 80% e mais preferencialmente manifestando uma homologia superior a 90% com a parte correspondente da sequência separadora, por exemplo, qualquer das sequências id. n^{os} 13 a 21 e 35 a 43.

15. Estojo de acordo com a reivindicação 14, em que o referido par de iniciadores é constituído por um iniciador RDa capaz de aumentar de comprimento no sentido de 5' e em que o outro iniciador RDb é capaz de aumentar de comprimento no sentido de 3', sendo o iniciador RDa complementar de uma sequência da Repetição Directa localizada do lado de 5' da sequência da Repetição Directa da qual o iniciador RDb é complementar, estando a Repetição Directa presente na Região Directa de um microrganismo pertencente ao grupo do complexo de *M. tuberculosis*.
16. Estojo de acordo com uma qualquer das reivindicações 14 ou 15, tendo o iniciador RDa a sequência id. n^o 50 e tendo o iniciador RDb a sequência id. n^o 51.
17. Estojo de acordo com uma qualquer das reivindicações 14 a 16, contendo um conjunto das referidas sondas oligonucleotídicas.

Lisboa, 4 de Outubro de 2000

 O Agente Oficial da Propriedade Industrial

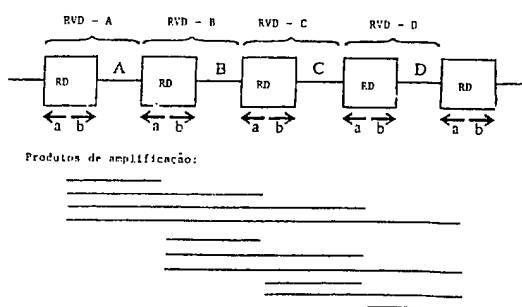
JOSÉ DE SAMPAIO
A.O.P.I.
Rua do Salitre, 195, r/c-Drt.
1250 LISBOA

Resumo

“Detecção e diferenciação de bactérias do complexo de *Mycobacterium tuberculosis* por oligotipificação da repetição de variante directa”

A invenção descreve um método de amplificação de ácido nucleico *in vitro*, utilizando iniciadores de amplificação, em que se utiliza um par de iniciadores que compreendem sequências oligonucleotídicas suficientemente complementares para uma parte da sequência de Repetição Directa de um microrganismo pertencente ao complexo de microrganismos de *M. tuberculosis*, para que ocorra a hibridação com uma Repetição Directa e subsequentemente tenha lugar o alongamento do iniciador hibridado, sendo esses iniciadores tais que o alongamento na reacção de amplificação ocorra com um iniciador no sentido de 5' e com o outro iniciador no sentido de 3'. A invenção descreve também um método de detecção de um microrganismo pertencente ao complexo de microrganismos de *M. tuberculosis*, o qual consiste em levar à prática o método de amplificação anteriormente referido, seguindo-se a realização de um teste de hibridação de uma forma conhecida *per se*, utilizando uma sonda oligonucleotídica que seja suficientemente homóloga com uma parte de um separador da Região Directa de um microrganismo pertencente ao complexo de *M. Tuberculosis*, para que ocorra a hibridação, detectando-se todos os produtos hibridados de uma forma conhecida *per se*. Também são divulgadas sondas particulares. A invenção descreve ainda um método para diferenciar o tipo de microrganismo pertencente ao complexo de *M. tuberculosis* numa amostra, o qual consiste em levar à prática o método de detecção anteriormente referido, seguindo-se uma comparação entre o padrão de hibridação obtido e um padrão de referência.

fig-2

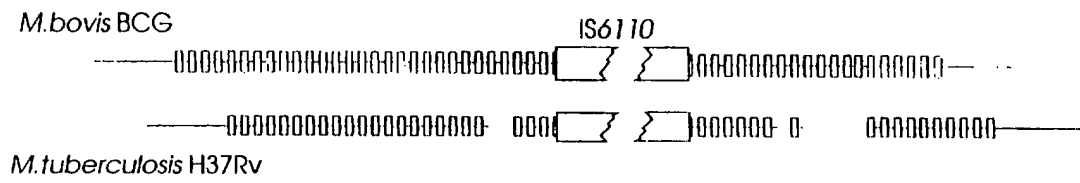


Lisboa, 4 de Outubro de 2000

al
O Agente Oficial da Propriedade Industrial
Jose de Sampaio
JOSÉ DE SAMPAIO
A.O.P.I.
Rua do Salfre, 105, 4/c-Ert.
1250 LISBOA

258

fig -1



SEQUÊNCIA DE RD DE CONSENSO: GTCGTCAGACCCAAAACCCCGAGAGGGGACGGAAAC

258

fig - 3-1

ACGCSTATATCGSTTTCCTACACCAGGATTCACGAGGGCACGCAACGTTGGCGAGCGACCTCATGGAGGTATGGCGG
GCGCCGATCATCGATGACACCGTACTTCGATTGATCGCGGACGGTGTGGTCGACACCCGGGCTTTCAGCAAGAACTC
CGACACGGGGCCGTCTTCGCGACACGGGAAGCCACACGATCCATCGCGCGCCCTTTTGAATCGAATCGCACGAA
CCGCCACCTACATCAAAGGCGATCCTTACC GATACTTTTTCAGTACGCCCTCGACTTGCAACTGCAAAGCTCGTGC
GTGTTATTCTGAAGCCGGGAACCCGTCGNGGTCGTCGATATCACCTCCGAGCCATCCGGAGCCTAAATGCCCACTCG
CAGCCGTGAGGAGTACTTCAATCTCCCGCTCAAAGTGGACGAGTCCAGCGGCACTATAGGCAAGATGTTCTGCTCTCG
TAATATACGACATCAGCGACAACCGGCGGGCGGGCTTCACTTGC GAAGATCCTGGCCGGGTTTGGCTATCGCGTCCAAG
AGTCCGCATTCTGAAGCGATGCTGACGAAGGGCCAGCTCGCGAACTAGTTGCACGTATCGACCGCTTCGCCATCGAC
TCCGACAACATCCGGATCTATAAGATAAGAGGTGTTGCCGCAGTTACGTTCTACGGAAGGGGACGGCTTGTACGGC
AGAGGAGTTTGTGTTCTTTTGACATCATCAGCAGGCATTGTTACCACACGCTGGACGAATTGTCCATAGA
GTCGTCAGACCCAAAACCCCGAGAGGGGACGGAAACTTAAAACCGTGTGTA CTGCAACCCGGAATTCCTGAAC
GTCGTCAGACCCAAAACCCCGAGAGGGGACGGAAACCATAGAGGGTCGCCGTTCTGGATCACGCTCCCCTAGTCGT
GTCGTCAGACCCAAAACCCCGAGAGGGGACGGAAACTTTTTGCCTCATAATTGGGGCAGACTTTTGACCAA
GTCGTCAGACCCAAAACCCCGAGAGGGGACGGAAACTCGCAAGCGCCGTGCTTCCAGTGATCGCCTTCTA
GTCGTCAGACCCAAAACCCCGAGAGGGGACGGAAACAACACCTCAGTAGCACGTCATACGCCGACCAATCATCAG
GTCGTCAGACCCAAAACCCCGAGAGGGGACGGAAACTTTTCTGACCATTGTGCGGGATTAGCGGGCTTAG
GTCGTCAGACCCAAAACCCCGAGAGGGGACGGAAACACCAATGCGTCGTCATTTCCGGCTTCAATTTACAGCT
GTCGTCAGACCCAAAACCCCGAGAGGGGACGGAAACTGAGGAGAGCGAGTACTCGGGGCTGCCGTCTGCGCTG
GTCGTCAGACCCAAAACCCCGAGAGGGGACGGAAACCGTGAAACCGCCCCAGCTCGCCGGGGCCGCTAG
GTCGTCAGACCCAAAACCCCGAGAGGGGACGGAAACTCGGAATCCCATGTGCTGACAGCGGATTTCGCAT
GTCGTCAGACCCAAAACCCCGAGAGGGGACGGAAACCGGGCAGCGTTCGACACCCGCTCTAGTTGACTTCCGG
GTCGTCAGACCCAAAACCCCGAGAGGGGACGGAAACAGGTGAGCAACGGCGGGCGCAACCTGGCGGCCACGGGTCC
GTCGTCAGACCCAAAACCCCGAGAGGGGACGGAAACATGGGATATCTGCTGCCCGCCCGGGGAGATGCTGTCCGAG
GTCGTCAGACCCAAAACCCCGAGAGGGGACGGAAACTTCGTCGACCATCATTGCCATTCCCTCTCCCACGT
GTCGTCAGACCCAAAACCCCGAGAGGGGACGGAAACTTGCGCCAACCTTTCGGTGTGATGCGGATGGTCCGGCTCGG

258

Fig - 3-2

GTCGTCAGACCCAAAACCCCGAGAGGGGACGGAAACCTTGAATAACGCGCAGTGAATTTTCGCGGA

TCAGACCCAAAACCCCGAGAGGGGACGGAAACATTTCGCACGAGTTCCTCGTCAGCGTCGTAATTCGCCA

GTCGTCAGACCCAAAACCCCGAGAGGGGACGGAAACCCGGCAACAATCGCGCCGGCCCGCGGGATGACTCCG

GTCGTCAGACCCAAAACCCCGAGAGGGGACGGAAACCGCATGGACCCGGGCGAGCTGCAGATGGTCCGGGAG

GTCGTCAGACCCAAAACCCCGAGAGGGGACGGAAACTGGATTGCGCTAACTGGCTTGGCGCTGATCCTGGTG

GTCGTCAGACCCAAAACCCCGAGAGGGGACGGAAACTTGGAGCGTGTACCCGAGACGGCACCATTGAGACAA

GTCGTCAGACCCAAAACCCCGAGAGGGGACGGAAACCCCTCAGCTCAGCATCGCTGATGCGGTCCAGCTCGTCCGT

GTCGTCAGACCCAAAACCCCGAGAGGGGACGGAAACCCAACCTCACCGCTGCTGGGTGAGACGTGCTCGCCCGGA

GTCGTCAGACCCAAAACCC

TGAACCGCCCG...IS6110....GACTCACCGGGGCGGTTC

3816CCCCGAGAGGGGACGGAAACTCGGGAGCCGATCAGCGACCACCGCACCTGTCA

GTCGTCAGACCCAAAACCCCGAGAGGGGACGGAAACCTTCAGCACCACCATCATCCGGCGCCTCAGCTCAGCAT

GTCGTCAGACCCAAAACCCCGAGAGGGGACGGAAACCCCTTCGACGCCGATTTCGTGATCTCTTCCCGCGGATAG

GTCGTCAGACCCAAAACCCCGAGAGGGGACGGAAACTGCCCGGCGTTTAGCGATCAACAACCAACTAATG

GTCGTCAGACCCAAAACCCCGAGAGGGGACGGAAACAGCGAAATACAGGCTCCACGACACGACCACAACGC

GTCGTCAGACCCAAAACCCCGAGAGGGGACGGAAACTCTTGACGATGCGGTTGCCCGCGCCCTTTTCCAGCC

GTCGTCAGACCCAAAACCCCGAGAGGGGACGGAAACAGGTTTCGCGTCAGACAGGTTTCGCGTCGATCAAGTCCG

GTCGTCAGACCCAAAACCCCGAGAGGGGACGGAAACTTTATCACTCCCGACCAAATAGGTATCGGCGTGTTCAA

GTCGTCAGACCCAAAACCCCGAGAGGGGACGGAAACATTTTGTAGCGGAACTCGTCCACAGTCCCCCTTTCAG

GTCGTCAGACCCAAAACCCCGAGAGGGGACGGAAACGCCCGTGGATGGCGGATGCGTTGTGCGCGCAAGT

GTCGTCAGACCCAAAACCCCGAGAGGGGACGGAAACCCGACGATGGCCAGTAAATCGGCGTGGGTAACCGATCCGG

GTCGTCAGACCCAAAACCCCGAGAGGGGACGGAAACTAGTACGCCATCTGTGCCTCATAAGGTCCAGTGCCTT

GTCGTCAGACCCAAAACCCCGAGAGGGGACGGAAACCTGACGGCACGGAGCTTTCCGGCTTCTATCAGGTA

GTCGTCAGACCCAAAACCCCGAGAGGGGACGGAAACCCCTCATGGTGGGACATGGACGAGCGCGACTATCCGG

GTCGTCGACCCAAAACCCCGAGAGGGGACGGAAACTGGACGCAGAATCGCACCGGGTGGGGAGGTGCAGCA

GTCGTCAGACCCAAAACCCCGAGAGGGGACGGAAACGCATATCGCCCGCCACACCACAGCCACGCTACTGCTCCAT

258

fig - 3-3

GTCCTCAGACCCAAAACCCCGAGAGGGGACGGAAACACACCGCCGATGACAGCTATGTCCGAGTGACATCCTCCA

GTCGTCAGACCCAAAACCACGAGAGGGGACGGAAACTTGAACCGCCCTTCGCGCGGTGTTTCGGCCGTGCCCCGA

GTCGTCAGACCCAAAACCCCGAGAGGGGACGGAAAC

TACGACGACTGGGTCGCCACCGCGTCTGTGACCTNGCATTGAGGATGANCATGATGGCGGCGTTGACGGTGAGGAC

GTTTGGTCATGAAATGNNCNCGCCGGGAGATGTCCGGCGGGGTCGGTGGTGTTCGGGGTGTGCGGTGTGGTGTTCAGT

CTGCCGTGACTTCGGCGATGGCGGTGCGGNTGGTGGATTGTCGACGATGGCCTTNTCGGCGCGAAGGCGGCGACG

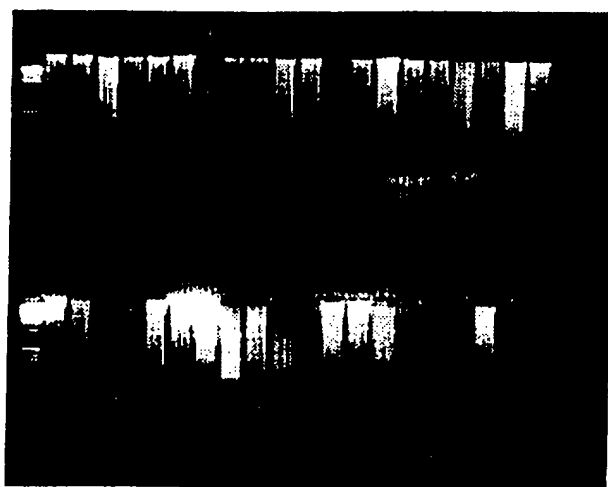
AGGGCTTNCAGGGCGAGGTTGTTGACCGCGGGGGTAGCCCCGNCTGGTCTGGTGGATCAACCCGATGGCGTCGTC

GGAGAACAGGGCATCGTCGNGTCCGGCTANCTTNAGGTTGTTGCCGTAGGTAGCTTCC

258

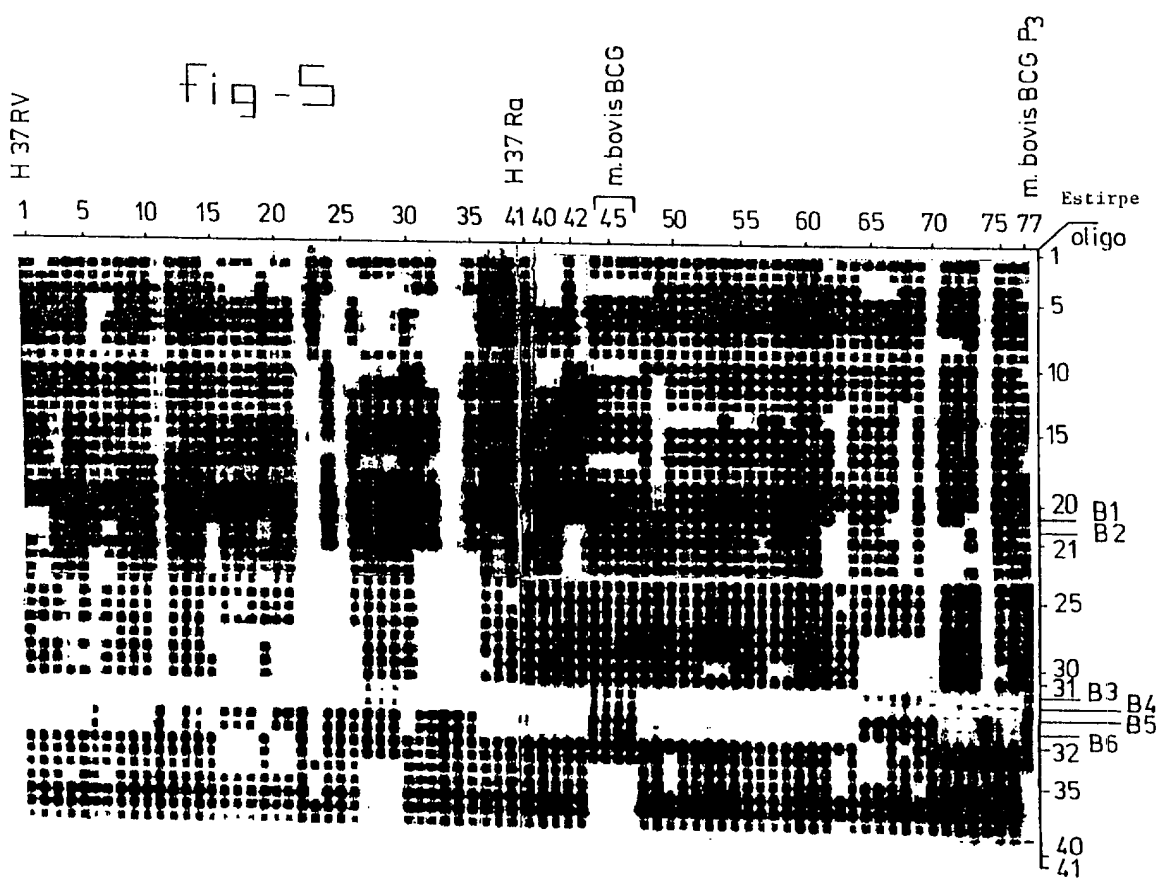
fig-4

H 37
Rv Ra 40 45 50 55



60 65 70

238



258

fig-6

