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

(11) PI 0607194-5 B1

(22) Data do Depósito: 30/01/2006

(45) Data de Concessão: 14/02/2018

(54) Título: MÉTODO E KIT PARA ANALISAR QUANTITATIVAMENTE UM MICRORGANISMO POR MARCAÇÃO DE RRNA

(51) Int.Cl.: C12N 15/09; C12Q 1/68

(30) Prioridade Unionista: 31/01/2005 JP 2005-023448

(73) Titular(es): KABUSHIKI KAISHA YAKULT HONSHA

(72) Inventor(es): KAZUNORI MATSUDA; TAKASHI ASAHARA; KOJI NOMOTO; MAYUMI KIWAKI; HIROKAZU TSUJI

“MÉTODO E KIT PARA ANALISAR QUANTITATIVAMENTE UM MICRORGANISMO POR MARCAÇAO DE rRNA”

Campo Técnico

[001]A presente invenção refere-se a um método para quantificar ou detectar um microrganismo, particularmente em um estado vivo, marcando o rRNA.

Antecedentes da Técnica

[002]Como método para quantificar um microrganismo, tem sido convencional e principalmente usado um método que envolve cultivar um microrganismo em um meio de seleção preliminarmente estimado e medir o número de células microbianas e um método que envolve cultivar um microrganismo em um meio de seleção líquido e medir a densidade ou absorbância óptica. Os seguintes métodos foram também usados na operação de identificação requerida de um microrganismo por detecção do microrganismo em um espécime, por exemplo, um método que envolve a identificação deste através da observação morfológica, coloração de Gram e características microbiológicas tais demanda de oxigênio, propriedades assimiladoras de açúcar e condição de crescimento em um meio; um método envolvendo a determinação deste por homologia de DNA-DNA; e método de detecção que usa um anticorpo monoclonal para um antígeno de superfície microbiana. Contudo, esses métodos requerem tempo e habilidade e, portanto, têm sido um problema do ponto de vista de rapidez e simplicidade.

[003]Nos anos recentes, métodos de amplificação de genes incluindo um método de PCR têm sido usados em uma extensa gama de áreas como técnicas para detectar traços de ácidos nucléicos. Esses métodos têm vantagens capazes de levar à aceleração e simplificação, sem incluir nenhum requisito obrigatório para cultivar o microrganismo contido em um espécime e capacidade de manusear diretamente um espécime como amostra. Assim, os métodos têm sido submetidos à investigação de aplicação à quantificação e detecção de um microrganismo.

Petição 870170016276, de 13/03/2017, pág. 25/75

[004]Como exemplo onde o método de PCR tem sido aplicado à análise de um microrganismo, um método é conhecido por quantificar uma bactéria por um método de PCR que usa o DNA total como uma sequência alvo e iniciadores universais (Documento de Patente 1). Métodos usando rDNA 16S como alvo têm sido também obtidos. Exemplos conhecidos desses incluem um método para a análise quantitativa por um método de PCR que usa rDNA 16S como sequência alvo (Documento de Patente 2), um método para análise de bactéria intestinal por um método de PCR usando rDNA 16S como sequência alvo (Documento de Patente 3), e um método para a detecção de linhagem bacteriana do gênero *Lactobacillus*, uma bactéria que provoca turbidez na cerveja (Documento de Patente 4). Contudo, esses métodos têm apresentado um problema, pois eles não podem ser usados como alternativas para um método convencional que tenha sido convencionalmente empregado, porque a sensibilidade de detecção não é alcançada na extensão obtida com o meio de cultura. A título de exemplo, realização do método para análise quantitativa como descrito no Documento de Patente 2 requer uma grande quantidade de DNA molde correspondente a uma contagem microbiana de 10^5/μL ou mais, o que torna o método impraticável. A baixa sensibilidade de detecção se deve provavelmente ao baixo número de cópias (quantidade de molde), do DNA total ou rDNA 16S fornecendo como molde para a PCR no microrganismo. Já que o DNA é conhecido por permanecer mesmo depois da morte de um microrganismo, esses métodos somente quantificam e detectam microrganismos mortos e vivos juntos, o que também tem acarretado problema para se quantificar e detectar precisamente um microrganismo em estado vivo (Documento Não Patentário 1).

[005]Como exemplos de aplicação de um método de PCR à análise de um microrganismo, foram também feitas tentativas para se realizar métodos que usam mRNA como sequência alvo; exemplos conhecidos destes incluem análise quantitativa de bactéria de ácido láctico em fezes, empregando mRNA como sequência alvo

(Documento Não Patentário 2). Métodos para detectar células cancerosas são também conhecidos, os quais usam como sequências alvo mRNAs específicos para células cancerosas em espécimes (Documentos de Patente 5 e 6). Contudo, mesmo esses métodos não têm proporcionado sensibilidade de detecção na medida em que eles pudessem substituir o método convencional como métodos de quantificação. Especificamente, o limite de detecção da análise quantitativa como mostrado no Documento de Patente 2 é de somente $10^{3,5}$ ou mais células/g de fezes; o método de análise não foi capaz de ser usado como alternativa ao método de cultura convencional em vista da sensibilidade de detecção. Além disso, esses métodos alvejam mRNAs de genes únicos para os microrganismos, e têm sido inadequados para a detecção em um espécime a ser testado contendo uma grande variedade de microrganismos devido a problemas tais como desenho de iniciador complicado e especificidade reduzida.

[006]Por conseguinte, tem sido aguardado um método que proporcione sensibilidade de detecção do mesmo modo que os convencionais métodos de detecção, sendo ao mesmo tempo um método rápido que use um método de PCR ou similares e que possa ainda quantificar e detectar precisamente um microrganismo no estado vivo.

[007]Para aperfeiçoar a sensibilidade, é possível alterar o desenho de um alvo de modo que o alvo possa estar presente de modo mais estável ou em maior abundância nas células. Contudo, tal alvo estável é provavelmente desfavorável ao propósito de detectar somente um microrganismo vivo, considerando que ele é suspeito de permanecer muito tempo em uma célula morta deste. Assim, não é fácil obter simultaneamente a detecção de apenas células vivas e sensibilidade de detecção suficientemente alta.

[008]É também sabido que rRNA é responsável por cerca de 85% do teor de RNA em uma célula e tem várias multi-cópias e que rRNA é estável em comparação ao

mRNA porque ele forma um complexo com proteína. Tem sido também relatado que o rRNA é detectado na ordem de 48 horas depois da morte microbiana (Documento Não Patentário 3) e, portanto, tem sido crença comum que ele seja inadequado para a detecção de um microrganismo em estado vivo (Documento Não Patentário 1).

[009]Documento de Patente 1: Patente Publicada JP 2002-238585

[010]Documento de Patente 2: Patente Publicada JP 2003-259879

[011]Documento de Patente 3: Patente Publicada JP 2002-112485

[012]Documento de Patente 4: Patente Publicada JP 10-210980

[013]Documento de Patente 5: Patente Publicada JP 10-248600

[014]Documento de Patente 6: Publicação de Pedido Internacional WO 00/17395

[015]Documento Não Patentário 1: J. Food Prot., vol. 67, Nº 4: 823-832 (2004)

[016]Documento Não Patentário 2: FEMS Microbiology Letters, vol. 231: 125-130 (2004)

[017]Documento Não Patentário 3: Appl. Environ. Microbiol., vol. 64, Nº 11: 4264-4268 (1998)

[018]Um objetivo da presente invenção é proporcionar um método para analisar quantitativamente um microrganismo, que pode atingir sensibilidade de detecção até o ponto de ser capaz de substituir um método de cultura convencional e detecção mais precisa do microrganismo em um estado vivo.

Exposição da Invenção

[019]Como resultado de intensivos estudos, os presentes inventores constataram que rRNA (i.e., 5S, 16S, e 23S nas bactérias, e 5S, 18S, 26S ou 28S nas células eucarióticas), que acreditava-se ser inadequado para detectar um microrganismo vivo em termos de estabilidade, pode ser inesperadamente usado como alvo para quantificar e detectar precisamente o número de células microbianas em um estado vivo sem incorporação de suas células mortas e ainda que o uso de um método de PCR na quantificação e detecção pode obter sensibilidade de detecção ao ponto de

ser capaz de substituir um método convencional, e a presente invenção foi deste modo obtida.

[020]Assim, a presente invenção proporciona um método para quantificar um microrganismo de interesse, usando como índice a quantidade de rRNA do microrganismo em um espécime a ser testado.

[021]A presente invenção proporciona também um método para detectar um microrganismo de interesse, usando como índice a presença de rRNA do microrganismo em um espécime a ser testado.

[022]A presente invenção proporciona também um fragmento de ácido nucléico usado no método acima, em que o fragmento é um fragmento de ácido nucléico contendo uma sequência de bases em uma das SEQ ID NOS: 2, 3 e 5 a 28 ou uma sequência de bases complementar às mesmas, ou um fragmento de ácido nucléico contendo uma sequência de bases homóloga a estas e funcionalmente equivalente a estas.

[023]A presente invenção proporciona um kit para realizar o método acima.

[024]O método para detecção que alveja o rRNA de acordo com a presente invenção pode ser usado para obter alta sensibilidade de detecção em comparação com o uso de um alvo convencional da presença abundante do alvo enquanto também detecta mais precisamente e quantificar um microrganismo em um estado sólido. Um método de PCR pode ser também usado na detecção para atingir sensibilidade de detecção ao ponto de ser capaz de substituir um método de cultura convencional. Além disso, o método utilizando um método de PCR pode obter rapidez e simplicidade acentuadas em comparação com métodos convencionais tal como método de cultura. Em outras palavras, o método da presente invenção pode ser usado para obter simultaneamente alta sensibilidade de detecção, quantificação e/ou detecção mais precisas de um organismo vivo, e rapidez e simplicidade. Assim, o método da presente invenção pode ser usado em situações práticas onde sejam reque-

ridas detecção e/ou quantificação de um microrganismo, tal como análise da flora intestinal e detecção e/ou quantificação de um microrganismo que vive em um espécime derivado de um alimento ou um organismo.

Breve Descrição dos Desenhos

[025]A Figura 1 é um conjunto de gráficos mostrando correlação entre o crescimento de vários microrganismos e a quantidade de transcrição de rRNA;

[026]A Figura 2 é um conjunto de gráficos mostrando uma curva padrão obtida por um método quantitativo de RT-PCR e comparação da faixa de detecção entre o método e um método quantitativo de PCR;

[027]A Figura 3 é um gráfico que mostra a faixa de detecção de *P. aeruginosa* de fezes humanas;

[028]A Figura 4 é um gráfico que mostra a comparação de valores quantitativos para Enterobacteriaceae fecal quando determinados pelo método quantitativo RT-PCR e pelo método de cultura;

[029]A Figura 5 é conjunto de gráficos mostrando a sensibilidade de detecção de *E. coli*, *S. aureus*, e *B. cereus* do leite de vaca;

[030]A Figura 6 é um conjunto de gráficos mostrando a sensibilidade de detecção de *P. aeruginosa* e *S.aureus* do sangue; e

[031]A Figura 7 é um gráfico que mostra a senibilidade de detecção de *E. coli* de um produto de leite fermentado.

Melhor Modo de Executar a Invenção

[032]O método para quantificar ou detectar um microrganismo de interesse de acordo com a presente invenção é caracterizado por usar como índice a abundância ou presença de rRNA do microrganismo em um espécime a ser testado.

[033]O rRNA de um microrganismo de interesse refere-se a um rRNA que um microrganismo a ser quantificado e detectado pode ter. Exemplos do rRNA incluem rRNAs procarióticos 5S, 28S; os rRNAs 16, 23S, 18S e 26S são particularmente pre-

feríeis em que eles são principalmente usado como índices confiáveis para classificação microbiana corrente. O microrganismo de interesse refere-se a um microrganismo a ser quantificado e detectado, e não está particularmente limitado. Exemplos deste incluem microrganismos da família *Eterobacteriaceae* e os gêneros *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Stqaphyloccus*, *Veillonella*, *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Bacteróides*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Prevotella*, Ruminococcus, *Fusobacterium*, *Propionibacterium*, *Peptostreptococcus*, *Vibrio*, *Bacillus*, *Campylobacter*, *Acinetobacter*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Weissella*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Heliocobacter*, *Neisseria*, *Listeria*, *Haemophilus*, *Mycobacterium*, *Gardnerella*, *Legionella*, *Aeromon*as, *Moraxella* e *Candida*, e microrganismos conforme descritos nas Tabelas 2 e 3 a serem mencionadas. O microrganismo de interesse de acordo com a presente invenção é um conceito que inclui não somente microrganismo de cepa, mas também um grupo, gênero e uma família que são compostos de uma população de 2 cepas ou mais compartilhando certas propriedades.

[034]O espécime a ser testado refere-se um objeto que é para ser examinado quanto à presença, abundância ou similares de um microrganismo. Exemplos do espécime a ser testado incluem espécimes de origem biológica, tal como *swab* conjuntival, cálculo dental, placa dentária, esputo expectorado, *swab* da garganta, saliva, descarga nasal, lavem broncoalveolar, efusão pleural, suco gástrico, lavagem gástrica, urina, muco cervical, descarga vaginal, lesão de pele, fezes, sangue, fluido de ascite, tecido, fluido espinhal, fluido sinovial, e lavagem de lesão; e objetos potencialmente contendo microrganismo, tais como alimento, medicamentos, cosméticos, produtos processados intermediários de alimento, medicamentos e cosméticos, calco microbiano, plantas, solo, lama ativada, e água de drenagem. A amostra de um espécime a ser testado refere-se a uma amostra tirada ou preparada de um espécime a ser testado, e não está particularmente limitada desde que seja uma amostra capaz de refletir a presença ou abundância de um microrganismo no espécime.

Exemplos destas incluem uma mistura contendo nucleotídeos e uma mistura contendo RNAs contidos em um espécime a ser testado; a mistura preferida é a que contém RNAs contidos em um espécime as ser tratado em vista do uso de um método de PCR.

[035]A amostra de um espécime a ser testado pode ser propriamente obtida, por exemplo, do todo ou de parte de um espécime a ser testado por um método conhecido, se necessário, depois do pré-tratamento usando métodos de extração, preparação e purificação. A título de exemplo, a mistura que contém RNAs pode ser obtida, por exemplo, por extração universal usando um método universal tal como “um método ultra-centrífugo com guanidina-cloreto de césio”, “método (AGPC) de guanidina ácida-fenol-clorofórmio”, “um método de pérolas magnéticas” e “um método de coluna de sílica”, se necessário, depois do pré-tratamento empregando um método conhecido tais como filtração, centrifugação e cromatografia; um kit comercial (por exemplo, kit Qiagen RNeasy, Trizol) podem ser também usados para isto.

[036]A amostra de um espécime a ser testado usado é preferivelmente RNAs em estado estabilizado em um microrganismo para impedir a decomposição desta de forma a manter a alta sensibilidade à detecção. A estabilização pode ser efetuada usando, por exemplo, um agente estabilizante comercial (por exemplo, RNAprotect Bscterial Reagent, RNAlater). A estabilização é preferivelmente realizada imediatamente depois de coletar o espécime para evita alteração da quantidade de RNAs no microrganismo.

[037]A quantificação de um microrganismo de interesse de acordo com a presente invenção usa como índice a quantidade de rRNA do microrganismo em um espécime a ser testado. Aqui, a quantidade de rRNA de um microrganismo de interesse em um espécime a ser testado pode ser determinada, por exemplo, por (1) obter a quantidade do produto amplificada por um método PCR usando fragmentos de ácido nucléico capazes de hibridizar especificamente para o rRNA do microrganismo de

interesse e uma amostra do espécime, (2) obter a eficácia de hibridização entre os fragmentos de ácido nucléico capazes de especificamente hibridizar para o rRNA do microrganismo de interesse e uma amostra do espécime, ou (3) usar um método quantitativo empregando um outro método conhecido.

[038]Aqui, no caso (1) de usar um método PCR, “os fragmentos de ácido nucléico capazes de hibridizar especificamente para o rRNA de um microrganismo de interesse” podem ser desenhados por comparação da sequência de bases do microrganismo com as sequências de bases de outros microrganismos para selecionar sequências específicas para rRNA, que o microrganismo de interesse pode ter. Aqui, a sequência do rRNA que o microrganismo pode ter pode ser obtido, por exemplo, por checagem contra uma base da dados (DDBJ, GenBank, etc.). Também, as sequências de bases podem ser alinhadas usando-se software (por exemplo, Clustal X) para encontrar sequências específicas por método visual ou quaisquer outros métodos. As sequências específicas para um microrganismo de interesse são preferivelmente selecionadas considerando-se a abrangência de escopo na qual o(s) microrganismo(s) a ser(em) quantificado(s) está(estão) incluído(s). Especificamente, por exemplo, se uma linhagem e para ser especificamente quantificada, as sequências específicas para a linhagem são preferivelmente selecionadas; se um gênero é para ser especificamente quantificado, as sequências específicas para o gênero são preferivelmente selecionadas. A seleção pode ser apropriadamente realizada usando-se um método conhecido.

[039]Além das sequências assim desenhadas, os fragmentos de ácido nucléico capazes de hibridizarem para o rRNA do microrganismo de interesse podem ser, cada, apropriadamente postulados se baseados em conhecimento técnico comum conhecido; uma sequência de bases complementar à sequência de bases mencionada acima, uma sequência de bases homóloga à esta similarmente usável para quantificar um microrganismo de interesse, e similares podem ser também empre-

gadas. Exemplos de da sequência de bases homóloga incluem um fragmento de ácido nucléico contendo (a) a sequência de bases acima mencionada que ainda contém substituição, adição ou deleção ou mais, preferivelmente de 1 a a 10 bases, (b) uma sequência de bases tendo um identidade de sequência de 90% ou mais, preferivelmente 95% ou mais, mais preferivelmente 99% ou mais com a sequência de bases acima mencionada, ou (c) uma sequência de bases capaz de hibridizar sob condições severas para um DNA contendo uma sequência de bases complementar à sequência de bases acima mencionada.

[040]O fragmento de ácido nucléico pode ser também uma parte de ácido nucléico à qual preferivelmente 100 bases, mais preferivelmente 20 bases, ainda mais preferivelmente 10 bases ou menos são adicionadas a ambas ou a uma extremidade, preferivelmente à extremidade 5', deste.

[041]O comprimento do fragmento de ácido nucléico não está particularmente limitado; contudo, o fragmento compreende preferivelmente de 5 a 50, mais preferivelmente de 12 a 35 bases.

[042]O fragmento de ácido nucléico assim desenhado pode ser sintetizado artificialmente, em um sintetizador de DNA de acordo com a sequência de bases deste. O fragmento é preferivelmente aquele cuja especificidade tenha sido verificada. Aqui, a especificidade pode ser verificada, por exemplo, por confirmação de que o uso de rRNA de interesse como um molde proporciona o produto amplificado por PCR específica em comparação com um controle adequado.

[043]Exemplos do fragmento de ácido nucléico incluem fragmentos de ácido nucléico contendo as sequências de base descritas em SEQ ID NOS: 1 a 30 ou as sequências de bases complementares às mesmas, ou fragmentos de ácido nucléico que contêm sequências de bases homólogas aos mesmos e funcionalmente equivalentes aos mesmos. Aqui, exemplos dos fragmentos de ácido nucléico que contêm sequências de bases homólogas aos mesmos e funcionalmente equivalentes aos

mesmos incluem fragmentos de ácido nucléico como mostrados em (a) a (c) abaixo, que podem ser usados para a quantificação e detecção de rRNA de um microrganismo de interesse.

(a)Um fragmento de ácido nucléico contendo a sequência de bases representada por uma de SEQ ID NOS: 1 a 30 ou uma sequência de bases complementar à mesma, em que o fragmento contém deleção, substituição ou adição de um ou várias bases.

(b)Um fragmento de ácido nucléico tendo uma identidade de sequência de 90% ou mais, preferivelmente 95% ou mais, mais preferivelmente 99% ou mais com a sequência de bases representada por uma de SEQ ID NOS: 1 a 30 ou uma sequência de bases complementar à mesma.

(c)fragmento de ácido nucléico contendo uma sequência de bases capaz de hibridizar em condições severas para DNA que contém a sequência de bases representada por uma de SEQ ID NOS: 1 a 30 ou uma sequência de bases complementar a esta.

[044]Aqui, a identidade das sequências de bases é calculada usando o programa de busca de homologia GENETYX ®.

[045]“Condições severas” incluem, por exemplo, condições de manter, para hibridização a 42ºC em uma solução contendo formamida a 50%. 5 x SSS, 5 x solução de Denhardt, e 250 mg/ mL de DNA de esperma de salmão.

[046]O fragmento de ácido nucléico usável para quantificação e detecção de rRNA de um microrganismo de interesse pode ser obtido, por exemplo, por realização de um método PCR para selecionar um fragmento de ácido nucléico que proporciona um produto de amplificação quando o rRNA do microrganismo é usado como um molde enquanto o produto não é proporcionado quando um outro alvo, por exemplo, rRNA de um microrganismo diferente ou mRNA, é empregado como molde.

[047]Então, (1) um fragmento de ácido nucléico contendo a sequência de bases descrita em SQ ID NO: 1 ou 2 ou uma sequência de bases complementar à mesma, ou um fragmento de ácido nucléico contendo uma sequência de base homóloga ao mesmo ou funcionalidade equivalente ao mesmo pode ser usado para quantificar especificamente e detectar *Bacillus cereus*; (2) um fragmento de ácido nucléico contendo a sequência de bases descrita em SEQ ID NO: 3 ou 4 ou uma sequência de bases complementar a esta, ou um fragmento de ácido nucléico contendo uma sequência de base homóloga ao mesmo e funcionalmente equivalente ao mesmo pode ser usado para especificamente quantificar e detectar *Clostridium perfringens*; (3) um fragmento de ácido nucléico contendo a sequência de bases descrita em SEQ ID NO: 5 ou 6 ou uma sequência de bases complementar à mesma, ou um fragmento de ácido nucléico contendo uma sequência de base homóloga ao mesmo e funcionalmente equivalente ao mesmo pode ser usado para quantificar especificamente e detectar *Enterobacteriaceae*; (4) fragmento de ácido nucléico contendo a sequência de bases descrita em SEQ ID NO: 7 ou 8 ou uma sequência de bases complementar à mesma, ou um fragmento de ácido nucléico contendo um sequência de bases homóloga ao mesmo um funcionalmente equivalente ao mesmo pode ser usado para quantificar especificamente e detectar o gênero de estafolilococo; (5) fragmento de ácido nucléico contendo a sequência de bases descrita em SEQ ID NO: 9 ou 10 ou uma sequência de bases complementar à mesma, ou um fragmento de ácido nucléico contendo um sequência de bases homóloga ao mesmo e funcionalmente equivalente ao mesmo pode ser usado para quantificar especificamente e detectar o gênero de *Pseudomonas*; (6) fragmento de ácido nucléico contendo a sequência de bases descrita em SEQ ID NO: 11 ou 12 ou uma sequência de bases complementar à mesma, ou um fragmento de ácido nucléico contendo um sequência de bases homóloga ao mesmo e funcionalmente equivalente ao mesmo pode ser usado para quantificar especificamente e detectar o gênero de *Enterococcus*; (7) fragmento de ácido

nucléico contendo a sequência de bases descrita em SEQ ID NO: 13 ou 14 ou uma sequência de bases complementar à mesma, ou um fragmento de ácido nucléico contendo um sequência de bases homóloga ao mesmo e funcionalmente equivalente ao mesmo pode ser usado para quantificar especificamente e detectar o gênero de *Lactobacillus acidophilus*; (8) fragmento de ácido nucléico contendo a sequência de bases descrita em SEQ ID NO: 15 ou 16 ou uma sequência de bases complementar à mesma, ou um fragmento de ácido nucléico contendo um sequência de bases homóloga ao mesmo e funcionalmente equivalente ao mesmo pode ser usado para quantificar especificamente e detectar o gênero do subgrupo *Lactobacillus ruminis*; (9) fragmento de ácido nucléico contendo a sequência de bases descrita em SEQ ID NO: 9 ou 10 ou uma sequência de bases complementar à mesma, ou um fragmento de ácido nucléico contendo um sequência de bases homóloga ao mesmo e funcionalmente equivalente ao mesmo pode ser usado para quantificar especificamente e detectar o gênero de o subgrupo *Lacobacillus plantarum*; (10) fragmento de ácido nucléico contendo a sequência de bases descrita em SEQ ID NO: 19 ou 20 ou uma sequência de bases complementar à mesma, ou um fragmento de ácido nucléico contendo um sequência de bases homóloga ao mesmo e funcionalmente equivalente ao mesmo pode ser usado para quantificar especificamente e detectar o subgrupo *Lactobacillus reuteri*; (11) fragmento de ácido nucléico contendo a sequência de bases descrita em SEQ ID NO: 21 ou 22 ou uma sequência de bases complementar à mesma, ou um fragmento de ácido nucléico contendo um sequência de bases homóloga ao mesmo e funcionalmente equivalente ao mesmo pode ser usado para quantificar especificamente e detectar o subgrupo *Lactobacillus sakei*; (12) fragmento de ácido nucléico contendo a sequência de bases descrita em SEQ ID NO: 23 ou 24 ou uma sequência de bases complementar à mesma, ou um fragmento de ácido nucléico contendo um sequência de bases homóloga ao mesmo e funcionalmente equivalente ao mesmo pode ser usado para quantificar especificamente e

detectar o subgrupo *Lactobacillus casei*; fragmento de ácido nucléico contendo a sequência de bases descrita em SEQ ID NO: 25 ou 26 ou uma sequência de bases complementar à mesma, ou um fragmento de ácido nucléico contendo um sequência de bases homóloga ao mesmo e funcionalmente equivalente ao mesmo pode ser usado para quantificar especificamente e detectar o *Lactobacillus brevis*; (14) fragmento de ácido nucléico contendo a sequência de bases descrita em SEQ ID NO: 27 ou 28 ou uma sequência de bases complementar à mesma, ou um fragmento de ácido nucléico contendo um sequência de bases homóloga ao mesmo e funcionalmente equivalente ao mesmo pode ser usado para quantificar especificamente e detectar *Lactobacillus fructivorans*; e (15) fragmento de ácido nucléico contendo a sequência de bases descrita em SEQ ID NO: 29 ou 30 ou uma sequência de bases complementar à mesma, ou um fragmento de ácido nucléico contendo um sequência de bases homóloga ao mesmo e funcionalmente equivalente ao mesmo pode ser usado para quantificar especificamente e detectar o gênero de *Lactobacillus fermentum*;

[048]Aqui, o fragmento de ácido nucléico contendo a sequência de bases em SEQ ID NO: é um conhecido fragmento de ácido nucléico conforme descrito em FEMS Microbiology Letters, vol. 202: 209-213 (2001). O fragmento de ácido nucléico contendo a sequência de bases em SEQ IS NO: 4 é um conhecidos fragmento de ácido nucléico conforme descrito em Microbiol. Immunol., vol. 46, No. 5: 353-358 (2002). O fragmento de ácido nucléico contendo a sequência de bases em SEQ ID NO: 29 ou 30 é um conhecido fragmento de ácido nucléico conforme descrito na Patente JP 11-151097, publicada. Em contraste, os fragmentos de ácido nucléico contendo as sequências de bases descritas em SEQ ID NOS: 2, 3 e 5 a 28 são fragmentos de ácido nucléico encontrados pelos presentes inventores.

[049]O método de PCR usando os fragmentos de ácido nucléico assim preparados e uma amostra de um espécime a ser testado pode ser executado por “PCR em

um sistema reacional que contém a amostra, usando os fragmentos de ácido nucléico como iniciadores e o rRNA de um microrganismo de interesse como um molde". O método PCR não está particularmente limitado desde que a reação amplifique especificamente um fragmento de nucleotídeo derivado de rRNA de um microrganismo de interesse. É preferido um método que inclui a etapa de usar rRNA do microrganismo de interesse como um molde para preparar um cDNA que emprega uma enzima, preferivelmente uma transcriptase reversa, ou similar. Mais preferido é um método que inclui, além da etapa acima, a etapa de usar o cDNA assim preparado como um molde para amplificar o fragmento de nucleotídeo. O método PCR pode ser realizado usando, por exemplo, uma RT-PCR conhecida. Aqui a RT-PCR pode ser executada usando um método conhecido tal como RT-PCR de duas etapas e RT-PCR de duas etapas; contudo, a RT-PCR de duas etapas é preferível porque esta é particularmente simples e impede a contaminação cruzada.

[050]O método de RT-PCR de uma etapa pode ser realizado usando, por exemplo, um kit comercial (por exemplo, kit PCR-RT de Uma Etapa Qiagen). A enzima tendo atividade de transcrição, que pode ser usada na reação RT, pode ser qualquer uma de várias transcriptases reversas tal como M-MHV transcriptase reversa. A DNA polimerase usada na PCR que amplifica DNA tem preferivelmente uma resistência térmica à temperatura de 90ºC ou mais.

[051]A PCR pode ser conduzida realizando de um a vários ciclos de uma reação de desnaturação térmica para converte o DNA de fita dupla em DNA de fita simples, uma reação de anelamento para hibridizar iniciadores para cDNA de molde e uma reação de extensão para permitir que a DNA polimerase aja, sob condições de temperatura de 90 a 98ºC, 37 a 72ºC e 50 a 75ºC, respectivamente. Um exemplo preferível de condições reacionais é a desnaturação térmica a 95ºC, por 30 segundos, anelamento a 60ºC por 30 segundos, e extensão a 72ºC por 60 segundos.

[052]Para a PCR, dois tipos de iniciadores são preferivelmente usados como estabelecido. Aqui, os dois iniciadores formam um conjunto. Aqui, é necessários que os dois iniciadores sejam feitos para formar uma combinação de uma fita guia e uma fita de retardo. Os fragmentos de ácido nucléico proporcionados pela presente invenção são, cada um, estabelecidos para terem uma temperatura anelamento aproximadamente constante na RT-PCR, que permite que fragmentos de ácido nucléico de uma pluralidade de microrganismos sejam testados simultaneamente testados. O fragmento de ácido nucléico da presente invenção pode ser também usado como uma sonda, e pode ser também empregado em combinação com um diferente iniciador universal conhecido, oligonucleotídeo ou similar.

[053]A amostra de um espécime a ser testado contendo rRNA que proporciona um molde para a RT-PCR tem preferivelmente um teor total de RNAs de 1 pg a 1 µg, mais preferivelmente 10 pg a 0,1 µg.

[054]Quando a PCR é apropriadamente conduzida, existe tipicamente uma correlação entre “a quantidade de produto amplificado por PCR”, “o número de ciclos de PCR”, e “a quantidade de molde para PCR”. Assim, a quantidade de rRNA de um microrganismo de interesse pode ser determinada se o cálculo é propriamente realizado levando em consideração a quantidade do produto amplificado foram pela PCR assim conduzida e o número dos ciclos de PCR.

[055]Como mostrado na Figura 1 do Exemplo a ser descrito, foi demonstrado que uma segunda correlação existe também entre “a quantidade de rRNA do microrganismo de interesse” assim determinada e “o número de células do microrganismo de interesse”. Portanto, o número de células do microrganismo de interesse pode ser determinado se o cálculo é realizado considerando “a quantidade de rRNA do microrganismo de interesse” assim determinada. Sem passar pelo processo de calcular “a quantidade de rRNA do microrganismo de interesse”, o número de células do microrganismo de interesse pode ser determinado mesmo por cálculo apropriado le-

vando em consideração “a quantidade do produto amplificado pela PCR” e “o número dos ciclos de PCR” obtido como descrito acima.

[056]A quantidade do produto amplificado por PCR e o número de ciclos de PCR podem ser apurados por qualquer método sem limitação particular, por exemplo, por identificação do número de ciclos de PCR quando o DNA alcança certa quantidade escolhida arbitrariamente. A identificação pode ser realizada, por exemplo, pelo uso de “um método de PCR que inclui marcar um produto de PCR em combinação com um método de PCR incluindo medir o marcador com o tempo” para identificar o número de ciclos de PCR quando certa intensidade de fluorescência escolhida é atingida. Aqui a certa intensidade de fluorescência é preferivelmente escolhida “dentro da faixa, que a intensidade pode atingir, quando o produto de amplificação é aumentado de modo logarítmico”, em termos que reflete apropriada correlação entre eles”. A faixa pode ser apropriadamente entendida usando-se um método conhecido. Aqui exemplos da marcação incluem marcação com um corante fluorescente; exemplos da mediação do marcador incluem a medição da intensidade de fluorescência. Aqui, exemplos da marcação com o corante fluorescente incluem marcação com um corante fluorescente de intercalação. Exemplos do corante fluorescente de intercalação incluem SYBR(R) Verde I. O corante de intercalação tem uma propriedade na qual a intensidade fluorescente é intensificada pela intercalação deste em um ácido nucléico, resultando assim na emissão de fluorescência tendo uma intensidade que reflete a quantidade de um produto de PCR amplificado. A marcação com um corante fluorescente pode ser também realizado pelo uso de uma sonda TaqMan, Molecular Beacon ou similares com o corante fluorescente. A sonda TaqMan ou Molecular Beacon é uma sonda na qual um corante fluorescente e um extintor são ligados a um oligonucleotídeo homólogo a uma sequência terminal de uma região amplificada por PCR, e é usada para permitir a coexistência em um sistema PCR. A interação do corante fluorescente e um extintor ligados à sonda permite a emissão de fluorescên-

cia em resposta a uma reação de amplificação de PCR, possibilitando assim que um produto amplificado por PCR seja observado com a tempo por medição da intensidade de fluorescência em cada estágio de PCR. Contudo, a sonda TagMAn, Molecular Beacon ou similar faz com que seja necessário escolher uma sequência complementar específica para micróbio adequada para a sonda, que pode ser difícil dependendo do objeto.

[057]A quantidade de rRNA pode ser determinada por considerar “a quantidade de produto amplificado por PCR e o número de ciclos de PCR” assim apurados e os resultados de um experimento comparativo adequado. Especificamente, a quantidade de rRNA do microrganismo de interesse pode ser calculada usando-se um método conhecido, por exemplo, levando-se em conta “os resultados do experimento comparativo realizado empregando uma rRNA, cuja quantidade é conhecida” para propriamente contrastar com ela “a quantidade de produto de PCR amplificado e o número de ciclos de PCR” apurados como descrito acima.

[058]Então, o número de células de um microrganismo de interesse pode ser determinado ao se levar em conta “a quantidade de rRNA do microrganismo” assim calculada e os resultados de um experimento comparativo adequado. Especificamente, o número de células do microrganismo de interesse pode ser calculado usando um método conhecido, por exemplo, ao se considerar “os resultados do experimento comparativo realizado empregando-se uma amostra de um espécime a ser testado na qual o número de células do microrganismo é conhecido” para apropriadamente contrastar com ele “a quantidade de rRNA do microrganismo de interesse” assim calculada. No contraste, em vista da simplicidade, uma curva padrão é preferivelmente usada, a qual mostra uma correlação entre “o número de células do microrganismo de interesse” usado como um molde para PCR e “o número de ciclos de PCR” quando a certa quantidade do produto amplificado por PCR é alcançada (daqui por diante algumas vezes referida com valor de C_T). A curva padrão é tipica-

mente preparada por plotagem do valor de C_T contra o número de células de um microrganismo marcada (vide Figura 2). O microrganismo usado para preparar a curva padrão pode ser uma linhagem conhecida tal como o tipo de linhagem deste.

[059]Sem se submeter ao processo de calcular especificamente a quantidade de rRNA, o número de células do microrganismo de interesse pode ser também diretamente calculados por contraste apropriado dos “resultados de um experimento comparativo realizado usando uma amostra de um espécime a ser testado, na qual o número de células do microrganismo correspondente é conhecido” com “a quantidade do produto amplificado por PCR e o número de ciclos de PCR” apurados conforme descrição acima. Especificamente, o calor de C_T derivado da amostra do espécime a ser testado pode ser aplicado à curva padrão descrita acima.

[060]Como descrito acima, a quantidade de rRNA de um microrganismo de interesse em um espécime a ser testado pode ser também determinado, por exemplo por (2) apurar a eficácia de hibridização entre um fragmente de ácido nucléico capas de especificamente hibridizar para o rRNA do microrganismo de interesse e uma amostra do espécime a ser testado.

[061]Aqui, o fragmento de ácido nucléico capaz de hibridizar especificamente para o rRNA do microrganismo de interesse que pode ser usado é, por exemplo, aqueles desenhados e preparados conforme descrição acima. O fragmento de ácido nucléico é preferivelmente um fragmento de ácido nucléico marcado. Aqui, exemplos do marcador incluem enzima, íon paramagnético, corante fluorescente, cromóforo, metal pesado e radioisótopo; exemplos mais preferidos do marcador incluem raiz forte peroxidase e fosfatase alcalina. A marcação pode ser efetuada por método conhecido.

[062]A quantidade de rRNA de um microrganismo de interesse em um espécime a ser testado e/ou o número de células do microrganismo podem ser apurados usando-se um método de conversão conhecido por medição da extensão de hibridi-

zação entre uma amostra do espécime a ser testado e o fragmento de ácido nucléico. O método de medir a extensão da hibridização não é particularmente limitadao e pode ser efetuado de acordo com um método conhecido; por exemplo, ele pode ser executado por medição do marcador adicionado ao fragmento de ácido nucléico. Especificamente, por exemplo, o método pode ser conduzido por medição da intensidade de fluorescência quando se usa o fragmento de ácido nucléico marcado com corante de fluorescência. A medição é preferivelmente realizada paralelamente à medição usando-se um controle adequado. Aqui, exemplos do controle adequado incluem “uma amostra conhecida como não hibridizando especificamente para o fragmento de ácido nucléico usado”, “uma amostra derivada de um espécime a ser testado onde o espécime contém um número já conhecido de células de um microrganismo de interesse”, e “uma amostra tirada ou preparada de um espécime a ser testado onde o espécime contém uma quantidade já conhecida de rRNA de um microrganismo de interesse”. Por checagem contra o controle, a quantidade de RNA ou número de células do microrganismo de interesse pode ser apurado usando-se um método de conversão conhecido. O número de células de microrganismo de interesse pode ser também apurado usando um método conhecido considerando-se a quantidade de rRNA do microrganismo de interesse assim calculada e os resultados de um experimento comparativo adequado.

[063]O método para detectar um microrganismo de interesse de acordo com a presente invenção usa com índice a presença de rRNA do microrganismo em uma amostra de um espécime a ser testado. Aqui, o termo “detectar um microrganismo” inclui identificar o microrganismo. O termo inclui também determinar a presença de um microrganismo a ser detectado em um espécime ou a ausência de um microrganismo a ser detectado em um espécime.

[064]Para determinar a presença de rRNA de um microrganismo de interesse em um espécime a ser testado usando o método de detecção da presente invenção, a detecção descrita em (1), (2), ou (3) abaixo pode, por exemplo, ser efetuada.

(1)Detectar um produto amplificado por PCR usando-se um fragmento de ácido nucléico capaz de especificamente hibridizar para o rRNA do microrganismo de interesse e uma amostra do espécime a ser testado.

(2)Detectar a hibridização entre o fragmento de ácido nucléico e a amostra.

(3)Detectar o rRNA do microrganismo usando um método conhecido diferente.

[065]Os métodos (1) a (3) podem ser facilmente realizados levando em consideração os métodos previamente descritos. A presença de rRNA do microrganismo de interesse indica que o microrganismo estava presente no espécime a ser testado, o que possibilita a detecção do microrganismo. Contudo, a detecção é preferivelmente efetuada por comparação com um controle adequado porque amplificação não-específica do produto de PCR e hibridização não-específica podem ocorrer.

[066]Como mostrado nos Exemplos descritos posteriormente, foi demonstrado que alta sensibilidade de detecção pode ser obtida pelo método quantitativo usando a quantidade de rRNA como índice e o método de detecção usando a presença de rRNA como índice em comparação com aquele por métodos convencionais usando a quantidade de rDNA como índice. Como mostrado nos Exemplos a serem descritos, foi também demonstrado que o método usando a quantidade de rRNA como índice pode quantificar precisamente e detectar um microrganismo em estado vivo sem quantificar e detectar células mortas em conjunto com o mesmo.

[067]Assim, o uso do método de quantificação ou detecção da presente invenção (daqui por diante também referido como “o método para presente invenção”) permite a um microrganismo ser especificamente quantificado e detectado em sensibilidade de detecção mais alta que aquela dos métodos convencionais e mesmo em um es-

tado vivo deste. Conseqüentemente, o método de presente invenção pode ser usado, por exemplo, em aplicações descritas em (1) a (4) abaixo.

(1)Uma aplicação na qual um microrganismo de interesse contido em um espécime a ser testado é quantificado e detectado em estado vivo em sensibilidade de detecção mais alta que aquela para métodos convencionais.

(2)Uma aplicação na qual o número de células mortas de um microrganismo contido em um espécime a ser testado é quantificado e detectado em sensibilidade de detecção mais alta que aquela para métodos convencionais.

(3)Uma aplicação na qual a razão dos números de células mortas e células vivas de um microrganismo é medida em sensibilidade de detecção mais alta que aquela para métodos convencionais.

(4)Uma aplicação na qual a presença ou abundância de um microrganismo vivo é “determinada” em sensibilidade de detecção mais alta que aquela para métodos convencionais. Aqui, a determinação inclui, por exemplo, (a) quantificação e detecção para verificar a presença ou abundância de um microrganismo vivo quando o número de células do microrganismo vivo é necessário para ser verificado de modo mais exato e preciso e (b) quando “o número de células de um microrganismo vivo” foi calculado em um outro sistema experimental, a determinação para examinar a exatidão do experimento e a precisão dos valores numéricos calculados. A esse respeito, quando o número de células mortas é quantificado, a medição do número total de as células mortas e as células vivas é preferivelmente efetuada em conjunção com ele, por exemplo, por um método conhecido para detectar as células mortas juntamente com as células vivas. O número das células mortas pode ser determinado por subtração do número das células vivas calculado pelo método da presente invenção a partir do número total.

[068]O método de presente invenção pode ser também usado como um método para quantificar ou detectar um microrganismo difícil de medir por métodos conven-

cionais, tal como um microrganismo incapaz de formar colônias e um microrganismo incapaz de cultura líquida.

[069]Como mostrado nos Exemplos descritos adiante, foi demonstrado que o uso de método PCR no método de quantificação e detecção pode obter sensibilidade de detecção na mesma extensão que um método de cultura. Assim, o método da presente invenção pode ser usado também como um método para quantificar ou detectar um microrganismo em sensibilidade de detecção na mesma medida ou mais que o método de cultura, i.e., em uma sensibilidade de detecção de 10^0 células ou mais/g de espécime ou 10^0 ou mais/mL de espécime.

[070]Um microrganismo pode ser também muito rápida e simplesmente quantificado e detectado quando o método PCR é usado, em comparação com o método de cultura. Além disso, de acordo com o método usando o método PCR, o processo da extração de RNA de um espécime para a quantificação ou detecção do microrganismo pode ser completado dentro de cerca de 6 horas. Assim, o método da presente invenção pode também ser usado como um método capaz de detectar um microrganismo em um curto período de tempo (dentro de 6 horas).

[071]O uso do método que emprega o método PCR de acordo coma presente invenção pode obter simultaneamente alta sensibilidade de detecção, quantificação e detecção mais precisas de um microrganismo vivo, e rapidez e simplicidade. Assim, o método da presente invenção pode ser usado, por exemplo, na aplicação de “o exame de contaminante e bactérias perigosas, microrganismo patogênicos, ou similares” em um local médico e na indústria alimentícia onde se requer particularmente rápida e sensível quantificação ou detecção.

[072]O método da presente invenção pode ser também efetuado usando-se um kit para realizar o método. Aqui, exemplo do kit para realizar o método inclui um kit que contém (1) fragmentos de ácido nucléico capazes de hibridizar especificamente para rRNA de um microrganismo de interesse, (2) um protocolo no qual um método

de implementação é descrito, e/ou (3) um reagente usado para extração de RNA, estabilização de RNA, e/ou uma PCR. Contudo, o kit da presente invenção não está limitado a esses, e refere-se a uma coleção de todo ou parte de requisitos para realizar todas ou parte das etapas do método. Aqui, “requisitos para realizar as etapas” podem ser apropriadamente entendidas por consideração à descrição estabelecida neste relatório descritivo.

Exemplos

[073]O conteúdo de presente invenção está descrito abaixo em mais detalhes por meio de Exemplos. Contudo, não se pretende que a invenção se limite a eles.

Exemplo 1: Preparação de iniciadores

[074]Para várias linhagens bacterianas, 16S e 23s, sequências de DNA de rRNA 16S e 23S foram obtidas da DNA Data Bank of Japan (http://www.ddbj.nig.ac.jp./Welcome-j.html). Essas sequências foram alinhadas usando o programa Clustal W, seguido por preparação de árvore filogenética. As linhagens foram classificadas por família, gênero e subgrupo com base na árvore filogenética; iniciadores foram desenhados para cada classificação. As sequências dos iniciadores preparados e as espécies de rRNA de interesse são mostradas na Tabela 1. As referências nas quais as sequências são descritas são mostradas na coluna para “referências” na Tabela 1. Se a coluna está em branco, isto indica que a sequência é um sequência nova encontrada pela presente invenção. A esse respeito, do Documento Não Patentário 4 representa Microbiol. Immunol., vol. 46, No. 5: 353-358 (2002); Documento Não Patentário 5, FEMS Microbiology Letters, vol. 202, 209-213 (2001); e Documento de Patente 7, Patente Publicada JP 11-151097.

[Tabela 1-1]

SEQ ID NOS:	Alvos		Nome de Iniciadores	Seqüências	Tamanhos de Produtos da Amplificação (bp)	Referências
1	Bacillus cereus	16S rRNA	S-S-Bc-200-a-S-18	TCGAAATTGAAAGGCGGC	285	Documento Não Patentário 5
2			Bc2R	CCAGCTTATTCAACTAGCACTT		
3	Clostridium perfringens	16S rRNA	s-Clper-F	GGGGGTTTCAACACCTCC	170	Documento Não Patentário 4
4			ClPER-R	GCAAGGGATGTCAAGTGT		
5	Enterobacteriaceae	23S rRNA	En-1su 3F	TGCCGTAACTTCGGGAGAAGGCA	428	
6			En-1su 3'R	TCAAGGACCAGTGTTCAGTGTC		
7	Staphylococcus	16S rRNA	g-Staph-F	TTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAA	79	
8			g-Staph-R	AACAACTTTATGGGATTTGCWTGA		
9	Pseudomonas	16S rRNA	PSD7F	CAAAACTACTGAGCTAGAGTACG	215	
10			PSD7R	TAAGATCTCAAGGATCCCAACGGCT		
11	Enterococcus	16S rRNA	g-Encoc-F	ATCAGAGGGGGATAACACTT	336	
12			g-Encoc-R	ACTCTCATCCTTGTTCTTCTC		
13	Subgrupo Lactobacillus ruminis	16S rRNA	sg-Laci-F	GATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGAT	197	
14			sg-Laci-R	TAAAGGCCAGTTACTACCTCTATCC		
15	Subgrupo Lactobacillus ruminis	16S rRNA	sg-Lrum-F	CACCGAATGCTTGCAYTCA	182	
16			sg-Lrum-R	GCCGCGGGTCCATCCAAAA		
17	Subgrupo Lactobacillus plantarum	16S rRNA	sg-Lpla-F	CTCTGGTATTGATTGGTGCTTGCAT	54	
18			sg-Lpla-R	GTTCGCCACTCACTCAAATGTAAA		
19	Subgrupo Lactobacillus reuteri	16S rRNA	sg-Lreu-F	GAACGCAYTGGCCCAA	290	
20			sg-Lreu-R	TCCATTGTGGCCGATCAGT		

[Tabela 1-2]

SEQ ID NOS:	Alvos		Nome de Iniciadores	Seqüências	Tamanhos de Produtos da Amplificação (bp)	Referências
21	Subgrupo Lactobacillus sakei	16S rRNA	sg-Lsak-F	CATAAAACCTAMCACCGCATGG	303	
22			sg-Lsak-R	TCAGTTACTATCAGATACRTTCTTCTC		
23	Subgrupo Lactobacillus casei	16S rRNA	sg-Lcas-F	ACCGCATGGTTCTTGGC	296	
24			sg-Lcas-R	CCGACAACAGTTACTCTGCC		
25	Lactobacillus brevis	16S rRNA	s-Lbre-F	ATTTTGTTTGAAAGGTGGCTTCGG	289	
26			s-Lbre-R	ACCCTTGAACAGTTACTCTCAAAGG		
27	Lactobacillus fructivorans	16S rRNA	s-Lfru-F	TGCGCCTAATGATAGTTGA	452	
28			s-Lfru-R	GATACCGTCGCGACGTGAG		
29	Lactobacillus fermentum	16S rRNA	Lfer-1	CCTGATTGATTTTGGTCGCCAAC	414	Documento de Patente 7
30			Lfer-2	ACGTATGAACAGTTACTCTCATACGT		Documento de Patente 7

W=A, T: Y=C, T: M=A, C: R=A, G

Exemplo 2: Determinação da especificidade dos iniciadores

[075]Para determinar se os iniciadores do Exemplo 1 têm realmente especificidade ou não, eles foram examinados quanto à especificidade para várias bactérias. Especificamente, 50 µL de cada uma das várias culturas bacterianas são mostradas na Tabela 2 (57 espécies em 28 gêneros) e Tabela 3 (60 espécies em 18 gêneros) foram adicionados em 2 vezes o volume de Reagente Bacteriano RNAprotect (QIAGEN) e incubados à temperatura ambiente por 5 minutos. A suspensão foi então centrifugada a 5.000 g por 10 minutos e submetida à remoção do sobrenadante. A essa foram adicionados 450 µL de tampão bacteriolítico (346,5 µL de tampão RLT (QIAGEN), 3,5 µL de β-mercaptoetanol, 100 µL de tampão de TE) e 300 mg de pérolas de vidro (0,1 mm de diâmetro), que foi então vigorosamente misturada pelo FastPrep FP120 (Bio 101) e 5.000 rpm por um minuto para triturar as células bacteriana. À solução triturada foram adicionados 500 µL de fenol saturado em água, que foi então incubada a 60ºC, por 10 minutos. A essa, foram adicionados 100 µL de clorofórmio/álcool isoamílico (CIA), que foi misturada e então submetida à centrifugação a 12.000 rpm por 5 minutos a 4ºC. Ao sobrenadante recuperado foi adicionado igual volume de fenol saturado em água/clorofórmio, que foi então misturado e novamente submetido à centrifugação sob as mesmas condições. Ao sobrenadante recuperado foi adicionado igual volume de CIA, que foi então agitado e novamente submetido à centrifugação sob as mesmas condições A 400 µL do sobrenadante recuperado foram adicionados igual volume de álcool isopropílico e um volume de 1/10 vezes de acetato de sódio 3M, que foi misturado por inversão e então submetido à centrifugação a 15.000 rpm por 10 minutos a 4ºC. O resultante foi submetido à remoção do sobrenadante, ao qual 500 µL de etanol a 75% foram adicionados antes de misturar por inversão, seguido por sujeição da mistura à centrifugação a 15.000 rpm por 2 minutos a 4ºC. Depois da remoção do sobrenadante e secagem a ar dentro do tubo, o precipitado foi dissolvido em 50 µL de água isenta de RNase para fazer um extrato

de RNA total. Uma RT-PCR quantitativa foi realizada usando kit de RT-PCR de Uma Etapa (QIAGEN). A composição da solução de reação (volume total: 25 µL_ era: 2 µL da solução de RNA total (equivalente a $2x20^5$ CFU); e 1 x de Tampão de RT-PCR de Uma Etapa, mistura dNTP 0,5 mM, um 1/25 vezes de volume de Mistura Enzimática para RT-PCR de Uma Etapa, um volume de 1/100.000 vezes de SYBR(R) Verde I (de Sondas Moleculares) e 0,75 µM (cada) de iniciadores (descritos na Tabela 1), que foram ajustados de modo que as quantidades respectivas formam concentrações finais. Equivalentes de RNA para $2x10^5$ CFU foi usado como um molde na TR-PCR. A solução de reação foi inicialmente submetida a uma reação de transcrição reversa a 50ºC, por 30minutos, e então aquecida a 95ºC por 15 minutos para inativar a transcriptase reversa. Subsequentemente, de 40 a 50 ciclos de 94ºC por 20 segundo, 55ºC ou 60ºC por 20 segundos e 72ºC por 50 segundos foram realizados para medir a quantidade de um produto de amplificação como um intensidade de fluorescência de SYBR(R) Verde I para cada ciclo. Essas séries de reações foram realizadas usando o sistema ABI PRISM® 790HT (da Applied Biosystems).

[076]Como resultado, conforme mostrado na Tabela 1, foi demonstrado que somente um gênero bacteriano ou linhagem de interesse pode ser especificamente detectado SYBR(R) Verde I pelo iniciador En-lsu 3F/3'R (*Enterobacteriaceae*), g-Staph-F/R (o gênero *Staphylococcus*), PSD7F/R (o gênero Pseudomonas), s-Clper-F/ClPER-R (*Clostridium perfringens*), S-S-Bc-200-a-S-18/Bc2R (*Bacillus cereus*) ou g-Encoc F/R (o gênero *Enterococcus*). Além disso, como estabelecido na Tabela 3, foi mostrado que somente um subgrupo ou linhagem de interesse pode ser especificamente detectada pelo iniciador sg-Laci-F/R (subgrupo *Lactobacillus acidophilus*), sg-LsaK-F/R (subgrupo *Lactobacillus sakei*), sg-Lcas-F/R (subgrupo *Lactobacillus casei*), sg-Lrum-F/R (subgrupo *Lactobacillus ruminis*), sg-Lpla-F/R (subgrupo *Lactobacillus plantarum*), s-Lbre-F/R (*Lactobacillus brevis*), s-Lfru-F/R (*Lactobacillus fructivorans*) ou LFer-1/2 (*Lactobacillus fermentum*). Nas Tabelas 2 e 3, + indica que a

detecção específica foi capas de ser obtida (valor de C_T: 1 para 30); - indica que o valor de C_T era 31 ou mais ou que não foi obtido produto de amplificação.

[Tabela 2-1]

Alvo	Reações com os seguintes iniciadores					
	En-lsu 3F/3'R	g-Encoc-F/R	g-Staph-F/R	s-Clper-F/ClPER-R	S-S-Bc-200-a-S-18/BC2R	PSD7F/R
Escherichia coli	+	-	-	-	-	-
Citrobacter freundii	+	-	-	-	-	-
Citrobacter koseri	+	-	-	-	-	-
Citrobacter amalonaticus	+	-	-	-	-	-
Enterobacter cloacae	+	-	-	-	-	-
Enterobacter aerogenes	+	-	-	-	-	-
Enterobacter sakazakii	+	-	-	-	-	-
Enterobacter cancerogenus	+	-	-	-	-	-
Enterobacter amnigenus	+	-	-	-	-	-
Klebsiella pneumoniae	+	-	-	-	-	-
Klebsiella oxytoca	+	-	-	-	-	-
Serratia marcescens	+	-	-	-	-	-
Proteus mirabilis	+	-	-	-	-	-
Proteus vulgaris	+	-	-	-	-	-
Proteus penneri	+	-	-	-	-	-
Hafnia alvei	+	-	-	-	-	-
Edwardsiella tarda	+	-	-	-	-	-
Providencia alcalifaciens	+	-	-	-	-	-
Providencia rettgerii	+	-	-	-	-	-
Morganella morganii	+	-	-	-	-	-
Salmonella choleraesuis	+	-	-	-	-	-
Yersinia enterocolitica	+	-	-	-	-	-
Pseudomonas aeruginosa	-	-	-	-	-	+
Pseudomonas fluorescens	-	-	-	-	-	+
Pseudomonas putida	-	-	-	-	-	+
Acinatebacter calcoaceticus	-	-	-	-	-	-
Bacteroides ovatus	-	-	-	-	-	-
Bacteroides vulgatus	-	-	-	-	-	-
Prevotella melaninogenica	-	-	-	-	-	-

[Tabela 2-2]

Alvo	Reações com os seguintes iniciadores					
	En-1su 3F/3'R	g-Encoc-F/R	g-Staph-F/R	s-Clper-F/ClPER-R	S-S-Bc-200-a-S-18/BC2R	PSD7F/R
Collinsella aerofaciens	-	-	-	-	-	-
Eggerthella lenta	-	-	-	-	-	-
Bifidobacterium catenulatum	-	-	-	-	-	-
Bifidobacterium longum	-	-	-	-	-	-
Ruminococcus productus	-	-	-	-	-	-
Ruminococcus obeum	-	-	-	-	-	-
Clostridium orbisciendens	-	-	-	-	-	-
Clostridium perfringens	-	-	-	+	-	-
Streptococcus intermedius	-	-	-	-	-	-
Streptococcus bovis	-	-	-	-	-	-
Staphylococcus aureus	-	-	+	-	-	-
Staphylococcus epidermidis	-	-	+	-	-	-
Staphylococcus haemolyticus	-	-	+	-	-	-
Staphylococcus lugdunensis	-	-	+	-	-	-
Staphylococcus saprophyticus	-	-	+	-	-	-
Staphylococcus schleiferi ss. coagulans	-	-	+	-	-	-
Bacillus cereus	-	-	-	-	+	-
Bacillus subtilis	-	-	-	-	-	-
Enterococcus faecalis	-	+	-	-	-	-
Enterococcus faecium	-	+	-	-	-	-
Enterococcus hirae	-	+	-	-	-	-
Enterococcus gallinarum	-	+	-	-	-	-
Enterococcus flavescens	-	+	-	-	-	-
Enterococcus durans	-	+	-	-	-	-
Lactobacillus acidophilus	-	-	-	-	-	-
Lactobacillus casei	-	-	-	-	-	-
Campylobacter jejuni	-	-	-	-	-	-
Candida albicans	-	-	-	-	-	-

[Tabela 3-1]

Alvo	Reações com os seguintes iniciadores								
	sg-Laci-F/R	sg-Lsak-F/R	sg-Lcas-F/R	sg-Lrum-F/R	sg-Lreu-F/R	sg-Lpla-F/R	s-Lbre-F/R	s-Lfru-F/R	Lfer-1/2
Lactobacillus acidophilus	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactobacillus gasseri	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactobacillus crispatus	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactobacillus jensenii	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactobacillus helveticus	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactobacillus johnsonii	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactobacillus delbrueckii ss. delbrueckii	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactobacillus delbrueckii ss. lactis	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactobacillus delbrueckii ss. bulgaricus	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactobacillus amylovorus	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactobacillus gallinarum	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactobacillus intestinalis	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactobacillus hamsteri	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Lactobacillus sakei	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Lactobacillus curvatus	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Lactobacillus vitulinus	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Lactobacillus graminis	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Lactobacillus casei	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Lactobacillus rhamnosus	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Lactobacillus zeae	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Lactobacillus ruminis	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Lactobacillus murinus	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Lactobacillus salivarius ss. salivarius	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Lactbacillus salivarius ss. salicinius	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Lactobacillus animalis	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Lactobacillus mali	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Lactobacillus reuteri	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Lactobacillus vaginalis	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Lactobacillus oris	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Lactobacillus panis	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Lactobacillus plantarum	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Lactobacillus pentosus	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Lactobacillus brevis	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Lactobacillus fructivorans	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Lactobacillus fermentum	-	-	-	-	-	-	-	-	+

[Tabela 3-2]

Alvo	Reações com os seguintes iniciadores								
	sg-Laci-F/R	sg-Lsak-F/R	sg-Lcas-F/R	sg-Lrum-F/R	sg-Lreu-F/R	sg-Lpla-F/R	s-Lbre-F/R	s-Lfru-F/R	Lfer-1/2
Escherichia coli	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pseudomonas aeruginosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pseudomonas fluorescens	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pseudomonas putida	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acinatebacter calcoaceticus	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bacteroides ovatus	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bacteroides vulgatus	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Prevotella melaninogenica	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Collinsella aerofaciens	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Eggerthella lenta	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bifidobacterium catenulatum	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bifidobacterium longum	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ruminococcus productus	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ruminococcus obeum	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Clostridium orbiscindens	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Clostridium perfringens	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Streptococcus intermedius	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Streptococcus bovis	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Staphylococcus aureus	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bacillus cereus	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bacillus subtilis	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Enterococcus faecalis	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactococcus lactis lactis	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Campylobacter jejuni	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Candida albicans	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Exemplo 3: Exame da relação entre o estado de crescimento de vários microrganismos e a quantidade de transcrição de rRNA

[077]Usando células de *Escherichia coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa* de diferentes fases de cultura, examinou-se uma relação entre o número de células bacterianas vivas medido usando-se um método de cultura e o número de células bacterianas tendo a capacidade de formar colônias, derivado da quantidade de transcrição de rRNA medida por um método RT-PCR quantitativo. Especificamente, depois do início da cultura aeróbica de cada bactéria com agitação a 37ºC em meio BHI, as culturas bacterianas foram coletadas com o tempo, seguido por uso das culturas para medir o número de células bacterianas por um método de cultura empregando meio BHI-ágar (37ºC, 24 horas). Por outro lado, RNA foi extraído das amostras similarmente coletadas e submetido à análise RT-PCR quantitativa. O número de células bacterianas em cada amostra foi calculado com base na curva padrão preparada do modo descrito no Exemplo 4, usando-se RNA extraído de uma linhagem bacteriana na última fase de crescimento logarítmico, o número de cujas células foi mostrado. A esse respeito, a extração de RNA total e RT-PCR quantitativa foram realizadas conforme descrição no Exemplo 2. Os resultados são mostrados na Figura 1. Na Figura 1, o círculo preto (•) indica o número de células bacterianas calculado da quantidade de transcrição de RNA, e o círculo em branco (○), o número de células bacterianas determinado pelo método de cultura. Para todas as linhagens bacterianas submetidas à análise, da fase de crescimento logarítmico a fase de morte, foi observada uma forte relação entre as curvas de variação do número de células bacterianas vivas determinado pelo método de cultura na solução bacteriana e o número de células bacterianas calculado da quantidade de transcrição de rRNA. Isso demonstrou que o número de células de um microrganismo vivo poderia ser determinado sob qualquer condição por medição da quantidade de transcrição de RNA.

Exemplo 4: Preparação de curvas padrão e comparação com um método PCR quantitativo

[078]Curvas padrão foram preparadas pelo método da presente invenção (método PCR quantitativo) usando células cultivadas, na última fase de crescimento logarítmico, de *P. aeruginosa* YIT6108^T (tipo de linhagem) e *S. aureus* YIT6075^T (tipo de linhagem). Curvas padrão foram também preparadas por método PCR quantitativo para comparar com aqueles preparados pelo método da presente invenção. Células axênicas de cada linhagem cultivada em meio BHI foram separadas para proporcionar números de células de 10^5, 10^4, 10^3, 10^2, 10^1 e 10^0, e submetidas à extração de RNA como descrito no Exemplo 2. Os extratos foram, cada um, submetidos à RT-PCR quantitativa de acordo com o Exemplo 2 usando iniciadores conforme descritos na Tabela 1. Foi examinada uma correlação entre o valor de C_T resultante e o número das células determinado pelo método de cultura descrito no Exemplo 3. Usando o método descrito abaixo, DNAs obtido das mesmas amostras foram também, cada um, examinados quanto à sua quantificação por método PCR empregando rDNA como sequência alvo. Especificamente, 1 mL de PBS foi adicionado à cada das soluções bacterianas separadas de modo a proporcionar números de células de 10^5, 10^4, 10^3, 10^2, 10^1 e 10^0, que foi agitada e então centrifugada a 15.000 rpm, por 5 minutos, a 4ºC, seguido da remoção do sobrenadante. Uma operação foi repetida duas vezes, onde 1 mL de PBS foi adicionado ao precipitado que foi então agitado e centrifugado antes da remoção do sobrenadante. Ao precipitado resultante foram adicionados 300 µL de tampão bacteriolítico (100 mM de Tris-HCl, 40 mM de EDTA, 1% de SDS, pH: 9,0), 500 µL de fenol saturado com TE, e 300 mg de pérolas de vidro (0,1 mm de diâmetro), que foi então vigorosamente agitado na FasPrep FP120 a 5.000 rpm por 30 segundos para triturar as células bacterianas. A solução com o triturado foi então centrifugada sob condições de 15.000 rpm, 4ºC e 5 minutos, seguido por recuperação do sobrenadante. Fenol (saturado com TE)/clorofórmio/álcool

isoamílico foi adicionado ao sobrenadante, que foi vigorosamente agitado no FastPrep FP120, a 4.000 rpm, por 45 segundos e então submetido à operação de centrifugação sob condições de 15.000 rpm, 4ºC e 5 minutos. Precipitação com álcool foi realizada usando o sobrenadante separado e recuperado, seguido por dissolução do precipitado em 50 µL de tampão de TE para fazer uma solução de DNA. Subseqüentemente, PCR foi conduzida usando a solução de DNA resultante como um molde. A PCR foi conduzida em um total de 25 µL de uma solução de reação contendo 2 µL da solução de DNA e uma mistura de 10 mM de Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM de KCl, 2,5 mM de $MgCl_2$, 0,45% de Triton X-100, 200 µM de dNTP, um volume de 1/100.000 vezes de SYBR(R) Verde I, 11 ng/µL de anticorpo TaqStar (R) (da Clon-Tech), 0,05 U/µL de Taq DNA polimerase (da Takara) e 0,25 µM (cada) de iniciadores PDS7F/R ou g-Staph-F/R) como concentrações finais. A solução de reação foi aquecida a 94ºC, por 5 minutos, então submetida a 40 ciclos de 94ºC por 20 segundos e 72ºC por 50 segundos, e subseqüentemente reagida a 72ºC por 10 minutos. A quantidade do produto de amplificação foi calculada para cada ciclo como intensidade de fluorescência de SYBR(R) Verde I. Essas séries de reação foram efetuadas usando ABI PRISM(R) 7900HT. A esse respeito, 1/25 da quantidade de extração de cada RNA e DNA foi submetido à reação.

[079]Como resultado, visto na Figura 2, ambos os métodos mostraram uma correlação extremamente boa entre o número logarítmico de células bacterianas e o valor de C_T. Na Figura 2, o valor de C_T é plotado versus o número células/extrato medido pelo método de cultura para cada linhagem bacteriana servindo como amostra. O círculo preto (•) indica o cada da RT-PCR quantitativa, e o círculo em branco (○), o caso da PCR quantitativa. Na curva aproximada obtida através do método de RT-PCR quantitativa, o coeficiente de correlação (R^2 – valor) foi 0,955 para P. aeruginosa e 0,9961 para *S. aureus*. Isso demonstrou que as curvas padrão permitem calcular o número de células bacterianas a partir dos valores de C_T. Além disso, o método

de RT-PCR quantitativa foi capaz de detectar 10^0 de célula bacteriana nas amostras indicando que o método tinha uma sensibilidade de detecção comparável a um método de cultura usado convencionalmente. Isso demonstrou que o método poderia ser usado para a quantificação e detecção de um microrganismo como alternativa para o método de cultura. O método da presente invenção tinha um sensibilidade de detecção de cerca de 1.000 vezes aquela do método de PCR usando rDNA como sequência alvo, demonstrando que tinha uma sensibilidade de detecção marcada conforme comparada a um meio previamente estudado para quantificar um microrganismo usando um método de amplificação de gene.

Exemplo 5: Detecção quantitativa de bactéria em fezes

[080]Várias concentrações de *P. aeruginosa* foram, cada uma, adicionadas a fezes humanas para comparar a faixa de detecção de um método de PCR quantitativa com aquela do método da presente invenção. Foram preparadas amostras fecais adicionadas de *P. aeruginosa*, em cada uma, células de *P. aeruginosa* equivalentes a 10^1, 10^2, 10^3, 10^4, 10^5, 10^6, 10^7 ou 10^8 células por 20 mg de fezes humanas foram adicionadas. O RNA total foi extraído de cada uma das amostras fecais adicionadas de *P. aeruginosa* e usado como molde para realizar a RT-PCR quantitativa da presente invenção. DNA foi também extraído de cada uma das mesmas amostradas e usado como molde para efetuar a PCR quantitativa. Além disso, as mesmas amostras são submetidas à medição do número de células bacterianas usando um método de cultura. A extração do RNA total e o método de RT-PCR quantitativa foram efetuados como descritos no Exemplo 2; o método de cultura, como no Exemplo 3; e a extração de DNA e o método de PCR quantitativa, como no Exemplo 4. A esse respeito, 1/2,500 das quantidades do RNA total e do DNA total obtidos foram submetidas à RT-PCR quantitativa e à PCR quantitativa, respectivamente.

[081]Como resultado, conforme mostrado na Figura 3, o método da presente invenção mostrou linearidade em uma curva aproximada de medições na faixa de

$10^{2,9}$ a 10^{10} células/g de fezes nas amostras fecais adicionadas de *P. aeruginosa*. Na Figura 3, o valor de C_T é plotado contra o número de células/g de fezes medido pelo método de cultura para *P. aeruginosa* servindo como amostra. O círculo preto (•) indica o caso da R-PCR quantitativa, e o círculo em branco (○), o caso da PCR quantitativa. Nas fezes humanas, o limite quantitativo do método da presente invenção era de $10^{2,9}$ células ou mais/g de fezes, e foi quase comparável àquele do método de cultura, que esta de 10^2 células ou mais/g de fezes. O método de cultura levou um dia, enquanto o método da presente invenção foi completado a partir da estabilização de RNA do espécime para a quantificação em cerca de 6 horas. Por outro lado, na análise pelo método de PCR quantitativa, linearidade foi observada em uma curva aproximada obtida a partir de medições na faixa de $10^{5,8}$ a 10^{10} células/g de fezes, e o limite de detecção era cerca de 1.000 vezes menor que aquele do método de RT-PCT quantitativa.

Exemplo 6: Análise de *enterobacteriaceae* fecal humana por RT-PCR quantitativa e um método de cultura

[082]A flor fecal humana foi analisada por uma RT-PCR quantitativa usando os iniciadores En-lsu-3F/3'R específicos para *enterobacteriaceae*. Fezes frescas excretadas foram coletadas de 38 adultos e diluídas por 1/10 sob condições anaeróbicas e diluídas por 1/10 sob condições anaeróbicas com um meio de transporte (10% de glicerina, 5% de cisteína, 1% de pó Lab-Lemco, 0,045% de NaCl, 0,0225% de KH_2PO_4, 0,0225% de K_2HPO_4, 0,0225% de $(NH_4)_2SO_4$, 0,00225% de $CaCl_2$, 0,0025% de $MgSO_4$). Uma alíquota de 200 µL (20 mg como fezes) foi retirada do diluente e submetida à extração de RNA total usando um método de RT-PCR quantitativa. A RT-PCA quantitativa foi efetuada usando 1/2.500 da quantidade do RNA total como molde. Uma alíquota do mesmo diluente foi também submetida à quantificação de CFU por método de cultura (DHL, meio de seleção). A estabilização de RNA, a extração do RNA total, e a RT-PCR quantitativa foram de acordo com o

Exemplo 2, e o método de cultura foi de acordo com um método convencional. O RNA total extraído da *E. coli* YIT 6044^T (tipo de linhagem) foi usado para preparar uma curva padrão para calcular o número de células bacterianas pela RT-PCR quantitativa

[083]Como resultado, conforme mostrado na Figura 4, foi demonstrado que o método de RT-PCR quantitativa alvejando rRNA de acordo com a presente invenção e o método de cultura mostraram uma correlação extremamente forte (coeficiente de correlação: 0,9255). Na Figura 4, a ordenada representa os resultados da quantificação pelo método de cultura, e a abscissa representa os resultados da quantificação pelo método da presente invenção. Para o método de cultura, ele levou dois dias para efetuar todas as operações, enquanto para o método da presente invenção, todas as operações foram completadas em cerca de 6 horas.

Exemplo 7: Exame de microrganismo em leite de vaca

[084]Várias concentrações de *E. coli*, *S. aureus*, e *B. cereus* foram, cada uma, adicionadas ao leite de vaca comercial para comparar o valor quantitativo de um método de cultura de semeadura em profundidade (Pour-plate) com aquele do método da presente invenção. *E. coli* ou *S. aureus* foi adicionada ao leite de vaca comercial de modo a fornecer números de 10^0, 10^1, 10^2, 10^3, 10^4, e 10^6 por mL para fazer as amostras. De cada amostra, 1 ml foi submetido à extração de RNA total e 1 mL do método de cultura por semeadura em profundidade (Pour-plate) (*E. coli*:meio de desoxicolato ágar, *S. aureus* e *B. aureus*: meio de ágar convencional, 37ºC, 20±2 horas). O RNA total extraído foi analisado pelo método de RT-PCR quantitativa usando os iniciadores descritos na Tabela 1 para determinar uma correlação entre o valor de C_T resultante e o número de células microbianas obtido pelo método de cultura de semeadura em profundidade (Pour-plate). A esse respeito, a extração de RNA total e o método de RT-PCR quantitativa foram conduzidos pelo método descrito no

Exemplo 2; 1/25 da quantidade do RNA total extraído foi submetido à RT-PCR quantitativa.

[085]Como resultado, conforme mostrado na Figura 5, o valor de C_T foi correlacionado com o número de células microbianas na faixa de 10^0 A 10^5 células por mL do leite para qualquer uma das linhagens. Na Figura 5, o valor de C_T é plotado contra o número de células/mL do leite medido pelo método de semeadura em profundidade (Pour-plate) para quantificar *E. coli* (esquerda superior da Figura 5), *S. aureus* (direita superior da Figura 5) e *B. cereus* (esquerda inferior da Figura 5) servindo como amostra. O limite quantitativo do método da presente invenção era de 10^0 célula ou mais/mL do leite e era comparável àquele do método de cultura de semeadura em profundidade (Pour-plate). Isso demonstrou que o método da presente invenção poderia fornecer uma alternativa para o método de cultura de semeadura em profundidade (Pour-plate) usando o médio de cultura oficial (meio de desoxicolato ágar ou meio de ágar convencional) como descrito na ordem Ministerial referente a padrão composicional, etc. para leite e produtos de leite. Além disso, o método de cultura de semeadura em profundidade (Pour-plate) levou um dia, enquanto o método da presente invenção foi completado a partir da estabilização do espécime para a quantificação em cerca de 6 horas.

Exemplo 8: Exame de bactérias no sangue

[086]Várias concentrações de S.aureus ou P. aeruginosa foram, cada uma, adicionadas a sangue humano para comparar o valor quantitativo de um método de cultura de semeadura em profundidade (método de cultura de sangue) com aquele do método da presente invenção. S. aureus ou P. aeruginosa foi adicionada, de modo a proporcionar números bacterianos de 10^0, 10^1, 10^2, 10^3, 10^4, e 10^5 por mL, ao sangue humano ao qual um volume 1/10 vezes do volume de uma solução a 3,8% de citrato de sódio foi adicionado como anticoagulante para fazer as amostras. De cada amostra, 0,5 mL foi submetido à extração de RNA total, e 0,5 mL ao método de cul-

tura de semeadura em profundidade (Pour-plate) (meio de BHI-ágar). O RAN total extraído foi analisado por um método de RT-PCR quantitativa para determinar uma correlação entre o valor de C_T resultante e o número de células bacterianas obtido pelo método de cultura de semeadura em profundidade (Pour-plate). A extração de RNA total e o método de RT-PCR quantitativa foram realizados pelo método descrito no Exemplo 2. E esse respeito, 1/25 da quantidade do RNA total extraído foi submetido à RT-PCR quantitativa.

[087]Como resultado, conforme mostrado na Figura 6, o número de células bacterianas foi correlacionado com o valor de C_T na faixa de 10^0 a 10^5 células/0,5 mL para cada uma das linhagens. Na Figura 6, o valor de C_T é plotado contra o número de células/0,5 mL do sangue calculado pelo método de cultura de semeadura em profundidade (Pour-plate) para quantificar *P. aeruginosa* (esquerda da Figura 6) ou *S. aureus* (direita da Figura 6) servindo como uma amostra. O limite quantitativo do método da presente invenção era de 10^0 células ou mais/0,5 mL do sangue e era comparável àquele do método de cultura de semeadura em profundidade (Pour-plate). Isso demonstrou que o método da presente invenção poderia fornecer uma alternativa para o método de cultura de semeadura em profundidade (Pour-plate). Além disso, o método de cultura de semeadura em profundidade (Pour-plate) levou um dia, enquanto o método da presente invenção foi completado a partir da estabilização do RNA do espécime até a quantificação em cerca de 6 horas.

Exemplo 9: Exame de *E. coli* em produto de leite fermentado

[088]*E. coli* foi adicionado a Yakult comercial (da Yakult Honsha Co., Ltd.) de modo a proporcionar números bacterianos de 10^0, 10^1, 10^2, 10^3, 10^4 e 10^5 por mL para fazer amostras. De cada amostra, 1 mL foi submetido à extração de RNA total, e 1 mL ao método de cultura de semeadura em profundidade (Pour-plate) suando meio de desoxicolato-ágar (37ºC, 20±2 horas). O RNA total extraído foi analisado por um método de RT-PCR quantitativa usando os iniciadores específicos para *enterobacte-*

riaceae En-lsu 3F/3'R para examinar a correlação entre o valor de C_T resultante e o número de células microbianas obtido pelo método de cultura de semeadura em profundidade (Pour-plate). A extração de RNA total foi efetuada como descrito no Exemplo 2 exceto pela trituração de células bacterianas pela adição de pérolas de vidro e o método de RT-PCR quantitativa foi realizado como descrito no Exemplo 2. A esse respeito, 1/25 da quantidade do RNA total extraído foi submetido à RT-PCR quantitativa.

[089]Como resultado, conforme mostrado na Figura 7, o valor de C_T era fortemente correlacionado com o número de células microbianas na faixa de 10^0 a 10^5 células por mL. Na Figura 7, o valor de C_T é plotado contra o número de $\log_{10}$ células/mL de Yakult medido por método de cultura de semeadura em profundidade (Pour-plate) para quantificar E. coli servindo como amostra. O limite quantitativo do método da presente invenção era de 10^0 célula ou mais/mL de Yakult e era comparável àquele do método de cultura de semeadura em profundidade (Pour plate). Isso demonstrou que o método da presente invenção poderia proporcionar uma alternativa para um método de cultura de semeadura em profundidade (Pour-plate) usando o meio de cultura oficial (meio de desoxicolato-ágar) como descrito na ordem Ministerial referente ao padrão composicional, etc. para leite e produtos de leite. Além disso, o método de cultura de semeadura em profundidade levou um dia, enquanto o método da presente invenção foi completado a partir a estabilização do RNA do espécime até a quantificação em cerca de 6 horas.

Exemplo 10: Análise de lactobacilos e enterococos em fezes humanas por RT-PCR quantitativa e um método de cultura

[090]Os números de células de bactérias dos gêneros Lactobacilo e Enterococo em fezes humanas usando iniciadores conforme os descritos na Tabela 1 e por um método de cultura. Fezes frescas excretadas foram coletadas de 48 adultos saudáveis, tratadas usando o método descrito no Exemplo 6, e submetidas à estabilização

de RNA, extração total de RNA e RT-PR quantitativa pelos métodos descritos no Exemplo 2. A esse respeito, 1/2.000 a 1/200.000 da quantidade do RNA total obtido foi submetido à RT-PCR quantitativa. Uma alíquota do mesmo diluente fecal foi também submetida à quantificação de CFU por um método de cultura (o gênero Lactobacilo: médio LBS, o gênero Enterococo: médio COBA, 37ºC, por 48 horas, em ambos os casos). O método de cultura foi de acordo com um método convencional; as colônias que surgiram foram submetidas à identificação de espécies bacterianas por um teste de propriedade bioquímica (coloração de Gram, teste de catalase, API Strep). O número de células de bactérias do gênero Lactobacilo pelo método de RT-PCR quantitativa foi calculado por combinação dos números de células de bactérias obtidos por métodos de RT-PCR quantitativa usando os iniciadores sg-Laci-F/R (subgrupo *Lactobacillus acidophillus*), sg-Lsak-F/R (subgrupo *Lactobacillus sakei*), sg-Lcas-F/R (subgrupo *Lactobacillus ruminis*), sg-Lreu-F/R (subgrupo *Lactobacillus reuteri*), sg-Lpla-F/R (subgrupo *Lactobacillus plantarum*), s-Lbre-F/R (*Lactobacillus brevis*), s-Lfru-F/R (*Lactobacillus fructivorans*) e LFer-1/2 (*Lactobacillus fermentum*).

[091]Como resultado, conforme mostrado na Tabela 4, os números de células de bactérias do gênero Lactobacilo e do gênero Enterococo nas fezes humanas foram quase comparáveis entre o método da presente invenção e o método de cultura. Em contraste, a freqüência de detecção foi alta em ambos os gêneros no método da presente invenção em comparação com o método de cultura. Isso pareceu ser devido à seguinte razão: (a) bactérias estavam presentes, que pertenciam ao gênero de Lactobacilo ou Enterococo agora marcadas mas que não puderam crescer por causa do meio de seleção tinham um seletividade mais forte que a necessária; ou (b) a seletividade fraca dos meios de seleção usados levaram ao crescimento, nos meios, de gêneros de bacterianos abundantemente presentes que não o alvo, que não permitiram a detecção dos gêneros bacterianos alvejados. Os resultados descritos acima sugeriram que o método da presente invenção não somente permite a obten-

ção do número de células de bactérias comprável àquele obtido por um método de cultura, como também pode detectar ou quantificar bactérias que anteriormente não podiam ser detectadas pelo método de cultura. Além disso, para o método de cultura, levam-se 7 dias para executar todas as operações, incluindo a identificação das espécies bacterianas, enquanto para o método da presente invenção, todas as operações foram completadas em cerca de 20 horas.

Tabela 4

Gênero	Método de RT-PCR Quantitativa		Método de Cultura	
	log_{10} células/g•fezes	Freqüência (%)	log_{10} células/g•fezes	Freqüência (%)
Lactobacilo	5,2±1,2	44/46 (96)	5,5±1,4	37/46 (80)
Enterococo	6,2±1,0	46/46 (100)	6,2±1,9	23/46 (50)

REIVINDICAÇÕES

1. Método para quantificar um microrganismo de interesse, em um estado vivo, usando como um índice uma quantidade de rRNA de um microrganismo de interesse em um espécime a ser testado, o método **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende medir um produto amplificado por um RT-PCR realizado usando fragmentos de ácido nucleico capazes de hibridizar especificamente ao rRNA do microrganismo de interesse e uma amostra do espécime a ser testado.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato que a medição do produto amplificado compreende identificar o número de ciclos de PCR quando o produto amplificado atinge uma certa quantidade.

3. Método, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **CARACTERIZADO** pelo fato que o método compreende medir o produto amplificado com o tempo.

4. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o espécime a ser testado é um espécime derivado de fezes, um alimento, ou um organismo.

5. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o rRNA do microrganismo de interesse na amostra do espécime a ser testado é estabilizado no microrganismo.

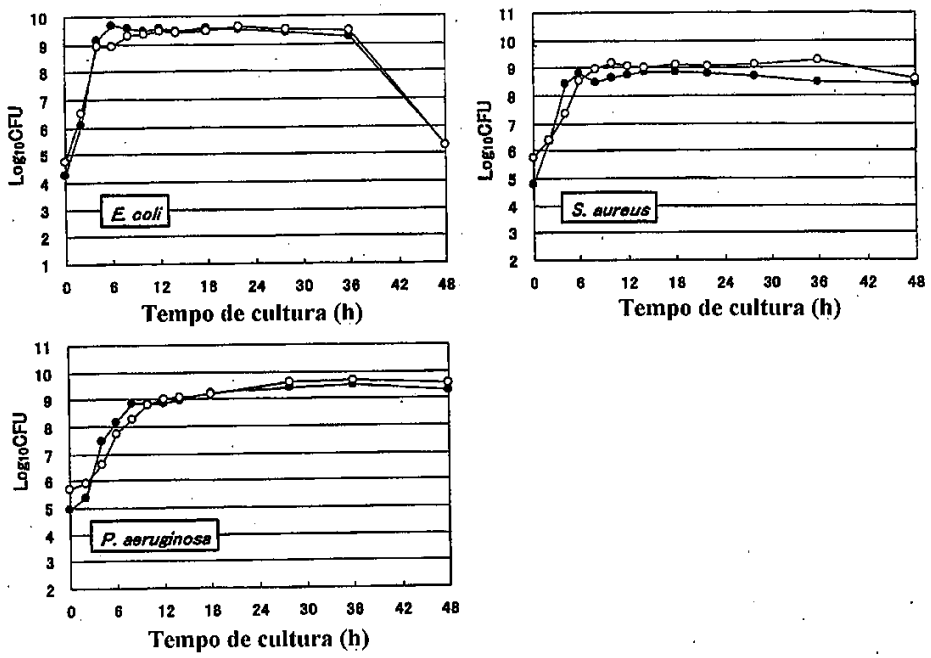
6. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o número de células do microrganismo de interesse é quantificado.

7. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, **CARACTERIZADO** pelo fato de que os fragmentos de ácido nucleico capazes de hibridizar especificamente ao rRNA do microrganismo de interesse são, cada um, um fragmento de ácido nucleico que compreende uma sequência de bases descrita em uma das SEQ ID NOs: 2, 3 e 5 a 28 ou uma sequência complementar a esta.

8. Kit, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende (1) fragmentos de ácido nucleico capazes de hibridizar especificamente ao rRNA de um microrganismo de interesse e/ou (2) um reagente usado para extração de RNA, estabilização de RNA, ou uma PCR.

74

Fig. 1


Log10CFU
E. coli
Tempo de cultura (h)
Log10CFU
S. aureus
Tempo de cultura (h)
Log10CFU
P. aeruginosa
Tempo de cultura (h)

75

Fig. 2

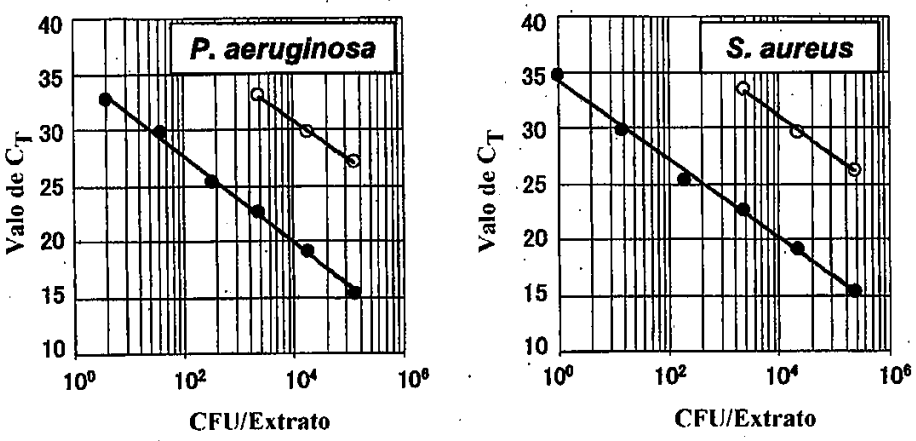
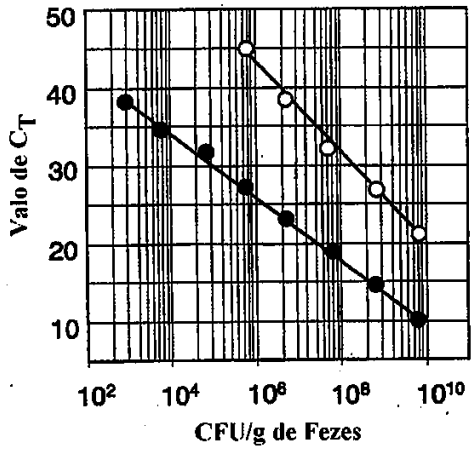

P. aeruginosa
S. aureus
Valo de C_T
40
35
30
25
20
15
10
10^0
10^2
10^4
10^6
CFU/Extrato

Fig. 3


Valo de C_T
50
40
30
20
10
10^2
10^4
10^6
10^8
10^{10}
CFU/g de Fezes

76

Fig. 4

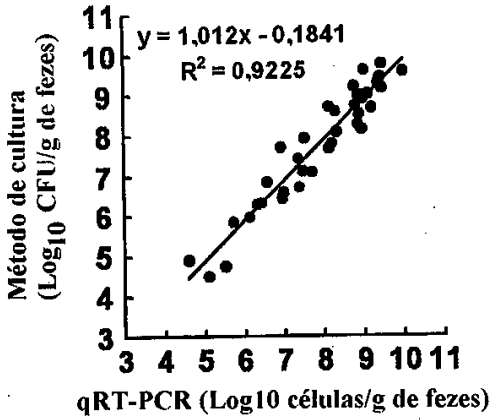
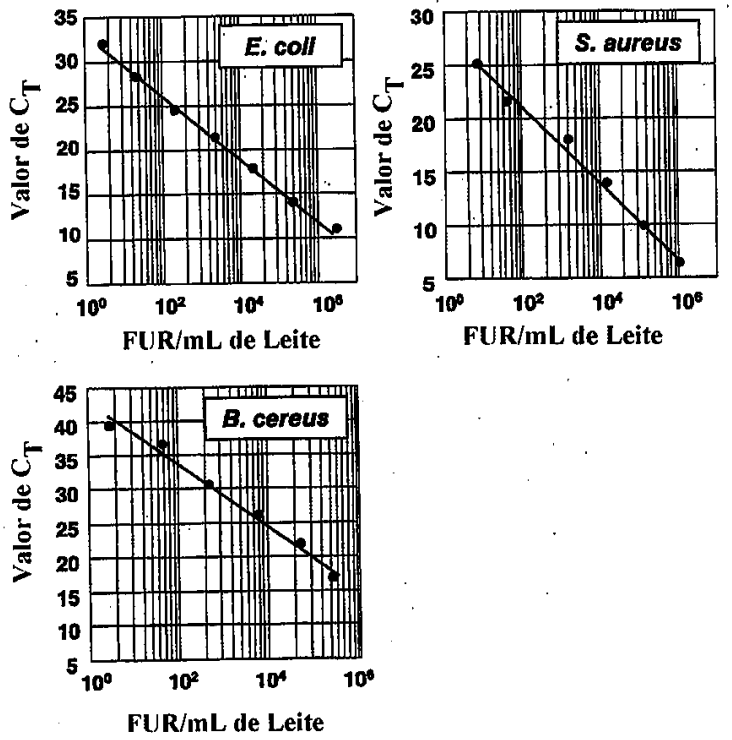

y = 1,012x - 0,1841
R^2 = 0,9225
Método de cultura
(Log_{10} CFU/g de fezes)
qRT-PCR (Log10 células/g de fezes)

Fig. 5


E. coli
S. aureus
B. cereus
Valor de C_T
FUR/mL de Leite

77

Fig. 6

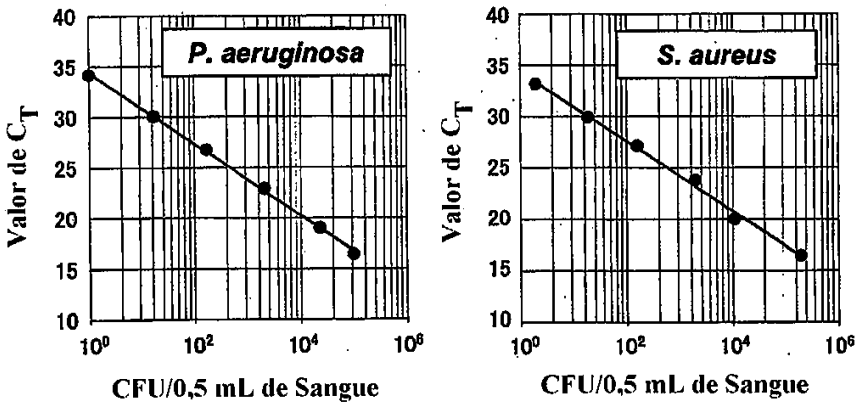
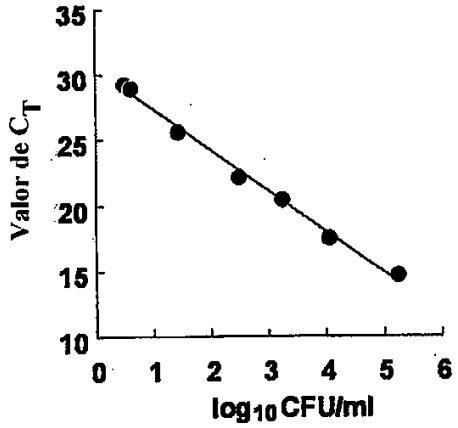

P. aeruginosa
S. aureus
Valor de C_T
40
35
30
25
20
15
10
10^0
10^2
10^4
10^6
CFU/0,5 mL de Sangue

Fig. 7


Valor de C_T
35
30
25
20
15
10
0
1
2
3
4
5
6
$\log_{10}$ CFU/ml