

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

(21) **PI0612464-0 A2**

(22) Data de Depósito: 18/04/2006
(43) Data da Publicação: 23/11/2010
(RPI 2081)



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

(54) Título: **MÉTODOS DE ANÁLISE DE UMA AMOSTRA PARA A DETECÇÃO DA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE UM ORGANISMO DE INTERESSE NA AMOSTRA**

(30) Prioridade Unionista: 19/04/2005 US 60/672,922,
12/08/2005 US 60/707,886

(73) Titular(es): E.I Du Pont de Nemours and Company

(72) Inventor(es): Frank R. Burns

(74) Procurador(es): Paola Calabria Mattioli

(86) Pedido Internacional: PCT US2006014552 de 18/04/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2006/113706 de 26/10/2006

(57) Resumo: MÉTODOS DE ANÁLISE DE UMA AMOSTRA PARA A DETECÇÃO DA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE UM ORGANISMO DE INTERESSE NA AMOSTRA. A presente invenção refere-se a um método para a análise de uma amostra para a detecção da presença ou ausência de um organismo de interesse na amostra que compreende: (a) a obtenção da amostra; (b) submeter a amostra a um tratamento de ruptura suficiente para fracionar quaisquer sequências de ácido nucléico presentes na amostra; e (c) a detecção para a presença ou ausência de um organismo de interesse na amostra. A etapa de detecção (c) pode compreender a realização da amplificação direcionada ao primer (de preferência, a reação em cadeia da polimerase) na amostra para produzir um resultado de amplificação e analisar o resultado da amplificação para um produto de amplificação, em que a presença ou ausência do produto da amplificação é indicativo da presença ou ausência do organismo de interesse na amostra.

**“MÉTODOS DE ANÁLISE DE UMA AMOSTRA PARA A DETECÇÃO DA
PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE UM ORGANISMO DE INTERESSE NA
AMOSTRA”**

O presente pedido reivindica o benefício do pedido de patente
5 provisório US 60/672.922, depositado em 19 de abril de 2005, e do pedido de
patente provisório US 60/707.886, depositado em 12 de agosto de 2005, sendo
cada um deles incorporado no presente como referência em sua totalidade.

CAMPO DA INVENÇÃO

O campo da invenção refere-se à detecção de organismos, com
10 base em ácidos nucleicos, em particular, aos métodos de amplificação do ácido
nucleico e as técnicas para a detecção de organismos em uma amostra.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

A detecção de um organismo, ou grupo de organismos, pode ser
realizada pela detecção de seqüências específicas de ácido nucleico
15 características daquele organismo ou grupo de organismos. A presença de
seqüências específicas de ácido nucleico pode ser detectada diretamente ou
pela hibridização específica ou pela amplificação utilizando primers que
amplificam as seqüências específicas de ácido nucleico.

Nos casos em que a amplificação é utilizada como parte do
20 método de detecção, é importante que pelo menos uma cópia das seqüências
específicas de ácido nucleico a ser amplificada esteja presente na amostra que
é colocada na reação de amplificação. Quando os organismos estão presentes
em baixas concentrações e/ou estão em uma matriz complexa que requer a
diluição para proceder com a amplificação, a sensibilidade pode ser limitada
25 pela necessidade de obter pelo menos uma cópia da seqüência específica de
ácido nucleico na reação.

Os ensaios de PCR específicos para fungos são descritos em G.
Zhou et al., *Development of a fungus-specific PCR assay for detecting low level*

fungi in an indoor environment, Molecular and Cellular Probes (2000) 14, 339-348. Esta referência descreve um método de agitação com partículas (*bead-beating*) da amostra antes da amplificação por PCR como a maneira mais eficaz de provocar uma quebra dos esporos e liberação do DNA fúngico. Especificamente, um procedimento de “primeira homogeneização” é descrito, em que 0,1 mL de amostra é diretamente adicionada em um tubo de 0,5 mL contendo cerca do mesmo volume de partículas. O tubo é fixado em um vórtex com corda elástica e é agitado no vórtex vigorosamente por 3 a 5 minutos ou colocado em um “*Mini-Bead Beater*” (“Mini-Agitador de Partículas”) e homogeneizado por 3 minutos, então aquecido em um banho de água fervente por 5 a 10 minutos para inativar as nucleases liberadas. A referência relata maior eficiência de amplificação de PCR com menos inibição, quando é utilizado 20% dos meios nutrientes e o procedimento de primeira homogeneização.

DESCRIÇÃO RESUMIDA DA INVENÇÃO

A presente invenção inclui:

Um método de análise de uma amostra para a detecção da presença ou ausência de um organismo de interesse na amostra, dito método compreende: (a) a obtenção da amostra; (b) submeter a amostra a um tratamento de ruptura suficiente para fracionar quaisquer seqüências de ácido nucléico presentes na amostra; e (c) a detecção para a presença ou ausência de um organismo de interesse na amostra.

Um método de análise de uma amostra para a detecção da presença ou ausência de um organismo de interesse na amostra, dito método compreende: (a) a obtenção da amostra; (b) a preparação da amostra ao conduzir pelo menos os seguintes processos na amostra: (1) enriquecimento, (2) separação das células da amostra, (3) lise celular, e (4) extração total do DNA; (c) submeter a amostra a um tratamento de ruptura suficiente para

fracionar quaisquer seqüências de ácido nucléico presentes na amostra; e (d) a detecção para a presença ou ausência de um organismo de interesse na amostra. De preferência, a etapa de preparação compreende conduzir o enriquecimento bacteriano e a separação das células bacterianas da amostra antes de dita etapa (c); ou conduzir o enriquecimento bacteriano, a separação das células bacterianas da amostra, e a lise celular, antes de dita etapa (c). Em outra realização preferida, na etapa de preparação, a lise celular é realizada simultaneamente ou após dita etapa (c).

Um método de análise de uma amostra para a detecção da presença ou ausência de um organismo de interesse na amostra, dito método compreende: (a) a obtenção da amostra; (b) o enriquecimento da amostra; (c) submeter a amostra enriquecida da etapa (b) a um tratamento de ruptura suficiente para fracionar quaisquer seqüências de ácido nucléico presentes na amostra; e (d) a detecção para a presença ou ausência de um organismo de interesse na amostra, em que dita etapa (b) compreende o enriquecimento da amostra em um recipiente, e em que dita etapa (c) compreende submeter a amostra enriquecida de dita etapa (b) a dito tratamento de ruptura no mesmo recipiente da etapa (b) sem a remoção da amostra enriquecida do mesmo.

De preferência, o tratamento de ruptura compreende adicionar os abjetos físicos (por exemplo, partículas, tais como de silício ou zircônio) à amostra e agitar a amostra que contém os objetos físicos. De maior preferência, o tratamento de ruptura compreende qualquer tratamento de ruptura físico, mecânico, químico, ou enzimático.

A etapa de detecção em quaisquer dos métodos acima compreende, de preferência, a realização da amplificação direcionada ao primer (por exemplo, reação em cadeia da polimerase) na amostra para produzir um resultado de amplificação e a análise do resultado da amplificação para um produto da amplificação, em que a presença ou ausência do produto

da amplificação é indicativo da presença ou ausência do organismo de interesse na amostra. De maior preferência, ainda, a etapa de detecção compreende: (i) a obtenção de pelo menos um conjunto de par de primer da amplificação determinado para amplificar uma sequência alvo localizada dentro de uma região de sequência do ácido nucléico repetitivo de um genoma do organismo de interesse; (ii) realizar a amplificação direcionada ao primer da amostra utilizando pelo menos um conjunto de par de primer da amplificação para produzir um resultado de amplificação; e (iii) analisar o resultado da amplificação para detectar a presença ou ausência do produto da amplificação da sequência alvo, em que a presença ou ausência do produto da amplificação é indicativo da presença ou ausência do organismo de interesse na amostra. De preferência, a etapa de detecção possui pelo menos um aumento de dez vezes na sensibilidade na detecção para o organismo de interesse quando comparado à detecção sem a realização de dita etapa (b).

De preferência, a análise do resultado da amplificação é realizada simultaneamente com a execução da amplificação direcionada ao primer. A análise utiliza, de preferência, os métodos de detecção da nuclease 5'.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A Figura 1 mostra o processo da análise da curva de fusão. A mudança na fluorescência do DNA alvo é capturada durante a fusão. A análise matemática do negativo na mudança do log da fluorescência dividida pela mudança na temperatura plotada *versus* a temperatura, resulta no pico do gráfico conhecido como curva de fusão.

As transformações de dados envolvem o seguinte:

1. Interpolar dados para conseguir pontos de dados espaçados uniformemente.
2. Adotar log de fluorescência (F).
3. Harmonizar log (F).

4. Calcular $-d(\log F)/dt$ $-d_F/d_T$.
5. Reduzir dados para 11-13 pontos de dados espaçados separados por um grau, dependendo do organismo alvo.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

5 A descrição de cada referência apresentada no presente é incorporada como referência em sua totalidade.

DEFINIÇÕES

Nesta descrição, uma série de termos e abreviações é utilizada. São fornecidas as seguintes definições.

10 A "reação em cadeia da polimerase" é abreviada como PCR.

O "polinucleotídeo", "seqüência de ácido nucléico", "seqüência de nucleotídeo" ou "fragmento de ácido nucléico" são utilizados intercambiavelmente e é um polímero de RNA ou DNA que é de fita simples ou dupla, opcionalmente que contém bases de nucleotídeos sintéticas, não naturais ou alteradas. Os nucleotídeos (geralmente encontrados em sua forma de monofosfato 5') são referidos como suas letras únicas como segue: "A" para adenilato ou desoxiadenilato (para RNA ou DNA, respectivamente), "C" para citidilato ou desoxicitidilato, "G" para guanilato ou desoxiguanilato, "U" para uridilato, "T" para desoxitimidilato, "R" para purinas (A ou G), "Y" para pirimidinas (C ou T), "K" para G ou T, "H" para A ou C ou T, "I" para inosina e "N" para qualquer nucleotídeo.

O termo "produto da amplificação" refere-se soa fragmentos de ácido nucléico produzidos durante uma reação de amplificação direcionada ao primer. Os métodos típicos de amplificação direcionada ao primer incluem a reação em cadeia da polimerase (PCR), reação em cadeia da ligase (LCR) ou amplificação por deslocamento de fita (SDA). Se a metodologia PCR for selecionada, a composição da replicação pode compreender os componentes para a replicação do ácido nucléico, por exemplo, nucleotídeo trifosfato, duas

(ou mais) seqüências de primers apropriados, polimerase termoestável, tampões, solutos e proteínas. Estes reagentes e os detalhes que descrevem os procedimentos para seu uso na amplificação dos ácidos nucléicos são fornecidos na patente US 4.683.202 (1987, Mullis, et al.) e patente US 4.683.195 (1987, Mullis, et al.). Se a metodologia PCR for selecionada, as composições da replicação podem compreender, por exemplo: uma ligase termoestável (por exemplo, ligase de *T. aquaticus*), dois conjuntos de oligonucleotídeos adjacentes (em que um membro de cada conjunto é complementar a cada uma das fitas alvo), tampão Tris-HCl, KCl, EDTA, NAD, ditiotritol e DNA de espermatozóide de salmão. Vide, por exemplo, Tabor et al., *Proc. Acad. Sci. U.S.A.*, 82: 1074 1078 (1985)).

O termo “primer” refere-se a um oligonucleotídeo (sintético ou de ocorrência natural), que é capaz de agir como um ponto de início da síntese ou da replicação de ácido nucléico ao longo de uma fita complementar quando colocada nas condições em que a síntese de uma fita complementar é catalisada por uma polimerase.

O DNA recombinante padrão e as técnicas de clonagem moleculares utilizadas no presente são bem conhecidos no estado da técnica e são descritas em Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª edição, Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, NY (1989) (a partir deste momento “Maniatis”); e por Ausubel, F. M. et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, publicado por Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1987).

Voltando agora para as realizações preferidas:

Em uma realização preferida, um método para a análise de uma amostra para a detecção da presença ou ausência de um organismo de interesse na amostra compreende: obtenção de uma amostra; submeter a amostra a um tratamento de ruptura suficiente para fracionar quaisquer

seqüências de ácido nucléico presentes na amostra; e detecção da presença ou ausência de um organismo de interesse na amostra.

Em outra realização preferida, um método para aumentar a sensibilidade da detecção de um organismo de interesse em uma amostra compreende: obtenção de uma amostra; submeter a amostra a um tratamento de ruptura suficiente para fracionar quaisquer seqüências de ácido nucléico presentes na amostra; e detecção da presença ou ausência de um organismo de interesse na amostra, em que a sensibilidade de dita etapa de detecção é aumentada, de preferência, em pelo menos 10 vezes, de maior preferência, de pelo menos qualquer número inteiro de 11 a 100 vezes, de maior preferência, ainda, de 10 vezes a qualquer número inteiro de 11 a 100 vezes, de maior preferência, ainda, de qualquer número inteiro de 10 – 99 vezes para 100 vezes, ou de maior preferência, de qualquer número inteiro de 10 – 100 vezes para qualquer número inteiro entre 100 – 10 vezes, quando comparado a não realização de dita etapa de submeter a amostra ao tratamento de ruptura.

De preferência, a etapa de detecção compreende realizar a amplificação direcionada ao primer (de preferência, reação em cadeia da polimerase) na amostra para produzir um resultado de amplificação e a análise do resultado da amplificação para um produto da amplificação, em que a presença ou ausência do produto da amplificação é indicativo da presença ou ausência do organismo de interesse na amostra. De maior preferência, a etapa de detecção compreende: obtenção de pelo menos um conjunto de par de primer de amplificação determinado para amplificar uma seqüência alvo localizada dentro de uma região de seqüência do ácido nucléico repetitivo de um genoma do organismo de interesse; realizar a amplificação direcionada ao primer da amostra utilizando pelo menos um conjunto de par de primer da amplificação para produzir um resultado de amplificação; e analisar o resultado da amplificação para detectar a presença ou ausência do produto da

amplificação da sequência alvo, em que a presença ou ausência do produto da amplificação é indicativo da presença ou ausência do organismo de interesse na amostra.

De maior preferência, a análise do resultado da amplificação é realizada simultaneamente com a execução da amplificação direcionada ao primer (por exemplo, reação em cadeia da polimerase). De maior preferência, ainda, a análise do produto da amplificação utiliza os métodos de detecção da nuclease 5'.

Em outra realização preferida, em qualquer um dos métodos da presente invenção, uma etapa de enriquecimento é realizada na amostra antes da etapa de submeter a amostra a um tratamento de ruptura. O enriquecimento da amostra é realizado em um recipiente e, de preferência, a etapa de submeter a amostra a um tratamento de ruptura é realizada na amostra enriquecida no mesmo recipiente em que a amostra foi enriquecida (isto é, ambos os tratamentos de enriquecimento e de ruptura podem ser realizados na amostra no mesmo recipiente). De preferência, o recipiente é um tubo de amostra, mas o recipiente também pode ser qualquer recipiente ou contêiner apropriado conhecido no estado da técnica, por exemplo, tubos de teste, béqueres, frascos, jarras, tubos de reação, ampolas, ou tubos de centrifuga.

AMOSTRAS PREFERIDAS E ORGANISMOS DE INTERESSE

De preferência, a amostra é de um animal, fonte ambiental ou alimentícia suspeita de contaminação pelo organismo de interesse.

O organismo de interesse pode ser qualquer ser vivo. De preferência, o organismo de interesse é um microorganismo. Os organismos específicos de interesse que podem ser detectados pelos métodos da presente invenção incluem, de preferência, as bactérias e os fungos.

Os organismos particularmente preferidos de interesse são os organismos fúngicos. Particularmente preferidos é o fungo *Sacchromyces cervisiae*.

Acredita-se que os métodos da presente invenção são particularmente vantajosos no aumento da sensibilidade de detecção dos organismos fúngicos em uma amostra.

Sem estar ligado a qualquer teoria ou mecanismo particular, acredita-se que a maior sensibilidade é obtida particularmente em organismos fúngicos, uma vez que os genomas dos organismos fúngicos contêm tipicamente de 100 a 200 cópias de seus genes do ácido ribonucléico ribossomal (rRNA) conjuntamente ordenados em unidades repetidas de cerca de 10.000 pares de base cada.

Em uma estratégia de amplificação de ácido nucléico direcionada ao primer, o equivalente de 4 μ L do material sendo testado é colocado na reação de amplificação. Se houver 20 fungos haplóides por mL, então, na média, um cromossomo que possui uma região de amplificação alvo no gene do rRNA é distribuído por 50 μ L (= 1 mL/ 20). A amostra de 4 μ L é, portanto, improvável de resultar em uma região de amplificação alvo estando presente quando a amplificação de ácido nucléico direcionado ao primer é realizado em 4 μ L de amostra.

Entretanto, ao submeter a amostra contendo um organismo fúngico a um tratamento de ruptura (explicado abaixo) de acordo com a presente invenção, então em 1 mL de amostra contendo 20 fungos haplóides, se o tratamento de ruptura é realizado para fracionar as seqüências de ácido nucléico do genoma fúngico em cerca de 10.000 pares de base, o 1 mL de amostra possui agora a média de 2.000 a 4.000 alvos (de 100 a 200 genes de rRNA) por mL, ou na média de 8 a 16 alvos por 4 μ L de amostra, aumentando com isso a sensibilidade na detecção, particularmente quando é empregada a amplificação de ácido nucléico direcionada ao primer.

Assim, de maior preferência, em outra realização preferida, os métodos da presente invenção podem ser empregados para detectar ou para

aumentar a sensibilidade na detecção de qualquer organismo de interesse que possui um genoma em que as seqüências de ácido nucléico repetitivas existem e servem como regiões alvo para a amplificação direcionada ao primer. A sensibilidade é aumentada por, de preferência, pelo menos 10 vezes, de maior preferência, pelo menos qualquer número inteiro de 11 a 100 vezes, de maior preferência, de 10 vezes a qualquer número inteiro de 11 a 100 vezes, de maior preferência, de qualquer número inteiro de 11 – 99 vezes a 100 vezes ou, de maior preferência, de qualquer número inteiro de 10 – 100 vezes para qualquer número inteiro de 100 – 10 vezes, quando comparado a não realização de um tratamento de ruptura de acordo com a presente invenção.

TRATAMENTO DE RUPTURA PREFERIDOS

Uma vez que a amostra é obtida, a próxima etapa é submeter a amostra a um tratamento de ruptura suficiente para fracionar qualquer seqüência de ácido nucléico presente na amostra. De preferência, as seqüências de ácido nucléico são do genoma do organismo de interesse para os quais a amostra está sendo analisada.

O tratamento de ruptura pode compreender qualquer método ou protocolo para as seqüências de ácido nucléico fracionados na amostra e, em particular, para as seqüências de ácido nucléico fracionados do genoma do organismo de interesse para o qual a amostra está sendo analisada. O tratamento de ruptura pode empregar abordagens físicas, químicas ou enzimáticas e não é limitada a estas abordagens específicas. Qualquer abordagem do fracionamento de ácido nucléico conhecido ou prontamente averiguável por um técnico no assunto regular pode ser utilizado e está incluso dentro da presente invenção. O tratamento de ruptura é realizado por um período de tempo suficiente para fracionar quaisquer seqüências de ácido nucléico presentes na amostra e um técnico no assunto pode determinar prontamente o comprimento deste período de tempo dependendo da amostra e

do organismo de interesse para o qual a amostra está sendo testada.

Os tratamentos de ruptura físicos preferidos incluem o uso de objetos físicos, tais como partículas, em combinação com a agitação da amostra. As condições de agitação devem ser suficientes para produzir as
5 forças de cisalhamento que rompem o DNA em fragmentos menores. Outros tratamentos de ruptura físicos incluem a sonicação, nebulização ou passagem da solução contendo DNA através de um orifício estreito.

Os tratamentos de ruptura químicos preferidos incluem o tratamento com hidróxido de sódio, tratamento com dimetilsulfato seguido por
10 peperidina, tratamento com formato de peperidina seguido pelo tratamento com piperidine ou tratamento com hidrazina seguido por piperidina.

Os tratamentos de ruptura enzimáticos preferidos incluem a digestão com nucleases não específicas tais como DNase 1 ou a digestão com as endonucleases de restrição tais como EcoR1.

15 Em uma realização particularmente preferida, o tratamento de ruptura compreende a adição de objetos físicos na amostra e a agitação da amostra contendo os objetos físicos. A agitação pode ser realizada por um período de tempo suficiente para fracionar quaisquer seqüências de ácido
20 nucléico presentes na amostra e um técnico no assunto regular pode prontamente determinar o comprimento deste período de tempo dependendo da amostra e do organismo de interesse para o qual a amostra está sendo testada. A agitação é realizada, de preferência, por pelo menos 6 minutos, de maior preferência, por pelo menos qualquer número inteiro de 6 a 20 minutos,
25 de maior preferência, de 6 minutos a qualquer número inteiro de 6 – 20 minutos, de maior preferência, ainda, de qualquer número inteiro de 6 – 19 minutos a 20 minutos, ou de maior preferência, de qualquer número inteiro de 6 – 20 minutos a qualquer número inteiro 20 – 6 minutos. Em uma realização particularmente preferida, a agitação é realizada por pelo menos 15 minutos.

Em outra realização preferida, a agitação é realizada por 15 a 20 minutos. Um equipamento particularmente preferido para a realização da agitação é o Disruptor Genie[®] (disponível pela Scientific Industries, Inc., Bohemia, NY). Os objetos físicos compreendem, de preferência, as partículas e, de maior
5 preferência, as partículas de silício ou zircônio. Os objetos físicos também podem compreender partículas de vidro.

Os métodos de acordo com a presente invenção podem ser utilizados diretamente com quaisquer amostras clínicas ou ambientais apropriadas, sem qualquer necessidade de preparação da amostra. Entretanto,
10 a fim de obter maior sensibilidade, e em situações onde o tempo não é um fator limitante, é preferível que as amostras sejam tratadas previamente.

Em outra realização preferida, portanto, antes da detecção para o organismo alvo de interesse na amostra, uma etapa de preparação da amostra pode ser realizada. De preferência, esta etapa de preparação pode
15 compreender pelo menos um dos seguintes processos: enriquecimento (por exemplo, do organismo alvo) nos meios de cultura, separação das células (por exemplo, do organismo alvo) da amostra, lise celular e extração de DNA. De maior preferência, esta etapa de preparação compreende a realização do enriquecimento e da separação antes de submeter a amostra a um tratamento
20 de ruptura. De maior preferência, ainda, esta etapa de preparação compreende a realização do enriquecimento, a separação e a lise celular, antes de submeter a amostra a um tratamento de ruptura. Em outra realização preferida, a lise celular é realizada simultaneamente ou após o tratamento de ruptura. Os exemplos das etapas de preparação da amostra realizadas em conjunto com
25 os métodos da presente invenção são apresentadas no Exemplo 1 abaixo.

Os procedimentos de enriquecimento típicos empregam meios que irão intensificar o crescimento e a saúde dos organismos alvo e também irão inibir o crescimento de quaisquer microorganismos secundários ou não

alvo presentes. Os meios de seleção foram desenvolvidos para uma variedade de organismos e um técnico no assunto saberá selecionar os meios apropriados para o organismo particular a ser enriquecimento. Uma discussão geral e as receitas dos meios não seletivos são descritas em *FDA*
5 *Bacteriological Analytical Manual*. (1998) publicado e distribuído pela Association of Analytical Chemists, Suite 400, 2200 Wilson Blvd, Arlington, VA 22201-3301.

Após o crescimento, uma amostra das misturas dos complexos é removida para a análise posterior. O procedimento da amostragem pode ser
10 acompanhado por uma variedade de meios bem conhecidos pelos técnicos no assunto.

Em uma realização preferida, 20 µL da cultura enriquecida é removida e adicionada a 200 µL da solução lisada contendo a protease. A solução lisada é aquecida a 37° C por 20 minutos seguido pela inativação da
15 protease a 95° C por 10 minutos conforme descrito em Bax[®] System User's Guide, Qualicon, Inc., Wilmington, DE.

Alternativamente, em uma realização de maior preferência, em qualquer dos métodos da presente invenção, uma etapa de enriquecimento é realizada na amostra antes da etapa em que se submete a amostra ao
20 tratamento de ruptura, em que o enriquecimento da amostra em realizado em um recipiente, e a etapa de submeter a amostra a um tratamento de ruptura é realizado na amostra enriquecida no mesmo recipiente em que a amostra foi enriquecida (isto é, ambos os tratamentos de enriquecimento e de ruptura são realizados na amostra no mesmo recipiente). De preferência, o recipiente é um
25 tubo de amostra, mas o recipiente também pode ser qualquer recipiente ou contêiner apropriado conhecido no estado da técnica, por exemplo, tubos de teste, béqueres, frascos, jarras, tubos de reação, ampolas, ou tubos de centrífuga.

DETECÇÃO E ANÁLISE PREFERIDAS

Uma variedade de métodos de detecção com base em ácido nucléico pode ser empregada para a detecção do(s) organismo(s) alvo de interesse. Uma variedade de métodos de amplificação de ácido nucléico
5 direcionado ao primer são conhecidos no estado da técnica incluindo os métodos de ciclização térmica (por exemplo, PCR, RT-PCR e LCR), bem como os métodos isotérmicos e a amplificação por deslocamento da fita (SDA), a amplificação com base na sequência de ácido nucléico (NASBA) e a sequência de replicação auto sustentável (3SR) e 'amplificação da Q replicase'.

10 O método preferido é o de PCR.

De preferência, em qualquer método da presente invenção, a etapa de detecção utiliza um conjunto de par de primer de amplificação determinado para amplificar uma sequência alvo localizada dentro de uma região de sequência do ácido nucléico repetitiva de um genoma do organismo
15 de interesse na amostra a ser testada.

Qualquer composição apropriada de replicação de ácido nucléico ("composição de replicação") em qualquer formato pode ser utilizada.

Uma composição de replicação típica para a amplificação em PCR pode compreender, por exemplo, dATP, dCTP, dGTP, dTTP, primers alvo
20 específicos e uma polimerase adequada. Se a composição de replicação estiver na forma líquida, os tampões apropriados conhecidos no estado da técnica podem ser utilizados (Sambrook, J. et al. 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª edição, Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Alternativamente, se a composição de replicação estiver contida na
25 forma de tablete, então os reagentes de tabletização típicos podem ser incluídos tais como estabilizantes e agentes ligantes. A tecnologia de tabletização preferida é apresentada nas patentes US 4.762.857 e US 4.678.812, cada uma das quais é incorporada no presente como referência em sua totalidade.

Em outra realização preferida, uma composição de replicação contém um controle interno positivo. As vantagens de um controle interno positivo contido dentro de uma reação de PCR foram previamente descritas (patente US 6.312.930 e documento WO 97/11197, cada uma das quais é incorporada no presente como referência em sua totalidade) e incluem: (i) o controle pode ser amplificação utilizando um único primer; (ii) a quantidade de produto controle de amplificação é independente de qualquer alvo de DNA ou RNA contido na amostra; (iii) o controle do DNA pode ser tabletizado com outros reagentes de amplificação para facilitar o uso e o alto grau de reprodutibilidade em ambos os procedimentos teste manual e automatizados; (iv) o controle pode ser utilizado com a detecção homogênea, isto é, sem a separação do produto de DNA dos reagentes; e (v) o controle interno possui um perfil de fusão que é distinto dos outros produtos de amplificação potenciais na reação. O DNA controle será de tamanho e composição base apropriados para permitir a amplificação em uma reação de amplificação direcionada ao primer. A sequência de DNA controle pode ser obtida a partir do genoma de organismos de interesse ou de outra fonte, mas deve ser amplificado de maneira reprodutível sob as mesmas condições que permitem a amplificação do produto de amplificação alvo.

A reação controle é útil para validar a reação de amplificação. A amplificação do DNA controle ocorre dentro do mesmo tubo de reação que a amostra que está sendo testada e, portanto, indica uma reação de amplificação bem sucedida quando as amostras são alvos negativos, isto é, nenhum produto de amplificação alvo é produzido. A fim de obter a validação significativa da reação de amplificação, um número apropriado de cópias do DNA controle deve ser incluído em cada reação de amplificação.

Em alguns casos, pode ser útil incluir uma composição de replicação de controle negativo adicional. A composição de replicação de

controle negativo irá conter os mesmos reagentes que a composição de replicação, mas sem a polimerase. A função primária de tal controle é monitorar a fluorescência secundária falsa em um formato homogêneo quando o método emprega um meio fluorescente de detecção. As composições de replicação podem ser modificadas dependendo se elas são determinadas para serem utilizadas na amplificação do DNA alvo ou do DNA controle.

As composições de replicação que irão amplificar o DNA alvo (composições de replicação teste) podem incluir (i) uma polimerase (em geral termoestáveis), (ii) um par de primer capaz de hibridizar para o DNA alvo e (iii) tampões para a reação de amplificação proceder.

As composições de replicação que irão amplificar o DNA controle (controle positivo ou composição de replicação positiva) podem incluir (i) uma polimerase (em geral termoestáveis), (ii) o DNA controle; (iii) pelo menos um primer capaz de hibridizar para o DNA controle; e (iv) tampões para a reação de amplificação proceder.

Um técnico no assunto irá entender que quaisquer condições de PCR em geral aceitáveis podem ser utilizadas para detectar de maneira bem sucedida o organismo alvo de interesse e, dependendo da amostra a ser testada e outras condições do laboratório, a otimização de rotina para as condições de PCR podem ser necessárias para atingir a sensibilidade e a especificidade ótima. De maneira ótima, eles obtêm os produtos de amplificação por PCR de todos os alvos específicos pretendidos, enquanto não fornecem o produto de PCR para outras espécies não alvo.

Em uma realização preferida, os seguintes reagentes e condições de ciclização podem ser utilizados. Cinqüenta microlitros (50 μ L) de lisado foram adicionados ao tubo de PCR contendo um tablete de reagente Bax[®] (fabricado pela Qualicon, Inc., Wilmington, DE), e o tablete contendo a polimerase Taq DNA, desoxinucleotídeos, SYBR[®] Green (Molecular Probes,

Eugene, OR), os componentes do tampão e os primers para obter uma concentração final no PCR de 0,150 micromols para cada primer. As condições de ciclização de PCR preferidas: 94° C, 2 minutos iniciais da desnaturação de DNA, seguida por 38 ciclos de desnaturação a 94° C, 15 segundos, 5 anelamento a 56° C por 45 segundos e alongamento a 70° C por 2 minutos, seguido por uma única espera final a 70° C.

Os resultados da amplificação direcionada ao primer podem ser analisados utilizando diversos métodos para detectar a presença ou a ausência de um produto de amplificação.

10 A detecção homogênea refere-se a um método preferido para a detecção dos produtos da amplificação onde não é necessária nenhuma separação (tal como por eletroforese em gel) dos produtos da amplificação dos moldes ou primers. A mistura de detecção homogênea é tipicamente acompanhada pela medida do nível de fluorescência da mistura de reação na 15 presença ou ausência de um corante fluorescente.

Em uma realização preferida, a análise da curva de fusão do DNA é utilizada para obter a detecção homogênea, em particular com o hardware BAX® System e os tabletes de reagente da Qualicon Inc. Os detalhes do sistema são dados na patente US 6.312.930 e nos documentos WO 97/11197 20 e WO 00/66777, cada um dos quais é incorporado no presente como referência em sua totalidade.

A análise da curva de fusão detecta e quantifica a molécula de ácido nucléico padrão de dupla fita ("dsDNA" ou "alvo") pelo monitoramento da fluorescência do produto de amplificação alvo ("amplicon alvo") durante cada 25 ciclo de amplificação em pontos de tempo selecionados.

Como é bem conhecido pelo técnico no assunto, as duas fitas de um dsDNA separam ou fundem, quando a temperatura é maior do que sua temperatura de fusão. A fusão de uma molécula de dsDNA é um processo, e

sob uma dada condição de solução, a fusão inicia em uma temperatura (denominada T_{MS} daqui por diante) e completa em outra temperatura (denominada T_{ME} daqui por diante). O termo familiar, T_M , designa a temperatura em que a fusão está 50% completa.

5 Um ciclo de PCR típico envolve uma fase de desnaturação onde o dsDNA é fundido, uma fase de anelamento do primer onde a temperatura é ótima para os primers se ligarem ao alvo agora de fita simples, e uma cadeia de fase de elongação (em uma temperatura T_E) onde a temperatura é ótima para o funcionamento da DNA polimerase.

10 De acordo com a presente invenção, o T_{MS} deve ser maior do que T_E e T_{ME} deve ser menor (com freqüência, substancialmente menor) do que a temperatura ao qual o DNA polimerase é inativado por aquecimento. As características de fusão são efetuadas pelas propriedades intrínsecas de uma dada molécula de dsDNA, tal como a composição de desoxinucleotídeo e o
15 comprimento do dsDNA.

Os corantes de intercalação irão se ligar à fita dupla de DNA. O complexo corante/ dsDNA irá fluorescer quando exposto ao comprimento de onda de excitação apropriado da luz, que é dependente do corante e a intensidade da fluorescência pode ser proporcional à concentração do dsDNA.

20 Os métodos para se ter vantagem no uso dos corantes de intercalação de DNA para detectar e quantificar o dsDNA são conhecidos no estado da técnica. Muitos corantes são conhecidos e utilizados no estado da técnica para estes propósitos. Os presentes métodos também tiram vantagem de tal relação.

Um exemplo de tal corante inclui os corantes de intercalação. Os
25 exemplos de tais corantes incluem, mas não estão limitados a, SYBR Green I[®], brometo de etídio, iodeto de propídio, TOTO[®] {Quinolinium, 1,1'-[1,3-propanodilbis-[(dimetilimino)-3,1-propanodil]]bis[4-[(3-metil-2(3H)-benzotiazolilideno)-metil]], tetraiodeto}, e YoPro[®] {Quinolinium, 4-[(3-metil-2(3H)-benzoxazolilideno)-metil]1-[3-

(trimetilamônio)-propil], diiodeto}. De maior preferência para a presente invenção, é um corante de cianeto não assimétrico tal como SYBR Green I[®], fabricado pela Molecular Probes, Inc. (Eugene, OR).

As análises da curva de fusão são obtidas pelo monitoramento da mudança na fluorescência enquanto a temperatura é aumentada. Quando a temperatura atinge o T_{MS} específico para a amplicon do alvo, o dsDNA começa a desnaturar. Quando o dsDNA desnatura, o corante de intercalação dissocia do DNA e a fluorescência diminui. A análise matemática do negativo na mudança do log da fluorescência dividida pela mudança na temperatura plotada *versus* a temperatura resulta no pico do gráfico conhecido como curva de fusão (Vide Figura 1, que ilustra a análise da curva de fusão em geral).

O processo de transformação de dados mostrados na Figura 1 envolve o seguinte:

- (1) Interpolar os dados para obter pontos de dados espaçados igualmente;
- (2) Tirar o log da fluorescência (F);
- (3) Arredondar log F;
- (4) Calcular $-d(\log F)/dT$;
- (5) Reduzir os dados a 11-13 pontos espaçados dos dados um grau separado (dependendo do organismo alvo).

O método de detecção homogêneo presente pode ser utilizado para detectar e quantificar os dsDNA, dos quais a presença e o nível dos organismos alvo pode ser determinado. Um pequeno número de alvos de dsDNA detectáveis está entre 1 e 10 sob as condições e volumes de reação típicos.

A detecção homogênea pode ser empregada para realizar as amplificações de ácido nucléico direcionadas ao primer "em tempo real", utilizando os pares de primer da presente invenção (por exemplo, PCR "em tempo real" e RT-PCR "em tempo real"). Os métodos "em tempo real"

preferidos são apresentados, por exemplo, nas patentes US 6.171.785 e US 5.994.056. cada um dos quais é incorporado no presente como referência em sua totalidade.

Outro método de detecção é o método de detecção da nuclease 5'
5', conforme apresentado, por exemplo, nas patentes US 5.804.375, US 5.538.848, US 5.487.972 e US 5.210.015, cada um dos quais são incorporados no presente como referência em sua totalidade.

Uma variedade de outros métodos de detecção PCR é conhecida no estado da técnica incluindo a eletroforese em gel não desnaturante padrão
10 (por exemplo, acrilamida ou agarose), eletroforese em gel por gradiente de desnaturação, e eletroforese em gel por gradiente de temperatura. A eletroforese em gel não desnaturante padrão é um método simples e rápido para a detecção de PCR, mas pode não ser adequado para todas as aplicações.

15 A Eletroforese em Gel por Gradiente de Desnaturação (DGGE) é um método de separação que detecta as diferenças no comportamento de desnaturação de pequenos fragmentos de DNA (200 – 700 pares de base). O princípio da separação é baseada em ambos os comprimentos do fragmento e a sequência do nucleotídeo. Nos fragmentos que são do mesmo comprimento,
20 uma diferença mínima como de um par de base pode ser detectada. Este é o contraste para a eletroforese em gel não desnaturante, onde os fragmentos de DNA são separados apenas em tamanho. Esta limitação da eletroforese em gel não desnaturante resulta porque a diferença na densidade de carga entre as moléculas de DNA é próxima do neutro e desempenha um papel muito
25 pequeno na separação. Conforme o tamanho do fragmento de DNA aumenta, sua velocidade através do gel diminui.

O DGGE é utilizado principalmente para separar os fragmentos de DNA de mesmo tamanho com base em seus perfis desnaturantes e

seqüência. Utilizando o DGGE, duas fitas de uma molécula de DNA separam, ou funde, quando é aplicado calor ou um desnaturante químico. A desnaturação de um duplex de DNA é influenciada por dois fatores: (1) as ligações de hidrogênio formadas entre os pares de base complementares (uma vez que as regiões ricas em GC fundem em altas condições de desnaturação do que as regiões que são ricas em AT); e (2) a atração entre as bases vizinhas na mesma fita, ou “empilhamento”. Conseqüentemente, uma molécula de DNA pode possuir diversos domínios de fusão com cada uma das suas condições de desnaturação características individuais determinadas pela sua seqüência de nucleotídeo. O DGGE explora o fato de que normalmente as moléculas de DNA idênticas que possuem o mesmo comprimento e seqüência de DNA, com a exceção de apenas um nucleotídeo dentro de um domínio específico de desnaturação, irá desnaturar em diferentes temperaturas ou T_M . Assim, quando é feita a eletroforese da dupla fita (ds) do fragmento de DNA através de um gradiente de aumento de desnaturante químico, ele começa a desnaturar e sofre uma mudança tanto conformacional quanto de mobilidade. O fragmento de dsDNA será mais rápido do que um fragmento de (ss) DNA de fita simples desnaturado, uma vez que a estrutura ramificada da porção de fita simples da molécula se torna emaranhada na matriz do gel. Conforme o ambiente desnaturante aumenta, o fragmento de dsDNA irá de dissociar completamente e a mobilidade da molécula através do gel é retardada na concentração de desnaturante em que os domínios de desnaturação particularmente baixos da fita de DNA se dissociam. Na prática, a eletroforese é realizada em uma temperatura constante (cerca de 60° C) e os desnaturantes químicos são utilizados em concentrações que irão resultar em 100% das moléculas de DNA sendo desnaturadas (isto é, 40% de formamida e 7 M de uréia). O gradiente desnaturante variável é criado utilizando um marcador de gradiente, tal que a composição de cada gel DGGE muda gradualmente de 0%

de desnaturante até 100% de desnaturante. Obviamente, os gradientes que contém um intervalo reduzido de desnaturante (por exemplo, 35% a 60%) também podem ser vertidos para aumentar a separação do DNA.

O princípio utilizado no DGGE também pode ser aplicado ao segundo método que utiliza um gradiente de temperatura ao invés de um gradiente de desnaturante químico. Este método é conhecido como Eletroforese em Gel com Gradiente de Temperatura (TGGE). Este método faz uso de um gradiente de temperatura para induzir a mudança conformacional do dsDNA para o ssDNA para separar os fragmentos de igual tamanho com seqüências diferentes. Como no DGGE, os fragmentos de DNA com diferentes seqüências de nucleotídeos irão se tornar imóveis em diferentes posições do gel. As variações no esquema do primer podem ser utilizadas como vantagem no aumento da utilidade do DGGE para a caracterização e identificação dos produtos de PCR. Estes métodos e princípios de utilização das variações dos esquemas dos primers estão descritos em PCR Technology Principles and Applications, Henry A. Erlich Ed., M. Stockton Press, NY, págs 71 a 88 (1988).

EXEMPLOS

A presente invenção é ainda exemplificada no seguinte Exemplo. Deve ser entendido que este Exemplo, enquanto indica as realizações preferidas da presente invenção, é dado somente como meio de ilustração.

EXEMPLO 1

Uma cultura noturna de fungos de *Sacchromyces cervasiae* (*S. cervasiae*) em caldo de dextrose de bata foi diluída em série em 5 vezes em uma solução de 1% de triptona com 2 mM de EDTA (tetraacetato de etileno diamina). Cada diluição foi simultaneamente analisada de acordo com cada um dos três métodos seguintes:

(1) A diluição foi plaqueada em agar de dextrose de batata para determinar a concentração de *S. cervasiae*.

(2) Uma porção da amostra foi submetida à lise celular química seguida pela amplificação de PCR utilizando uma levedura BAX[®] System e um kit de detecção do ensaio de bolor (disponível pela DuPont Qualicon, Wilmington, DE), que utiliza primers específicos fúngicos que amplifica uma porção do gene de RNA 18s ribossomal e detecta a amplicon, em um instrumento BAX[®] System (disponível pela DuPont Qualicon, Wilmington, DE).

(3) Uma porção da amostra foi colocada em um tubo com 0,5 mM de partículas de sílica – zircônio, agitada por 15 minutos em um Disruptor Genie[®], e então uma alíquota foi submetida à lise celular química seguida pela amplificação de PCR utilizando uma levedura BAX[®] System e um kit de detecção do ensaio de bolor, que utiliza primers específicos fúngicos que amplifica uma porção do gene de RNA 18s ribossomal e detecta a amplicon, em um instrumento BAX[®] System.

As amostras correram com diferentes quantidades de unidades formadoras de colônias de *S. cerevisiae* como o sinal de início de acordo com os métodos 2 a 3 acima. Os resultados são mostrados na Tabela 1. Conforme mostrado abaixo, o método 3 aumenta a sensibilidade da detecção em níveis abaixo de 2 CFU.

TABELA 1

Sinal da reação CFU/ PCR	Resultado do ensaio Bax [®] - partículas agitadas (método 3 acima)	Resultado do ensaio Bax [®] - nenhuma partícula (método 2 acima)
50	+	+
10	+	+
2	+	+
0,4	+	-
0,08	+	-

REIVINDICAÇÕES

1. MÉTODO DE ANÁLISE DE UMA AMOSTRA PARA A DETECÇÃO DA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE UM ORGANISMO DE INTERESSE NA AMOSTRA, caracterizado pelo fato de que dito método
5 compreende:

(a) a obtenção de uma amostra;

(b) submeter a amostra a um tratamento de ruptura suficiente para fracionar quaisquer seqüências de ácido nucléico presentes na amostra; e

(c) a detecção para a presença ou ausência de um organismo de
10 interesse na amostra.

2. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que em dita etapa (b), o tratamento de ruptura compreende a adição de objetos físicos na amostra e a agitação da amostra contendo os objetos físicos.

15 3. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que ditos objetos físicos compreendem partículas.

4. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que ditas partículas compreendem o silício ou o zircônio.

5. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado
20 pelo fato de que em dita etapa (b), o tratamento de ruptura compreende um tratamento de ruptura físico, químico ou enzimático.

6. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende ainda, antes de dita etapa (c), uma etapa de preparação da amostra ao conduzir pelo menos um dos seguintes processos
25 na amostra: (1) enriquecimento, (2) separação das células da amostra, (3) lise celular, e (4) extração total do DNA.

7. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que dita etapa de preparação compreende a realização do

enriquecimento bacteriano e separação das células da amostra antes de dita etapa (b).

8. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que dita etapa de preparação compreende a realização do enriquecimento bacteriano, separação das células da amostra e lise celular, antes de dita etapa (b).

9. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que em dita etapa de preparação, dita lise celular é realizada simultaneamente com ou após dita etapa (b).

10. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que dita etapa de detecção (c) compreende a realização da amplificação direcionada ao primer na amostra para produzir um resultado de amplificação, e a análise do resultado da amplificação para um produto da amplificação, em que a presença ou ausência do produto da amplificação é indicativo da presença ou ausência do organismo de interesse na amostra.

11. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que dita etapa de detecção (c) compreende:

(i) a obtenção de pelo menos um conjunto de par de primer da amplificação, determinado para amplificar uma seqüência alvo localizada dentro de uma região de seqüência do ácido nucléico repetitivo de um genoma do organismo de interesse;

(ii) realizar a amplificação direcionada ao primer da amostra utilizando pelo menos um conjunto de par de primer da amplificação para produzir um resultado de amplificação; e

(iii) analisar o resultado da amplificação de dita etapa (c) (ii) para detectar a presença ou ausência do produto da amplificação da seqüência alvo, em que a presença ou ausência do produto da amplificação é indicativo da presença ou ausência do organismo de interesse na amostra.

12. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que em dita etapa (c), a amplificação direcionada ao primer é uma reação em cadeia da polimerase.

13. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que dita análise do resultado da amplificação é realizada simultaneamente com dita execução da reação em cadeia da polimerase.

14. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que em dita etapa (c) a dita análise do resultado da amplificação utiliza os métodos de detecção da nuclease 5'.

15. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que dita etapa (c) possui pelo menos um aumento de 10 vezes na sensibilidade na detecção do organismo de interesse quando comparado à detecção sem a realização de dita etapa (b).

16. MÉTODO DE ANÁLISE DE UMA AMOSTRA PARA A DETECÇÃO DA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE UM ORGANISMO DE INTERESSE NA AMOSTRA, caracterizado pelo fato de que dito método compreende:

(a) a obtenção da amostra;

(b) o enriquecimento da amostra;

(c) submeter a amostra enriquecida da etapa (b) a um tratamento de ruptura suficiente para fracionar quaisquer seqüências de ácido nucléico presentes na amostra; e

(d) detecção para a presença ou ausência de um organismo de interesse na amostra, em que dita etapa de detecção compreende:

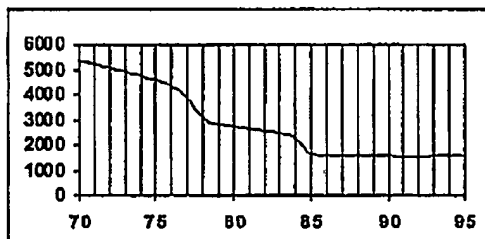
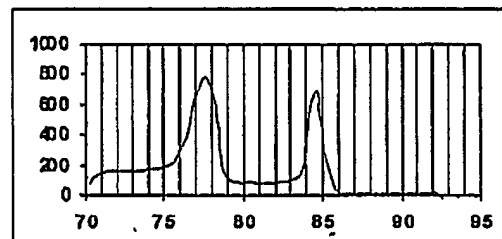
(i) a obtenção de pelo menos um conjunto de par de primer da amplificação determinado para amplificar uma seqüência alvo localizada dentro de uma região de seqüência do ácido nucléico repetitiva de um genoma do

organismo de interesse;

(ii) realizar a amplificação direcionada ao primer da amostra utilizando pelo menos um conjunto de par de primer da amplificação para produzir um resultado de amplificação; e

5 (iii) analisar o resultado da amplificação de dita etapa (d) (ii) para detectar a presença ou ausência do produto da amplificação da sequência alvo, em que a presença ou ausência do produto da amplificação é indicativo da presença ou ausência do organismo de interesse na amostra.

10 17. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que dita etapa (b) compreende o enriquecimento da amostra em um recipiente, em que dita etapa (c) compreende submeter a amostra enriquecida de dita etapa (b) ao dito tratamento de ruptura no mesmo recipiente da etapa (b) sem a remoção da amostra enriquecida do mesmo.

Fig. 1***Mecanismo de análise da curva de fusão******Transformação de dados******dados originais******dados processados***

RESUMO**“MÉTODOS DE ANÁLISE DE UMA AMOSTRA PARA A DETECÇÃO DA
PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE UM ORGANISMO DE INTERESSE NA
AMOSTRA”**

5 A presente invenção refere-se a um método para a análise de
uma amostra para a detecção da presença ou ausência de um organismo de
interesse na amostra que compreende: (a) a obtenção da amostra; (b)
submeter a amostra a um tratamento de ruptura suficiente para fracionar
quaisquer seqüências de ácido nucléico presentes na amostra; e (c) a detecção
10 para a presença ou ausência de um organismo de interesse na amostra. A
etapa de detecção (c) pode compreender a realização da amplificação
direcionada ao primer (de preferência, a reação em cadeia da polimerase) na
amostra para produzir um resultado de amplificação e analisar o resultado da
amplificação para um produto de amplificação, em que a presença ou ausência
15 do produto da amplificação é indicativo da presença ou ausência do organismo
de interesse na amostra.