



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

(21) PI 0715982-0 A2



(22) Data de Depósito: 18/10/2007  
(43) Data da Publicação: 06/08/2013  
(RPI 2222)

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

**(54) Título:** PAR DE SEQUÊNCIAS DO PRIMER DIAGNÓSTICO DE VIBRIO HARVEYI, KIT PARA A DETECÇÃO DO VIBRIO HARVEYI MÉTODOS PARA A DETECÇÃO DA PRESENÇA DO VIBRIO HARVEYI E MÉTODO PARA A QUANTIFICAÇÃO DA QUANTIDADE DE VIBRIO HARVEYI

**(57) Resumo:** "PAR DE SEQUÊNCIAS DO PRIMER DIAGNÓSTICO DE VIBRIO HARVEYI, KIT PARA A DETECÇÃO DO VIBRIO HARVEYI, MÉTODOS PARA A DETECÇÃO DA PRESENÇA DO VIBRIO HARVEYI E MÉTODO PARA A QUANTIFICAÇÃO DA QUANTIDADE DE VIBRIO HARVEYI". A presente invenção se refere aos primers que foram isolados, sendo diagnóstico para a detecção do VIBRIO HARVEYI. Os primers estão baseados em uma porção do gene de VIBRIO HARVEYI Lux R e podem ser utilizados nos métodos de teste de amplificação direcionada do primer ou hibridização do ácido nucléico.

**(30) Prioridade Unionista:** 20/10/2006 US 60/853,379

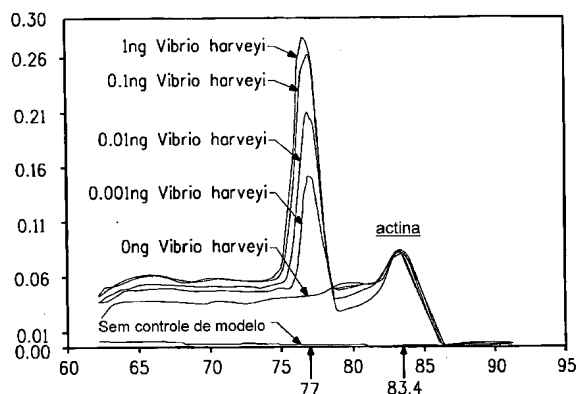
**(73) Titular(es):** E.I DU PONT DE MOURS AND COMPANY

**(72) Inventor(es):** CHRISTIAN P. LENGES , JIANZHONG ZHANG, MARIO W. CHEN, RICHARD C. EBERSOLE

**(74) Procurador(es):** Priscila Penha de Barros Thereza

**(86) Pedido Internacional:** PCT US2007022268 de 18/10/2007

**(87) Publicação Internacional:** WO 2008/048673 de 24/04/2008



**“PAR DE SEQUÊNCIAS DO PRIMER DIAGNÓSTICO DE *VIBRIO HARVEYI*, KIT PARA A DETECÇÃO DO *VIBRIO HARVEYI*, MÉTODOS PARA A DETECÇÃO DA PRESENÇA DO *VIBRIO HARVEYI* E MÉTODO PARA A QUANTIFICAÇÃO DA QUANTIDADE DE *VIBRIO HARVEYI*”**

5                   **REFERÊNCIA CRUZADA AO PEDIDO DE PATENTE RELACIONADO**

O pedido de patente reivindica a prioridade da norma 35 USC § 119 do Pedido de Patente Provisório US 60/853379, depositado em 20 de outubro de 2006, que é incorporado no presente para todos os propósitos.

**CAMPO DA INVENÇÃO**

10                   A presente invenção se refere ao campo do teste de diagnóstico. Mais especificamente, novos primers foram desenvolvidos para a utilização na detecção do *Vibrio harveyi*.

**ANTECEDENTES DA INVENÇÃO**

15                   As criações de aquicultura e de camarões comerciais sofrem perdas extensivas devido aos efeitos de uma série de patógenos comuns. O *Vibrio harveyi*, uma bactéria em formato de bastonete, Gram negativo, é relatado como sendo o patógeno da bactéria mais importante da indústria de aquicultura do camarão. Algumas das linhagens desta bactéria são altamente patogênicas para o camarão, enquanto outras linhagens podem ser

20                   consideradas como sendo patógenos oportunistas.

A detecção do *Vibrio harveyi* em reprodutores de criadouro e em pós larvas permite que o camarão infectado seja eliminado antes de entrar em um sistema de produção comercial. Conseqüentemente, uma variedade de métodos foi desenvolvida para a detecção do *Vibrio harveyi* no camarão,

25                   incluindo os métodos com base em ácido nucléico e os métodos imunológicos (Lightner et al., *Aquaculture* 164(1): 201 – 220 (1998)). Os métodos de reação da cadeia polimerase (PCR) são de interesse particular porque eles são simples, rápidos e sensíveis. Os métodos de PCR para a detecção do *Vibrio*

*harveyi*, que são baseados na amplificação de diferentes regiões diagnóstico do genoma, foram descritos (vide, por exemplo, Conejero et al., *J. Gen. Appl. Microbiol.* 50(3): 137 – 142 (2004); Conejero et al., *J. Appl. Microbiol.* 95(3): 602 – 611 (2003); e Oakey et al., *J. Appl. Microbiol.* 95: 1293 – 1303 (2003)).

5                Todos os métodos acima são úteis para a detecção do *Vibrio harveyi*; entretanto, eles geralmente sofrem de uma falta de especificidade, sensibilidade ou são complexos e demorados. Adicionalmente, devido à elevada taxa de mutação da bactéria, os testes direcionados às diferentes regiões do genoma seriam úteis. Portanto, há uma necessidade por um teste  
10                altamente sensível para o *Vibrio harveyi* que seja rápido, preciso e facilmente utilizado na área. O problema citado é enfocado no presente pela descoberta dos primers com base em uma parte do gene *Vibrio harveyi* LuxR que pode ser utilizado nos métodos de ensaio de amplificação direcionado ao primer ou de hibridização do ácido nucléico para a detecção do *Vibrio harveyi* sem os  
15                problemas associados às metodologias prévias.

#### **DESCRIÇÃO RESUMIDA DA INVENÇÃO**

                  Em uma realização, a presente invenção apresenta uma sequência do primer diagnóstico *Vibrio harveyi* isolada conforme apresentado em SEQ ID No.: 1 ou SEQ ID No.: 2, ou uma molécula de ácido nucléico  
20                isolada que é complementar à SEQ ID No.: 1 ou SEQ ID No.: 2.

                  Em outra realização, a presente invenção apresenta um par de seqüências de primer diagnóstico do *Vibrio harveyi* conforme apresentado na SEQ ID No.: 1 e na SEQ ID No.: 2.

                  Em outra realização, a presente invenção apresenta um kit para a  
25                detecção do *Vibrio harveyi* que compreende um par de seqüências do primer diagnóstico de *Vibrio harveyi* descrito no presente.

                  Em outra realização, a presente invenção apresenta um método para a detecção da presença do *Vibrio harveyi* em uma amostra que

compreende:

(i) fornecer o DNA a partir de uma amostra suspeita de conter *Vibrio harveyi*; e

5 (ii) examinar o DNA com uma sonda derivada da seqüência do primer diagnóstico *Vibrio harveyi* isolado de qualquer uma das SEQ ID No.: 1 – 2 sob condições de hibridização apropriadas;

- em que a identificação de um fragmento de ácido nucléico hibridizável confirma a presença do *Vibrio harveyi*.

10 Em outra realização, a presente invenção apresenta um método para a detecção da presença do *Vibrio harveyi* em uma amostra compreendendo:

(i) fornecer o DNA a partir de uma amostra suspeita de conter *Vibrio harveyi*;

15 (ii) amplificar o DNA com um par das seqüências do primer diagnóstico de *Vibrio harveyi* descritas no presente, tal que os produtos da amplificação são gerados;

- em que a presença dos produtos da amplificação confirma a presença do *Vibrio harveyi*.

20 Em outra realização, a presente invenção apresenta um método para a quantificação da quantidade do *Vibrio harveyi* em uma amostra compreendendo:

(i) fornecer o DNA a partir de uma amostra suspeita de conter *Vibrio harveyi*;

25 (ii) amplificar dito DNA com um par das seqüências do primer diagnóstico do *Vibrio harveyi* descritas no presente por ciclagem térmica entre pelo menos uma temperatura desnaturante e uma temperatura de extensão na presença de um agente fluorescente de ligação ao ácido nucléico ou uma sonda marcada com fluorescência;

(iii) medir a quantidade de fluorescência gerada pelo agente fluorescente de ligação ao ácido nucléico ou a sonda marcada com fluorescência durante a ciclagem térmica;

5 (iv) determinar um número de ciclo limite, em que a quantidade de fluorescência gerada pelo agente fluorescente de ligação ao ácido nucléico ou a sonda marcada de modo fluorescente atinge um valor limite fixo acima de um valor da linha de base; e

(v) calcular a quantidade do *Vibrio harveyi* na amostra pela comparação do número de ciclo limite determinado para o *Vibrio harveyi* na amostra com uma curva padrão do número de ciclo limite *versus* o logaritmo da concentração padrão determinada utilizando as soluções padrão de concentração conhecida.

#### **BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS**

15 As diversas realizações da presente invenção podem ser compreendidas de modo mais amplo a partir da seguinte descrição detalhada, figura e das descrições da sequência concomitante, que forma uma parte do presente pedido de patente.

A Figura 1A mostra a curva de fusão para o produto *Vibrio harveyi* VHL1 e o produto controle da amostra interna de actina formada pela amplificação simultânea por PCR do DNA de *Vibrio harveyi* e do DNA da actina, conforme descrito no Exemplo 5. Os valores da temperatura de fusão (T<sub>m</sub>) do *Vibrio harveyi* e dos produtos da actina são indicados em suas curvas de fusão correspondentes.

25 A Figura 1B mostra os resultados de uma separação por eletroforese do gel de agarose das amostras contendo o produto *Vibrio harveyi* VH1 e o produto controle da amostra interna de actina formado por amplificação simultânea por PCR do DNA de *Vibrio harveyi* e do DNA da actina, conforme descrito no Exemplo 5. A quantidade de DNA do *Vibrio*

*harveyi* e do camarão é mostrada acima de cada banda; “M” é uma banda do DNA de 100 bp.

As seguintes sequências obedecem a norma 37 C. F. R. 1.821 - 1.825 (*Requirements for Patent Applications Containing Nucleotide Sequences and/or Amino Acid Sequence Disclosures - the Sequence Rules*) e são consistentes com o Padrão ST.25 (1998) da Organização da Propriedade Intelectual Mundial (WIPO) e a sequência que lista as exigências do EPO e PCT (Regras 5.2 e 49.5(a-bis), e Seção 208 e Anexo C das Instruções Administrativas). Os símbolos e o formato utilizado para os dados de sequência do nucleotídeo e do aminoácido cumprem com as regras estabelecidas na norma 37 C.F.R. §1.822.

As SEQ ID Nos: 1 e 2 são as sequências de nucleotídeos dos primers de diagnóstico do *Vibrio harveyi* úteis para a detecção do *Vibrio harveyi*.

A SEQ ID No: 3 é a sequência de nucleotídeos dos padrões de *Vibrio harveyi* sintéticos descritos na Seção de Métodos Gerais dos Exemplos. Esta sequência também é a sequência de nucleotídeos do produto de amplificação obtido utilizando os primers de diagnóstico de *Vibrio harveyi*, dados como as SEQ ID No.: 1 e 2, em uma reação de amplificação direcionado ao primer.

As SEQ ID Nos: 4 – 7 são as sequências de nucleotídeos dos primers de controle da amostra interna no Exemplo 5.

As SEQ ID Nos: 8 e 9 são as sequências de nucleotídeos das sondas marcadas com fluorescência descritas nos Exemplos 6 e 7.

#### **DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO**

Estão descritos no presente os primers úteis em testes para a detecção do *Vibrio harveyi*. Os primers podem ser utilizados nos métodos de amplificação no ácido nucléico, bem como nos testes de hibridização para a

detecção e quantificação eficiente do *Vibrio harveyi* virulento.

Na presente descrição, uma série de termos e abreviações é utilizada. As seguintes definições são fornecidas e devem ser referidas para a interpretação das reivindicações e do relatório descritivo.

5                   “Reação em cadeia polimerase” é abreviada como PCR.

O termo “sequência do primer diagnóstico de *Vibrio harveyi* isolado” se refere a uma sequência correspondendo a uma porção do genoma de *Vibrio harveyi* sendo diagnóstico para a presença do *Vibrio harveyi*.

10                   Conforme utilizado no presente, um “fragmento de ácido nucléico isolado” é um polímero de RNA ou DNA que é de fita simples ou dupla, contendo opcionalmente bases de nucleotídeo sintético, não natural ou alterado. Um fragmento de ácido nucléico isolado na forma de um polímero de DNA pode ser compreendido de um ou mais segmentos de cDNA, DNA genômico ou DNA sintético.

15                   O termo “produto de amplificação” ou “amplicon” se refere ao fragmento de ácido nucléico que é produzido durante uma reação de amplificação direcionada ao primer. Os métodos típicos da amplificação direcionada ao primer incluem a reação em cadeia polimerase (PCR), reação em cadeia ligase (LCR), amplificação de deslocamento de fita (SDA) ou outros  
20                   processos de amplificação isotérmicos. Caso a metodologia do PCR for selecionada, a composição de replicação incluiria, tipicamente, por exemplo: os trifosfatos de desoxinucleotídeo, dois primers com sequências apropriadas, uma polimerase de DNA termoestável e proteínas. Estes reagentes e os procedimentos descritos em detalhes para sua utilização na amplificação dos  
25                   ácidos nucléicos são fornecidos na patente US 4.683.202 (1987, Mullis, et al.) e patente US 4.683.195 (1986, Mullis, et al.). Se a metodologia LCR for selecionada, então as composições de replicação do ácido nucléico iriam compreender, por exemplo: uma ligase termoestável (por exemplo, ligase *T.*

*aquaticus*), dois conjuntos de oligonucleotídeos adjacentes (em que um membro de cada conjunto é complementar a cada uma das fitas alvo), tampão de Tris-HCl, KCl, EDTA, NAD, ditioneitol e DNA de esperma de salmão. Vide, por exemplo, Tabor et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 82:1074 – 1078 (1985).

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

10 O termo “ciclagem térmica” se refere a todo o padrão de mudança de temperatura utilizado durante certos métodos de amplificação do ácido nucléico, tais como PCR e LCR. Este processo é comum e bem conhecido no estado da técnica. Vide, por exemplo, Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, NY (1989); e a patente US 4.683.202 de Mullis et al., e a patente US 4.683.195 de Mullis et al. Em geral, a ciclagem térmica do PCR inclui uma etapa de desnaturação inicial em alta temperatura, seguida por uma série repetitiva de ciclos de temperatura designados para permitir a desnaturação do molde, anelamento do primer e prolongamento dos primers anelados pela polimerase.

20

O termo “número de ciclo limite” também referido no presente como “CT”, se refere ao número de ciclos durante a ciclagem térmica em que a quantidade de fluorescência devido à formação do produto atinge um valor limite fixo acima de um valor da linha de base.

25 O termo “sonda” se refere a um oligonucleotídeo (sintético ou de ocorrência natural) que é significativamente complementar a uma sequência alvo, também referida no presente como um “fragmento” (isto é, a sequência a ser detectada ou uma parte da sequência a ser detectada) e forma uma



estrutura duplicada por hibridização com pelo menos uma fita da sequência alvo. A sonda pode ser marcada para facilitar a detecção, por exemplo, utilizando um marcador fluorescente ou um marcador ligante.

O termo “porção inibidora da replicação” se refere a qualquer átomo, molécula ou grupo químico que está ligado ao grupo hidroxila 3’ terminal de um oligonucleotídeo que irá bloquear a iniciação da extensão da cadeia para a replicação de uma fita de ácido nucléico. Os exemplos incluem, mas não estão limitados a, 3’ dideoxynucleotídeos (por exemplo, cordicepina), fosfato, ligantes (por exemplo, biotina e dinitrofenol), moléculas repórter (por exemplo, fluoresceína e rodamina), cadeias carbônicas (por exemplo, propanol), um nucleotídeo ou polinucleotídeo não pareado ou unidades de ácido nucléico peptídeo.

O termo “não participatório” se refere à falta de participação de uma sonda ou primer em uma reação para a amplificação de uma molécula de ácido nucléico. Especificamente, uma sonda ou primer não participatória é uma que não irá servir como um substrato para, ou ser prolongada por, uma DNA polimerase. Uma “sonda não participatória” é inerentemente incapaz de ser prolongada na cadeia por uma polimerase. Ela pode ou não possuir uma porção inibitória da replicação.

Uma molécula de ácido nucléico é “hibridizável” para outra molécula de ácido nucléico, tal como um cDNA, DNA genômico ou RNA, quando uma forma de fita simples da molécula de ácido nucléico pode anelar em outra molécula de ácido nucléico em condições apropriadas de temperatura e força iônica da solução. As condições de hibridização e de lavagem são bem conhecidas e exemplificadas em Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, NY (1989), particularmente capítulo 11 e Tabela 11.1 do mesmo (incorporado inteiramente no presente como referência). As

condições de temperatura e força iônica determinam o “rigor” da hibridização. Para a seleção preliminar dos ácidos nucléicos homólogos, as condições de hibridização de baixo rigor, correspondentes a uma temperatura de fusão ( $T_m$ ) de 55° C, podem ser utilizadas, por exemplo, 5X SSC, 0,1% SDS, 0,25% de leite e sem formamida; ou 30% de formamida, 5X SSC, 0,5% SDS. As condições de hibridização de rigor moderado correspondem a um  $T_m$  maior, por exemplo, 40% de formamida, com 5X ou 6X SSC. A hibridização requer que os dois ácidos nucléicos contenham sequências complementares, embora dependendo do rigor da hibridização, os desapareamentos entre as bases são possíveis. O rigor apropriado para a hibridização dos ácidos nucléicos depende do comprimento dos ácidos nucléicos e do grau de complementação, variáveis bem conhecidas no estado da técnica. Quanto maior o grau de similaridade ou homologia entre duas sequências de nucleotídeos, maior o valor de  $T_m$  para os híbridos de ácidos nucléicos possuindo aquelas sequências. A estabilidade relativa (correspondendo a um  $T_m$  maior) das hibridizações do ácido nucléico diminui na seguinte ordem: RNA:RNA, DNA:RNA, DNA:DNA. Para os híbridos maiores que 100 nucleotídeos em comprimento, as equações para calcular o  $T_m$  foram derivadas (vide Sambrook et al., *supra*, 9.50 – 9.51). Para as hibridizações com ácidos nucléicos mais curtos, isto é, oligonucleotídeos, a posição dos desapareamentos se torna mais importante, e o comprimento do oligonucleotídeo determina sua especificidade (vide, Sambrook et al., *supra*, 11.7 – 11.8). Em uma realização, o comprimento para um ácido nucléico hibridizável é de pelo menos cerca de 10 nucleotídeos. De preferência, um comprimento mínimo para um ácido nucléico hibridizável é de pelo menos cerca de 15 nucleotídeos; de maior preferência, pelo menos cerca de 20 nucleotídeos; e de maior preferência, ainda, o comprimento é de pelo menos 30 nucleotídeos. Além disso, o técnico no assunto irá reconhecer que a temperatura e a concentração do sal da solução de lavagem podem ser

ajustadas conforme necessário de acordo com os fatores, tais como o comprimento da sonda.

“Gene” se refere a um fragmento de ácido nucléico que expressa proteínas específica, incluindo as seqüências reguladoras que precedem (sequências de não codificação 5’) e a seguir (sequências de não codificação 3’) a sequência de codificação. “Gene nativo” se refere a um gene conforme encontrado na natureza com suas próprias seqüências reguladoras. “Gene quimérico” se refere a qualquer gene que não é um gene nativo, que compreende as seqüências regulatórias e codificadoras que não são encontradas juntas na natureza. Consequentemente, um gene quimérico pode compreender as seqüências regulatórias e as seqüências de codificação que são derivadas de fontes diferentes ou seqüências regulatórias e seqüências de codificação derivadas a partir da mesma fonte, mas dispostas de um modo diferente do que aquela encontrada na natureza. “Gene endógeno” se refere a um gene nativo em seu local natural no genoma de um organismo. Um gene “exógeno” se refere a um gene não normalmente encontrado no organismo hospedeiro, mas que é introduzido no organismo hospedeiro por transferência de gene. Os genes exógenos podem compreender os genes nativos inseridos em um organismo não nativo, ou genes quiméricos. Um “transgene” é um gene que foi introduzido no genoma por um procedimento de transformação.

O termo “ligado de modo operável” se refere à associação das seqüências de ácido nucléico em um único fragmento de ácido nucléico, tal que a função de uma é afetada pela outra. Por exemplo, um promotor é ligado de modo operável a uma sequência de codificação quando é capaz de efetuar a expressão daquela sequência de codificação (isto é, aquela que a sequência de codificação está sob o controle

transcricional do promotor). As sequências de codificação podem ser ligadas de modo operável às sequências reguladoras na orientação *sense* ou *antisense*.

5 O termo “expressão”, conforme utilizado no presente, se refere à transcrição e a acumulação estável do RNA *sense* (mRNA) ou *antisense* derivado do fragmento de ácido nucléico da presente invenção. A expressão também pode se referir à translação do mRNA em um polipeptídeo.

Os termos “plasmídeo”, “vetor” e “cassete” se referem a um  
10 elemento cromossomal extra que freqüentemente carrega os genes que não são parte do metabolismo central da célula e, geralmente, na forma de moléculas de DNA de fita dupla circular. Tais elementos podem ser sequências de replicação autônomas, sequências de integração do genoma, fago ou sequências de nucleotídeos, linear ou circular, de um  
15 DNA ou RNA de fita simples ou dupla, derivado de qualquer fonte, em que uma série de sequências de nucleotídeos foi unida ou recombinada em uma construção única que é capaz de introduzir um fragmento de promotor e sequência de DNA para um produto do gene selecionado junto com a sequência não traduzida 3’ apropriada dentro de uma célula. O  
20 “cassete de transformação” se refere a um vetor específico contendo um gene exógeno e possuindo elementos em adição ao gene exógeno que facilitam a transformação de uma célula hospedeira particular. “Cassete de expressão” se refere a um vetor específico contendo um gene exógeno e possuindo elementos em adição ao gene exógeno que permitem maior  
25 expressão daquele gene em um hospedeiro exógeno.

O termo “software de análise de sequência” se refere a qualquer algoritmo de computador ou programa de software que é útil para a análise da sequência do nucleotídeo ou do aminoácido. O software de análise da

sequência pode estar disponível comercialmente ou ser desenvolvido independentemente. O software de análises de sequência típica irá incluir, mas não está limitado a, software integrado GCG dos programas (Wisconsin Package Versão 9.0, Genetics Computer Group (GCG), Madison, WI),  
 5 BLASTP, BLASTN, BLASTX (Altschul et al., *J. Mol. Biol.*, 215: 403 – 410 (1990), DNASTAR (DNASTAR, Inc., Madison, WI), e Vector NTi versão 7.0. Dentro do contexto do presente pedido de patente, será entendido que onde o software análises de sequência é utilizado para a análise, em que os resultados das análises serão baseados nos “valores predeterminados” do programa  
 10 referenciado, salvo indicações em contrário. Conforme utilizado no presente, “valores predeterminados” irão significar qualquer conjunto de valores ou parâmetros que originalmente carregam com o software quando primeiro inicializado.

O DNA recombinante padrão e as técnicas de clonagem  
 15 molecular utilizadas no presente são bem conhecidas no estado da técnica e são descritos por Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, NY (1989) (a seguir "Maniatis"); e por Ausubel, F. M. et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, publicado por Greene Publishing Assoc,  
 20 and Wiley- Interscience (1987).

### **GENOMA DO *VIBRIO HARVEYI***

O *Vibrio harveyi* é o principal patógeno bacteriano do camarão com uma elevada taxa de mortalidade e uma ampla gama de hospedeiros. O genoma completo do *Vibrio harveyi* não foi seqüenciado.

### **25 SEQUÊNCIAS DO PRIMER DIAGNÓSTICO *VIBRIO HARVEYI***

Estão descritas no presente as sequências do primer diagnóstico úteis em uma variedade de formatos de testes para a detecção altamente sensível do *Vibrio harveyi*. Estes primers são direcionados para as regiões do

gene LuxR do *Vibrio harveyi* não previamente utilizados para a detecção *Vibrio harveyi* (Showalter et al., *J. Bacteriol.*, 172 (6): 2946 – 2954 (1990), GenBank: M55260).

As sequências do primer foram identificadas empiricamente  
 5 utilizando uma série de ferramentas de análise da sequência “*in silico*” (isto é, com base no computador). Neste processo, uma base de dados foi reunida contendo todas as sequências do genoma de *Vibrio harveyi* conhecidas. Estas sequências foram primeiro alinhadas e então analisadas para os locais do primer utilizando o software Vector NTI® (InforMax Inc., Bethesda, MD) com  
 10 base na homologia com outras sequências do genoma de *Vibrio harveyi*, um comprimento amplicon especificado, concentração do sal, T<sub>m</sub> (temperatura de fusão), teor de C + G e liberdade do grampo e dos parâmetros de estrutura secundários. Os primers prospectivos foram então classificados com relação às sequências GenBank. Aqueles primers estabelecidos para conter menos de 5  
 15 bases de homologia com outras sequências de gene não alvo foram selecionados para a investigação experimental da eficiência de amplificação por PCR e formação mínima do primer – dímero. Os primers que mostram ambas a alta eficiência de amplificação e a formação primer – dímero mínima foram selecionados para o teste com um grupo de DNA isolado do camarão infectado com diversos patógenos do camarão e o DNA do camarão certificado  
 20 ser livre da doença. Aqueles primers que amplificam todas as linhagens de *Vibrio harveyi* e não mostram resposta a ambos o DNA do camarão infectado com os patógenos não *Vibrio harveyi* e ao DNA isolado de diferentes espécies de camarões livres da doença certificados foram selecionados como primers  
 25 úteis.

As sequências de primer descobertas como sendo úteis na detecção do *Vibrio harveyi* e sua localização no gene LuxR do *Vibrio harveyi* são dadas na Tabela 1. Estes primers podem ser sintetizados utilizando a

química da fosforamidita padrão ou pode ser obtida a partir das companhias, tais como a Sigma Genosys (The Woodlands, TX).

**TABELA 1**

**SEQUÊNCIAS DE PRIMER DIAGNÓSTICO DO *VIBRIO HARVEYI***

Primer, direção	SEQ ID No.	Localização do gene LuxR do <i>Vibrio harveyi</i> (GenBank M55260)
VHL1F, para frente	1	679 – 700
VHL1R, Reverso	2	758 – 737

5

**MÉTODOS DE TESTE**

As sequências do primer descritas no presente podem ser utilizadas em uma variedade de formatos de ensaio para a detecção e a quantificação do *Vibrio harveyi*. Os dois formatos mais convenientes contam com métodos de hibridização do ácido nucléico ou métodos de amplificação direcionada do primer, tais como PCR.

10

**MÉTODOS DE TESTE DE AMPLIFICAÇÃO DIRECIONADA DO PRIMER**

Em uma realização, a presente sequência do primer diagnóstico *Vibrio harveyi* pode ser utilizada na amplificação do ácido nucléico direcionada ao primer para a detecção da presença do *Vibrio harveyi*. Uma variedade de métodos de amplificação do ácido nucléico direcionado ao primer é bem conhecida no estado da técnica e é apropriada para a utilização com os primers descritos no presente. Estes métodos de amplificação do ácido nucléico incluem os métodos de ciclagem térmica (por exemplo, reação em cadeia polimerase (PCR) e a reação em cadeia ligase (LCR)), bem como os métodos isotérmicos e a amplificação de deslocamento de fita (SDA).

15

20

Os métodos LCR são bem conhecidos no estado da técnica (vide, por exemplo, Tabor et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 82: 1074 – 1078 (1985)). Tipicamente, as composições de replicação do ácido nucléico compreendem, por exemplo: uma ligase termoestável (por exemplo, ligase *T.*

*aquaticus*), dois conjuntos de primers 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 esperma de salmão.

Os métodos DAS também são bem conhecidos no estado da técnica. Uma discussão detalhada da metodologia SDA é dada por Walker et al., (*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 89 : 392 (1992)). Tipicamente, no SDA, dois primers de oligonucleotídeos são utilizados, cada um possuindo regiões complementares a apenas uma das fitas no alvo. Após a desnaturação por calor, os fragmentos alvo de fita simples se ligam aos respectivos primers que estão presentes em excesso. Ambos os primers contêm as sequências de reconhecimento da enzima de restrição assimétrica localizadas 5' das sequências de ligação alvo. Cada complexo primer-alvo circula através do estreitamento e das etapas de polimerização/ deslocamento na presença de uma enzima de restrição, um DNA polimerase e três trifosfatos de desoxinucleotídeos (dNTPs) e um trifosfato de desoxinucleotídeo  $\alpha$ -tio (dNTP[aS]).

O método preferido para a detecção do *Vibrio harveyi* utilizando as sequências do primer diagnóstico descritas no presente é o PCR, que é descrito por Mullis et al., na patente US 4.683.202 e na patente US 4.683.195, que são ambos especificamente incorporados no presente como referência. Nos métodos PCR, as sequências do primer diagnóstico de *Vibrio harveyi* descritas no presente são utilizadas como um par que é capaz de iniciar uma reação de amplificação do ácido nucléico que amplifica uma região dentro do genoma do *Vibrio harveyi*. Especificamente, o primer *forward* VHL1F, dado como a SEQ ID No: 1, é utilizado com o primer reverso VHL1R dado como SEQ ID No: 2. Em geral, os dois primers são misturados com a amostra de DNA, uma mistura de quatro desoxinucleotídeos trifosfatos (isto é, dATP, dCTP, dTTP e dGTP), uma polimerase de DNA termoestável, tal como a



polimerase de DNA Taq, em uma solução tampão. Esta mistura é então ciclada térmica utilizando um instrumento de ciclagem térmica para amplificar a região alvo desejada. Os cicladores térmicos estão disponíveis comercialmente a partir de muitas fontes (por exemplo, Applied Biosystems (Foster City, CA);  
5 Brinkmann (Westbury, NY); MJ Research (Waltham, MA); e Stratagene (La Jolla, CA)).

Em geral, a ciclagem térmica do PCR inclui uma etapa de desnaturação inicial em alta temperatura, seguida por uma série repetitiva de ciclos de temperatura designados para permitir a desnaturação do molde, o  
10 anelamento do primer e a extensão dos primers anelados pela polimerase. Em geral, as amostras são aquecidas inicialmente por cerca de 2 a 10 minutos em uma temperatura de cerca de 95° C para desnaturar a amostra de DNA de fita dupla. Então, no começo de cada ciclo, as amostras são desnaturadas por cerca de 10 a 60 segundos, dependendo das amostras e do tipo de  
15 instrumento utilizado. Após a desnaturação, os primers são deixados para anelar para o DNA alvo em uma temperatura mais baixa, de cerca de 40° C a cerca de 60° C, por cerca de 20 a 60 segundos. A extensão dos primers pela polimerase é freqüentemente realizada em uma temperatura que varia de cerca de 60° C a cerca de 72° C. A quantidade de tempo utilizada para a extensão irá  
20 depender do tamanho do amplicon e do tipo de enzimas utilizadas para a amplificação e é prontamente determinada pela experimentação de rotina. Adicionalmente, a etapa de anelamento pode ser combinada com a etapa de extensão, resultando em uma ciclagem de duas etapas. A ciclagem térmica também pode incluir as mudanças de temperatura adicionais nos testes de  
25 PCR. O número de ciclos utilizados nos testes depende de muitos fatores, incluindo os primers utilizados, a quantidade da amostra de DNA presente e as condições de ciclagem térmica. O número de ciclos a serem utilizados em qualquer ensaio pode ser prontamente determinado pelo técnico no assunto

utilizando a experimentação de rotina. Opcionalmente, a etapa de extensão final pode ser adicionada após o término da ciclagem térmica para assegurar a síntese de todos os produtos de amplificação.

Seguinte à amplificação, a sequência de nucleotídeo amplificado  
5 pode estar ligada a um vetor apropriado seguido pela transformação de um organismo hospedeiro apropriado com dito vetor. Deste modo, se assegura um fornecimento mais prontamente disponível da sequência amplificada. Alternativamente, seguinte à amplificação, a sequência amplificada ou uma de suas partes pode ser quimicamente sintetizada para a utilização como uma  
10 sonda de nucleotídeo para a utilização em um teste de hibridização, conforme descrito abaixo. Em uma situação, a sequência de DNA da região variável pode ser estabelecida utilizando métodos, tais como o método didesóxi (Sanger, F. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 74: 5463 – 5467 (1977)). A sequência obtida é utilizada para guiar a escolha da sonda para o organismo e a(s) sequência(s)  
15 mais apropriada(s) é(são) selecionada(s).

De modo a detectar a presença do *Vibrio harveyi* em uma amostra suspeita de conter *Vibrio harveyi* (por exemplo, camarão ou outro crustáceo) utilizando um método de amplificação do ácido nucléico direcionado ao primer, o DNA da amostra deve ser fornecido em uma forma que é capaz de  
20 ser amplificado.

Tipicamente, o DNA deve estar livre da célula e dos materiais da amostra e pode ser tratado para eliminar as proteínas e outros componentes celulares. O DNA pode ser obtido da bactéria a partir de qualquer tecido apropriado, fluido ou material da amostra incluindo, mas não limitado a, tecido  
25 de camarão (por exemplo, gelras, pleópodes, hemolinfa, músculo, cauda, pedúnculo, estômago, pata e tecido conectivo), fluidos de lavagem e amostras do reservatório de água. Tipicamente, as células bacterianas são isoladas a partir dos materiais da amostra. Estas amostras podem ser cultivadas em um

meio de crescimento apropriado, tal como caldo de soja triptica, suplementada com NaCl, agar de sangue suplementado com NaCl, caldo de Marine ou caldo de tiosulfato citrato bile sacarose (TCBS). Alternativamente, o DNA pode ser extraído diretamente a partir da amostra para teste. As amostras podem ser

5 suspeitas de conter *Vibrio harveyi* por uma série de razões, incluindo a proximidade de um contaminante conhecido ou não, ou podem apenas ser suspeitas de contaminação em virtude da presença comum de *Vibrio harveyi* na indústria de camarão comercial. Portanto, uma amostra suspeita de conter *Vibrio harveyi* pode ser qualquer amostra de DNA descrita acima.

10 Os métodos para fornecer DNA, que são apropriados para a amplificação, a partir das amostras são bem conhecidos no estado da técnica (Maniatis, supra). O DNA pode ser extraído diretamente a partir do material da amostra. Alternativamente, o DNA pode ser extraído a partir de uma amostra bacteriana, por exemplo, ao obter as células por centrifugação, lisar as células

15 com dodecilsulfato de sódio (SDS) e, extrair o DNA com fenol e álcool clorofórmio – isoamila, conforme descrito por Goarant et al., (Appl. Environ. Microbiol. 65(3): 1145 – 1151 (1999)). Adicionalmente, o DNA pode ser fornecido em uma forma que é apropriada para a amplificação utilizando um kit de isolamento do DNA disponível comercialmente, tal como o QIAamp DNA

20 Mini Kit (Qiagen, Valencia CA), o QIAamp Tissue kit (Qiagen) ou o High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Applied Science, Indianapolis, IN).

Então, o DNA é amplificado com o par de sequências de primer diagnóstico descritas no presente, utilizando um método de amplificação do ácido nucléico, conforme descrito acima. A presença do produto de

25 amplificação, detectada conforme descrito abaixo, confirma a presença do *Vibrio harveyi* na amostra. Em uma realização, o PCR é utilizado para amplificar o DNA.

Nos métodos de amplificação do ácido nucléico, os resultados do

teste podem ser interpretados erroneamente devido à falha do reagente, erros de procedimento e mau funcionamento do instrumento. Adicionalmente, os problemas surgem devido a presença de substâncias inibidoras nos materiais da amostra ou da degradação da amostra de DNA ou RNA durante o processamento da amostra e a recuperação do ácido nucléico. Para superar estes problemas, os testes de controle interno podem ser realizados em combinação com o ensaio de *Vibrio harveyi* para alertar os usuários destes tipos de erros e para auxiliar na quantificação dos resultados do teste.

Dois tipos de teste de controle interno podem ser utilizados. Uma abordagem está baseada na co-amplificação de um “controle de molde interno” (ITC), que é adicionado à mistura do reagente de amplificação de ácido nucléico antes da reação. Uma segunda abordagem está baseada na co-amplificação de um “controle de amostra interna” (ISC) contido na amostra. Em ambos os casos, a sequência de DNA ou RNA do controle interno é diferente daquela do DNA de *Vibrio harveyi*.

O controle da amostra interna pode ser uma sequência de gene de DNA ou RNA conservada ou presente de modo consistente nos materiais da amostra (por exemplo, tecido e hemolinfa de camarão). Os primers utilizados para amplificar o DNA ou RNA alvo ISC são selecionados tal que eles não amplificam o DNA de *Vibrio harveyi* e os primers teste de *Vibrio harveyi* são selecionados tal que eles não amplificam o controle da amostra interno dos alvos de DNA ou RNA. Deste modo, os alvos ISC e *Vibrio harveyi* amplificam independentemente. No teste, ambos os alvos ISC e o *Vibrio harveyi* são processados utilizando os mesmos reagentes e condições. Além disso, ambos os moldes alvo são amplificados utilizando os mesmos reagentes e condições de reação. Pelo fato do molde ISC e primers estarem presentes nas amostras teste, o produto ISC deve ser produzido durante a amplificação. Se o produto ISC não for formado, isto é um indicativo de que a química teste não funcionou

corretamente e os resultados do teste *Vibrio harveyi* estão incorretos e não devem ser confiados. A formação do produto ISC correta indica que a química teste funcionou corretamente e supõe-se que o processamento da amostra *Vibrio harveyi* e as reações teste funcionaram corretamente, tal que o teste

5 *Vibrio harveyi* pode ser interpretado mais precisamente.

Os primers ISC podem ser selecionados a partir das sequências de gene dos genes que codificam as proteínas estruturais, enzimas metabólicas ou produtos ribossomais das espécies do hospedeiro do patógeno que estão sujeitos às infecções de *Vibrio harveyi*. Por exemplo, os primers ISC

10 podem ser sequências de gene derivadas a partir do gene de actina do camarão, ou genes ribossomais 18S, 23S ou 5S do camarão, ou outros genes constitutivos nos organismos hospedeiros. Os exemplos apropriados dos pares de primer ISC incluem, mas não estão limitados a, SEQ ID Nos: 4 e 5 e SEQ ID Nos: 6 e 7, derivado a partir do gene de actina 1 do *Penaeus monodon*

15 (GenBank AF100986), conforme mostrado na Tabela 2.

**TABELA 2**

**CONTROLE DA AMOSTRA INTERNA (ISC) DAS SEQUÊNCIAS DE PRIMER**

Primer, direção	SEQ ID No:	Localização do gene de actina 1 (GenBank AF100986)
ActinF2, para frente	4	391 – 411
ActinR2, reverso	5	608 – 629
ActinF3, para frente	6	326 – 346
ActinR3, reverso	7	553 – 574

Em uma realização, pelo menos um par de primers ISC está incluso na mistura do reagente de amplificação do ácido nucléico de modo a

20 produzir um produto de controle da amostra interna na reação de amplificação. Em uma realização, pelo menos um par dos primers ISC é selecionado a partir do grupo que consiste nas SEQ ID Nos: 4 e 5 e SEQ ID Nos: 6 e 7.

Adicionalmente, o controle do molde interno (ITC) pode ser utilizado para trazer vantagem aos primers teste de *Vibrio harveyi* para auxiliar na quantificação da resposta teste. As exigências do primer para o ITC são similares àquelas dos primers ISC com a exceção de que ambos o molde ITC e os primers são adicionados à mistura do reagente de amplificação. Os primers ITC são selecionados tal que eles não amplificam o DNA ou RNA genômico a partir das espécies teste, tal como camarão, que estão sujeitos à infecção pelo *Vibrio harveyi*. O molde ITC é adicionado em uma concentração conhecida, tal que o número de cópias por reação é conhecido. Pelo fato do molde ITC estar incluso na mistura do reagente de amplificação, o produto ITC é fabricado durante a amplificação. A quantidade de produto ITC irá variar de reação para reação dependendo da eficiência de amplificação da reação e de outras variáveis. Uma vez que estas mesmas variáveis também afetam a amplificação do DNA do *Vibrio harveyi*, a quantidade do produto de *Vibrio harveyi* produzida estará proporcionalmente relacionada à quantidade do produto ITC produzido na reação. Portanto, o número de cópias do molde de *Vibrio harveyi* no teste pode ser deduzido a partir da proporcionalidade entre o ITC originalmente adicionado, o produto ITC formado e o produto *Vibrio harveyi* produzido. A formação relativa do produto pode ser determinada em unidades de CT quando as sondas internas marcadas são utilizadas ou pela derivação das curvas de fusão na temperatura de fusão respectiva do produto.

As sequências do primer ITC podem ser designadas racionalmente ou derivadas a partir das sequências de genes das espécies não testadas, tais como outras viroses ou genes de vegetais e animais que não estão presentes nas amostras teste. Deste modo, os materiais da amostra não contêm outros DNA ou RNA que poderiam ser amplificados pelos primers ITC.

Em uma realização, pelo menos um controle do molde interno e pelo menos um par de primers ITC estão inclusos na mistura do reagente de

amplificação do ácido nucléico de modo a produzir pelo menos um produto de ITC na reação de amplificação.

Uma variedade de métodos de detecção, que são bem conhecidos no estado da técnica, pode ser utilizada nos métodos descritos no presente. Estes métodos de detecção incluem, mas não estão limitados a, eletroforese em gel de não desnaturação padrão (por exemplo, acrilamida ou agarose), eletroforese em gel de gradiente de desnaturação, eletroforese em gel de gradiente de temperatura, eletroforese capilar e detecção de fluorescência.

Os métodos de detecção de fluorescência fornecem uma detecção rápida e sensível dos produtos da amplificação. A detecção da fluorescência também fornece a capacidade de detecção em tempo real, em que a formação dos produtos da amplificação é monitorada durante o processo de ciclagem térmica. Adicionalmente, a quantidade do alvo inicial pode ser quantificada utilizando a detecção por fluorescência. A detecção por fluorescência pode ser realizada pela adição de um agente fluorescente de ligação ao ácido nucléico na mistura de reação, antes ou após o processo de ciclagem térmica. De preferência, o agente fluorescente de ligação ao ácido nucléico é um corante de intercalação que é capaz de inserção não covalente entre os pares de base sobrepostos na dupla hélice do ácido nucléico. Entretanto, os agentes fluorescentes de ligação ao ácido nucléico não intercalantes também são apropriados. Os exemplos não limitantes dos agentes fluorescentes de ligação ao ácido nucléico úteis nos métodos da presente invenção são o brometo de etídio e o SYBR<sup>®</sup> Green I (disponível pela Molecular Probes; Eugene, OR). A adição do agente fluorescente de ligação ao ácido nucléico na mistura de reação antes da ciclagem térmica permite o monitoramento da formação dos produtos de amplificação em tempo real, conforme descrito por Higuchi (patente US 5.994.056). Os cicladores térmicos

capazes de realizar medidas de fluorescência em tempo real estão disponíveis comercialmente a partir de companhias, tais como Applied Biosystems (Foster City, CA), MJ Research (Waltham, MA) e Stratagene (La Jolla, CA). Seguinte à amplificação, a confirmação do produto de amplificação pode ser avaliada pela determinação da temperatura de fusão do produto utilizando os métodos conhecidos no estado da técnica, por exemplo, pela geração de uma curva de fusão utilizando a medida de fluorescência.

A detecção da fluorescência dos produtos da amplificação também pode ser realizada utilizando outros métodos conhecidos no estado da técnica, tais como a utilização de uma sonda marcada de modo fluorescente. A sonda compreende uma sequência complementar a pelo menos uma parte do produto de amplificação. Os exemplos não limitantes de tais sondas incluem as sondas TaqMan® (Applied Biosystems) e Molecular Beacons (Goel et al., *J. Appl. Microbiol.*, 99(3): 435 – 442 (2005)). Por exemplo, as sequências do gene para a construção das sondas marcadas de modo fluorescente, para a utilização com os primers de *Vibrio harveyi* descritos no presente, podem ser selecionadas pela análise dos genes do *Vibrio harveyi* e dos amplicons teste utilizando o software disponível comercialmente, tal como Primer Express® v2.0 (Applied BioSystems Inc., Foster City Califórnia), conforme descrito com detalhes nos Exemplos 6 e 7. As sequências das sondas são selecionadas para se incluírem nas extremidades proximais dos amplicons teste do *Vibrio harveyi* específico. As sequências de sonda apropriadas incluem, mas não estão limitadas, as sequências apresentadas na SEQ ID Nos: 8 e 9. As sondas podem ser marcadas de modo fluorescente utilizando os métodos conhecidos no estado da técnica, tais como aqueles descritos abaixo para marcar as sondas de hibridização. Para a detecção fluorescente em tempo real, as sondas podem ser duplamente marcadas. Por exemplo, a extremidade 5' da sonda pode ser marcada com um fluoróforo, tal como o 6FAM™ (Applied



BioSystems) e a extremidade 3' pode ser marcada com um corante silenciador, tal como o 6-carboxitetrametilrodamina (TAMRA). No caso de uma sonda de ligação no sulco secundário, a extremidade 3' pode ser marcada com um corante silenciador e um complexo ligante no sulco secundário. As sondas

5    marcadas de modo fluorescente podem ser obtidas a partir das fontes comerciais, tal como o Applied BioSystems.

Em uma realização, a presente invenção apresenta um método para a quantificação da quantidade de *Vibrio harveyi* em uma amostra. Nesta realização, o RNA é fornecido a partir de uma amostra suspeita de conter

10    *Vibrio harveyi*, conforme descrito acima. O DNA é amplificado com pelo menos um par de primers de oligonucleotídeo descrito no presente por ciclagem térmica entre pelo menos uma temperatura de desnaturação e uma temperatura de extensão na presença de um agente fluorescente de ligação ao ácido nucléico ou uma sonda marcada de modo fluorescente. A quantidade de

15    fluorescência gerada pelo agente fluorescente de ligação ao ácido nucléico ou a sonda marcada de modo fluorescente é medida durante a ciclagem térmica. A partir das medidas da fluorescência, o número de ciclos limite é determinado em que a quantidade de fluorescência gerada pelo agente fluorescente de ligação ao ácido nucléico ou a sonda marcada de modo fluorescente atinge um

20    valor limite fixo acima de um valor da linha de base. Um número limite do ciclo é referido no presente como o número ou valor CT. O número CT pode ser determinado manualmente ou determinado automaticamente pelo instrumento. Para determinar o número CT, a fluorescência da linha de base é determinada para cada amostra durante os ciclos de amplificação iniciais. Um algoritmo

25    matemático é então empregado para estabelecer o quanto uma mudança estatisticamente significativa na fluorescência seria necessária para que o sinal de fluorescência estivesse acima da base. O número de ciclos em que a fluorescência excede este limite é referido como o número CT. Tipicamente,

quanto mais DNA presente na amostra no início da ciclagem térmica, menor o número de ciclos será necessário para atingir o valor limite. Portanto, o número CT está inversamente relacionado com a quantidade inicial de *Vibrio harveyi* na amostra. Após o número CT para a amostra *Vibrio harveyi* ser determinado, a  
5 quantidade de *Vibrio harveyi* originalmente presente na amostra pode ser calculada pela comparação do número de ciclos limite determinado para o *Vibrio harveyi* na amostra com uma curva padrão do número de ciclos limite *versus* o logaritmo da concentração do molde determinado utilizando as soluções padrão de concentração conhecida, conforme é bem conhecido no  
10 estado da técnica.

#### **MÉTODOS DE HIBRIDIZAÇÃO DO ÁCIDO NUCLEÍCO**

Os componentes básicos de um teste de hibridização do ácido nucleíco para o *Vibrio harveyi* incluem uma sonda de DNA, uma amostra suspeita de conter *Vibrio harveyi* e um método de hibridização específico. As  
15 sondas da presente invenção são sequências de ácido nucleíco de fita simples que são complementares às sequências de ácido nucleíco para serem detectadas e são “hibridizáveis” às mesmas. Tipicamente, nos métodos de hibridização, o comprimento da sonda pode variar a partir de tão pouco quanto 5 bases à diversos quilobases e irá depender do teste específico a ser  
20 realizado. Apenas parte da molécula da sonda precisa ser complementar à sequência do ácido nucleíco a ser detectado. Em adição, a complementariedade entre a sonda e a sequência alvo não precisa ser perfeita. A hibridização ocorre entre moléculas imperfeitamente complementares com o resultado que certa fração das bases na região hibridizada não é pareada com  
25 a base complementar apropriada.

As sondas de DNA descritas no presente são derivadas a partir das sequências do primer diagnóstico de *Vibrio harveyi* descritas acima. Conforme utilizado no presente, a frase “derivada a partir das sequências do

primer diagnóstico de *Vibrio harveyi*” significa que as sondas de DNA podem ser as sequências do primer diagnóstico de *Vibrio harveyi*, as sequências do produto de amplificação obtidas a partir do mesmo utilizando um método de amplificação do ácido nucléico, partes das sequências do primer diagnóstico de *Vibrio harveyi* ou as sequências do produto de amplificação ou as sequências complementares completas de qualquer uma das sequências mencionadas acima. O termo “parte” conforme utilizado acima se refere a qualquer parte das sequências do primer diagnóstico de *Vibrio harveyi* ou dos produtos de amplificação obtidos a partir do mesmo que é menos de que a sequência completa. De preferência, o comprimento da porção para a utilização como uma sonda é de pelo menos 15 bases, de maior preferência, pelo menos cerca de 20 bases. Os exemplos não limitantes de sondas de DNA derivadas a partir das sequências do primer diagnóstico de WSSV incluem as sequências do primer diagnóstico de *Vibrio harveyi* dadas como as SEQ ID No: 1 e 2, as sequências do produto de amplificação dadas como SEQ ID No: 3 e suas sequências complementares completas.

A sonda pode ser marcada para facilitar a detecção. Os métodos para ligar os marcadores nas sondas de ácido nucléico são bem conhecidos no estado da técnica. Por exemplo, a sonda pode ser marcada durante a síntese pela incorporação dos nucleotídeos marcados. Alternativamente, a marcação da sonda pode ser realizada pela tradução estreita ou marcação final. A marca pode compreender um fluoróforo para a detecção da fluorescência, ou um ligante, tal como a biotina, que é detectada utilizando uma molécula de ligação marcada por enzima que se liga ao ligante (por exemplo, streptavidina marcada por enzima) subsequente à hibridização.

De modo a detectar a presença de *Vibrio harveyi* em uma amostra suspeita de conter *Vibrio harveyi*, o dNA é fornecido a partir da amostra, conforme descrito acima. A amostra de DNA é deixada disponível

para entrar em contato com a sonda antes que qualquer hibridização da sonda e a molécula alvo possa ocorrer. Portanto, o RNA deve estar livre da célula e colocado nas condições apropriadas antes que a hibridização possa ocorrer. Adicionalmente, em algumas realizações, pode ser desejável purificar o DNA para eliminar as proteínas, lipídeos e outros componentes celulares. Uma variedade de métodos de purificação do ácido nucléico, tal como a extração de fenol – clorofórmio, é conhecida pelos técnicos no assunto (Maniatis, *supra*). Adicionalmente, os kits estão disponíveis a partir de fontes comerciais para a extração e purificação do RNA, conforme descrito acima. A purificação da pré-hibridização é particularmente útil para os testes de hibridização do filtro padrão.

Em uma realização, os testes de hibridização podem ser realizados diretamente nos lisados celulares, sem a necessidade de extrair os ácidos nucléicos. Isto elimina as diversas etapas a partir do processo de manuseio da amostra e acelera o teste. Para realizar tais testes em lisados de células não processadas, um agente caotrópico é tipicamente adicionado nos lisados celulares preparados conforme descrito acima. O agente caotrópico estabiliza os ácidos nucléicos pela inibição da atividade da nuclease. Além disso, o agente caotrópico permite a hibridização sensível e rígida das sondas de oligonucleotídeos curtas no DNA em uma temperatura ambiente (Van Ness and Chen, *Nucl. Acids Res.*, 19: 5143 – 5151 (1991)). Os agentes caotrópico apropriados incluem o cloreto de guanidínio, tiocianato de guanidínio, tiocianato de sódio, tetracloroacetato de lítio, perclorato de sódio, tetracloroacetato de rubídio, iodeto de potássio e trifluoroacetato de cézio, entre outros. Tipicamente, o agente caotrópico está presente em uma concentração final de cerca de 3 M. Caso desejado, é possível adicionar formamida na mistura de hibridização, tipicamente, de 30 a 50% em volume.

Os métodos de hibridização são bem definidos e incluem os

métodos de hibridização da solução (isto é, homogênea) e da fase sólida (isto é, heterogênea). Tipicamente, a amostra de RNA é sondada (isto é, colocada em contato em condições que irão permitir a hibridização do ácido nucléico) com uma sonda derivada a partir as sequências do primer diagnóstico do *Vibrio* 5 *harveyi* descritas no presente. Isto envolve o contato da sonda e da amostra de DNA na presença de um sal inorgânico ou orgânico nas condições de concentração e temperatura apropriadas. A sonda e a amostra de ácidos nucléicos devem estar em contato por um tempo suficientemente longo, tal que qualquer hibridização possível entre a sonda e a amostra de ácido nucléico 10 possa ocorrer. A concentração da sonda ou alvo na mistura irá determinar o tempo necessário para a ocorrência da hibridização. Quanto maior a concentração da sonda ou do alvo, menor o tempo necessário de incubação da hibridização.

As diversas soluções de hibridização podem ser empregadas. 15 Tipicamente, estas podem compreender de cerca de 20 a 60% em volume, de preferência, 30% de um solvente orgânico polar. Uma solução de hibridização comum emprega cerca de 30 a 50% em volume de formamida, cerca de 0,15 a 1 M de cloreto de sódio, cerca de 0,05 a 0,1 M de tampões, tais como o citrato de sódio, Tris-HCl, PIPES ou HEPES (o pH varia de cerca de 6 a 9), cerca de 20 0,05 a 0,2% de detergente, tal como o dodecilsulfato de sódio (SDS), entre 0,5 e 20 mM de EDTA, FICOLL (Amersham Bioscience Inc., Piscataway, NJ) (peso molecular de cerca de 300 a 500 quilodaltons), polivinilpirrolidona (peso molecular de cerca de 250 a 500 quilodalton) e soroalbumina. Também podem estar inclusos em uma solução de hibridização típica os ácidos nucléicos de 25 veículo não marcado a partir de cerca de 0,1 a 5 mg/mL, DNA nucléico fragmentado (por exemplo, timo de bezerro ou DNA de esperma de salmão ou RNA de levedura) e, opcionalmente, de cerca de 0,5 a 2% em peso por volume de glicina. Outros aditivos também podem ser inclusos, tais como os agentes

de exclusão do volume que incluem uma variedade de agentes com capacidade de intumescer ou hidrossolúveis polares (por exemplo, polietileno glicol), polímeros aniônicos (por exemplo, poliacrilato ou polimetilacrilato) e polímeros de sacarídeo aniônicos (por exemplo, sulfato de dextrano).

5                   A hibridização de ácido nucléico é adaptável a uma variedade de formatos de teste. Um dos mais apropriados é o formato de teste do sanduíche. O teste do sanduíche é particularmente adaptável à hibridização nas condições não desnaturantes. Um componente principal de um teste do tipo sanduíche é um suporte sólido. O suporte sólido tem adsorvido a ele, ou acoplado  
10 covalentemente ao mesmo, uma sonda de captura de ácido nucléico imobilizado que não é marcada e é complementar a uma porção da sequência de DNA da amostra. As sondas particularmente úteis na presente invenção são aquelas derivadas a partir das sequências de diagnóstico do *Vibrio harveyi* presentes, conforme descrito acima. O DNA capturado é detectado utilizando  
15 uma segunda sonda que é marcada, conforme descrito acima, e é complementar a uma porção diferente da amostra da sequência de DNA. O marcador pode ser detectado utilizando os métodos conhecidos no estado da técnica (por exemplo, fluorescência, quimiluminescência, teste de enzima do par ligante e similares).

20                   Os métodos de hibridização também podem ser utilizados em combinação com os métodos de amplificação do ácido nucléico, tais como o PCR. Por exemplo, as presentes sequências de diagnóstico do *Vibrio harveyi* podem ser utilizadas como as sondas de detecção bloqueadas 3' em um formato de teste homogêneo ou heterogêneo. Por exemplo, uma sonda gerada  
25 a partir das presentes sequências pode ser 3' bloqueadas ou não participatória e não serão prolongadas por, ou participam de, uma reação de amplificação de ácido nucléico. Adicionalmente, a sonda incorpora um marcador que pode servir como um ligante reativo a age como um ponto de ligação para a

imobilização do híbrido da sonda/ analito ou como um repórter para produzir o sinal detectável. Conseqüentemente, o DNA genômico isolado a partir de uma amostra suspeita de acolher o *Vibrio harveyi* é amplificado pelos protocolos de amplificação direcionados por primer padrão na presença de um excesso da sonda de detecção 3' bloqueada para produzir os produtos da amplificação. Pelo fato da sonda ser 3' bloqueada, ela não participa ou interfere na amplificação do alvo. Após a amplificação do ciclo final, a sonda de detecção se anela na porção relevante do DNA amplificado e o complexo anelado é então capturado no suporte através do ligante reativo.

A presente sonda é versátil e pode ser designada em diversas formas alternativas. A extremidade 3' da sonda pode ser bloqueada na participação em uma reação de extensão do primer pela incorporação ou ligação de uma porção inibidora da replicação. As porções inibidoras da replicação típicas incluem, mas não estão limitadas a, didesoxinucleotídeos, 3' desoxinucleotídeos, uma sequência de nucleosídeos ou nucleotídeos não pareados, grupos 3' fosfato e agentes químicos, tais como a biotina, dinitrofenol, fluoresceína, rodamina e cadeias carbônicas. O inibidor da replicação é ligado covalentemente ao grupo 3' hidróxi do nucleotídeo 3' terminal da sonda não participatória durante a síntese química, utilizando a química do fosforamidita de cianoetila padrão. Este processo utiliza a química da síntese da fase sólida, em que a extremidade 3' é ligada covalentemente a um suporte insolúvel (vidro de poro controlado, ou "CPG") enquanto a cadeia recém sintetizada cresce no término 5'. Dentro do contexto da presente invenção, os 3-desoxiribonucleotídeos são os inibidores da replicação preferidos. A cordicepina (3-desoxiadenosina) é a de maior preferência. Uma vez que a cordicepina estará ligada na extremidade terminal 3' da sonda, a síntese é iniciada a partir da cordicepina ligada covalentemente ao CPG, 5-dimetoxitritil-N-benzoil-3-desoxiadenosina (cordicepin), 2-succinoil alquilamino

de cadeia longa CPG (Glen Research, Sterling, VA). O grupo dimetoxitritil é removido e o início da síntese de cadeia começa no grupo hidroxila 5' desprotegido da cordicepina de fase sólida. Após o término da síntese, a sonda de oligonucleotídeo é clivada do suporte sólido deixando um grupo hidroxila 2' livre na cordicepina ligada terminalmente ao 3'. Outros reagentes também podem ser ligados ao término 3' durante a síntese da sonda não participatória para servir como inibidores da replicação. Estes incluem, mas não estão limitados a, outras 3-desoxiribonucleotídeos, biotina, dinitrofenol, fluoresceína e digoxigenina. Os suportes CPG, derivatizados com cada um destes reagentes, estão disponíveis a partir de fontes comerciais (por exemplo, Glen Research, Sterling, VA; e Clontech Laboratories, Palo Alto, CA).

Alternativamente, a amplificação assimétrica pode ser utilizada para gerar uma fita complementar à sonda de detecção. As condições do PCR assimétrico para a produção do DNA de fita simples são similares às condições descritas acima para PCR; entretanto, as concentrações do primer são ajustadas tal que um primer está em excesso e o outro primer é limitante. É considerado que este procedimento aumentaria a sensibilidade do método. Este melhoramento na sensibilidade ocorreria pelo aumento do número de fitas simples disponíveis para a ligação com a sonda de detecção.

#### 20 AVALIAÇÃO DA INATIVAÇÃO DO *VIBRIO HARVEYI*

Os métodos para a detecção da presença e a quantificação da quantidade de *Vibrio harveyi* em uma amostra descrita no presente podem ser utilizados para avaliar a extensão da inativação do *Vibrio harveyi*. Por exemplo, os métodos descritos no presente podem ser utilizados em combinação com um tratamento químico para melhorar a saúde e o crescimento do camarão. Especificamente, durante a produção e o crescimento do camarão, as amostras tomadas das instalações de produção, ou as amostras tomadas do ambiente dos camarões foram amostradas e testadas quanto à presença do



*Vibrio harveyi* utilizando os métodos descritos no presente. Se o *Vibrio harveyi* for encontrado, as instalações e/ou o camarão podem ser tratados para matar ou controlar o vírus. Pelo fato da elevada sensibilidade do teste, o *Vibrio harveyi* pode ser detectado precocemente, antes da devastação e perda do cultivo. Portanto, a utilização dos métodos descritos no presente em combinação com a intervenção química pode aprimorar a eficiência de produção e o rendimento. Os exemplos de tratamentos químicos incluem, mas não estão limitados a, desinfetantes oxidativos, tais como o desinfetante Virkon® S (uma marca comercial registrada da E. I. Du Pont de Nemours and Co.), ácidos peracéticos, peróxido de hidrogênio, permanganato, monopersulfato de potássio, ácido hipocloroso, hipoclorito, iodo e similares; probióticos, imunoestimulantes, suplementos alimentares. Após o tratamento químico, o camarão pode ser amostrado e testado novamente para determinar se o tratamento foi bem sucedido na erradicação da bactéria.

#### KITS DE DETECÇÃO

Em outra realização, a presente invenção apresenta um kit para a detecção do *Vibrio harveyi* com base em um método de amplificação do ácido nucléico. O kit compreende um par das sequências do primer diagnóstico do *Vibrio harveyi*, conforme descrito acima. Adicionalmente, o kit pode ainda compreender pelo menos um dos seguintes reagentes: uma polimerase de DNA termoestável, uma mistura de quatro desoxinucleotídeos trifosfato diferentes, um agente de fluorescência de ligação ao ácido nucléico, pelo menos um par dos primers de controle da amostra interna, pelo menos um controle do molde interno e pelo menos um par dos primers de controle do molde interno, e uma sonda que compreende uma sequência complementar a uma porção de pelo menos uma região do ácido nucléico dentro do genoma *Vibrio harveyi* que é capaz de ser amplificado com as sequências do primer diagnóstico do *Vibrio harveyi* contidos no kit. Os primers e outros reagentes do

kit podem estar em diversas formas, tais como líquido, seco ou tablete e podem estar presentes em qualquer recipiente apropriado ou recipientes múltiplos, tais como frascos, tubos e similares.

Em outra realização, a presente invenção apresenta um kit para a  
5 detecção do *Vibrio harveyi* com base em um método de hibridização do teste do tipo sanduíche. Este kit compreende um primeiro componente para a coleção das amostras a partir de um camarão ou outro crustáceo suspeito de ter contraído o *Vibrio harveyi* e tampões para o espalhamento e a lise da amostra. Um segundo componente inclui meios na forma seca ou líquida para  
10 a hibridização dos ácidos nucleicos do alvo e da sonda, bem como para a remoção das formas indesejáveis e não hibridizadas por lavagem. Um terceiro componente inclui um suporte sólido (por exemplo, vara, grânulo e similares) sobre o qual é (são) fixada(s) (ou ao qual é conjugado) a(s) sonda(s) de ácido nucleico não marcada(s) que é (são) derivada(s) das sequências de primer  
15 diagnóstico de *Vibrio harveyi* isolado descritas no presente. Um quarto componente contém a sonda marcada que é complementar a uma segunda e diferente região da mesma fita de DNA à qual a sonda de ácido nucleico não marcada e imobilizada do terceiro componente é hibridizada. A sonda marcada também pode ser derivada a partir das sequências de primer diagnóstico de  
20 *Vibrio harveyi* isolado descritas no presente.

### EXEMPLOS

A presente invenção é ainda definida nos seguintes Exemplos. Deve ser entendido que estes exemplos, enquanto indicam as realizações preferidas da presente invenção, são dados apenas como meio de ilustração. A  
25 partir da discussão acima e destes Exemplos, um técnico no assunto pode certificar as características essenciais da presente invenção e, sem se desviar do seu espírito e escopo, pode realizar diversas mudanças e modificações da presente invenção para adaptá-la a diversos usos e condições.

O significado das abreviações é conforme segue: "s" significa segundo(s), "min" significa minuto(s), "hr" significa hora(s), "d" significa dia(s), "µL" significa microlitro(s), "mL" significa mililitro(s), "L" significa litro(s), "µM" significa micromolar, "mM" significa millimolar, "nM" significa nanomolar, "M" significa molar, "mmol" significa millimol(s), "µmol" significa micromol(s), "ng" significa nanograma(s), "fg" significa femtograma(s), "µg" significa micrograma(s), "mg" significa miligrama(s), "g" significa grama(s), "nm" significa nanômetro(s), "mU" significa milliunidade(s), "U" significa unidade(s), "rxn" significa reação(ões), "PCR" significa reação de polimerase em cadeia, "OD" significa a densidade óptica, "OD<sub>260</sub>" significa a densidade óptica medida em um comprimento de onda de 260 nm, "OD<sub>280</sub>" significa a densidade óptica medida em um comprimento de onda de 280 nm, OD<sub>280/260</sub>" significa a proporção do valor OD<sub>280</sub> para o valor OD<sub>260</sub>, "rpm" significa revoluções por minuto, "CT" significa o número do ciclo em que um desenvolvimento na fluorescência na reação excede o limiar de detecção e "SPF" significa livre do patógeno específico certificado.

#### **MÉTODOS GERAIS**

O DNA recombinante padrão e as técnicas de clonagem molecular utilizadas nos Exemplos são bem conhecidos no estado da técnica e descritos por Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989, por T. J. Silhavy, M. L. Bannan, and L. W. Enquist, *Experiments with Gene Fusions*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1984, e por Ausubel, F. M. et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Assoc, e Wiley- Interscience, N.Y., 1987.

As análises das sequências do genoma e do primer designado foram realizadas utilizando o Conjunto de Vetor<sup>®</sup> NTI disponível a partir InforMax Inc. (Bethesda, MD).

As enzimas e reagentes utilizados no presente foram adquiridos a partir dos seguintes fornecedores:

- Applied Biosystems, Foster City, CA: AmpliTaq (Catálogo No. N808-0160);

5                   - New England Biolabs, Beverly, MA: mistura de solução de desoxinucleotídeo (Catalog No. N0447S);

- Sigma Genosys, The Woodlands, TX: Oligonucleotídeos;

- Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA: 4% Agarose E-gels (Catalog No. G6018-02);

10                   - Qiagen, Valencia, CA: Proteinase K (Catálogo No. 19131); e

- RNase A, livre de DNase (Catálogo No. 19101).

Adicionalmente, os kits e reagentes foram adquiridos a partir dos seguintes fornecedores: SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA; Catálogo No. 4309155); e QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, 15 Valencia, CA; Catálogo No. 51304).

As seguintes linhagens bacterianas foram obtidas a partir da American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA:

- *Vibrio harveyi* ATCC 25919,

- *Vibrio harveyi* ATCC 14126,

20                   - *Vibrio splendidus* ATCC 33871,

- *Vibrio anguillarum* ATCC 43312,

- *Vibrio alginolyticus* ATCC 33839,

- *Vibrio penaeicida* ATCC 51842,

- *Vibrio proteolyticus* ATCC 53559,

25                   - *Escherichia coli* ATCC 25922,

- *Escherichia coli* ATCC 11229,

- *Bacillus subtilis* ATCC 82,

- *Pseudomonas fluorescens* Migula ATCC 700830.

As linhagens de *Vibrio* foram cultivadas em agar ou caldo Marine 2216 (DIFCO, Detroit, MI, Catálogo No. 279110) a 30° C com ou sem agitação.

As amostras de DNA de camarão foram obtidas a partir de Donald V. Lightner, Department of Veterinary Science and Microbiology, The University of Arizona, Tucson, AZ 85721, USA. Estes incluíam as amostras de DNA a partir do camarão livre de doença certificado (SPF) e do camarão infectado contendo baculovirose tipo *Penaeus monodon* (MBV), vírus da síndrome de Taura (TSV), vírus da síndrome da mancha branca (WSSV), vírus da cabeça amarela de *P. monodon* (YHV), vírus da Necrose Hipodérmica e Hematopoiética Infecciosa (IHHNV) e vírus da Mionecrose Infecciosa (IMNV). Adicionalmente, as amostras de DNA foram obtidas a partir do camarão cultivado comercial e a partir das linhagens de bactéria obtidas a partir da ATCC. Estas amostras de DNA foram preparadas utilizando o Qiagen QIAamp DNA Mini Kit utilizando os protocolos do fabricante.

### MOLDES E PRIMERS

As sequências de oligonucleotídeos de DNA para a síntese dos moldes de *Vibrio harveyi* sintéticos foram preparadas a partir do gene (LuxR) da proteína reguladora da bioluminescência de *Vibrio harveyi* (Número de Acesso ao GenBank M55260; Showalter et al., *J. Bacteriol.*, 172(6): 2946 – 2954 (1990)); e foram sintetizados utilizando a química da fosforamidita padrão ou obtidas comercialmente (Sigma Genosys Company, The Woodlands, TX). A concentração de DNA e o número de cópias dos alvos do molde sintético e as amostras foram medidas de modo espectrofotométrico a 260 nm (OD<sub>260</sub>). Os moldes foram diluídos em números de cópias específicas em água purificada e foram utilizados como controles positivos e padrões para a quantificação do teste. A Tabela 3 mostra o local no gene LuxR, a identificação da sequência e o comprimento do alvo molde. As sequências dos primers úteis para a detecção de *Vibrio harveyi* são dadas como a SEQ ID No: 1 e 2.

**TABELA 3****SEQUÊNCIAS DOS MOLDES**

Modelo	Tamanho (bp)	No SEQ ID	Localização no Gene LuxR de <i>Vibrio harveyi</i> (GenBank M55260)
VHLT	80	3	679 – 758

**ISOLAMENTO DO DNA**

Um Mini kit de DNA QIAamp foi utilizado para recuperar o DNA do tecido de camarão. O DNA total foi recuperado utilizando os reagentes do kit e os procedimentos do fabricante. Em geral, isto envolve a adição de 200 µL de um tampão de extração do kit (10 mM de tampão Tris-HCl, pH 8,5, 10 mM de EDTA, 100 mM de NaCl, 0,5% de dodecil sulfato de sódio e 250 µg/mL de proteinase K) a 20 mg de tecido de camarão em um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL. Os tecidos do camarão foram obtidos a partir das gelras ou pernas. Os tecidos foram rompidos no tampão de extração por trituração com um bastão fornecido pelo fabricante. Os conteúdos do tubo foram então encubados a 56° C por pelo menos 30 minutos até a amostra ser dissolvida. A amostra foi misturada em vórtex por 20 segundos. Então, 4 µL de RNase A (100 mg/ mL) foram adicionados ao tubo e a mistura de reação foi incubada por 2 minutos à temperatura ambiente. O kit de tampão de lise (200 µL) foi adicionado ao tubo e o tubo foi incubado a 70° C por 10 minutos. O etanol (200 µL) foi então adicionado e a solução foi misturada em vórtex. A solução foi então transferida para uma coluna de rotação e centrifugada a 8.000 x g por 1 minuto. Então, 500 µL de tampão de lavagem foi adicionado e a coluna de rotação foi centrifugada novamente a 8.000 rpm por 1 minuto. Após colocar a coluna de rotação em um tubo de coleta limpo, 500 µL do tampão de lavagem foi adicionado na coluna de rotação e ela foi centrifugada a 13.000 rpm por 4 minutos. Após colocar a coluna de rotação em um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL limpo, 100 µL do kit de tampão de eluição foi adicionado na coluna de

rotação. Após incubar à temperatura ambiente por 1 minuto, o tubo foi centrifugado a 8.000 rpm por 1 minuto. O eluato contendo o DNA foi coletado em um tubo de microcentrifuga de 1,5 mL. No material recuperado, a pureza do DNA foi avaliada pelas medidas de proporção de OD<sub>280/260</sub> convencionais e a quantidade de DNA foi determinada a partir das medidas de OD<sub>260</sub>. Em alguns casos, as amostras foram diluídas com água livre de Dnase para o teste.

### EXEMPLO 1

#### DEMONSTRAÇÃO DA AMPLIFICAÇÃO POR PCR DO DNA DE *VIBRIO HARVEYI*

##### UTILIZANDO UM ALVO SINTÉTICO

O propósito destes Exemplos era demonstrar a detecção dos moldes sintéticos de *Vibrio harveyi* utilizando as condições de amplificação do PCR e os primers descritos no presente.

Os padrões do molde foram preparados por diluições em série de 10 vezes dos moldes do *Vibrio harveyi* sintéticos (descritos acima) em água livre de DNase. Em geral, as concentrações do molde dos padrões variavam de 10<sup>5</sup> a 0 cópias/ 5 µL. Uma mistura principal foi preparada pela adição de 25 µL de Mistura Principal de SYBR Green PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA; Catálogo No. 4309155), com um volume de soluções padrão do primer suficiente para fornecer uma concentração final de 125 nM de primers *forward* e 62,5 nM de reversos, e o suficiente de água livre de DNase para constituir um volume final de 45 µL/ reação. A mistura principal foi mantida em gelo até sua utilização.

Para cada reação, 5 µL do padrão do molde foi primeiro adicionado nos poços de reação de PCR e então 45 µL da mistura principal foram adicionados. As reações foram então cicladas térmicas por 40 ciclos utilizando um programa de temperatura de 95° C por 15 segundos e 60° C por 1 minuto com uma etapa de desnaturação inicial de 95° C por 10 minutos. As amplificações foram realizadas em uma placa de reação de 96 poços óptica

MicroAmp utilizando o ciclador térmico ABI PRISM 7900 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Durante cada ciclo, a formação do produto de PCR foi detectada ao monitorar o aumento na fluorescência surgindo da interação do corante repórter SYBR<sup>®</sup> Green com os produtos de amplificação do DNA. Após o término do PCR, uma curva de dissociação (curva de fusão) foi gerada sobre o intervalo de 60° C a 95° C. Os dados foram analisados utilizando o software ABI PRISM 7900 SDS. Em adição, a formação do produto de PCR foi analisada por eletroforese em gel de agarose utilizando a agarose Egel a 4% (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA; Cat No. G6018-02) de acordo com os protocolos do fabricante do gel.

Os resultados resumidos na Tabela 4 demonstram que o produto amplicon de tamanho apropriado foi produzido quando o molde de *Vibrio harveyi* estava presente. O nível do molde mínimo detectável estava entre 1 e 10 cópias/ rxn. As amostras não contendo molde não produziram o produto detectável.

A amplificação (CT) e a formação do produto amplicon foram, respectivamente, inversamente e diretamente proporcionais ao logaritmo da concentração do molde de partida.

**TABELA 4**

**RESULTADOS DA AMPLIFICAÇÃO POR PCR UTILIZANDO UM ALVO SINTÉTICO**

Primer Forward, SEQ ID No	Primer Invertido, SEQ ID No	Modelo SEQ ID No	Tamanho do Produto (bp)	Menor Modelo Detectável (cópias/rxn)
1	2	3	80	1 a 10

**EXEMPLOS 2 E 3**

**DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE DNA DE *VIBRIO HARVEYI* A PARTIR DE CULTURAS DE BACTÉRIAS**

O propósito destes Exemplos foi demonstrar a detecção e a



quantificação do *Vibrio harveyi* utilizando o teste de PCR com os primers descritos no presente.

Nestes Exemplos, as diluições em série do DNA de *Vibrio harveyi* do molde sintético apropriado (descrito acima) que varia de  $10^5$  a  $10^0$  cópias por reação, foram amplificadas utilizando as condições determinadas no Exemplo 1. Uma curva padrão (não mostrada) foi gerada utilizando os valores CT determinados a partir de cada uma das concentrações do molde sintético ao plotar os valores CT, com 95% de intervalos de confiança, contra o logaritmo do número de cópias do molde inicial nos padrões. A inclinação desta curva (isto é, o CT *versus* a concentração do log) foi então utilizada para estimar as cópias do *Vibrio harveyi* em uma amostra desconhecida a partir de seus respectivos valores de CT.

O DNA genômico foi isolado a partir de duas linhagens de *Vibrio harveyi* (ATCC 25919 e ATCC 14126). O DNA extraído foi diluído em série em água purificada e utilizado para fornecer uma série de amostras que variam na concentração do DNA de 10 ng/  $\mu$ L a 1 pg/  $\mu$ L do DNA total. Os controles negativos incluíram uma água controle não contendo molde e duas amostras de DNA de camarão (50 ng/rxn) a partir de duas linhagens de camarão não infectado (SPF) (*Litopenaeus vannamei* e *Penaeus monodon*).

As amostras diluídas foram então amplificadas utilizando os primers da SEQ ID Nos: 1 e 2 e a amplificação, mistura principal, condições de ciclagem térmica e instrumento determinado no Exemplo 1. O valor CT para cada amostra de DNA diluída foi então avaliado a partir das reações de amplificação do PCR. As cópias do *Vibrio harveyi* nas amostras foram então estimadas a partir do valor de CT e a inclinação do padrão CT *versus* o log do gráfico da concentração do molde. Os produtos de PCR também foram analisados por eletroforese em gel de agarose, conforme descrito no Exemplo 1.

Os resultados estão resumidos na Tabela 5. Na Tabela, o número de cópia de *Vibrio harveyi* por reação é dado como a média de três replicatas. Os resultados indicam que o conjunto de primer produziu o tamanho do produto de amplicon correto a partir do DNA de *Vibrio harveyi* e detectou o DNA nas amostras. Os limites de detecção variaram de cerca de 2 cópias/ rxn a cerca de 25 cópias/ rxn do genoma de *Vibrio harveyi*. Nenhum produto de amplificação foi detectado na amostra de controle de água ou nas amostras de camarão SPF.

**TABELA 5****RESULTADOS DA DETECÇÃO DO DNA DE LINHAGEM DE *VIBRIO HARVEYI***

Exemplo	ATCC No.:	Genoma de <i>Vibrio harveyi</i> DNA/ rxn (ng)	CT	<i>Vibrio harveyi</i> cópias/ rxn
2	55919	10	17,6	251838
		1	21,2	19051
		0,1	25,2	2109
		0,01	28,9	193
		0,001	32,1	25
	nenhuma	0 (água)	> 40	0
		0 (DPF <i>L. vannamei</i> )	> 40	0
		0 (SPF <i>L. monodon</i> 50 ng)	> 40	0
3	14126	10	22,6	1097
		1	24,9	2406
		0,1	29,5	136
		0,01	32,8	16
		0,001	36,6	2
	nenhum	0 (água)	> 40	0
		0 (SPF <i>L. vannamei</i> (50 ng))	> 40	0
		0 (SPF <i>P. monodon</i> (50 ng))	> 40	0

#### **EXEMPLO 4**

##### **ESPECIFICIDADE DOS PRIMERS DE *VIBRIO HARVEYI***

O propósito deste Exemplo era demonstrar que os primers descritos no presente não amplificam o DNA isolado de outras bactérias ou DNA e RNA do camarão infectado com outros patógenos do camarão.

As amostras de DNA e RNA isoladas a partir do camarão infectado com MBV, WSSV, YHV, TSV, IHHNV, IMNV e SPF foram testados utilizando os primers e o método de PCR descrito nos Exemplos 2 e 3. Em adição, as amostras de DNA isoladas de outras linhagens de *Vibrio* (*Vibrio splendidus*, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio penaeicida* e *Vibrio proteolyticus*) e outras linhagens de bactéria não *Vibrio* (*Escherichia coli* (ATCC 25922), *Escherichia coli* (ATCC 11229), *Bacillus subtilis* (ATCC 82) e *Pseudomonas fluorescens* Migula (ATCC 700830)) foram testados utilizando os primers e o método de PCR descrito nos Exemplos 2 e 3.

Nenhuma amplificação por PCR foi observada no teste das amostras de DNA ou RNA do camarão a partir do camarão infectado com diversos patógenos do camarão nem quando o teste de outras espécies de *Vibrio* ou linhagens bacterianas não *Vibrio*. Estas descobertas reunidas demonstram que os primers de PCR de *Vibrio harveyi* e os métodos descritos no presente são seletivos para o *Vibrio harveyi* e suportam as conclusões de que os primers não reagem com o DNA do camarão, ou DNA e RNA das viroses do camarão, outras espécies de *Vibrio* ou outra bactéria.

#### **EXEMPLO 5**

##### **DETECÇÃO DO RNA DO *VIBRIO HARVEYI* EM UM CONTROLE DA AMOSTRA INTERNA**

##### **UTILIZANDO O PCR**

O propósito deste Exemplo era demonstrar que os primers de *Vibrio harveyi* descritos no presente podem ser utilizados em combinação com os primers do controle da amostra interna (ISC) para produzir um produto ISC

em adição ao produto *Vibrio harveyi*. Os resultados apresentados abaixo demonstram que os primers de ISC amplificam independentemente a amostra de DNA e não interferem na amplificação do DNA do *Vibrio harveyi*. A presença do produto ISC fornece um marcador que pode ser utilizado como uma  
5 indicação de que a amostra de DNA de quantidade e qualidade suficiente foi recuperada para o teste.

Os primers ISC foram derivados da sequência do gene para actina 1 de *Penaeus monodon* (GenBank: AF100986). De modo a promover a amplificação preferencial do amplicon *Vibrio harveyi*, os primers ISC foram  
10 designados para amplificar um a fragmento de DNA que era maior do que os amplicons teste de *Vibrio harveyi* alvo. As sequências do primer ISC são dadas como SEQ ID No: 4 e 5 e SEQ ID Nos: 6 e 7 (vide Tabela 2).

As amostras contendo o *Vibrio harveyi* e DNA de actina de camarão foram preparadas por diluições em séries de 10 vezes de uma  
15 preparação de DNA genômica obtida a partir de uma cultura de bactéria de *Vibrio harveyi* (ATCC 25919). O teor de DNA das amostras variou de 0,1 ng a 0,1 pg por reação. O DNA do camarão de *Penaeus monodon* genômico (10 ng/rxn) a partir de um camarão não infectado foi então adicionado em cada amostra de *Vibrio harveyi* e para as amostras controle negativo não contendo  
20 DNA de *Vibrio harveyi*.

Uma mistura de PCR principal foi preparada ao combinar 15 µL/ reação da Mistura Principal de SYBR® Green PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA; Catálogo No. 4309155) com um volume de soluções padrão do primer (20 µM para cada um dos primers *Vibrio harveyi* e 10 µM para cada um dos  
25 primers de actina) suficientes para fornecer uma concentração final de 125 nM para cada um dos primers de *Vibrio harveyi forward* e reverso (SEQ ID Nos: 1 e 2, respectivamente) e 32 nM para cada um dos primers da *forward* (ActinF3) e reverso (ActinR3) (SEQ ID Nos: 6 e 7), respectivamente. A água livre de DNase

foi adicionada para constituir um volume final de 25  $\mu$ L/reação. A mistura de reação foi mantida em gelo até o uso.

Para cada reação, 5  $\mu$ L das amostras foi primeiro adicionado nos poços de reação de PCR e, então, 25  $\mu$ L da mistura principal foi adicionada. As reações foram então cicladas térmica por 40 ciclos utilizando um programa de temperatura de 95° C por 15 segundos e 60° C por 1 minuto com uma etapa de desnaturação inicial de 95° C por 5 minutos. A amplificação foi realizada em uma placa de reação de 96 poços óptico MicroAmp utilizando o ciclador térmico ABI PRISM 7900 (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Durante cada ciclo, a formação do produto foi monitorada pelo valor CT determinado a partir do aumento na fluorescência surgindo da interação do corante repórter SYBR® Green com os produtos de amplificação do DNA, conforme descrito acima. Após 40 ciclos, uma curva de dissociação (curva de fusão) foi gerada sobre o intervalo de 60° C a 95° C. Os dados foram analisados utilizando o software ABI PRISM 7900 SDS. Em adição, a formação do produto de PCR foi analisada por eletroforese em gel de agarose utilizando 4% de agarose Egels (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA; Cat No. G6018-02) e os protocolos do fabricante do gel.

Os resultados obtidos utilizando o ISC ActinF3 (SEQ ID No: 6) e ActinR3 (SEQ ID No: 7) são mostrados nas Figuras 1A e 1B. Estas figuras demonstram a amplificação simultânea de ambos os alvos molde *Vibrio harveyi* e controle. O DNA do *Vibrio harveyi* específico produziu um produto de 80 bp com uma temperatura de fusão de 77° C. A actina ISC produziu um produto de 249 bp ( $T_m$  = 83,4° C). O produto *Vibrio harveyi* e os produtos do controle interno de actina foram detectados por ambas as análises da curva de fusão (Figura 1A) e eletroforese em gel (Figura 1B) com base nestes tamanhos e nas diferenças da temperatura de fusão. Em ambas a ausência do alvo *Vibrio harveyi* e em diversas concentrações do

alvo *Vibrio harveyi*, a formação do produto ISC foi detectada como um pico de temperatura de fusão único a 83,4° C (conforme mostrado na Figura 1A) e por eletroforese (conforme mostrado na Figura 1B). Em todas as amostras contendo o molde de *Vibrio harveyi*, o amplicon de *Vibrio harveyi* específico foi detectado por ambas a temperatura de fusão (T<sub>m</sub> = 77° C) e por eletroforese em gel. Estes resultados demonstram que o molde de ISC da actina co-amplifica com o molde de *Vibrio harveyi* e que a amplificação PCR e o limite de detecção do teste PCR (1 pg de DNA de *Vibrio harveyi*) não foi afetado pela presença do ISC.

#### EXEMPLOS 6 E 7

#### DETECÇÃO EM TEMPO REAL DO *VIBRIO HARVEYI* UTILIZANDO AS SONDAS MARCADAS DE MODO FLUORESCENTE

Estes exemplos demonstram que os primers de *Vibrio harveyi* descritos no presente podem ser utilizados com as sondas marcadas de modo fluorescente para a detecção em tempo real e a quantificação do *Vibrio harveyi*.

As sequências de gene para a construção das sondas marcadas de modo fluorescente foram selecionadas pela análise dos genes *Vibrio harveyi* e dos amplicons teste utilizando o software Primer Express<sup>®</sup> v2.0, adquirido pela Applied BioSystems Inc. (Foster City, CA 94404). As sequências da sonda foram selecionadas para serem incluídas nas extremidades proximais dos amplicons teste de *Vibrio harveyi* específicos e foram de 20 a 110 bases em comprimento, dependendo do tamanho e da sequência do amplicon. A preferência para as sequências de sonda foi dada para as regiões com um teor de G/C de 30 a 80% e com um teor de C maior do que de G, e sem 5' G. Em geral, as sequências da sonda foram selecionadas possuindo um T<sub>m</sub> de 8 a 10° C acima do T<sub>m</sub> respectivo dos primers teste. As sequências das sondas que

hibridizaram por cruzamento em outras espécies não foram selecionadas para a utilização. As sequências da sonda selecionadas para satisfazerem este critério estão listadas na Tabela 6.

Para a detecção em tempo real, as sequências da sonda foram duplamente marcadas. Duas abordagens de marcação diferentes foram empregadas. A extremidade 5' das sondas foi marcada com um fluoróforo (6FAM™, Applied Biosystems). A extremidade 3' foi marcada com um corante silenciador ou no caso da sonda de ligação ao sulco secundário (MGB), a extremidade 3' foi marcada com um corante silenciador ou um complexo do ligante de sulco secundário. As sondas marcadas foram preparadas e adquiridas comercialmente pela Applied BioSystems.

**TABELA 6**

**SEQUÊNCIAS DE SONDAS DE *VIBRIO HARVEYI***

Sonda	No SEQ ID	No GenBank	Localização	Rótulo 5'	Rótulo 3'
VHLPM	8	M55260	703 – 729	FAM <sup>1</sup>	MGB <sup>2</sup>
VHLPT	9	M55260	703 – 729	FAM	TAMRA <sup>3</sup>

<sup>1</sup>FAM é um reagente 6FAM™, Applied BioSystems;

<sup>2</sup>MGB é MGB™, Applied BioSystems;

<sup>3</sup>TAMRA é 6-carboxitetrametilrodamina.

Os padrões de molde foram preparados pelas diluições em série de 10 vezes dos moldes de *Vibrio harveyi* sintéticos (SEQ ID No.: 3) em água livre de DNase. Em geral, as concentrações do molde dos padrões variam de 10<sup>7</sup> a 0 cópias/μL. Uma mistura principal foi preparada pela combinação de 25 μL/ reação de Mistura TaqMan® Universal Master (Applied Biosystems, Foster City, CA; Catálogo No. 4326708) com um volume de soluções padrão do primer (20 μM para cada um dos primers de *Vibrio harveyi*) suficientes para fornecer uma concentração final de 250 nM para cada um dos primers *forward* e reverso

de *Vibrio harveyi* apropriado, conforme mostrado na Tabela 7, um volume da solução padrão da sonda para fornecer uma concentração final de 100 nM e água livre de DNase para constituir um volume final de 45 µL/ reação. A mistura principal foi mantida em gelo até o uso.

5                    Para cada reação, 5 µL da amostra padrão e então 45 µL da mistura principal foram adicionadas a cada poço de reação de PCR. As reações foram então cicladas térmica por 40 ciclos utilizando um programa de temperatura de 95° C por 15 segundos e 60° C por 1 minuto com uma etapa de desnaturação inicial de 95° C por 5 minutos. As amplificações foram realizadas  
10 em uma placa de reação de 96 poços óptica MicroAmp utilizando um ciclador térmico comercial (Idaho Technologies Inc., Salt Lake, UT ou Applied Biosystems, Foster City, CA). Durante cada ciclo, a formação do produto de PCR foi detectado ao monitorar a mudança na fluorescência surgindo da sonda marcada de modo fluorescente.

15                    Os dados foram analisados utilizando o software de ciclagem térmica. Em adição, a formação do produto de PCR foi analisada por eletroforese em gel de agarose utilizando a agarose Egels a 4% (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA; Cat No. G6018-02) utilizando os protocolos do fabricante.

20                    Os resultados, resumidos na Tabela 7, demonstram que o produto amplicon de tamanho apropriado foi produzido para cada conjunto de primer/sonda quando o molde de *Vibrio harveyi* apropriado estava presente. O nível do molde detectável mínimo estava entre 100 e 5.000 cópias/ rxn, dependendo dos primers e da sonda utilizada. As amostras não contendo o  
25 molde não produziram o produto detectável.

A amplificação (CT) e a formação do produto amplicon foram, respectivamente, inversamente e diretamente proporcionais ao logaritmo da concentração do molde de partida.



**TABELA 7****RESULTADOS PARA A AMPLIFICAÇÃO DO PCR UTILIZANDO UM ALVO SINTÉTICO**

Exemplo	Primer <i>forward</i> No SEQ ID	Primer reverso No SEQ ID	Modelo No SEQ ID	Sonda No SEQ ID	Tamanho do Produto (bp)	Menor Modelo Detectável (cópias/rxn)
6	1	2	3	8	80	5.000
7	1	2	3	9	80	100

**LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS**

<110> E.I. du Pont de Nemours and Co.  
 Ebersole, Richard

<120> Diagnóstico de sequências para patógenos do camarão

<130> CL3543

<160> 9

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Sequência Artificial

<220>  
 <223> Primer VHL1F

<400> 1  
 cacgtgatga agtatggcca tt 22

<210> 2  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Sequência Artificial

<220>  
 <223> Primer VHL1R

<400> 2  
 ggctttgatg aacatgtttt gc 22

<210> 3  
 <211> 80  
 <212> DNA  
 <213> Sequência Artificial

<220>  
 <223> Template VHLT

<400> 3  
 cacgtgatga agtatggcca ttattcgtga ccacaaaccg cactaaccaa cttctagtgc 60  
 aaaacatggt catcaaagcc 80

<210> 4  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Sequência Artificial

<220>  
 <223> Primer

<400> 4  
 cgaaaccttc aacacaccgc c 21

<210> 5  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Sequência Artificial

<220>  
 <223> Primer

<400> 5  
 cggtggtggt gaaggagtag cc 22

<210> 6  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Sequência Artificial

<220>  
 <223> Primer

<400> 6  
 gtcctcctta ctgaggctcc c 21

<210> 7  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Sequência Artificial

<220>  
 <223> Primer

<400> 7  
 gaggtcacga ccagccaagt cg 22

<210> 8  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Sequência Artificial

<220>  
 <223> exame de DNA

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Rotulado com FAM

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (27)..(27)  
 <223> Rotulado com MGB

<400> 8  
 tcgtgaccac aaaccgcact aaccaac 27

<210> 9

<211> 27  
<212> DNA  
<213> Sequência Artificial

<220>  
<223> exame de DNA

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(1)  
<223> Rotulado com FAM

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (27)..(27)  
<223> Rotulado com TAMRA

<400> 9  
tcgtgaccac aaaccgcact aaccaac

### REIVINDICAÇÕES

1. PAR DE SEQUÊNCIAS DO PRIMER DIAGNÓSTICO DE *Vibrio harveyi*, conforme apresentado na SEQ ID No: 1 e SEQ ID No: 2.

2. KIT PARA A DETECÇÃO DO *Vibrio harveyi*, que  
5 compreende o par de sequências do primer diagnóstico de *Vibrio harveyi*, conforme descrito na reivindicação 1.

3. KIT PARA A DETECÇÃO DO *Vibrio harveyi*, de acordo com a reivindicação 2, em que o kit compreende adicionalmente pelo menos um reagente selecionado a partir do grupo que consiste em uma polimerase  
10 termoestável, uma mistura de quatro desoxinucleotídeos trifosfato diferentes, uma molécula fluorescente de ligação ao ácido nucléico, pelo menos um par dos primers de controle da amostra interna, pelo menos um controle do molde interno e pelo menos um par dos primers de controle do molde interno, e uma sonda que compreende uma sequência complementar a uma porção de pelo  
15 menos uma região do ácido nucléico dentro do genoma *Vibrio harveyi* que é capaz de ser amplificado com pelo menos um par das sequências do primer diagnóstico do *Vibrio harveyi*.

4. MÉTODO PARA A DETECÇÃO DA PRESENÇA DO *Vibrio harveyi*, em uma amostra que compreende:

20 (i) fornecer o DNA a partir de uma amostra suspeita de conter *Vibrio harveyi*; e

(ii) examinar o DNA com uma sonda derivada da sequência do primer diagnóstico *Vibrio harveyi* isolado conforme apresentado na SEQ ID No.: 1 ou SEQ ID No.: 2 sob condições de hibridização apropriadas;

25 - em que a identificação de um fragmento de ácido nucléico hibridizável confirma a presença do *Vibrio harveyi*.

5. MÉTODO PARA A DETECÇÃO DA PRESENÇA DO *Vibrio harveyi*, em uma amostra, de acordo com a reivindicação 4, em que a sonda

derivada da sequência do primer diagnóstico de *Vibrio harveyi* isolado é selecionada a partir do grupo que consiste da SEQ ID No: 1, SEQ ID No: 2, SEQ ID No: 3, e suas sequências complementares completas.

5 6. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 4, em que a sonda contém uma porção de inibição da replicação na extremidade 3'.

7. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 6, em que a porção inibidora da replicação é selecionada a partir do grupo que consiste em didesoxinucleotídeos, 3' desoxinucleotídeos, uma sequência de nucleosídeos ou nucleotídeos não pareados, grupos 3' fosfato e agentes químicos.

10 8. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 7, em que o 3'-desoxinucleotídeo é a cordicepina.

9. MÉTODO PARA DETECTAR A PRESENÇA DE *Vibrio harveyi*, em uma amostra que compreende:

15 (i) fornecer o DNA a partir de uma amostra suspeita de conter *Vibrio harveyi*;

(ii) amplificar o DNA com um par das seqüências do primer diagnóstico de *Vibrio harveyi* conforme apresentadas na SEQ ID No: 1 e SEQ ID No: 2, tal que os produtos da amplificação são gerados;

20 - em que a presença dos produtos da amplificação confirma a presença do *Vibrio harveyi*.

10. MÉTODO PARA DETECTAR A PRESENÇA DE *Vibrio harveyi*, em uma amostra de acordo com a reivindicação 9, em que a amplificação de (ii) é realizada utilizando a reação de polimerase em cadeia.

25 11. MÉTODO PARA DETECTAR A PRESENÇA DE *Vibrio harveyi*, em uma amostra de acordo com a reivindicação 9, em que a amplificação de (ii) é realizada na presença de um agente fluorescente de ligação ao ácido nucléico ou uma sonda marcada de modo fluorescente e a presença dos produtos da amplificação é confirmada utilizando a detecção

fluorescente.

12. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 11, em que a sonda marcada de modo fluorescente é selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID No: 8 e SEQ ID No: 9.

5 13. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 9, em que pelo menos um par dos primers de controle da amostra interna está incluso na amplificação de (ii) para produzir um produto controle da amostra interna.

14. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 13, em que pelo menos um par dos primers de controle da amostra interna é selecionado a  
10 partir do grupo que consiste em SEQ ID Nos: 4 e 5 e SEQ ID Nos: 6 e 7.

15 15. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 9, em que pelo menos um par dos primers de controle do molde interno e pelo menos um controle do molde interno estão inclusos na amplificação de (ii) para produzir um produto controle do molde interno.

16. MÉTODO PARA A QUANTIFICAÇÃO DA QUANTIDADE DE *Vibrio harveyi*, em uma amostra que compreende:

(i) fornecer o DNA a partir de uma amostra suspeita de conter *Vibrio harveyi*;

(ii) amplificar o DNA com um par das seqüências do primer diagnóstico do *Vibrio harveyi* descritas na SEQ ID No. 1 e SEQ ID No:2 por  
20 ciclagem térmica entre pelo menos uma temperatura desnaturante e uma temperatura de extensão na presença de um agente fluorescente de ligação ao ácido nucléico ou uma sonda marcada com fluorescência;

(iii) medir a quantidade de fluorescência gerada pelo agente  
25 fluorescente de ligação ao ácido nucléico ou a sonda marcada com fluorescência durante a ciclagem térmica;

(iv) determinar um número de ciclo limite, em que a quantidade de fluorescência gerada pelo agente fluorescente de ligação ao ácido nucléico ou

a sonda marcada de modo fluorescente atinge um valor limite fixo acima de um valor da linha de base; e

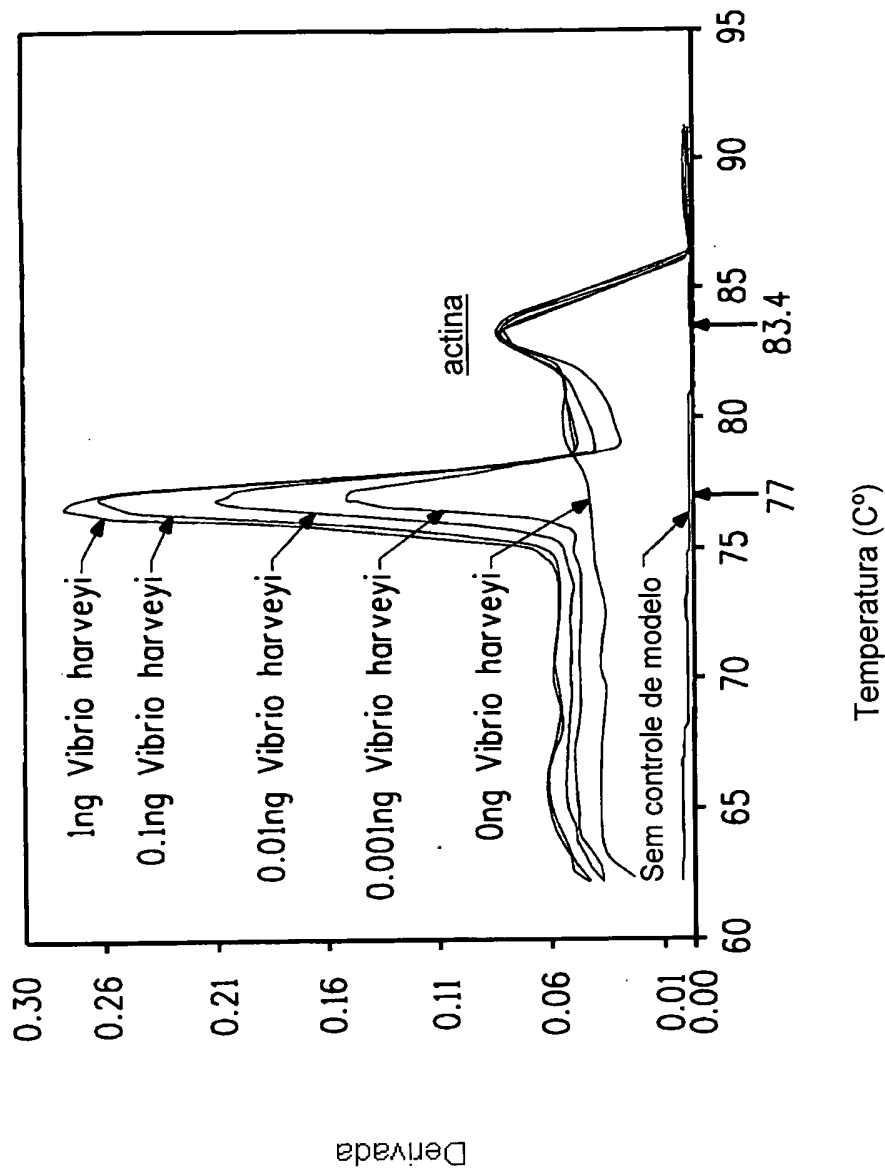
(v) calcular a quantidade do *Vibrio harveyi* na amostra pela comparação do número de ciclo limite determinado para o *Vibrio harveyi* na amostra com uma curva padrão do número de ciclo limite *versus* o logaritmo da concentração padrão determinada utilizando as soluções padrão de concentração conhecida.

17. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 16, em que a sonda marcada de modo fluorescente é selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID No: 8 e SEQ ID No 9.

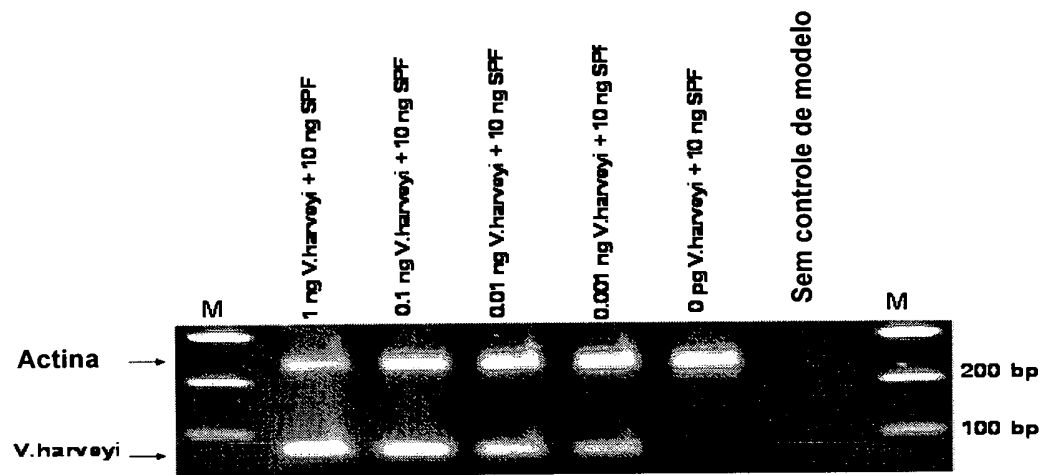
18. MÉTODO, de acordo com uma das reivindicações 4, 9 ou 16, em que o método é utilizado para avaliar a inativação do *Vibrio harveyi*.

19. MÉTODO, de acordo com uma das reivindicações 4, 9 ou 16, em que o método é utilizado em combinação com o tratamento químico para melhorar a saúde e o crescimento do camarão.





**Fig.1A**

**Fig.1B**

### **RESUMO**

**“PAR DE SEQUÊNCIAS DO PRIMER DIAGNÓSTICO DE *VIBRIO HARVEYI*, KIT PARA A DETECÇÃO DO *VIBRIO HARVEYI*, MÉTODOS PARA A DETECÇÃO DA PRESENÇA DO *VIBRIO HARVEYI* E MÉTODO PARA A QUANTIFICAÇÃO DA QUANTIDADE DE *VIBRIO HARVEYI*”**

A presente invenção se refere aos primers que foram isolados, sendo diagnóstico para a detecção do *Vibrio harveyi*. Os primers estão baseados em uma porção do gene de *Vibrio harveyi* LuxR e podem ser utilizados nos métodos de teste de amplificação direcionada do primer ou hibridização do ácido nucléico.