

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

| | |
|--|--|
| (22) Data de pedido: 1996.01.15 | (73) Titular(es): INSTITUT PASTEUR 25-28, RUE DU DOCTEUR ROUX 75724 PARIS CEDEX 15 FR |
| (30) Prioridade(s): 1995.01.16 FR 9500410 | INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM) FR |
| (43) Data de publicação do pedido: 2005.06.08 | (72) Inventor(es): MURIEL LE GUERN FELLOUS FR MICHEL YVAN POPOFF FR |
| (45) Data e BPI da concessão: 2011.02.02 088/2011 | (74) Mandatário: MARIA SILVINA VIEIRA PEREIRA FERREIRA RUA CASTILHO, N.º 50, 5º - ANDAR 1269-163 LISBOA PT |

(54) Epígrafe: **OLIGONUCLEÓTIDO PARA A DETECÇÃO DE SALMONELA**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO TEM POR OBJECTIVO MEIOS NOVOS QUE INCLUEM SEQUÊNCIAS DE NUCLEÓTIDOS, PARA A DETECÇÃO NOMEADAMENTE APÓS AMPLIFICAÇÃO, DE ADN OU DE ADNC DE S. ENTÉRICA E/OU S. BONGORI. A PRESENTE INVENÇÃO REFERE-SE NOMEADAMENTE AOS OLIGONUCLEÓTIDOS REPRESENTADOS EM SEGUIDA. IAGL: 5'-TA TTA AGT ATG CAG GTT ATG - 3' IAG2: 5'-AGA GAA TTT CTG GAA AGT GAA- 3' IAG3: 5'-ATA TCC ACG CAG GAA ATA ACA GGA CTT -3' IAG4: 5'-GAG CGT GCC TTA CCG ACG ATA-3' IAG5: 5'-GCA GGG ATC ACT AAG CTG TG-3' IAG6: 5'-CGT GGG CAA CCA GCA CTA ACG-3' SLM1: 5'-CG GGT TAA AGG TTA TCA CCT-3' SLM2: 5'-AG CAT GGC GCA AAT GGG-3' SLM3: 5'-GCA CCA GGA AAG CAT TAA GTT GAT AGA ACA C-3' SLM4: 5'-CTT CGC TGG GAC ACA AAG CA-3' SS28: 5'-TAA TGC TTT CCT GGT GC-3'. IAG7: 5'-T ACG GCA TGG GCT GAT TGC T-3' IAG8: 5'-T TAC GCT ATC GCC CAG CAG CAG GA-3' IAG9: 5'-T GGT CAT AAC CGA GAT GGT TCA ACC GAT C-3' IAG10: 5'-A CAG TTG TTA CAG GAT CCC T-3'.

RESUMO

"OLIGONUCLEÓTIDO PARA A DETECÇÃO DE SALMONELLA"

A presente invenção tem por objectivo meios novos que incluem sequências de nucleótidos, para a detecção nomeadamente após amplificação, de ADN ou de ADNc de S. entérica e/ou S. bongori. A presente invenção refere-se nomeadamente aos oligonucleótidos representados em seguida.

Iag1: 5'-TA TTA AGT ATG CAG GTT ATG - 3'
Iag2: 5'-AGA GAA TTT CTG GAA AGT GAA- 3 '
Iag3: 5'-ATA TCC ACG CAG GAA ATA ACA GGA CTT -3'
Iag4: 5'-GAG CGT GCC TTA CCG ACG ATA-3'
Iag5: 5'-GCA GGG ATC ACT AAG CTG TG-3'
Iag6: 5'-CGT GGG CAA CCA GCA CTA ACG-3'
S1m1: 5'-CG GGT TAA AGG TTA TCA CCT-3'
S1m2: 5'-AG CAT GGC GCA AAT GGG-3'
S1m3: 5'-GCA CCA GGA AAG CAT TAA GTT GAT AGA ACA C-3'
S1m4: 5'-CTT CGC TGG GAC ACA AAG CA-3'
SS28: 5'-TAA TGC TTT CCT GGT GC-3'.
Iag7: 5'-T ACG GCA TGG GCT GAT TGC T-3'
Iag8: 5'-T TAC GCT ATC GCC CAG CAG CAG GA-3'
Iag9: 5'-T GGT CAT AAC CGA GAT GGT TCA ACC GAT C-3'
Iag10: 5'-A CAG TTG TTA CAG GAT CCC T-3'

DESCRIÇÃO
"OLIGONUCLEÓTIDO PARA A DETECÇÃO DE SALMONELA"

O género salmonela contém duas espécies, a salmonela entérica, espécie que se divide em seis subespécies, com base em características bioquímicas e homologias ao nível do AND e a salmonela bongori. O género subdivide-se em mais de 2000 serovarietades definidas pelos antigénios somáticos e flagelares. As bactérias do género salmonela são em geral patogénicas para o animal ou para o homem. Sabe-se que as salmonelas estão entre os agentes responsáveis pelas intoxicações alimentares mais vulgares nos países desenvolvidos, por isso são importantes métodos de detecção rápidos e fiáveis das subespécies da salmonela.

As salmonelas responsáveis pelas toxi-infecções alimentares pertencem na sua maioria à subespécie I (também chamado grupo I) de S. entérica

No entanto, as toxi-infecções não são as únicas patologias provocadas pelas infecções por salmonela.

Por exemplo, a salmonela entérica, subespécie entérica da sub-variedade typhi (doravante designada Typhi) é o agente causador da febre tifóide humana.

Tendo em conta a natureza das infecções provocadas pelas salmonelas e a necessidade de investigar especialmente a sua presença nas amostras biológicas recolhidas de pacientes ou alimentos constata-se que é indispensável dispor de meios rápidos e eficazes para detectar a sua presença.

Os métodos correntes de cultura, largamente utilizados até ao presente para a detecção das salmonelas, necessitam de um período considerável e não estão adaptados, por exemplo, para seguir a contaminação de produtos alimentares. Para ultrapassar as desvantagens destes métodos, foram já propostos vários outros métodos baseados em técnicas da biologia molecular, tais como os testes de hibridação e os testes de reacção de polimerização em cadeia. Foram utilizadas diferentes sondas de ADN em numerosos protocolos de hibridação e de PCR para detectar as subespécies de salmonela na alimentação. No entanto, nenhuma destas técnicas é completamente satisfatória, visto que as sequências utilizadas não são totalmente conhecidas ou não estão exclusivamente presentes no género salmonela e, assim, podem conduzir a reacções cruzadas entre a sonda e as sequências de ADN de outras enterobactérias ou podem conduzir a um grande número de falsos negativos ou de falsos positivos.

Os inventores investigaram os meios que permitam a detecção específica e eficaz do conjunto das salmonelas das espécies S. entérica e/ou S. bongori. Deste ponto de vista, interessaram-se pela estirpe salmonela entérica, subespécie entérica, serovariedade typhi (S. Typhi) e pelo gene que toma parte na invasão das células pela S. Typhi.

Além disso, definiram determinadas condições que permitem a detecção específica de determinados grupos de salmonelas, por exemplo as bactérias do grupo I.

Já se mostrou, no estado anterior da técnica, que a estirpe Typhi é capaz de aderir às monocamadas das células HeLa e de penetrar nas células (Yabuuchi *et al.*, 1986) No entanto,

até hoje, os determinantes genéticos implicados no processo de adesão e de penetração nas células não foram claramente identificados. Elsinghorst *et al.* (1989) clonaram um fragmento cromossómico de Typhi que confere às bactérias do tipo Escherichia coli a capacidade de penetrar nas células Henle 407. Recentemente, identificou-se e clonou-se uma outra região cromossómica implicada na invasão das células HeLa pela estirpe Typhi Ty2 (Popoff e Dion, 1990).

Os inventores do presente pedido de patente identificaram num fragmento de ADN de 2,4 kb de S. typhi, incluído na sequência HindIII de 7,9 kb, descrito por Popoff e Dion (1990), regiões susceptíveis de participar na actividade invasiva da salmonela entérica, subespécie entérica, serovariedade Typhi nas células e em particular nas culturas de células do tipo HeLa, regiões essas que, por outro lado eram susceptíveis de ser utilizadas nas reacções para a realização de um diagnóstico geral de todos os representantes das espécies S. entérica e/ou S. bongori ou eventualmente nas condições de detecção particulares para o diagnóstico específico do grupo I de S. entérica.

Uma sequência designada por IagA e uma sequência designada IagB foram identificadas pelos inventores e caracterizadas como participantes na invasão celular que se manifesta no caso de uma infecção devido à salmonela entérica, subespécie entérica, serovariedade Typhi.

A especificidade destas sequências no seio da S. Typhi levou os inventores a propor a sua utilização na definição dos meios de diagnóstico de uma infecção por S. typhi, seja para o diagnóstico de uma infecção pela salmonela da

espécie S. entérica e/ou S. bongori ou, nalguns casos, para a detecção de S. entérica de grupos específicos.

Estes meios utilizáveis para o diagnóstico de uma infecção pela salmonela entérica e/ou salmonela bongori, incluem oligonucleótidos susceptíveis de serem aplicados nas reacções de amplificação de sequências de nucleótidos, por exemplo reacções de polimerização em cadeia. O presente pedido de patente descreve também sondas para a detecção de ácidos nucleicos de S. entérica ou de uma subespécie específica de S. entérica e/ou de S. bongori, sendo eventualmente estes ácidos nucleicos fragmentos amplificados.

A presente invenção tem igualmente como objectivo um conjunto e um método de detecção da presença de salmonela entérica e de salmonela bongori nas amostras biológicas e, por exemplo nos produtos alimentares ou em todas as amostras que forem objecto de um diagnóstico clínico. Outros métodos e conjuntos de detecção são específicos de estirpes do grupo I da S. entérica. Esses outros métodos permitem, pelo contrário, procurar a presença de bactérias S. entérica ou S. bongori do género salmonela. O género salmonela comporta, assim, seis subespécies ou grupos I, II, III, IV, V ou VI. As subespécies I, II, III, IV e VI pertencem à espécie S. entérica e a subespécie V pertence à espécie S. bongori. O presente pedido de patente descreve também as sequências de nucleótidos que tomam parte na invasão de células pela salmonela entérica, subespécie entérica, serovariedade Typhi, caracterizadas por se tratar de uma das sequências IagA ou IagB respectivamente incluídas entre os nucleótidos 97 e 1755 da sequência

representada na figura 1 (IagA) e entre os nucleótidos 1776 e 2255 da sequência representada na figura 1 (IagB).

O presente pedido de patente descreve também as sequências de nucleótidos modificados em relação a IagA ou IagB, mas que no entanto têm as mesmas propriedades no que diz respeito à invasão de células, ou hibridação em condições estritas com uma das sequências referidas acima.

O presente pedido de patente descreve igualmente as proteínas IagA ou IagB correspondentes às sequências apresentadas na figura 1 ou variantes dessas sequências obtidas por mutação, deleção ou adição de ácidos aminados, desde que a sequência resultante seja reconhecida por anticorpos dirigidos contra uma das sequências referidas acima IagA ou IagB.

Em geral, a presente invenção tem como objecto toda a sequência de ácidos aminados codificada pelos genes IagA e IagB, representados na figura 1.

A invenção refere-se por outro lado a todos os fragmentos de uma dessas sequências, em particular a todos os fragmentos sob forma purificada, suficientes para conservar a S.typhi as suas propriedades de adesão e de infecção de células, e em particular das células HeLa em cultura.

O processo de infecção das células HeLa em cultura é o processo padrão que foi descrito, principalmente no pedido de patente internacional, publicado com o número WO 92/01056.

De acordo com um outro aspecto, a presente invenção refere-se aos meios para a detecção da presença de S. entérica e/ou S. bongori e eventualmente para a quantificação de S. entérica e/ou S. bongori em amostras biológicas.

Por amostras biológicas entendem-se todas as amostras recolhidas para a realização de análises in vitro, em animais ou seres humanos ou recolhidas a partir de produtos alimentares, seja qual for a natureza ou a partir de todo o meio líquido, sólido ou gasoso susceptível de conter os agentes patogénicos em investigação.

A presente invenção tem como objecto neste contexto, uma sequência de nucleótidos, composta por pelo menos 9 nucleótidos, caracterizada por estes se hibridarem com umas das sequências IagA ou IagB apresentadas acima.

As condições de hibridação são definidas em função da especificidade de hibridação investigada e as condições adequadas são dadas a título indicativo nos exemplos do presente pedido de patente.

A presente invenção utiliza oligonucleótidos a partir da parte C-terminal da sequência IagA representada na figura 1.

As sequências do tipo oligonucleótido podem ser seleccionadas para serem utilizadas como iniciadores tanto para a detecção por amplificação do ADN genómico ou do ADNc de salmonela da espécie S. entérica e/ou da espécie S. bongori, pertencente aos outros grupos I a VI.

Podem-se principalmente tratar de sequências de nucleótidos obtidas por meio da síntese química, de acordo com os métodos conhecidos dos técnicos da especialidade.

Os oligonucleótidos preferidos, utilizáveis para a amplificação do ácido nucleico característico das bactérias que pertencem a um dos grupos I, II, IIIa, IIIb, IV, V ou VI do género salmonela e principalmente o ADN gnómico ou o ADNc de S. entérica e/ou S. bongori são, por exemplo, os seguintes (está indicada a sua posição dentro da sequência IagA representada na figura 1):

| | posição |
|---|----------------|
| Iag1: 5'-TA TTA AGT ATG CAG GTT ATG - 3' | 1424-1443 |
| Iag2: 5'-AGA GAA TTT CTG GAA AGT GAA- 3' | 1585-1605 |
| Iag3: 5'-ATA TCC ACG CAG GAA ATA ACA GGA CTT -3' | 1495-1521 |
| Iag4: 5'-GAG CGT GCC TTA CCG ACG ATA-3' | 1564-1584 |
| Iag5: 5'-GCA GGG ATC ACT AAG CTG TG-3' | 1318-1337 |
| Iag6: 5'-CGT GGG CAA CCA GCA CTA ACG-3' | 1637-1657 |
| Também os oligonucleótidos | |
| S1m1: 5'-CG GGT TAA AGG TTA TCA CCT-3' | 709-728 |
| S1m2: 5'-AG CAT GGC GCA AAT GGG-3' | 1014-1031 |
| S1m3: 5'-GCA CCA GGA AAG CAT TAA GTT GAT AGA ACA C-3' | 732-762 |
| S1m4: 5'-CTT CGC TGG GAC ACA AAG CA-3' | 823-842 e |
| SS28: 5'-TAA TGC TTT CCT GGT GC-3' | são divulgados |

Outros oligonucleótidos susceptíveis de serem utilizados como iniciadores para a amplificação do ADN ou do ADNc do gene IagB de todas as estirpes de salmonela da espécie S. entérica e/ou S. bongori foram definidos a partir da sequência IagB representada na figura 1.

O presente pedido de patente descreve assim os oligonucleótidos correspondentes às seguintes sequências:

Iag7: 5' - T ACG GCA TGG GCT GAT TGC T - 3'

Lag8: 5' - T TAC GCT ATC GCC CAG CAG CAG GA- 3'

Iag9: 5' - T GGT CAT AAC CGA GAT GGT TCA ACC GAT C -3'

Iag10: 5' - A CAG TTG TTA CAG GAT CCC T.- 3'

Estes oligonucleótidos podem igualmente ser utilizados como sondas, por exemplo, para a detecção dos produtos da amplificação do ADN e/ou do ADNc de S. entérica e/ou S. bongori.

Um par de iniciadores preferidos para a realização da amplificação do ácido nucleico de S. entérica e/ou S. bongori, seja qual for o grupo a que pertence a bactéria, é formado, por exemplo, pelos iniciadores Iag5 (sens) e Iag6 (antisens).

Este par de iniciadores dirige a amplificação de um fragmento de ácido nucleico de 340 bp.

Um outro par de iniciadores é constituído pelos iniciadores S1m1 (sens) e S1m2 (antisens). Os iniciadores podem ser hibridados com o ADN ou o ADNc de bactérias S. entérica e/ou S. bongori de um dos grupos I, II, III, IV, V ou VI.

Oligonucleótidos utilizáveis como iniciadores para a detecção específica de salmonela entérica grupo I desde que as condições de detecção após amplificação do ADN ou do ADNc sejam as descritas no exemplo I.

Estes iniciadores são caracterizados pela sua capacidade de amplificar as sequências do ácido nucleico das estirpes de S. entérica ou de S. bongori representativas dos grupos I, II, III, IV, V e VI, desde que as condições de detecção

sejam as expostas no exemplo I, permitindo apenas a detecção das bactérias do grupo I.

Um par de oligonucleótidos que podem ser utilizados para este fim, enquanto iniciadores específicos para a detecção de sequências de ADN ou de ADNc de S. entérica do grupo I, é constituído por exemplo pelas sequências seguintes:

SS2 5' - CCGGGCAGATGATACCC - 3' e

SS28' - TAATGCTTTCCTGGTGC - 3'.

Os oligonucleótidos definidos pelos inventores permitem prever o diagnóstico de S. entérica e S. bongori em condições satisfatórias de eficácia e rapidez, de facilidade e de especificidade.

A presente invenção tem igualmente como objectivo um conjunto para a detecção de S. entérica e/ou S. bongori por meio de amplificação do ADN genómico ou complementar de S. entérica e/ou S. bongori, caracterizado por compreender:

- os oligonucleótidos descritos anteriormente, capazes de hibridar nas condições estritas com o ADN genómico ou o ADNc de S. entérica e/ou S. bongori,
- uma sonda para a detecção dos fragmentos amplificados que correspondam a uma das definições dadas nas páginas anteriores,
- os reagentes necessários para a realização da reacção de amplificação.

O presente pedido de patente descreve a utilização dos oligonucleótidos anteriormente referidos como iniciadores para a amplificação de uma sequência do ADN ou do ADNc de

Salmonela entérica e/ou Salmonela bongori, compreendida numa das sequências IagA ou IagB, tal como descrito nas páginas anteriores ou complementares de uma tal sequência, ou ainda à utilização desses oligonucleótidos como sondas para a detecção de uma sequência de oligonucleótidos amplificados.

A presente invenção tem assim, em particular, como objecto a utilização de um par de iniciadores oligonucleótidos tal como definido na reivindicação 1 para a amplificação de uma sequência de ADN ou de ADNc de salmonela entérica e de salmonela bongori ou ainda a utilização destes oligonucleótidos como sonda para a detecção de uma sequência de nucleótidos amplificados.

Por exemplo, os oligonucleótidos Iag5 e Iag6 podem ser utilizados respectivamente como iniciadores sens e antisens para a detecção de S. entérica e S. bongori do grupo I, II, III, IV, V ou VI. Fora do âmbito das reivindicações o par de iniciadores S1m1 e S1m2 podem ser utilizados para a detecção de bactérias da espécie S. entérica e/ou S. bongori de um destes grupos numa amostra biológica.

É divulgada a utilização dos oligonucleótidos SS2 e SS28 para a detecção específica in vitro numa amostra biológica de S. entérica do grupo I.

A detecção é específica na medida em que os iniciadores utilizados para a amplificação das sequências de nucleótidos investigadas permitem a amplificação de bactérias S. entérica e S. bongori pertencentes a um dos outros grupos II, III, IV, V ou VI, mas as condições estabelecidas não permitem a detecção das bactérias destes

mesmos grupos ou de organismos diferentes susceptíveis de estar presentes na amostra biológica testada.

O presente pedido de patente descreve assim um conjunto de oligonucleótidos utilizáveis para a detecção de bactérias S. entérica e/ou S. bongori após a amplificação do ADN genómico ou complementar de S. entérica e/ou S. bongori, caracterizado por compreender:

- um par de oligonucleótidos que corresponda às definições previamente dadas, capaz de hibridar nas condições estritas com o ADN genómico ou o ADNc de S. entérica e/ou S. bongori,
- uma sonda que corresponda às definições dadas acima.

Um primeiro conjunto de oligonucleótidos utilizáveis para a detecção in vitro numa amostra biológica, de estirpes de salmonela entérica e/ou S. bongori pertencentes a um dos grupos I, II, III, IV, V ou VI é caracterizado por conter os seguintes oligonucleótidos:

- a sequência Iag5 (5'-GCA GGG ATC ACT AAG CTG TG-3' e a sequência Iag6 (5'-CGT GGG CAA CCA GCA CTA ACG-3') utilizáveis como iniciadores da amplificação e
- a sequência Iag3 (5'-ATA TCC ACG CAG GAA ATA ACA GGA CTT -3') utilizável como sonda de revelação e
- a sequência Iag4 (5'-GAG CGT GCC TTA CCG ACG ATA-3') utilizável como sonda de captura.

Um outro conjunto de oligonucleótidos utilizáveis para a detecção específica in vitro numa amostra biológica de S. entérica do grupo I é caracterizado por incluir os seguintes oligonucleótidos:

SS2 (5'-CCGGGCAGATGATACCC-3'e
SS28 ('-TAATGCTTTCCTGGTGC-3').

O presente pedido de patente descreve ainda uma proteína IagA codificada pela sequência de nucleótidos IagA representada na figura 1 e uma proteína IagB codificada pela sequência de nucleótidos IagB representada na figura 1.

As proteínas IagA e IagB possuem respectivamente as sequências de ácidos aminados representados na figura 1.

O presente pedido de patente descreve igualmente um processo para a detecção *in vitro* numa amostra biológica, de sequências de nucleótidos salmonela entérica e/ou S. bongori, previamente amplificados por exemplo por PCR, caracterizado por incluir as fases de:

- desnaturação da sequência de S. entérica e/ou S. bongori amplificada,
- estabelecimento de contacto das sequências de nucleótido amplificadas, desnaturadas de S. entérica e/ou S. bongori com uma sonda de captura e uma sonda de revelação, obtidas a partir dos oligonucleótidos definidos anteriormente, em condições que permitam uma hibridação das sondas de captura e de revelação anteriormente mencionadas com a sequência de nucleótidos amplificada, anteriormente mencionada, de S. entérica e/ou S. bongori, sendo a sonda de captura fixada à superfície de um alvéolo de uma placa de microtitulação e sendo a sonda de revelação marcada e liberta num tampão de hibridação apropriado;
- incubação da mistura reaccional por tempo suficiente para permitir a reacção de hibridação;

- lavagem para eliminar os oligonucleótidos que não reagiram;
- revelação das sondas de revelação que hibridaram com as sequências de nucleótidos amplificadas.

O processo de detecção anteriormente descrito pode ser caracterizado de modo vantajoso por a detecção ser realizada de acordo com as seguintes fases:

- desnaturação de um volume de 10 μ l da sequência amplificada por meio da adição, volume a volume, de uma solução de 200 mM NaOH, 40 mM EDTA,
- pré-hibridação das microplacas, sendo a superfície dos alvéolos revestida com a sonda de captura, num tampão de hibridação adequado,
- libertação da microplaca e preenchimento de cada uma das cúpulas com 200 μ l de tampão de hibridação, encerrando o fragmento amplificado, desnaturado e a sonda de revelação marcada com peroxidase numa concentração de 10 ng/ μ l,
- incubação da mistura durante uma hora a 37 °C sob agitação,
- lavagem da mistura que reagiu com uma solução de lavagem 10x (100 mM Tris, 3M NaCl, 1% Tween 20, pH 7,4)
- detecção de actividade da peroxidase associada à sonda por meio de colorimetria em presença de um substrato colorido.

A revelação da actividade da peroxidase presente na sonda de revelação pode ser obtida por meio da realização das seguintes fases:

- depósito de 200 μ l de uma solução de 40 mM de citrato trissódico, 0,03% de H₂O 30%, 7,5 mg/ml de

ortofenilenodiamina (OPD) em cada um dos alvéolos que contêm a mistura de reacção,

- incubação da microplaca durante 30 min no escuro a 37 °C,
- bloqueio da reacção por meio da adição de 50 µl/alvéolo de uma solução de H₂SO₄ 4N,
- determinação da densidade óptica num comprimento de onda de 492 nm (referência a 620 nm).

De um modo interessante, a sonda de captura utilizada é o oligonucleótido Iag4 e a sonda de revelação é o oligonucleótido Iag3.

Assim, os meios permitem a detecção qualitativa ou quantitativa da presença de bactérias do tipo S. entérica e/ou S. bongori, sendo uma detecção não específica de entre um dos grupos I, II, III, IV, V ou VI de S. entérica e S. bongori.

Nas condições específicas da realização da fase de detecção, tal como são expostas no exemplo I, os iniciadores SS2, SS28 e a sonda SS40 permitem, pelo contrário, a detecção específica de bactérias do grupo 1 de S. entérica.

Outras características e vantagens da presente invenção constam dos exemplos apresentados em seguida e nas figuras:

Figura 1: Sequência de nucleótidos de um fragmento de ADN de 2,4 kb da região da invasão de salmonela ser. Typhi. Os locais de potenciais ligações ao ribossoma estão sublinhados.

Figura 2: Percentagem da actividade obtida com diferentes estirpes de salmonela, pertencentes a diferentes serovariedades por meio de hibridação sandwich. Serovariedades dos diferentes isolados de salmonela testados:

- a: S. entérica subespécie entérica (I), ref^{a.}: C53
- b: S. entérica subespécie salamae (II), ref^{a.}: 975-71
- c: S. entérica subespécie salamae (II), ref^{a.}: 3975-83
- d: S. entérica subespécie arizonae (IIIa), ref^{a.}: 1600 K
- e: S. entérica subespécie arizonae (IIIa), ref^{a.}: So 20-20
- f: S. entérica subespécie diarizonae (II), ref^{a.}: 5250-85
- g: S. entérica subespécie diarizonae (IIIb), ref^{a.}: 8013-93
- h: S. entérica subespécie houtenae (IV), ref^{a.}: 1357-73
- i: S. bongori, ref^{a.}: 2790-79
- k: S. entérica subespécie indica (VI), ref^{a.}: 4355-84 - 7, 6, 5, 4, e 3: log (quantidade de moléculas do ADN).

Figura 3: Alinhamento das sequências dos fragmentos amplificados, (nucleótidos 1345 a 1644) dos 6 grupos de salmonelas.

Figura 4: Amplificação graças aos iniciadores Iag5 e Iag6 em dois representantes de cada um dos grupos de salmonelas.

Figura 5: Auto-radiografia da mancha de Southern dos produtos amplificados das salmonelas.

Figura 6: Determinação do número mínimo de moléculas do ADN cromossómico que podem ser detectadas. Auto-radiografia da mancha de Southern e hibridação em microplaca.

Figura 7: Localização dos oligonucleótidos seleccionados no gene IagA.

EXEMPLO 1

CLONAGEM E SEQUENCIAÇÃO DO FRAGMENTO DE ADN DE 2,4 KB

Este fragmento de ADN foi sub-clonado com um fragmento de restrição, obtido por ruptura com as enzimas HindIII a partir da sequência HindIII de 7,9 kb, descrita na publicação de Popoff e Dion, 1990 nos derivados do vector m13 (Messing e Vieira, 1982).

Depois da realização desta clonagem, executou-se o método de terminação da cadeia dideoxi, utilizando o ADN T7 polimerizado modificado (Sequenase, USB Corp.) e os oligonucleótidos sintéticos universais a título de iniciadores. Todas as extremidades dos fragmentos de restrição utilizados sobrepõem-se umas nas outras. A sequenciação do ADN foi realizada pelo menos 2 vezes para cada cadeia. A sequenciação dos nucleótidos foi analisada recorrendo ao programa de Lipan e Pearson, 1985.

Como mostra a sequência apresentada na figura 1, duas fases abertas de leitura estão contidas no fragmento sequenciado; estas são designadas pelos termos IagA (abreviação de *invasion associate gene* - gene associado à invasão) e IagB. As duas fases abertas de leitura são transcritas na mesma orientação. O primeiro codão ATG (bp 97) da fase aberta de leitura do IagA, que é precedido pela sequência 5'-AGAGA-3', deve corresponder ao local de iniciação da tradução do gene IagA. O gene IagA codifica um polipeptídeo que contém 553 resíduos de ácidos aminados com um peso molecular calculado em 63026 Da. Foi detectada uma homologia significativa entre o domínio N-terminal da proteína IagA e

o domínio que corresponde à proteína de regulação da transcrição PhoB (24% da identidade e 52% de semelhança para uma sobreposição de 108 ácidos aminados) e a proteína PhoP (25% de identidade e 69% de semelhança para 100 ácidos aminados alinhados) de E. coli. O codão de iniciação ATG do gene IagB (bp 1776) é igualmente precedido por um potencial local de ligação ao ribossoma (5'-AGGAAG-3'). O gene IagB codifica um polipeptídeo que contém 160 ácidos aminados e com um peso molecular calculado em 18369 Da. A comparação da sequência da proteína IagB com as sequências traduzidas, contidas no banco de dados Genbank revelou uma homologia significativa com a proteína IpgF (43% de identidade e 66% de semelhança para 151 ácidos aminados alinhados).

A proteína IpgF é codificada pelo gene ipgF, que está situado no plasmídeo associado à virulência de Shigella flexneri na extremidade 5' do local mxi-spa (Allaoui et al, 1993).

As proteínas de salmonela entérica, subespécie entérica serovariedade Typhi evidenciadas desempenham, portanto, um papel na infecção por estas bactérias e principalmente na adesão e penetração nas células.

EXEMPLO 2

DETECÇÃO ESPECÍFICA DE S. ENTÉRICA DO GRUPO I

Foi elaborado um protocolo para a detecção das subespécies de salmonela por meio de reacção de polimerização em cadeia (PCR). Um par de oligonucleótidos utilizados como iniciadores foi definido para amplificar um fragmento de 93 pb de um gene necessário para a invasão das células HeLa por S. Typhi, estirpe Ty2. O produto da amplificação foi analisado por uma hibridação não radioactiva, em sandwich

nas placas de microtitulação, utilizando dois oligonucleótidos diferentes, conforme o processo descrito por Chevrier *et al*, 1993, *Mol. Cell. Probes* 7, 187-197. O oligonucleótido de captura foi fosforilado na sua extremidade 5' e ligado de modo covalente aos alvéolos possuidores de grupos aminados de uma placa de microtitulação. O oligonucleótido de detecção foi aminado na sua extremidade 5', depois foi marcado com um éster de biotinil-N-hidroxisuccinimida. Após a hibridação, as moléculas híbridas foram detectadas pela avidina conjugada com fosfatase alcalina e um substrato cromogénico. Este método necessita apenas da utilização de um ciclador térmico e de um leitor de microtitulação convencional e pode ser realizado a uma larga escala.

MATERIAIS E MÉTODOS

ESTIRPES BACTERIANAS

Duzentos e vinte e oito isolados clínicos (quadro 1) incluindo S. bongori (Sambrook *et al*, 1989, *Molecular cloning, a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.), S. entérica subespécie I(116), II(56), IIIa(11), IIIb(30), IV(5) e VI(5) e 16 estirpes de enterobactérias não salmonela (quadro 2) que representam 9 géneros diferentes foram utilizados neste estudo. A estirpe C53 de S. ser. Typhimurium foi utilizada como controlo positivo e a estirpe HB101 de E. coli foi utilizada como controlo negativo nos testes de PCR.

EXTRACÇÃO DO ADN

As estirpes foram cultivadas num meio LB a 37 °C. Para proceder à rápida extracção do ADN, 2 ml da cultura mantida de um dia para outro foram centrifugados e ressuspensos em 1 ml de TE (tampão 10 mM Tris-HCl a pH 8 com 1 mM de EDTA).

As células foram centrifugadas, o sedimento da centrifugação foi ressuspenso em 500 µl de água destilada, estéril e aquecido a 100 °C durante 10 minutos. Finalmente, a solução foi centrifugada e o sobrenadante foi conservado para experiências em PCR.

INICIADORES OLIGONUCLEOTÍDICOS E SONDAS

Os oligonucleótidos foram sintetizados num sintetizador de ADN cyclone (Millipore Waters) recorrendo à tecnologia de fosforoamidita.

As sequências dos iniciadores de oligonucleótidos eram as seguintes:

SS2: 5'-CCGGGCAGATGATACCC-3' e

SS28: 5'-TAATGCTTTCCTGGTGC-3'.

A sonda oligonucleotídica de captura,

SS40: 5'-CCCGAACTATCTCGATCTGTACAATATTATCATT-3' foi fosforilada na sua extremidade 5' com a quinase polinucleótida T4 (Boehringer) conforme a descrição feita por Sambrook et al, 1989, (Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.). A sonda de detecção octadecanucleotídica SS41 (5'-GCAGGTGATAACCTTTAA-3') foi utilizada com uma função amino na sua extremidade 5', recorrendo ao método de fosforamidita em base sólida num sintetizador de ADN Applied Biosystem 380B depois foi marcada com o éster de N-hidroxisuccinimida do ácido D-biotinil- ϵ -aminocaprílico (Boehringer) de acordo com a descrição feita por Tham et al, 1990, (FEMS Microbiol. Lett. 69, 109-116). Os oligonucleótidos de captura e de detecção foram purificados

os dois numa coluna de dessalinização rápida HR 10/10 com o sistema FPLC (Pharmacia).

EXPERIÊNCIAS COM PCR

As reacções de amplificação foram realizadas num volume total de 100 µl, num tampão de 50 mM de Tris-HCl, pH 8,5, contendo 4 mM de MgCl₂, 100 µg/ml de albumina do soro de bovino, 1 µM de cada iniciador, 200 µM de cada dNTP e de 1U de Taq ADN polimerase (Amersham). A mistura de amplificação foi coberta com 100 µl de óleo mineral e submetida a 10 ciclos de amplificação conforme a seguinte descrição: as amostras foram incubadas a 94 °C durante 10 seg. para desnaturar o ADN, a 60 °C durante 10 segundos para emparelhar os iniciadores de ADN e a 72 °C durante 30 seg. para realizar a reacção de extensão dos iniciadores emparelhados, sendo este seguido por 30 ciclos de acordo com o seguinte protocolo: desnaturação a 87 °C durante 10 seg., emparelhamento a 60 °C durante 10 seg. e extensão a 72 °C durante 30 seg. Os ciclos térmicos foram realizados num conjunto aquecedor programável (Thermal ractor Hybaid, UK).

As experiências de PCR foram realizadas com 5 µl de solução de ADN. Cada experiência incluía controlos negativos (5 µl de tampão TÉ) para cada grupo de 10 amostras e no fim de cada série.

TESTES DE HIBRIDAÇÃO SANDWICH EM BANDAS COVALINK NH®

Foram já descritos dois protocolos de hibridação não radioactiva em bandas CovaLink NH® por Chevrier *et al* (1993, Mol. Cell. Probes 7, 187-197). No presente caso foi utilizada uma técnica de hibridação sandwich na medida em que esta permite uma melhor sensibilidade da detecção. A

reacção foi realizada em microalvéolos cobertos com o oligonucleótido SS40 utilizando um processo de ligação covalente, tal como descrita detalhadamente por Chevrier et al ou Rasmussen, S.R. et al (1991, Anal. Biochem. 198, 138-142).

O fragmento de ADN submetido à reacção de PCR foi desnaturado directamente nos alvéolos adicionando-se sequencialmente 95 µl de água destilada, 5 µl de amostra de PCR, 40 µl de sonda de detecção e 14 µl de NaOH 1 N por alvéolo. Passados 10 minutos foi realizada a neutralização adicionando-se 21 µl de NaH₂PO₄ 1 M, contendo 1% de sarcosilo. Todas as amostras foram realizadas em dobro. Após a neutralização, a banda foi depositada numa superfície metálica e mantida numa incubadora de um dia para outro a 40 °C. A concentração final da sonda de detecção biotinilada SS41 era de 0,5 nM. Durante a incubação na incubadora é preferível não deixar vazios os alvéolos não utilizados, enchendo-os com água de forma a obter alterações térmicas homogéneas. Os microalvéolos foram lavados 5 vezes à temperatura ambiente com TBS-Tw (0,15 M NaCl, 10 mM de tampão Tris HCl a pH 8, 1% Tween 20). 100 µl de conjugado alcalino de fosfatase extravidina (Sigma) diluído em 1 µg/ml em TBS-Tw contendo 1% de albumina de soro bovino foram adicionados por alvéolo. Depois a banda foi incubada à temperatura ambiente durante 1 h, lavada 5 vezes com TBS-Tw e finalmente adicionaram-se 200 µl de dietanolamina 1 M a pH 9,8, contendo 1 mM de MgCl₂ e 1 mM de fosfato de para-nitrofenilo. A reacção da enzima foi realizada durante 30 minutos até 2 horas. A absorção foi medida a 405 nm recorrendo a um leitor de microplaca (Dynatech). O sinal obtido com a solução padrão do fragmento de ADN amplificado (800 fm/alvéolo) de S. ser.

Typhimurium estirpe C53 foi considerado como representando 100% e utilizado como referência para cada teste de hibridação. Os valores dos espaços em branco correspondem à absorção média medida nos alvéolos cobertos pelo oligonucleótido SS40, incubado apenas com 0,5 nM de sonda oligonucleotídica SS41 biotinilada.

RESULTADOS

OPTIMIZAÇÃO DO MÉTODO

Os iniciadores e as sondas foram escolhidos na sequência *IagA*. Diferentes pares de iniciadores foram testados para otimizar a técnica de hibridação sandwich em microplacas Covalink. O par de iniciadores escolhido (SS2 e SS28) permitiu a amplificação específica da região de 93 pb do ADN genómico da salmonela. Utilizando este par de iniciadores revelámos que uma concentração padrão de NgCl_2 (1,5 a 2 mM) conduziu a um resultado de amplificação relativamente desinteressante e que uma concentração de 4 mM em MgCl_2 era necessária para obter uma amplificação eficaz. Os oligonucleótidos internos SS40 e SS41 foram utilizados num teste de hibridação não radioactiva, a título de sonda de captura e de sonda de detecção respectivamente.

ESPECIFICIDADE DA TÉCNICA

A especificidade do método para a detecção das salmonelas foi avaliada com 228 estirpes de salmonela (quadro 1) e 16 estirpes de bactérias heterólogas (quadro 2). Os resultados encontram-se resumidos no quadro 3. Edwardsiella tarda, Klebsiella pneumoniae, espécies de Enterobacter e de Acinetobacter, Pasteurella, Vibrio harveyi, Serratia marcescens e, mais importante, espécies de Citrobacter e todos os E. coli deram um sinal de hibridação inferior a

20%. Com base neste valor, concluiu-se que todas as estirpes de salmonela pertencentes à subespécie I podem ser detectadas pelo presente método. Além disso, apenas uma estirpe (estirpe 3975-83) das 56 estirpes da subespécie e 3 estirpes das 11 estirpes da subespécie IIIa deram um sinal positivo. A salmonela bongori e as estirpes pertencentes à subespécie IIIb, IV e VI não foram detectáveis.

NÍVEL DE DETECÇÃO DA TÉCNICA COM BACTÉRIAS INTEIRAS

Foram feitas diluições até a 1/10 de uma suspensão da estirpe C53 de S. ser. Typhimurium (de 10^9 a 10^{-2} células/ml) para determinar o número mínimo de bactérias que poderiam ser detectadas pelo PCR seguido da técnica de hibridação não radioactiva. O ADN foi extraído de cada suspensão calibrada recorrendo à técnica de extracção rápida por meio de ebulição. Os resultados obtidos mostram claramente que a técnica de extracção rápida do ADN por meio de simples ebulição da suspensão antes da reacção de PCR é uma técnica eficaz. Com efeito, esta permite a detecção de apenas uma unidade cfu.

Quadro 1:

| Subespécies de salmonela utilizadas para determinar a especificidade dos testes de hibridação do ADN. | | |
|--|-----------------------|----------------------|
| Microorganismo testado | Nº de isolados | Nº de serovar |
| <i>Salmonella entérica</i> subsp entérica I | 116 | 43 |
| Serovar Adelaide | | 1 |
| Agona | | 2 |
| Altona | | 1 |
| Angoda | | 1 |
| Bardo | | 2 |
| Blockley | | 1 |
| Bovismorbificans | | 3 |
| Braenderup | | 4 |
| Brandenburg | | 1 |
| Bredeney | | 1 |
| Broughton | | 2 |
| Cerro | | 1 |
| Chester | | 1 |
| Coeln | | 1 |
| Concord | | 1 |

| Subespécies de salmonela utilizadas para determinar a especificidade dos testes de hibridação do ADN. | | |
|---|----------------|---------------|
| Microorganismo testado | Nº de isolados | Nº de serovar |
| Dakar | | 1 |
| Derby | | 2 |
| Énteridis | | 28 |
| Georgia | | 1 |
| Hadar | | 1 |
| Heidelberg | | 4 |
| Ibadan | | 2 |
| Indiana | | 1 |
| Infantis | | 5 |
| Lexington | | 1 |
| London | | 1 |
| Mbandaka | | 1 |
| Montevideo | | 6 |
| Moscow | | 1 |
| Ohio | | 1 |
| Orion | | 1 |
| Panama | | 3 |
| ParaTyphi B | | 2 |
| Saintpaul | | 1 |
| Typhimurium | | 13 |
| Typhisuis | | 1 |
| Vaertan | | 1 |
| Veneziana | | 1 |
| Vinohrady | | 1 |
| Virchow | | 10 |
| Wien | | 1 |
| Woodinville | | 1 |
| Yolo | | 1 |
| <i>Salmonella entérica</i> subsp salamae | 56 | 56 |
| II | | |
| <i>Salmonella entérica</i> subsp arizonae | 11 | 29 |
| IIIa | | |
| <i>Salmonella entérica</i> subsp diarizonae | 30 | 5 |
| IIIb | | |
| <i>Salmonella entérica</i> subsp houtenae | 5 | 5 |
| IV | | |
| <i>Salmonella entérica</i> subsp indica VI | 5 | 5 |
| <i>Salmonella bongori</i> | 5 | 5 |
| (inicialmente <i>S. entérica</i> subsp. <i>Bongori</i> V) | | |

Quadro 2

| Bactérias heterólogas utilizadas no teste de hibridação do ADN | | |
|--|--------------|--------------------|
| Género | Espécies | Número de isolados |
| <i>Escherichia</i> | coli | 4 |
| <i>Edwardsiella</i> | tarda | 1 |
| <i>Citrobacter</i> | amalonaticus | 1 |
| | freundii | 1 |
| <i>Klebsiella</i> | pneumoniae | 1 |
| <i>Enterobacter</i> | agglomerans | 1 |
| | asburiae | 1 |
| | hormoechei | 1 |
| <i>Pasteurella</i> | multocida | 1 |
| <i>Acinetobacter</i> | Iwoffii | 1 |
| | haemolyticus | 1 |
| <i>Vibrio</i> | harveyi | 1 |
| <i>Serratia</i> | marcescens | 1 |

HIBRIDAÇÃO QUANTITATIVA COM O ADN GENÓMICO PURIFICADO

O processo de hibridação não radioactiva utilizada nos testes presentemente descritos pode ser facilmente realizado em estudos quantitativos. Para comparar os sinais de hibridação obtidos com as diferentes estirpes de salmonela, foi extraído o ADN de 10 estirpes representantes de 6 subespécies de salmonela entérica e da espécie salmonela bongori, depois as quantidades calibradas do ADN foram submetidas às reacções de PCR seguidas de uma hibridação sandwich. Os resultados são apresentados na figura 2. Demonstrou-se que o sinal de hibridação obtido com 10^7 moléculas de ADN de salmonela bongori ou das subespécies II, IIIa, IIIb, IV e VI de salmonela entérica é mais fraco que o sinal de hibridação observado com 10^3 moléculas de ADN de estirpes da subespécie I. Entretanto, é importante sublinhar que o isolado 3975-83 (subespécie II) deu o mesmo sinal de hibridação que as estirpes pertencentes às subespécies I.

DISCUSSÃO

A amplificação por PCR permite uma detecção muito sensível das sequências do ADN específico. A sensibilidade da amplificação depende essencialmente do número de cópias do ADN alvo, da pureza da amostra a analisar, do método de extracção do ADN e da sensibilidade do método utilizado para detectar os produtos de PCR. A visualização dos produtos de PCR por meio de coloração com brometo de etídio num gel de electroforese não é compatível com a utilização rotineira da técnica e não é suficientemente sensível. A sensibilidade pode ser melhorada por meio da utilização de PCR dupla ou de sondas de ADN com uma hibridação em Dot blot ou Southern blot. No entanto, a PCR dupla é muito sensível à contaminação pelo ADN e as técnicas de

hibridação Dot blot ou Southern blot não são adequadas para a automatização. A hibridação em microplaca oferece assim uma técnica apropriada para a detecção e quantificação de fragmentos amplificados por PCR. A ligação covalente simples dos ácidos nucleicos aos microalvéolos representa uma variante interessante à adsorção passiva e um importante melhoramento na detecção de fragmentos amplificados por PCR nos microalvéolos.

Sabe-se que as estirpes de salmonela que provocam infecções entre os homens pertencem essencialmente à subespécie I. Com efeito, mais de 95% dos isolados clínicos entre seres humanos pertence a esta subespécie (Rowe, B., 1987, Salmonella surveillance. Reports received from centers participating in the WHO programme. World Health Organization London). Além disso, em 1991 o "Centre National d'Études Vétérinaires et Alimentaires" de Paris (França) relatava [Corbion, B. et al, 1991, Inventory of Salmonella] que nos anos precedentes a maioria das estirpes isoladas em animais, seja no alimento seja no meio ambiente, em 1988 e 1989 (isto é 18832 estirpes) pertencem à subespécie I (99,2%).

Os resultados relatados nesta publicação permitiram definir um método baseado na amplificação por PCR, para a detecção de estirpes patogénicas da salmonela. Um par de iniciadores, SS2 e SS28, e um par de sondas, SS40 e SS41 foram seleccionados a partir de um gene necessário para a invasão das células HeLa pela salmonela ser. Typhi, estirpe Ty2. Utilizando a combinação entre a técnica de PCR e a hibridação sandwich não radioactiva em microplaca foram detectadas todas as salmonelas da subespécie I.

O limite da detecção foi inferior a um limite representado por 10 células por tubo de PCR, o que está conforme os resultados obtidos por outras técnicas de PCR semelhantes. Uma vez estabelecido o parentesco dos ácidos nucleicos entre os membros da enterobactérias é importante controlar a especificidade destes novos iniciadores e sondas com os géneros de enterobactérias mais susceptíveis de conduzir às reacções do tipo "falso-positivo". A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que nenhuma reacção de falso-positivo pode ter lugar desde que se cumpram as condições de PCR e de hibridação descritas anteriormente.

É interessante notar que a estirpe salmonela 3975-83 (subespécie II) apresentava um sinal de hibridação idêntico ao obtido com os isolados pertencentes à subespécie I. Esta estirpe foi isolada em 1983 a partir das fezes de um paciente humano na Grã-Bretanha. Com base nas características bioquímicas, esta nova serovariedade foi classificada na subespécie II mas foi considerada como uma estirpe atípica visto que não foi detectada a sua presença na gelatinase (Le Minor, L. et al, 1984, Suplemento N°. XXVII, 1983, to Kauffmann-White Scheme, Ann. Microbiol. (Institut Pasteur) 135 B, 45-51). À luz dos resultados presentemente descritos, a posição taxonómica da estirpe 3975-83 deveria ser reexaminada recorrendo à técnica de hibridação ADN-ADN.

Os dados aqui apresentados indicam que o método de hibridação baseado na utilização de um gene necessário à invasão das células HeLa pela salmonela ser. Typhi, estirpe Ty2 pode distinguir as estirpes da subespécie I das salmonelas das outras bactérias entéricas, incluindo E. coli. A hibridação não radioactiva numa microplaca Covalink

NH é sensível e apropriada para a análise de um grande número de amostras.

EXEMPLO 3 DETECÇÃO DO ADN DE SALMONELA AMPLIFICADA POR MEIO DE HIBRIDAÇÃO SANDWICH

SEQUÊNCIA DOS OLIGONUCLEÓTIDOS

Os fragmentos de ADN escolhidos são os seguintes (ver posição na sequência da figura 1):

| | Domínio C-terminal | posição |
|-------|---|-----------|
| Iag1: | 5'-TA 'TTA AGT ATG CAG GTT ATG - 3' | 1424-1443 |
| Iag2: | 5'-AGA GAA TTT CTG GAA AGT GAA - 3' | 1585-1605 |
| Iag3: | 5'-ATA TCC ACG CAG GAA ATA ACA GGA CTT - 3' | 1495-1521 |
| Iag4: | 5'-GAG CGT GCC TTA CCG ACG ATA - 3' | 1564-1584 |
| Iag5: | 5'-GCA GGG ATC ACT AAG CTG TG - 3' | 1318-1337 |
| Iag6: | 5'-CGT GGG CAA CCA GCA CTA ACG - 3' | 1637-1657 |
| | | |
| S1m1: | 5'-CG GGT TAA AGG TTA TCA CCT - 3' | 709-728 |
| S1m2: | 5'-AG CAT GGC GCA AAT GGG - 3' | 1014-1031 |
| S1m3: | 5'-GCA CCA GGA AAG CAT TAA GTT GAT AGA ACA C-3' | 732-762 |
| S1m4: | 5'-CTT CGC TGG GAC ACA AAG CA - 3' | 823-842 |

Preferencialmente, os pares de iniciadores Iag5 (sens) e Iag6 (antisens) dirigem a amplificação de um fragmento de 340 bp, o par S1m1 (sens) e S1m2 (antisens) dirige a amplificação de um fragmento de 323 bp (figura 3).

A figura 4 mostra a eficácia da amplificação de um par de iniciadores Iag5 e Iag6 em 2 representantes de cada um dos grupos de salmonelas.

PROCESSO DE DETECÇÃO

Foi utilizado um formato de detecção por meio de hibridação sandwich.

Hibridam-se dois oligonucleótidos em simultâneo no fragmento amplificado, desnaturado. Um dos dois, chamado sonda de captura, está fixado de forma passiva (mas pode também ser fixado de forma covalente) à superfície de um alvéolo de placa de microtitulação de 96 alvéolos. O outro, chamado sonda de revelação, está marcado com um elemento que é facilmente evidenciado. A sonda de revelação está livre no tampão de hibridação.

As sondas de captura e de revelação são complementares de 2 regiões diferentes, situadas no interior do fragmento amplificado.

A sonda de detecção no caso presentemente descrito está ligada a um marcador enzimático, nomeadamente uma peroxidase e vai servir de sonda de revelação. É preferencialmente o caso dos oligonucleótidos Iag3 e S1m3. Outros oligonucleótidos podem ser fixados a um suporte sólido, do tipo microplaca, um suporte de partículas ou membrana e servir de sonda de captura, este particularmente para os oligonucleótidos Iag4 e slm4.

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS:

1) Preparação do ADN das salmonelas

Segundo o método da ebulição na presença de Chelex (Chelex 6%, SDS 0.1%, NP40 1%, Tween 20 1%), obtêm-se as sequências de ADN. Este reagente é comercializado pela Biorad e

utilizado de acordo com o protocolo do fabricante (ref. Walsh et al. 1991. BioTechniques 10:506-513).

2) Amplificação

Segundo o método descrito inicialmente por Saiki e tal como o exposto, por exemplo, na patente europeia EP 0201184.

A PCR é realizada recorrendo à seguinte mistura reaccional:

50 mM KCl

10mM Tris-HCl pH 8.3

1,5mM MgCl₂

125 µM desoxirribonucleótidos (dCTP, dATP, dGTP)

250 µM de UTP

25 pmoles de cada um dos iniciadores

10ng ADN

1 unidade de uracil N glicosilase

1 unidade de Taq polimerase.

A mistura reaccional foi realizada utilizando 10 µl da solução que continha o ADN a amplificar num volume de 100 µl. O dUPT e o UNG são utilizados em sistemas de descontaminação (patente Life Technologies European Patent Application 0 401 037). O ciclador térmico utilizado é o 9600 da Perkin Elmer.

Após uma incubação de 50 °C durante 2 min para permitir a acção do UNG e uma desnaturação a 95 °C durante 5 min, os ciclos de temperatura utilizados são os seguintes:

5 ciclos (95 °C 15 seg, 50 °C 15 seg, 72 °C 15 seg)

35 ciclos (95 °C 15 seg, 57 °C 15 seg, 72 °C 15 seg)

3) Visualização da reacção de amplificação

3-1) Marcação da sonda de revelação

As sondas são marcadas com peroxidase de raiz-forte (ref. PCR protocols: a guide to methods and application; Academic press (1990), 15, p 4513-4534) e a actividade da enzima é revelada por colorimetria.

3-2) Gel de agarose com BET e hibridação em membrana

Depois da amplificação, depositou-se 10 µl do produto da amplificação sobre gel de agarose e o ADN foi transferido para a membrana conforme as técnicas clássicas (Maniatis). A membrana foi pré-hibridada 30 min a 68 °C em tampão de hibridação (10x Denhart, 6x SSC, 0,1% SDS) depois foi hibridada a 42 °C durante 3 h com 60 ng de sonda por ml de tampão de hibridação.

Realizou-se em seguida uma lavagem de acordo com as seguintes etapas:

- 2 vezes, 10 min em 2 x SSC - 0,1 % SDS à temperatura ambiente,
- 1 vez 30 min em 0,1 x SSC - 0,1% SDS a 42 °C,
- 2 vezes, 10 min em 2 x SSC à temperatura ambiente,

Revelação: a membrana foi espongeada entre duas folhas de papel absorvente (papel Whatman 3 MM) e colocada num recipiente próprio e seco.

O reagente de detecção Amersham (reagente de detecção ECL RPN 2105) foi preparado extemporaneamente, volume por volume; 30 ml de volume total para uma membrana 5 x 8 cm. Foi obtida uma cassete para auto-radiografia fixando uma folha de papel absorvente (papel Whatman 3 MM) no fundo.

Todas estas etapas podem ser feitas à luz. Em seguida em câmara escura.

Mergulha-se a membrana no reagente de detecção durante 1 min, lado do ADN para cima, escorre-se rapidamente a membrana, coloca-se na cassete, lado do ADN para cima, coloca-se debaixo de uma folha de plástico transparente (senão a membrana cola-se à película) e coloca-se uma película de radiografia em cima (película X-OMAT KODAK).

A exposição é realizada durante 30 min à temperatura ambiente, depois a película é revelada pelos técnicos de revelação clássica (revelador, água, fixador).

3-3) Microplaca

3-3-1) Cobertura de oligonucleótido de captura

Pode ser feita por adsorção (Cook *et al*, NAR, 16: 4077-4095 (1988) ou acoplagem covalente (Rasmussen, S.R. *et al*, 1991. Analytical Biochemistry 198, 138-142).

3-3-2) Hibridação em microplaca e leitura

10 µl do produto da amplificação foram desnaturados por meio da adição, volume por volume, de uma solução de 200 mM de NaOH, 40 mM de EDTA.

As microplacas cuja superfície dos alvéolos está coberta com a sonda de captura, foram pré-hibridadas num tampão de hibridação com 10x Denhart, 6x SSC, 0,1% SDS.

Assim que a microplaca foi esvaziada e cada uma das cúpulas recebeu 200 µl de tampão de hibridação, tapando o fragmento amplificado, desnaturado e a sonda de revelação na

concentração de 10 ng/ μ l. A incubação teve lugar durante uma hora a 37 °C e sob agitação.

Depois da lavagem (solução de lavagem 10X:100 mM Tris, 3M NaCl, 1% Tween 20, pH 7,4), foi detectada a actividade da peroxidase associada à sonda, por colorimetria, na presença de um substrato colorido.

Para tal, distribuíram-se por cada um dos alvéolos 200 μ l de uma solução de 40 mM de citrato trissódico, 0,03% de H₂O 30%, 7,5 mg/ml de ortofenilendiamina (OPD). A microplaca foi incubada durante 30 min no escuro e a 37 °C. 50 μ l/alvéolo de uma solução de 4N H₂SO₄ foram adicionados para bloquear a reacção.

A densidade óptica foi determinada num comprimento de onda de 492 nm (referência a 620 nm).

4) Sequenciação dos produtos PCR e alinhamento manual das seqüências.

De acordo com as técnicas clássicas, utilizando, por exemplo um autómato "373 DNA sequencer" da Applied Biosystem e o conjunto "dye terminator" da Applied.

RESULTADOS

O modelo exemplificado é preferencialmente o seguinte sistema de oligonucleótidos:

Iag5 iniciador sens - Iag6 iniciador antisens
Iag3 sonda de revelação e Iag4 sonda de captura.

(é de notar que o Iag4 pode igualmente ser marcado e ser utilizado como sonda de revelação).

ESTUDO DA ESPECIFICIDADE

Foi aplicado no conjunto de estirpes bacterianas enumeradas nos quadros 4 e 5.

A amplificação do ADN extraído das 45 estirpes de salmonelas analisadas gerou um fragmento do tamanho esperado (cf. fig. 5). As manchas de Southern do conjunto de produtos amplificados foram hibridadas com a sonda de oligonucleótido interna *Iag3*, marcada com peroxidase. Nenhuma das estirpes não-salmonela deu lugar a uma hibridação com uma sonda de peroxidase realizada em membrana conforme o protocolo descrito anteriormente.

Os mesmos produtos da amplificação foram experimentados em formato microplaca.

A interrupção foi fixada arbitrariamente em 0,050. Todos os representantes de cada um dos grupos de salmonelas dão um valor de densidade óptica superior a 0,050 (quadro 6).

SENSIBILIDADE

Para determinar o número mínimo de moléculas de ADN cromossómico de salmonelas que podem ser detectadas foi amplificada uma gama de diluição de ADN cromossómico purificado. 5 moléculas são visíveis na auto-radiografia da mancha de Southern e detectadas em hibridação de microplaca. O valor obtido em colorimetria é superior ao da interrupção (figura 6).

Os oligonucleótidos seleccionados para a realização deste exemplo foram localizados na sequência do gene *IagA* (figura 7).

ESTIRPES DE SALMONELAS ESTUDADAS

Quadro 4

| Nº | Estirpe | Serotipo | Grupo |
|----|-------------------------------|---------------------------------|-------|
| 1 | <i>Salmonella</i> Marseille | | I |
| 2 | <i>Salmonella</i> Nyanza | | I |
| 3 | <i>Salmonella</i> Poona | | I |
| 4 | <i>Salmonella</i> Kampala | | I |
| 5 | <i>Salmonella</i> Taksony | | I |
| 6 | <i>Salmonella</i> Teshie | | I |
| 7 | <i>Salmonella</i> Indiana | | I |
| 8 | <i>Salmonella enteritidis</i> | | I |
| 9 | <i>Salmonella</i> Kentucky | | I |
| 10 | <i>Salmonella</i> Napoli | | I |
| 11 | | 841 11:a:d:en 215 | II |
| 12 | | 1703K41:2:15 | II |
| 13 | | 950-7143:d:z39 | II |
| 14 | | 10-65 44:24, 223 : - | II |
| 15 | | 3209-81 45: z 23 | II |
| 16 | | 5331/ 86 62: z 29 : - | IIIa |
| 17 | | 3064-4 / 252 41: k : - | IIIa |
| 18 | | 594-54 38: z 54: - | IIIa |
| 19 | | 1694 cdai 426 63: z 4, z32: - | IIIa |
| 20 | | So 50/16 62: f, z 51:- | IIIa |
| 21 | | 5251-85 58: r : z 53 | IIIb |
| 22 | | 1758-76 6, 14 : z 10 : enx 215 | IIIb |
| 23 | | 453-68 16 : liv : z53 | IIIb |
| 24 | | 4305-57 16 : li(v) : z 35 | IIIb |
| 25 | | 1698-75 11 : liv : z | IIIb |
| 26 | | 8275-94 47 : r : enx 215 | IIIb |
| 27 | | 8283-94 53 : z 10 : z | IIIb |
| 28 | | cdc 456-5 / 93 40 : i : 1, 5, 7 | IIIb |
| 29 | | 8284-94 60: i : z | IIIb |
| 30 | | 1693 K 38 : k : z 55 | IIIb |
| 31 | | 1707 48 : f : z 51 :- | IV |
| 32 | | 7231/89 45 : z 36, z 38 | IV |
| 33 | | 6887 / 60 48 : f, z 51 : - | IV |
| 34 | | 1357 /73 43 : z4, z 24 : - | IV |
| 35 | | 1550 K 16 : z 4, z 23:- | IV |

| Nº | Estirpe | Serotipo | Grupo |
|----|---------------------------|--------------------------------|-------|
| 36 | <i>Salmonella Bongor</i> | 261 -66 48 : z35 : - | V |
| 37 | <i>Salmonella Camdeni</i> | 2022 - 77 44 : r : - | V |
| 38 | | 4985 - 85 48 : z 39 : - | V |
| 39 | | 7688 - 9166 : z 39 : - | V |
| 40 | | 1387 - 7340 : a : | V |
| 41 | | 1941 - 77 6,7 : z 41: 1,7 | VI |
| 42 | | 1449 K45 : a enx | VI |
| 43 | | 4355 - 84 1.6. 14.25: a :e,n,x | VI |
| 44 | | 1711 K11 .b:enx | VI |
| 45 | | 1688 K 1,6.14,25:2 10: 1.12.7 | VI |

ESTIRPES NÃO SALMONELA

Quadro 5

| Nº | Nome | Identificação |
|----|-----------------------------------|---------------|
| 1 | <i>Klebsiella oxytoca</i> | 0059 SDP |
| 2 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 0054 SDP |
| 3 | <i>Acinetobacter baumannii</i> | 0033 SDP |
| 4 | <i>Proteus mirabilis</i> | RP402 |
| 5 | <i>Serratia marcescens</i> | 0042 SDP |
| 6 | <i>Enterobacter agglomerans</i> | 0067 SDP |
| 7 | <i>Citrobacterdiversus</i> | 0068 SDP |
| 8 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 0011 SDP |
| 9 | <i>Enterobacter aerogenes</i> | 0066 SDP |
| 10 | <i>Escherichia coli</i> | 0131 SDP |
| 11 | <i>Enterocoque faecalis</i> | 76117 |
| 12 | <i>Proteus mirabilis</i> | AP03 |
| 13 | <i>Enterocoque faecalis</i> | 76117 |
| 14 | <i>Enterobacter cloacae</i> | 0060 SDP |
| 15 | <i>Mycobacterium avium</i> | 6 |
| 16 | <i>Mycobacterium tuberculosis</i> | H 37 RV |
| 17 | <i>Listeria monocytogenes</i> | 1/2 LG3 |

DETECÇÃO EM MICROPLACA**Quadro 6**

| Amostras | DO a 420 nm |
|------------------------------------|--------------------|
| 2 Nyanza gpo I | 3.029 |
| 3 Poona gpo 1 | 3.103 |
| 11 gpo II | 3.155 |
| 12 gpo Il | 0.751 |
| 18 gpo III a | 3.139 |
| 20 gpo Ill a | 3.068 |
| 21 gpo III b | 3.161 |
| 30 gpo III b | 3.201 |
| 31 gpo IV | 0.272 |
| 35 gpo IV | 0.527 |
| 36 gpo V | 1.868 |
| 40 gpo V | 3.347 |
| 45 gpo VI | 0.900 |
| Klebsiella oxytoca | 0.022 |
| Klebsiella pneumoniae | 0.017 |
| Acinetobacter baumannii | 0.024 |
| Proteus mirabilis | 0.019 |
| Serratia marcescens | 0.019 |
| Enterobacter agglomerans | 0.023 |
| Mycobacterium avium n° 6 | 0.025 |
| Mycobacterium tuberculosis H 37 RV | 0.020 |
| Listeria monocytogenes 1/2 LG3 | 0.015 |
| Água de controlo | 0.018 |
| Água de controlo | 0.022 |

LISTA DE SEGUÊNCIAS

(1) INFORMAÇÃO GERAL:

- (i) REQUERENTE: INSTITUTO PASTEUR
INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE
MEDICALE
- (ii) TÍTULO DA INVENÇÃO: OLIGONUCLEÓTIDO PARA A
DETECÇÃO DE SALMONELA
- (iii) NÚMERO DE SEQUÊNCIAS:29

(iv) MORADA CORRESPONDENTE:

- (A) MORADA: ERNEST GUTMANN - YVES PLASSERAUD
S.A.
- (B) RUA: 3 RUE CHAVEAU - LAGARDE
- (C) CIDADE: PARIS
- (D) ESTADO:
- (E) PAÍS: FRANÇA
- (F) ZIP: 75008

(v) LEITURA POR COMPUTADOR:

- (A) MEIO: Floppy disk
- (B) COMPUTADOR: compatível IBM PC
- (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Versão
#1.30

(vi) DADOS ACTUAIS DO PEDIDO:

- (A) NÚMERO DO PEDIDO:XXXXXXXXXXXX
- (B) DATA DE DEPÓSITO: 15 DE JANEIRO DE 1996
- (C) CLASSIFICAÇÃO:

(vii) DADOS DO PEDIDO ANTERIOR:

- (A) NÚMERO DO PEDIDO: FR 9500410
- (B) DATA DE DEPÓSITO: 16 DE JANEIRO DE 1995

(vii) DADOS DO PEDIDO ANTERIOR:

- (A) NÚMERO DO PEDIDO: 96 400 098.8
- (B) DATA DE DEPÓSITO: 15 DE JANEIRO DE 1996

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:1:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 2406 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico

- (C) ENCADEAMENTO DE CADEIAS: duplo
 - (D) TOPOLOGIA: linear
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)
- (vi) FONTE ORIGINAL:
- (A) ORGANISMO: SALMONELA SER. TYPHI
- (ix) CARACTERÍSTICAS:
- (A) NOME/KEY: CDS
 - (B) LOCALIZAÇÃO: 97..1755
 - (D) OUTRAS INFORMAÇÕES: /produto = "iagA"
- (ix) CARACTERÍSTICAS:
- (A) NOME/KEY: CDS
 - (B) LOCALIZAÇÃO: 1776..2255
 - (D) OUTRAS INFORMAÇÕES: /produto= "iagB"
- (xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:1:

| | |
|---|-----|
| GTACTAGCAG CAGAATTACT GAAACAGTAG ATTCTATCCT AACGACTTGT ATTAGCTATT | 60 |
| ATAACTTTTC ACCCTGTAAG AGAATACACT ATTATC ATG CCA CAT TTT AAT CCT | 114 |
| Met Pro His Phe Asn Pro | |
| 1 5 | |
| GTT CCT GTA TCG AAT AAA AAA TTC GTC TTT GAT GAT TTC ATA CTC AAC | 162 |
| Val Pro Val Ser Asn Lys Lys Phe Val Phe Asp Asp Phe Ile Leu Asn | |
| 10 15 20 | |
| ATG GAC GGC TCC CTC GTA CGC TCA GAA AAG AAA GTC AAT ATT CCG CCA | 210 |
| Met Asp Gly Ser Leu Val Arg Ser Glu Lys Lys Val Asn Ile Pro Pro | |
| 25 30 35 | |
| AAA GAA TAT GCC GTT CTG GTC ATC CTG CTC GAA GCC GCC GGC AAG ATT | 258 |
| Lys Glu Tyr Ala Val Leu Val Ile Leu Leu Glu Ala Ala Gly Lys Ile | |
| 40 45 50 | |
| GTG AGT AAA AAC ACC TTA TTG GAC CAA GTA TGG GGC GAC GCG GAA GTT | 306 |
| Val Ser Lys Asn Thr Leu Leu Asp Gln Val Trp Gly Asp Ala Glu Val | |
| 55 60 65 70 | |
| AAC GAA GAA TCT CTT ACC CGC TGT ATC TAT GCC TTA CGA CGT ATT CTG | 354 |
| Asn Glu Glu Ser Leu Thr Arg Cys Ile Tyr Ala Leu Arg Arg Ile Leu | |
| 75 80 85 | |
| TCG GAA GAT AAA GAG CAT CGT TAC ATT GAA ACA CTG TAC GGA CAG GGT | 402 |
| Ser Glu Asp Lys Glu His Arg Tyr Ile Glu Thr Leu Tyr Gly Gln Gly | |
| 90 95 100 | |
| TAT CGG TTT AAT CGT CCG GTC GTA GTG GTG TCT CCG CCA GCG CCG CAA | 450 |
| Tyr Arg Phe Asn Arg Pro Val Val Val Val Ser Pro Pro Ala Pro Gln | |
| 105 110 115 | |
| CCT ACG ACT CAT ACA TTG GCG ATA CTT CCT TTT CAG ATG CAG GAT CAG | 498 |
| Pro Thr Thr His Thr Leu Ala Ile Leu Pro Phe Gln Met Gln Asp Gln | |
| 120 125 130 | |
| GTT CAA TCC GAG AGT CTG CAT TAC TCT ATC GTG AAG GGA TTA TCG CAG | 546 |
| Val Gln Ser Glu Ser Leu His Tyr Ser Ile Val Lys Gly Leu Ser Gln | |
| 135 140 145 150 | |
| TAT GCG CCC TTT GGC CTG AGC GTG CTG CCG GTG ACC ATT ACG AAG AAC | 594 |
| Tyr Ala Pro Phe Gly Leu Ser Val Leu Pro Val Thr Ile Thr Lys Asn | |
| 155 160 165 | |
| TGC CGC AGT GTT AAG GAT ATT CTT GAG CTC ATG GAT CAA TTA CGC CCC | 642 |
| Cys Arg Ser Val Lys Asp Ile Leu Glu Leu Met Asp Gln Leu Arg Pro | |
| 170 175 180 | |
| GAT TAT TAT ATC TCC GGC CAG ATG ATA CCC GAT GGT AAT GAT AAT ATT | 690 |
| Asp Tyr Tyr Ile Ser Gly Gln Met Ile Pro Asp Gly Asn Asp Asn Ile | |
| 185 190 195 | |

| | |
|---|------|
| GTA CAG ATC GAG ATA GTT CGG GTT AAA GGT TAT CAC CTG CTG CAC CAG Val Gln Ile Glu Ile Val Arg Val Lys Gly Tyr His Leu Leu His Gln 200 205 210 | 738 |
| GAA AGC ATT AAG TTG ATA GAA CAC CAA CCC GCT TCT CTC TTG CAA AAC Glu Ser Ile Lys Leu Ile Glu His Gln Pro Ala Ser Leu Leu Gln Asn 215 220 225 230 | 786 |
| AAA ATT GCG AAT CTT TTG CTC AGA TGT ATT CCC GGA CTT CGC TGG GAC Lys Ile Ala Asn Leu Leu Arg Cys Ile Pro Gly Leu Arg Trp Asp 235 240 245 | 834 |
| ACA AAG CAA ATT AGC GAG CTA AAT TCG ATT GAC AGT ACC ATG GTC TAC Thr Lys Gln Ile Ser Glu Leu Asn Ser Ile Asp Ser Thr Met Val Tyr 250 255 260 | 882 |
| TTA CGC GGT AAG CAT GAG TTA AAT CAA TAC ACC CCC TAT AGC TTA CAG Leu Arg Gly Lys His Glu Leu Asn Gln Tyr Thr Pro Tyr Ser Leu Gln 265 270 275 | 930 |
| CAA GCG CTT AAA TTG CTG ACT CAA TGC GTT AAT ATG TCG CCA AAC AGC Gln Ala Leu Lys Leu Leu Thr Gln Cys Val Asn Met Ser Pro Asn Ser 280 285 290 | 978 |
| ATT GCG CCT TAC TGT GCG CTG GCA GAA TGC TAC CTC AGC ATG GCG CAA Ile Ala Pro Tyr Cys Ala Leu Ala Glu Cys Tyr Leu Ser Met Ala Gln 295 300 305 310 | 1026 |
| ATG GGG ATT TTT GAT AAA CAA AAC GCA ATG ATC AAA GCT AAA GAA CAT Met Gly Ile Phe Asp Lys Gln Asn Ala Met Ile Lys Ala Lys Glu His 315 320 325 | 1074 |
| GCT ATT AAG GCG ACA GAG CTG GAC CAC AAT AAT CCA CAA GCT TTA GGA Ala Ile Lys Ala Thr Glu Leu Asp His Asn Asn Pro Gln Ala Leu Gly 330 335 340 | 1122 |
| TTA CTG GGG CTA ATT AAT ACG ATT CAC TCA GAA TAC ATC GTC GGG AGT Leu Leu Gly Leu Ile Asn Thr Ile His Ser Glu Tyr Ile Val Gly Ser 345 350 355 | 1170 |
| TTA CTA TTC AAA CAA GCT AAC TTA CTT TCG CCC ATT TCT GCA GAT ATT Leu Leu Phe Lys Gln Ala Asn Leu Leu Ser Pro Ile Ser Ala Asp Ile 360 365 370 | 1218 |
| AAA TAT TAT TAT GGC TGG AAT CTT TTC ATG GCT GGT CAG TTG GAG GAG Lys Tyr Tyr Tyr Gly Trp Asn Leu Phe Met Ala Gly Gln Leu Glu Glu 375 380 385 390 | 1266 |
| GCC TTA CAA ACG ATT AAC GAG TGT TTA AAA TTG GAC CCA ACG CGC GCA Ala Leu Gln Thr Ile Asn Glu Cys Leu Lys Leu Asp Pro Thr Arg Ala 395 400 405 | 1314 |
| GCC GCA GGG ATC ACT AAG CTG TGG ATT ACC TAT TAT CAT ACC GGT ATT Ala Ala Gly Ile Thr Lys Leu Trp Ile Thr Tyr Tyr His Thr Gly Ile 410 415 420 | 1362 |
| GAT GAT GCT ATA CGT TTA GGC GAT GAA TTA CGC TCA CAA CAC CTG CAG Asp Asp Ala Ile Arg Leu Gly Asp Glu Leu Arg Ser Gln His Leu Gln 425 430 435 | 1410 |

| | |
|---|------|
| GAT AAT CCA ATA TTA TTA AGT ATG CAG GTT ATG TTT CTT TCG CTT AAA | 1458 |
| Asp Asn Pro Ile Leu Leu Ser Met Gln Val Met Phe Leu Ser Leu Lys | |
| 440 445 450 | |
| GGT AAA CAT GAA CTG GCA CGA AAA TTA ACT AAA GAA ATA TCC ACG CAG | 1506 |
| Gly Lys His Glu Leu Ala Arg Lys Leu Thr Lys Glu Ile Ser Thr Gln | |
| 455 460 465 470 | |
| GAA ATA ACA GGA CTT ATT GCT GTT AAT CTT CTT TAC GCT GAA TAT TGT | 1554 |
| Glu Ile Thr Gly Leu Ile Ala Val Asn Leu Leu Tyr Ala Glu Tyr Cys | |
| 475 480 485 | |
| CAG AAT AGT GAG CGT GCC TTA CCG ACG ATA AGA GAA TTT CTG GAA AGT | 1602 |
| Gln Asn Ser Glu Arg Ala Leu Pro Thr Ile Arg Glu Phe Leu Glu Ser | |
| 490 495 500 | |
| GAA CAG CGT ATA GAT AAT AAT CCG GGA TTA TTA CCG TTA GTG CTG GTT | 1650 |
| Glu Gln Arg Ile Asp Asn Asn Pro Gly Leu Leu Pro Leu Val Leu Val | |
| 505 510 515 | |
| GCC CAC GGC GAA GCT ATT GCC GAG AAA ATG TGG AAT AAA TTT AAA AAC | 1698 |
| Ala His Gly Glu Ala Ile Ala Glu Lys Met Trp Asn Lys Phe Lys Asn | |
| 520 525 530 | |
| GAA GAC AAT ATT TGG TTC AAA AGA TGG AAA CAG GAT CCC CGC TTG ATT | 1746 |
| Glu Asp Asn Ile Trp Phe Lys Arg Trp Lys Gln Asp Pro Arg Leu Ile | |
| 535 540 545 550 | |
| AAA TTA CCG TAAAATCTGA GAGAGGAGAT ATG CAT TAT TTT TTT ATC ATC | 1796 |
| Lys Leu Arg Met His Tyr Phe Phe Ile Ile | |
| 1 5 | |
| GTA ATC TGG TTG CTT AGC ATA AAT ACG GCA TGG GCT GAT TGC TGG CTT | 1844 |
| Val Ile Trp Leu Leu Ser Ile Asn Thr Ala Trp Ala Asp Cys Trp Leu | |
| 10 15 20 | |
| CAG GCT GAA AAA ATG TTC AAT ATT GAA TCC GAA CTA CTT TAC GCT ATC | 1892 |
| Gln Ala Glu Lys Met Phe Asn Ile Glu Ser Glu Leu Leu Tyr Ala Ile | |
| 25 30 35 | |
| GCC CAG CAG GAA TCG GCG ATG AAA CCT GGC GCC ATT GGT CAT AAC CGA | 1940 |
| Ala Gln Gln Glu Ser Ala Met Lys Pro Gly Ala Ile Gly His Asn Arg | |
| 40 45 50 55 | |
| GAT GGT TCA ACC GAT CTT GGC CTG ATG CAA ATT AAC AGC TTC CAT ATG | 1988 |
| Asp Gly Ser Thr Asp Leu Gly Leu Met Gln Ile Asn Ser Phe His Met | |
| 60 65 70 | |
| AAA AGG CTG AAA AAA ATG GGG ATT AGT GAA AAA CAG TTG TTA CAG GAT | 2036 |
| Lys Arg Leu Lys Lys Met Gly Ile Ser Glu Lys Gln Leu Leu Gln Asp | |
| 75 80 85 | |
| CCC TCG AAT TCT GTC ATT GTG GGC GCA TCC ATT TTA TCA GAT ATG ATG | 2084 |
| Pro Ser Ile Ser Val Ile Val Gly Ala Ser Ile Leu Ser Asp Met Met | |
| 90 95 100 | |
| AAA ATC TAC GGT TTT AGC TGG GAG GCC GTT GGC GCT TAT AAT GCC GGG | 2132 |
| Lys Ile Tyr Gly Phe Ser Trp Glu Ala Val Gly Ala Tyr Asn Ala Gly | |
| 105 110 115 | |

```

ACG TCG CCG AAA CGA TCG GAT ATA AGG AAA CGT TAT GCT AAA AAA ATT      2180
Thr Ser Pro Lys Arg Ser Asp Ile Arg Lys Arg Tyr Ala Lys Lys Ile
120                      125                      130                      135

TGG GAG AAT TAC AGA AAA TTA AAA GAG ATG TCA GCA GAA GAG AAA AAC      2228
Trp Glu Asn Tyr Arg Lys Leu Lys Glu Met Ser Ala Glu Glu Lys Asn
                      140                      145                      150

AAA AGA CTT TCT ATC GCG GTA AAC AAA TAATTATACA GGAATAGCTT      2275
Lys Arg Leu Ser Ile Ala Val Asn Lys
                      155                      160

ACTTTCAGAT AATTCTAAAA GTAAGCTATG TTTTATCAG CTTGCCCTCG TCATAAGCAA      2335

CTGGCGCTTG CATTGCTTTT AGTTGTACAA ACTGTGAGGC GCTTCCAGC ATTCTATTGT      2395

TCGTTGAATT C                                                                2406

```

(3) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:2:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 553 ácidos aminados
- (B) TIPO: ácidos aminados
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:2:

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Pro | His | Phe | Asn | Pro | Val | Pro | Val | Ser | Asn | Lys | Lys | Phe | Val | Phe |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
| Asp | Asp | Phe | Ile | Leu | Asn | Met | Asp | Gly | Ser | Leu | Val | Arg | Ser | Glu | Lys |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | |
| Lys | Val | Asn | Ile | Pro | Pro | Lys | Glu | Tyr | Ala | Val | Leu | Val | Ile | Leu | Leu |
| | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | |
| Glu | Ala | Ala | Gly | Lys | Ile | Val | Ser | Lys | Asn | Thr | Leu | Leu | Asp | Gln | Val |
| | 50 | | | | | 55 | | | | | 60 | | | | |
| Trp | Gly | Asp | Ala | Glu | Val | Asn | Glu | Glu | Ser | Leu | Thr | Arg | Cys | Ile | Tyr |
| 65 | | | | | 70 | | | | | 75 | | | | | 80 |
| Ala | Leu | Arg | Arg | Ile | Leu | Ser | Glu | Asp | Lys | Glu | His | Arg | Tyr | Ile | Glu |
| | | | | 85 | | | | | 90 | | | | | 95 | |
| Thr | Leu | Tyr | Gly | Gln | Gly | Tyr | Arg | Phe | Asn | Arg | Pro | Val | Val | Val | Val |
| | | | 100 | | | | | 105 | | | | | 110 | | |
| Ser | Pro | Pro | Ala | Pro | Gln | Pro | Thr | Thr | His | Thr | Leu | Ala | Ile | Leu | Pro |
| | | 115 | | | | | 120 | | | | | 125 | | | |
| Phe | Gln | Met | Gln | Asp | Gln | Val | Gln | Ser | Glu | Ser | Leu | His | Tyr | Ser | Ile |
| | 130 | | | | | 135 | | | | | 140 | | | | |
| Val | Lys | Gly | Leu | Ser | Gln | Tyr | Ala | Pro | Phe | Gly | Leu | Ser | Val | Leu | Pro |
| 145 | | | | | 150 | | | | | 155 | | | | | 160 |

Val Thr Ile Thr Lys Asn Cys Arg Ser Val Lys Asp Ile Leu Glu Leu
 165 170 175
 Met Asp Gln Leu Arg Pro Asp Tyr Tyr Ile Ser Gly Gln Met Ile Pro
 180 185 190
 Asp Gly Asn Asp Asn Ile Val Gln Ile Glu Ile Val Arg Val Lys Gly
 195 200 205
 Tyr His Leu Leu His Gln Glu Ser Ile Lys Leu Ile Glu His Gln Pro
 210 215 220
 Ala Ser Leu Leu Gln Asn Lys Ile Ala Asn Leu Leu Leu Arg Cys Ile
 225 230 235 240
 Pro Gly Leu Arg Trp Asp Thr Lys Gln Ile Ser Glu Leu Asn Ser Ile
 245 250 255
 Asp Ser Thr Met Val Tyr Leu Arg Gly Lys His Glu Leu Asn Gln Tyr
 260 265 270
 Thr Pro Tyr Ser Leu Gln Gln Ala Leu Lys Leu Leu Thr Gln Cys Val
 275 280 285
 Asn Met Ser Pro Asn Ser Ile Ala Pro Tyr Cys Ala Leu Ala Glu Cys
 290 295 300
 Tyr Leu Ser Met Ala Gln Met Gly Ile Phe Asp Lys Gln Asn Ala Met
 305 310 315 320
 Ile Lys Ala Lys Glu His Ala Ile Lys Ala Thr Glu Leu Asp His Asn
 325 330 335
 Asn Pro Gln Ala Leu Gly Leu Leu Gly Leu Ile Asn Thr Ile His Ser
 340 345 350
 Glu Tyr Ile Val Gly Ser Leu Leu Phe Lys Gln Ala Asn Leu Leu Ser
 355 360 365
 Pro Ile Ser Ala Asp Ile Lys Tyr Tyr Tyr Gly Trp Asn Leu Phe Met
 370 375 380
 Ala Gly Gln Leu Glu Glu Ala Leu Gln Thr Ile Asn Glu Cys Leu Lys
 385 390 395 400
 Leu Asp Pro Thr Arg Ala Ala Ala Gly Ile Thr Lys Leu Trp Ile Thr
 405 410 415
 Tyr Tyr His Thr Gly Ile Asp Asp Ala Ile Arg Leu Gly Asp Glu Leu
 420 425 430
 Arg Ser Gln His Leu Gln Asp Asn Pro Ile Leu Leu Ser Met Gln Val
 435 440 445
 Met Phe Leu Ser Leu Lys Gly Lys His Glu Leu Ala Arg Lys Leu Thr
 450 455 460
 Lys Glu Ile Ser Thr Gln Glu Ile Thr Gly Leu Ile Ala Val Asn Leu
 465 470 475 480

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | His | Tyr | Phe | Phe | Ile | Ile | Val | Ile | Trp | Leu | Leu | Ser | Ile | Asn | Thr |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
| Ala | Trp | Ala | Asp | Cys | Trp | Leu | Gln | Ala | Glu | Lys | Met | Phe | Asn | Ile | Glu |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | |
| Ser | Glu | Leu | Leu | Tyr | Ala | Ile | Ala | Gln | Gln | Glu | Ser | Ala | Met | Lys | Pro |
| | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | |
| Gly | Ala | Ile | Gly | His | Asn | Arg | Asp | Gly | Ser | Thr | Asp | Leu | Gly | Leu | Met |
| | 50 | | | | | 55 | | | | | 60 | | | | |
| Gln | Ile | Asn | Ser | Phe | His | Met | Lys | Arg | Leu | Lys | Lys | Met | Gly | Ile | Ser |
| 65 | | | | | 70 | | | | | 75 | | | | | 80 |
| Glu | Lys | Gln | Leu | Leu | Gln | Asp | Pro | Ser | Ile | Ser | Val | Ile | Val | Gly | Ala |
| | | | | 85 | | | | | 90 | | | | | 95 | |
| Ser | Ile | Leu | Ser | Asp | Met | Met | Lys | Ile | Tyr | Gly | Phe | Ser | Trp | Glu | Ala |
| | | | 100 | | | | | 105 | | | | | 110 | | |
| Val | Gly | Ala | Tyr | Asn | Ala | Gly | Thr | Ser | Pro | Lys | Arg | Ser | Asp | Ile | Arg |
| | | 115 | | | | | 120 | | | | | | 125 | | |
| Lys | Arg | Tyr | Ala | Lys | Lys | Ile | Trp | Glu | Asn | Tyr | Arg | Lys | Leu | Lys | Glu |
| | 130 | | | | | 135 | | | | | 140 | | | | |
| Met | Ser | Ala | Glu | Glu | Lys | Asn | Lys | Arg | Leu | Ser | Ile | Ala | Val | Asn | Lys |
| 145 | | | | | 150 | | | | | 155 | | | | | 160 |

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:4:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 20 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) ENCADEAMENTO DE CADEIAS: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: outro ácido nucleico

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:4:

TATTAAGTAT GCAGGTTATG 20

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:5:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 21 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico

- (C) ENCADEAMENTO DE CADEIAS: simples
 - (D) TOPOLOGIA: linear
-
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: outro ácido nucleico
 - (xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:5:
AGAGAATTTTC TGCAAAGTGA A 21
-
- (2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:6:
 - (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
 - (A) COMPRIMENTO: 27 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) ENCADEAMENTO DE CADEIAS: simples
 - (D) TOPOLOGIA: linear
 - (ii) TIPO DE MOLÉCULA: outro ácido nucleico
 - (xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:6:
ATATCCACGC AGGAAATAAC AGGACTT 27
-
- (2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:7:
 - (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
 - (A) COMPRIMENTO: 21 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) ENCADEAMENTO DE CADEIAS: simples
 - (D) TOPOLOGIA: linear
 - (ii) TIPO DE MOLÉCULA: outro ácido nucleico
 - (xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:7:
GAGCGTGCCT TACCGACGAT A 21
-
- (2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:8:
 - (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
 - (A) COMPRIMENTO: 20 pares de base
 - (B) TIPO: ácido nucleico

- (C) ENCADEAMENTO DE CADEIAS: simples
 - (D) TOPOLOGIA: linear
-
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: outro ácido nucleico
 - (xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:8:
GCAGGGATCA CTAAGCTGTG 20
-
- (2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:9:
 - (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
 - (A) COMPRIMENTO: 21 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) ENCADEAMENTO DE CADEIAS: simples
 - (D) TOPOLOGIA: linear
 - (ii) TIPO DE MOLÉCULA: outro ácido nucleico
 - (xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:9:
CGTGGGCAAC CAGCACTAAC G 21
-
- (2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:10:
 - (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
 - (A) COMPRIMENTO: 20 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) ENCADEAMENTO DE CADEIAS: simples
 - (D) TOPOLOGIA: linear
 - (ii) TIPO DE MOLÉCULA: outro ácido nucleico
 - (xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:10:
CGGGTTAAAG GTTATCACCT 20
-
- (2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:11:
 - (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
 - (A) COMPRIMENTO: 17 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico

- (C) ENCADEAMENTO DE CADEIAS: simples
 - (D) TOPOLOGIA: linear
-
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: outro ácido nucleico
 - (xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:11:
AGCATGGCGC AAATGGG 17
-
- (2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:12:
 - (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
 - (A) COMPRIMENTO: 31 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) ENCADEAMENTO DE CADEIAS: simples
 - (D) TOPOLOGIA: linear
 - (ii) TIPO DE MOLÉCULA: outro ácido nucleico
 - (xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:12:
GCACCAGGAA AGCATTAAGT TGATAGAACA C 31
-
- (2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:13:
 - (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
 - (A) COMPRIMENTO: 20 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) ENCADEAMENTO DE CADEIAS: simples
 - (D) TOPOLOGIA: linear
 - (ii) TIPO DE MOLÉCULA: outro ácido nucleico
 - (xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:13:
CTTCGCTGGG ACACAAAGCA 20
-
- (2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:14:
 - (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
 - (A) COMPRIMENTO: 17 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico

- (C) ENCADEAMENTO DE CADEIAS: simples
 - (D) TOPOLOGIA: linear
-
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: outro ácido nucleico
 - (xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:14:
TAATGCTTTC CTGGTGC 17
-
- (2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:15:
 - (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
 - (A) COMPRIMENTO: 20 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) ENCADEAMENTO DE CADEIAS: simples
 - (D) TOPOLOGIA: linear
 - (ii) TIPO DE MOLÉCULA: outro ácido nucleico
 - (xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:15:
TACGGCATGG GCTGATTGCT 20
-
- (2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:16:
 - (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
 - (A) COMPRIMENTO: 24 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) ENCADEAMENTO DE CADEIAS: simples
 - (D) TOPOLOGIA: linear
 - (ii) TIPO DE MOLÉCULA: outro ácido nucleico
 - (xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:16:
TTACGCTATC GCCCAGCAGC AGGA 24
-
- (2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:17:
 - (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
 - (A) COMPRIMENTO: 29 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico

- (C) ENCADEAMENTO DE CADEIAS: simples
 - (D) TOPOLOGIA: linear
-
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: outro ácido nucleico
 - (xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:17:
TGGTCATAAC CGAGATGGTT CAAACGATC 29
-
- (2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:18:
 - (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
 - (A) COMPRIMENTO: 20 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) ENCADEAMENTO DE CADEIAS: simples
 - (D) TOPOLOGIA: linear
 - (ii) TIPO DE MOLÉCULA: outro ácido nucleico
 - (xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:18:
ACAGTTGTTA CAGGATCCCT 20
-
- (2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:19:
 - (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
 - (A) COMPRIMENTO: 17 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) ENCADEAMENTO DE CADEIAS: simples
 - (D) TOPOLOGIA: linear
 - (ii) TIPO DE MOLÉCULA: outro ácido nucleico
 - (xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:19:
CCGGGCAGAT GATACCC 17
-
- (2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:20:
 - (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
 - (A) COMPRIMENTO: 300 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico

- (C) ENCADEAMENTO DE CADEIAS: duplo
- (D) TOPOLOGIA: linear

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)
- (xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:20:

```
TATTATCATA CCGGTATTGA TGATGCTATA CGTTTAGGCG ATGAATTACG CTCACAACAC    60
CTGCAGGATA ATCCAATATT ATTAAGTATG CAGGTTATGT TTCTTTCGCT TAAAGGTAAA    120
CATGAACTGG CACGAAAATT AACTAAAGAA ATATCCACGC AGGAAATAAC AGGACTTATT    180
GCTGTTAATC TTCTTTACGC TGAATATTGT CAGAATAGTG AGCGTGCCTT ACCGACGATA    240
AGAGAATTC TGGAAAGTGA ACAGCGTATA GATAATAATC CGGGATTATT ACCGTTAGTG    300
```

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:21:

- (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
 - (A) COMPRIMENTO: 300 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) ENCADEAMENTO DE CADEIAS: duplo
 - (D) TOPOLOGIA: linear

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)
- (xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:21:

```
TATTATCATA CTGGTATTGA TGATGCTATA CGTTTAGGCG ATGAATTACG CTCACAACAC    60
CTGCAGGATA ATCCAATATT ATTAAGTATG CAGGTTATGT TTCTTCTCT TAAAGGTAAA    120
CATGAACTGG CACGAAAATT ATCTAAAGAA ATATCCACGC AGGAAATAAC AGGGCTTATT    180
GCTGTTAATC TTCTTTATGC TGAATACTGT CAGAATAGTG AGCGTGCCTT ACCGACGATA    240
AGAGAATTC TGGAAAGTGA ACAGCGTATA GATAATAATC CGGGATTATT ACCGTTAGTG    300
```

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:22:

- (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
 - (A) COMPRIMENTO: 300 pares de base
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) ENCADEAMENTO DE CADEIAS: duplo

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:22:

```
TATTATCATA CCGGCATTGA TGATGCCATA CGTTTAGGAG ATGAAGTACG CTCACAGCAC      60
CTGCAGGATA ATCCCATTTT ATTAAGTATG CAGGTTATGT TTCCTTCGCT TAAAGGTAAA      120
CATGAGCTGG CACGAAAATT AACTAAGAG ACATCCCCGC ATGAGATAAC AGGGCTTATT      180
GCTATTAATC TTCCTTATGC TGAATACTGT CAGAATAGTG AGCGAGCCTT ACCGAGGATA      240
AGAGAATATC TGGCAAGTGA ACGGAGTATT GATAATAATC CTGGACTATT ACCGTTAGTG      300
```

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:23:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 300 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) ENCADEAMENTO DE CADEIAS: duplo

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:23:

```
TATTATCATG CCGGCATTGA TGATGCTATA CGTTTAGGAG ATGAATTACG TTCACAACAT      60
CTGCAGGATA ATCCCACTACT ATTAAGTATG CAGGTTATGT TTCCTTCGCT TAAAGGTAAA      120
CATGAAGCTGG CACGAAAATT AGCTAAGAG ATATCCBAGC ATGAATAAC AGGGCTTATT      180
GCTGTTAATC TTCCTGATGC TGAATACTGT CAGAATAGCG AGCGTGCATT ACCGAGGATA      240
AGAGAGTTTC TGGAAAGTGA ACAGAATACT GATAATAATC CCGGGCTATT ACCGTTAGTG      300
```

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:24:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 300 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) ENCADEAMENTO DE CADEIAS: duplo

- (D) TOPOLOGIA: linear
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)
- (xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:24:

```

TACTATCATA CTGGCCTTGA TGATGCTATA CGTTTAGGAG ATGAATTACG TTCGCAACAT      60
TTGCAGGATA ATCCAATATT ATTAAGTATG CAGGTTATGT TTCTTTCGCT TAAAGGTAAA      120
CATGAAC TGG CACGAAAATT AACTAAGAA ATATCCACAC ATGAAATAAC AGGGCTTATT      180
GCTGTAAATC TTCTTTATGC TGAATACTGT CAGAATAGTG AGCGTGCCTT AGCGACGATA      240
AGAGAATTC TGGAAAGTGA ACAGAGTGTG GATAATAACC CAGGGTTATT ACCGTTAGTG      300

```

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:25:

- (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
 - (A) COMPRIMENTO: 300 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) ENCADEAMENTO DE CADEIAS: duplo
 - (D) TOPOLOGIA: linear
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)
- (xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:25:

```

TATTATCAGA CTGGCATTGA TGATGCTATA CGTTTAGGCG ATGAATTACG CTCACAATAT      60
CTGCAGGATA ATCCAATATT ATTAAGTATG CAGCTTATGT TTCTTTCGCT TAAAGGTAAA      120
CATGACTTGG CACGAAAATT AGCTAAGAA ATATCCACAC ACCAAGTAAC AGGGCTTATT      180
GCTGTAAATC TTCTTTATGC TGAATACTGT CAGAATAGCG AGCGTGCCTT ACCGGCGATA      240
AGAGAATTC TGGAAAGTGA ACAGAAATATA GATAATAATC CGGGGCTATT ACCGTTAGTG      300

```

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:26:

- (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
 - (A) COMPRIMENTO: 300 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) ENCADEAMENTO DE CADEIAS: duplo
 - (D) TOPOLOGIA: linear

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)
- (xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:26:

```
TACTATCATA CAGGCCTTGA TGATGCTATA CGTTTAGGCG ATGAATTACG TACACAACAT    60
TTGCAAGATA ATCCTATATT ATTAAGTATG CAAGTTATGT TTCTTTCGCT TAAAGGTAAA    120
CATGAACCTGG CACGGCTATT AGCTAAAGAA ATATCCTCAC ATGAAATAAC AGGGCTTATT    180
GCTATTAAATC TTCTTTATGC TGAATATTGT CAGAATAGTG AGCGGCCTT ACCGGCGATA    240
AAAGAATTC TGGAACTGA ACAAATATT CACAATAACC CTGGGCTATT ACCGTTAGTG    300
```

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:27:

- (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
 - (A) COMPRIMENTO: 300 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) ENCADEAMENTO DE CADEIAS: duplo
 - (D) TOPOLOGIA: linear

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)
- (xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:27:

```
TATTATCATA CCGGCATTGA TGATGCTATA CGGTTAGGAG ATGAATTACG TTCACACAC    60
TTGCAGGATA ATCCAATATT ATTAAGTATG CAGGTTATGT TTCTTTCGCT TAAAGGTAAA    120
CATGAACCTGG CACGAAAATT AACTAAAGAA ATATCCAGAC ATGAAATAAC AGGGCTTATT    180
GCTGTTAATC TTCTTTATGC TGAATACTGT CAGAATAGTG AGCGTGCCTT ATCGAGGATA    240
AGAGAATTC TGGAACTGA ACAGAGTATT GATAATAATC CAGGACTATT ACCGTTAGTG    300
```

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:28:

- (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
 - (A) COMPRIMENTO: 34 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) ENCADEAMENTO DE CADEIAS: simples
 - (D) TOPOLOGIA: linear

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: outro ácido nucleico

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:28:
CCCGAACTAT CTCGATCTGT ACAATATTAT CATT 34

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:29:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 18 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) ENCADEAMENTO DE CADEIAS: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: outro ácido nucleico

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:29:
GCAGGTGATT ACCTTTAA 18

Lisboa, 2 de Maio de 2011

REIVINDICAÇÕES

1. Par de iniciadores de oligonucleótidos, **caracterizado por** consistir em dois oligonucleótidos de pelo menos 9 nucleótidos, capaz de hibridar nas condições estritas com a sequência de nucleótidos que corresponde à parte C-terminal do gene *iagA* definida entre as posições 1318 e 1755 da sequência *iagA* representada na figura 1, sendo o referido par capaz de amplificar uma sequência de ADN ou de ADNc de *Salmonella entérica* e *Salmonella bongori* contidos na sequência *iagA*.

2. Par de iniciadores de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** as condições de hibridação estritas serem de 50°C, na seguinte mistura reactiva: 50mM KCl, 10mM Tris-Hcl pH 8,3, 1,5mM MgCl₂, 125µM de dCTP, dATP e dGTP, 250µM de dUTP, 25pmole de cada um dos iniciadores, 1 unidade de Uracil-N-Glicosilase e 1 U de Taq.

3. Conjunto para a detecção da presença de *Salmonella entérica* e/ou *Salmonella bongori* em amostras biológicas, **caracterizado por** compreender:

- um par de iniciadores de oligonucleótidos de acordo com a reivindicação 1 ou 2,
- uma sonda para a detecção de fragmentos amplificados, e
- reagentes necessários para a realização da reacção de amplificação.

4. Utilização de um par de iniciadores de acordo com a reivindicação 1, para a amplificação de sequências de nucleótidos de bactérias do género *Salmonella* das espécies *entérica* e *bongori*.

5. Utilização de um par de iniciadores de oligonucleótidos de acordo com a reivindicação 1, para a detecção após a amplificação do ADN genómico ou do ADNc, de bactérias do género *Salmonella* das espécies *entérica* e *bongori*.

6. Utilização de acordo com a reivindicação 4 ou 5, em que as condições de hibridação estritas são de 50°C, na seguinte mistura reactiva: 50mM KCl, 10mM Tris-Hcl pH 8,3, 1,5mM MgCl₂, 125µM de dCTP, dATP e dGTP, 250µM de dUTP, 25pmole de cada um dos iniciadores, 1 unidade de Uracil-N-Glicosilase e 1 U de Taq.

Lisboa 2 de Maio de 2011

1 31
 GTA CTA GCA GCA GAA TTA CTG AAA CAG TAG ATT CTA TCC TAA CGA CTT GTA TTA GCT ATT

 61 91 *laga*
 ATA ACT TTT CAC CCT GTA AGA GAA TAC ACT ATT ATC ATG CCA CAT TTT AAT CCT GTT CCT
 met pro his phe asn pro val pro

 121 151
 GTA TCG AAT AAA AAA TTC GTC TTT GAT GAT TTC ATA CTC AAC ATG GAC GGC TCC CTC GTA
 val ser asn lys lys phe val phe asp asp phe ile leu asn met asp gly ser leu val
 181 211
 CGC TCA GAA AAG AAA GTC AAT AIT CCG CCA AAA GAA TAT GCC GTT CTG GTC ATC CTG CTC
 arg ser glu lys lys val asn ile pro pro lys glu tyr ala val leu val ile leu leu
 241 271
 GAA CCC GCC GGC AAG ATT GTG AGT AAA AAC ACC TTA TTG GAC CAA GTA TCG GGC GAC GCG
 glu ala ala gly lys ile val ser lys asn thr leu leu asp gln val trp gly asp ala
 301 331
 GAA GTT AAC GAA GAA TCT CTT ACC CGC TGT ATC TAT GCC TTA CGA CGT ATT CTG TCG GAA
 glu val asn glu glu ser leu thr arg cys ile tyr ala leu arg arg ile leu ser glu
 361 391
 GAT AAA GAG CAT CGT TAC AIT GAA ACA CTG TAC GGA CAG GGT TAT CCG TTT AAT CGT CCG
 asp lys glu his arg tyr ile glu thr leu tyr gly gln gly tyr arg phe asn arg pro
 421 451
 GTC GTA GTC GTC TCT CCG CCA GGC CCG CAA CCT ACC ACT CAT ACA TTG GCG ATA CTT CCT
 val val val val ser pro pro ala pro gln pro thr thr his thr leu ala ile leu pro
 481 511
 TTT CAG ATG CAG GAT CAG GTT CAA TCC GAG AGT CTG CAT TAC TCT ATC GTG AAG GCA TTA
 phe gln met gln asp gln val gln ser glu ser leu his tyr ser ile val lys gly leu
 541 571
 TCG CAG TAT GCG CCC TTT GGC CTG AGC GTG CTG CCG GTG ACC AIT ACG AAG AAC TCC CCC
 ser gln tyr ala pro phe gly leu ser val leu pro val thr ile thr lys asn cys arg
 601 631
 ACT GTT AAG GAT ATT CTT GAG CTC ATG GAT CAA TTA CCG CCC GAT TAT TAT ATC TCC GCG
 ser val lys asp ile leu glu leu met asp gln leu arg pro asp tyr tyr ile ser gly
 661 691
 CAG ATG ATA CCC GAT GGT AAT GAT AAT ATT GTA CAG ATC GAG ATA GTT CCG GTT AAA GGT
 gln met ile pro asp gly asn asp asn ile val gln ile glu ile val arg val lys gly
 721 751
 TAT CAC CTG CTG CAC CAG GAA AGC ATT AAG TTG ATA GAA CAC CAA CCC GCT TCT CTC TTG
 tyr his leu leu his gln glu ser ile lys leu ile glu his gln pro ala ser leu leu
 781 811
 CAA AAC AAA ATT GCG AAT CTT TTG CTC AGA TGT AIT CCC GGA CTT CCG TGG GAC ACA AAG
 gln asn lys ile ala asn leu leu leu arg cys ile pro gly leu arg trp asp thr lys
 841 871
 CAA ATT AGC GAG CTA AAT TCG ATT GAC AGT ACC ATG GTC TAC TTA CCC GGT AAG CAT GAG
 gln ile ser glu leu asn ser ile asp ser thr met val tyr leu arg gly lys his glu
 901 931
 TTA AAT CAA TAC ACC CCC TAT AGC TTA CAG CAA CCG CTT AAA TTG CTG ACT CAA TGC GTT
 leu asn gln tyr thr pro tyr ser leu gln gln ala leu lys leu leu thr gln cys val
 961 991
 AAT ATG TCG CCA AAC AGC ATT GCG CCT TAC TGT GCG CTG GCA GAA TCC TAC CTC AGC ATG
 asn met ser pro asn ser ile ala pro tyr cys ala leu ala glu cys tyr leu ser met
 1021 1051
 CCG CAA ATG GCG AIT TTT GAT AAA CAA AAC GCA ATG ATC AAA GCT AAA GAA CAT CCG ATT
 ala gln met gly ile phe asp lys gln asn ala met ile lys ala lys glu his ala ile
 1081 1111
 AAG GCG ACA GAG CTG GAC CAC AAT AAT CCA CAA GCT TTA GGA TTA CTG GGG CTA ATT AAT
 lys ala thr glu leu asp his asn asn pro gln ala leu gly leu leu gly leu ile asn

Figura 1 (1)

1141
ACG ATT CAC TCA GAA TAC ATC GTC GGG AGT TTG CTA TTC AAA CAA GCT AAC TTA CTT TCG
thr ile his ser glu tyr ile val gly ser leu leu phe lys gln ala asn leu leu ser

1171
1201
CCC ATT TCT GCA GAT ATT AAA TAT TAT TAT GGC TGG AAT CTT TTC ATG GCT GGT CAG TTG
pro ile ser ala asp ile lys tyr tyr tyr gly trp asn leu phe met ala gly gln leu
1261/421
GAG CAG GCC TTA CAA ACC ATT AAC GAG TGT TTA AAA TTG GAC CCA ACC CGC GCA GCC GCA
glu glu ala leu gln thr ile asn glu cys leu lys leu asp pro thr arg ala ala ala
1321/441
GGG ATC ACT AAG CTG TGG ATT ACC TAT TAT CAT ACC GGT ATT GAT GAT GCT ATA CGT TTA
gly ile thr lys leu trp ile thr tyr tyr his thr gly ile asp asp ala ile arg leu
1381/461
GGC GAT GAA TTA CGC TCA CAA CAC CTG CAG GAT AAT CCA ATA TTA TTA AGT ATG CAG GTT
gly asp glu leu arg ser gln his leu gln asp asn pro ile leu leu ser met gln val
1441/481
ATG TTT CTT TCG CTT AAA GGT AAA CAT GAA CTG GCA CGA AAA TTA ACT AAA GAA ATA TCC
met phe leu ser leu lys gly lys his glu leu ala arg lys leu thr lys glu ile ser
1501
ACG CAG GAA ATA ACA GCA CTT ATT GCT CTT AAT CTT CTT TAC GCT GAA TAT TGT CAG AAT
thr gln glu ile thr gly leu ile ala val asn leu leu tyr ala glu tyr cys gln asn
1561
AGT GAG CGT GCC TTA CCG ACC ATA AGA GAA TTT CTG GAA AGT GAA CAG CGT ATA GAT AAT
ser glu arg ala leu pro thr ile arg glu phe leu glu ser glu gln arg ile asp asn
1621
AAT CCG GGA TTA TTA CCG TTA GTC CTG CTT GCC CAC GCC GAA GCT ATT GCC CAG AAA ATG
asn pro gly leu leu pro leu val leu val ala his gly glu ala ile ala glu lys met
1681
TGG AAT AAA TTT AAA AAC GAA GAC AAT ATT TGG TTC AAA AGA TGG AAA CAG GAT CCC CGC
trp asn lys phe lys asn glu asp asn ile trp phe lys arg trp lys gln asp pro arg
1741
TTG ATT AAA TTA CGG TAA AAT CTC ACA CAG GAG AT ATG CAT TAT TTT TTT ATC ATC GTA
leu ile lys leu arg met his tyr phe phe ile ile val
1800 553 1830 554
ATC TGG TTG CTT AGC ATA AAT ACQ GCA TGG GCT GAT TGC TGG CTT CAG GCT GAA AAA ATG
ile trp leu leu ser ile asn thr ala trp ala asp cys trp leu gln ala glu lys met
1860
TTC AAT ATT GAA TCC GAA CTA CTT TAC GCT ATC GCC CAG CAG GAA TCG GCG ATG AAA CCT
phe asn ile glu ser glu leu leu tyr ala ile ala gln gln glu ser ala met lys pro
1920
GGC GCC ATT GGT CAT AAC CGA GAT GGT TCA ACC GAT CTT GCC CTG ATG CAA ATT AAC AGC
gly ala ile gly his asn arg asp gly ser thr asp leu gly leu met gln ile asn ser
1980
TTC CAT ATG AAA AGG CTG AAA AAA ATG GGG ATT AGT GAA AAA CAG TTG TTA CAG GAT CCC
phe his met lys arg leu lys lys met gly ile ser glu lys gln leu leu gln asp pro
2040
TGC ATT TCT GTC ATT CTG GGC GCA TCC ATT TTA TCA GAT ATG ATG AAA ATC TAC GGT TTT
cys ile ser val ile val gly ala ser ile leu ser asp met met lys ile tyr gly phe
2100
AGC TGG GAG GCC GTT GGC GGT TAT AAT GCC GGG ACC TCG CCG AAA CGA TCG GAT ATA AGG
ser trp glu ala val gly ala tyr asn ala gly thr ser pro lys arg ser asp ile arg
2160
AAA CCT TAT GCT AAA AAA ATT TCG GAG AAT TAC AGA AAA TTA AAA CAG ATG TCA GCA GAA
lys arg tyr ala lys lys ile trp glu asn tyr arg lys leu lys glu met ser ala glu
2220
GAG AAA AAC AAA AGA CTT TCT ATC GCG GTA AAC AAA TAA TTA TAC AGC AAT AGC TTA CTT
glu lys asn lys arg leu ser ile ala val asn lys
713

Figura 1 (2)



Figura 2

ALINHAMENTO DE SEQUÊNCIAS DE FRAGMENTOS AMPLIFICADOS
(nucleótidos 1345 a 1644)
dos 6 GRUPOS DE SALMONELAS

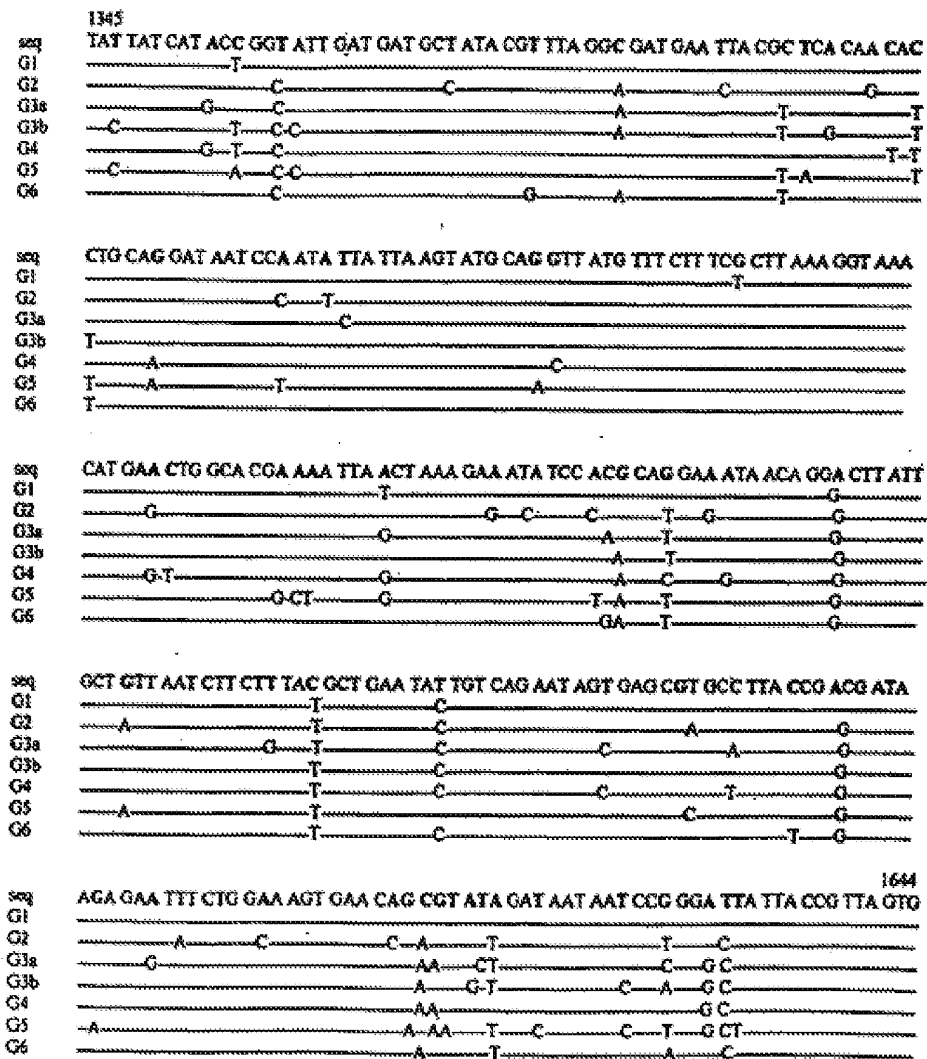


Figura 3

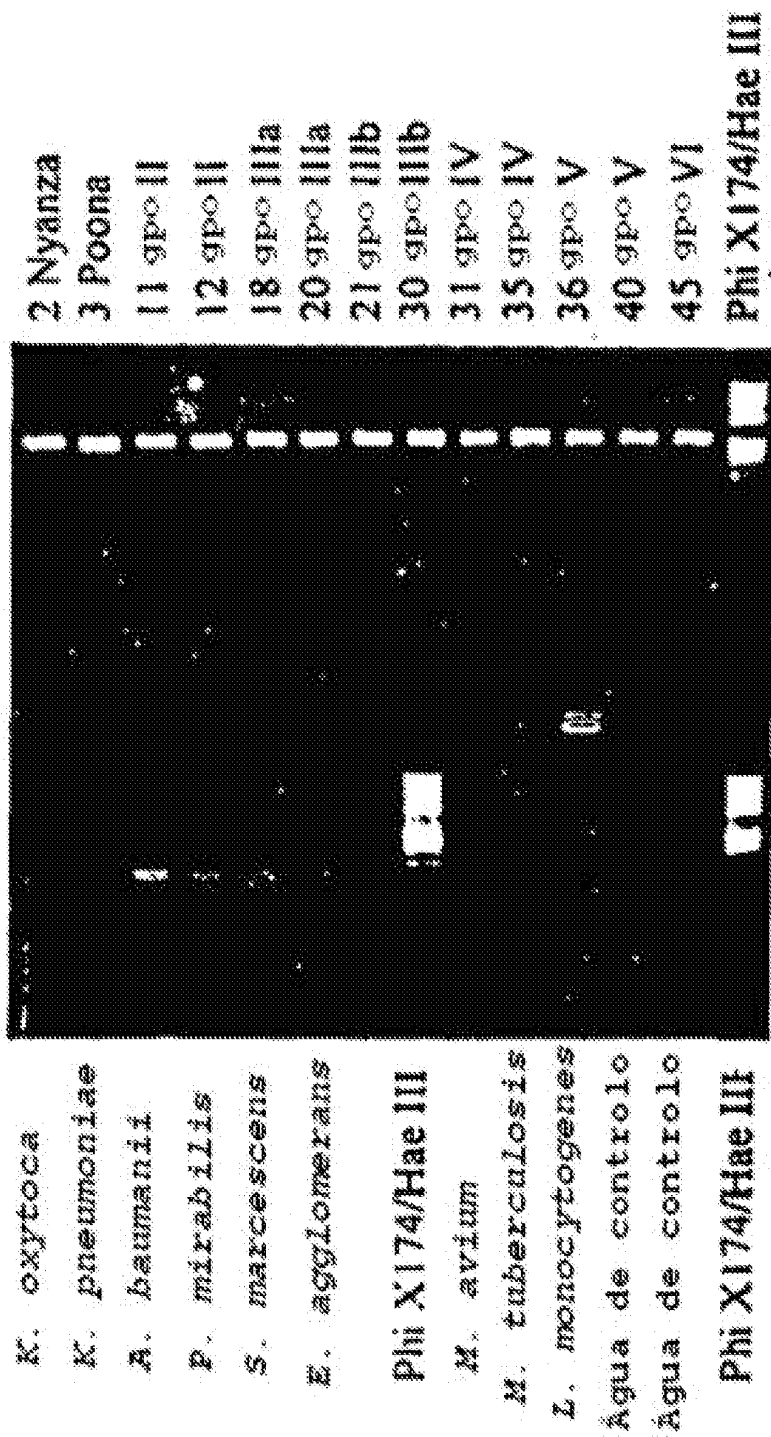


Figura 4

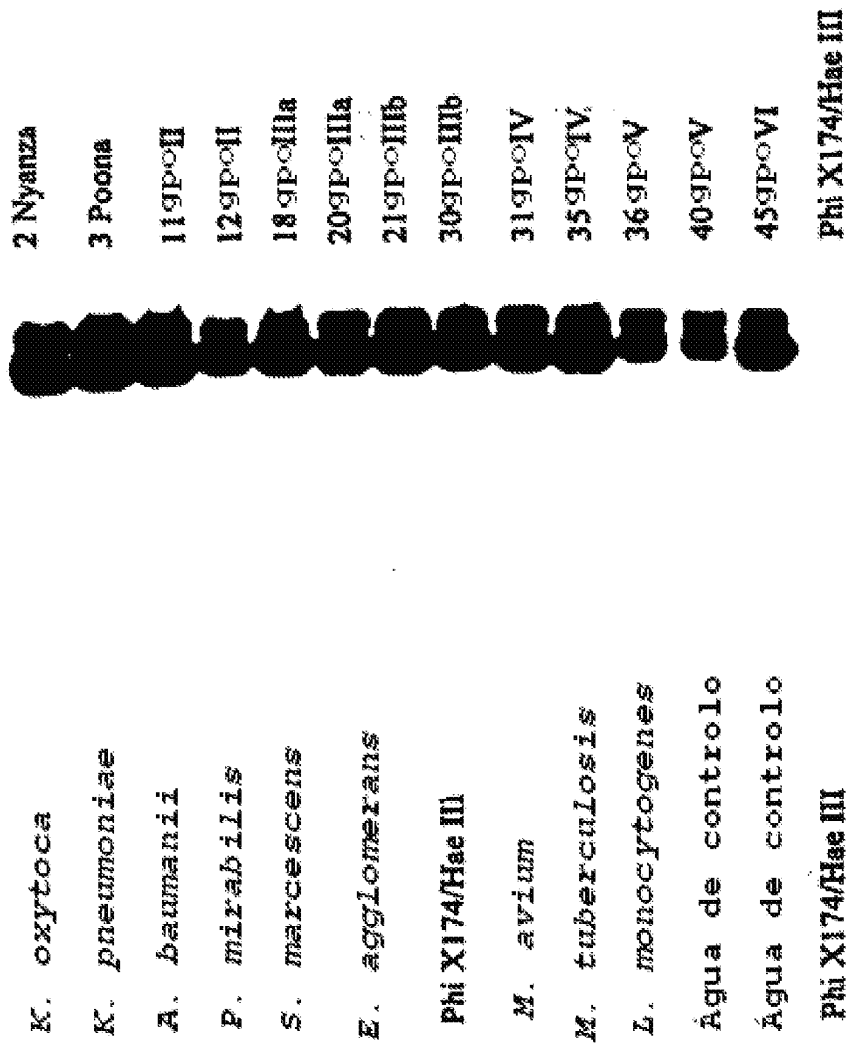


Figura 5

SENSIBILIDADE





| número de cópias | hibridação em membrana | densidade óptica microplaca |
|------------------|---|-----------------------------|
| 1 | | 0.020 |
| 5 |  | 0.351 |
| 10 |  | 1.912 |
| 50 |  | 3.123 |
| 100 |  | 3.200 |
| Água de controle | | 0.021 |

Figura 6

Localização dos iniciadores e das sondas
sobre a sequência do gene IagA

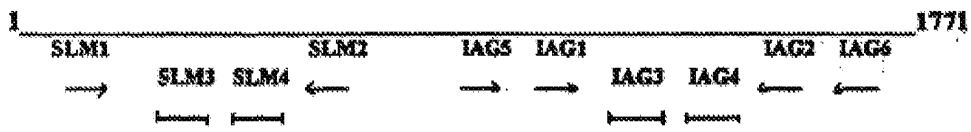


Figura 7