



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

(11) PI 9711144-9 B1



* B R P I 9 7 1 1 1 4 4 B 1 *

(22) Data de Depósito: 16/07/1997

(45) Data da Concessão: 25/08/2015
(RPI 2329)

(54) Título: Artigo para determinar a presença ou a quantidade de estafilococos positivos à nuclease termoestável
processo para determinar estafilococos positivos à nuclease termoestável em uma amostra, e, estojo para a detecção
de estafilococos positivos à nuclease termoestável em uma amostra.

(51) Int.CI.: C12Q1/14

(30) Prioridade Unionista: 14/08/1996 US 08/696385

(73) Titular(es): Minnesota Mining And Manufacturing Company

(72) Inventor(es): Maryls E. Lund, Patrick A. Mach

“PROCESSO PARA DETERMINAR ESTAFILOCOCOS POSITIVOS À NUCLEASE TERMOESTÁVEL EM UMA AMOSTRA *IN VITRO*, E, ESTOJO PARA A DETECÇÃO DE ESTAFILOCOCOS POSITIVOS À NUCLEASE TERMOESTÁVEL EM UMA AMOSTRA”

5

Campo da Invenção

Esta invenção se refere à detecção de estafilococos potencialmente enterotoxigênicos, positivos à nuclease termoestável, incluindo Staphylococcus aureus, em amostras, e a um artigo para tal detecção contendo nucleotídeos não-hidrolisados, azul toluidina O, e um

10

ligante.

Fundamentos da Invenção

A detecção de estafilococos potencialmente enterotoxigênicos é um aspecto importante do processamento de alimentos e pode ser usado como um meio de varredura para indicações de contaminação durante o processamento e para a contaminação pós-processamento. As avaliações de amostra de alimento quanto a estafilococos potencialmente enterotoxigênicos podem servir como uma indicação direta da presença de espécies patogênicas potenciais em alimentos. A

15 para indicações de contaminação durante o processamento e para a contaminação pós-processamento. As avaliações de amostra de alimento quanto a estafilococos potencialmente enterotoxigênicos podem servir como uma indicação direta da presença de espécies patogênicas potenciais em alimentos. A

20 detecção de Staphylococcus aureus (S. aureus), uma espécie enterotoxigênica conhecida, é especialmente importante no processamento de alimentos. Outras espécies potencialmente enterotoxigênicas de Staphylococcus são também conhecidas, e a

25 testagem de amostras quanto à contaminação com estas espécies pode também ser importante. Além disso, a testagem de amostras do paciente para indicar possível infecção por estafilococos patogênico é importante no ambiente clínico.

Processos usuais para a detecção de S.aureus utilizam meio de ágar de Baird-Parker de gema-de-ovo-telurita-piruvato (abreviado como

BPA) para determinar a presença presumível de S.aureus em uma parte fracional de uma amostra. Neste processo, as placas de BPA são examinadas quanto à presença de colônias "típicas" após 48 horas de incubação. As amostras das colônias são então transferidas a uma infusão cérebro-coração para uma incubação adicional de até 24 horas. As culturas de caldo são misturadas com plasma de coelho para uma incubação adicional de 6 horas. As misturas de cultura-plasma são então avaliadas quanto à presença de coagulação do plasma (isto é, formação de coalho). As culturas que dão origem a um coalho são consideradas como sendo "positivas à coagulase". Um resultado positivo presumível a partir de BPA seguido por um resultado positivo à coagulase é considerado como sendo a confirmação da presença de S.aureus na amostra.

O uso da atividade de coagulase associada com a presença de S.aureus foi também verificado como estando correlacionado com a patogenicidade potencial, incluindo a produção de enterotoxina. A natureza morosa, tediosa, do teste de coagulase, entretanto, o torna impraticável para a testagem de rotina de grandes quantidades de amostras.

A presença de S.aureus é presentemente confirmada tanto em processamento de alimentos como em ambientes clínicos pelo uso do teste coagulase. Por exemplo, em ambiente clínico, as amostras são relatadas como "CNS" (staph. negativo à coagulase) ou "CPS" (staph. positivo à coagulase).

Duas alternativas para o teste de coagulase apresentaram boa relação estatística para a reação de coagulase de S.aureus; hialuronidase e nuclease termoestável (TNase). O sistema de hialuronidase, entretanto, é complexo e dispendioso. A testagem quanto à atividade TNase era também tediosa até que Lachica *et al.*, Applied microbiology 21(4), págs.585-87 (1971), descreveu o uso do corante metacromático, azul toluidina O, corante para a detecção de TNase pelo manchamento diferencial na presença de DNA hidrolisado e não-hidrolisado.

O processo de detecção de TNase foi descrito e usado em processos incluindo (1) formação de reservatórios em uma placa de Petri enchida com ágar de DNA/TBO e colocação das culturas fervidas dentro do reservatório para determinar a presença de TNase, (2) formação de reservatórios em um meio de ágar de DNA/TBO fundido sobre a superfície de uma lâmina de microscópio (ou equivalente) e seguindo o procedimento de (1), (3) sobrepondo uma placa de ágar de Baird-Parker (ou equivalente) com ágar de DNA/TBO fundido após a placa de BPA desenvolvido ter sido pré-incubada a 60°C por pelo menos 2 horas. (1), (2) e (3) fornecem resultados legíveis em 2-4 horas a partir de colônias ou suspensões que são positivas para TNase. Usando estes processos, vários investigadores demonstraram correlação do teste de TNase com o teste de coagulase para S.aureus de até 100%.

A atividade de TNase foi também detectada em outras espécies de Staphylococcus potencialmente enterotoxigênicas, incluindo algumas que são negativas à coagulase, por exemplo,

Staphylococcus hyicus. A TNase parece assim ser um melhor indicador da enterotoxigenicidade do que o teste de coagulase, isto é, os organismos mais enterotoxigênicos são positivos à TNase, embora nem todos sejam positivos à coagulase.

Embora os processos correntes de testagem de TNase sejam confiáveis, a sua utilidade na testagem ou varredura de grandes quantidades de amostras é severamente limitada pela necessidade de formar reservatórios ou preparar ágar fundido de modo a que sejam obtidos resultados, os quais são demorados, e por técnicas ineficientes no contexto de testagem de grandes quantidades de amostras. Seria assim desejável desenvolver um teste de TNase para estafilococos potencialmente enterotoxigênicos, que iria permitir a testagem eficiente e confiável ou a varredura de grandes quantidades de amostras, em processamento de alimentos ou em aplicações

clínicas.

Sumário da Invenção

5 Em um aspecto, a invenção é caracterizada por um artigo para a detecção ou confirmação da presença de estafilococos potencialmente enterotoxigênicos, positivos à nuclease termoestável, em uma amostra. O artigo contém nucleotídeos não-hidrolisados, azul toluidina O, e um ligante. O artigo possui pelo menos duas superfícies, e é adaptado para a colocação contra uma amostra suspeita de conter estafilococos enterotoxigênicos, tais que S. aureus.

10 Em modalidades preferidas, o ligante é goma de guar. O artigo pode ainda compreender carragenano lamda como um agente de intensificação de contraste. O artigo pode ser de qualquer espessura ou configuração. Por exemplo, o artigo pode estar em formato de disco, e como tal, adaptado para a colocação em uma placa ou reservatório, ou sobre um sistema de placa de cultura de filme delgado, tal que um Petrifilm^{MR}.
15 Preferivelmente, o artigo possui uma espessura de entre cerca de 0,12-0,25 mm.

O artigo contém preferivelmente um suporte sólido, tal que um filme de poliéster, adjacente a uma superfície do artigo. O artigo pode
20 ainda conter um material protetor. O material protetor pode estar adjacente a uma superfície exposta do artigo. Quando o artigo contém um suporte sólido adjacente a uma superfície, o material protetor pode estar adjacente à superfície oposta.

O artigo da invenção pode conter reagentes selecionados de tal modo que a hidrólise mediada por nuclease termoestável (TNase) dos
25 nucleotídeos não-hidrolisados no artigo ocorra em um pH particular. Preferivelmente, o artigo contém reagentes selecionados de tal modo que a hidrólise do nucleotídeo ocorra em um pH de cerca de 9,0. Alternativamente, o artigo pode preferivelmente conter reagentes, de tal modo que a hidrólise

do nucleotídeo ocorra em um pH de cerca de 7,3.

Em outro aspecto, a invenção é caracterizada por um processo de detecção de estafilocos positivos à nuclease termoestável em uma amostra. O processo inclui os estágios de (1) aplicar um artigo como acima descrito para a detecção de estafilococos positivos à nuclease termoestável a uma amostra suspeita de conter estafilococos potencialmente enterotoxigênicos, e (2) confirmar a presença ou ausência de estafilococos positivos à nuclease termoestável na amostra. A presença ou ausência é confirmada pela detecção da presença ou ausência de uma alteração de cor de azul para vermelho ou rosa no artigo.

Em modalidades preferidas, a amostra é uma amostra de alimento. Em outras modalidades preferidas, a amostra é uma amostra a partir de um paciente.

O meio de cultura, ao qual a amostra de teste é aplicada, pode ser um meio à base de ágar, tal que Ágar de Baird-Parker, ou, mais preferivelmente, pode ser um dispositivo de placa de cultura de filme delgado, adaptado para o crescimento de estafilococos.

O estágio de incubação da amostra de teste no meio de cultura preferivelmente inclui a incubação da amostra a cerca de 37°C por cerca de 18-48 horas. O estágio de aquecimento da amostra envolve preferivelmente incubar a amostra pelo menos a cerca de 60°C por pelo menos cerca de 30 minutos.

O processo pode ainda compreender o estágio de quantificar o número de estafilococos positivos à nuclease termoestável na amostra. A quantificação pode envolver a contagem do número de colônias associadas a uma alteração de cor no artigo, e correlacionar o número de colônias com uma quantidade de estafilococos potencialmente enterotoxigênicos na amostra.

Em outro aspecto, a invenção é caracterizada por um estojo para a detecção de estafilococos positivos à nuclease termoestável em uma

amostra. O estojo contém reagentes e nutrientes para o crescimento de microorganismos a partir da amostra, e um artigo para a detecção de estafilococos positivos à nuclease termoestável em uma amostra.

5 Em modalidade preferidas, os reagentes e nutrientes para o crescimento de microorganismos incluem um dispositivo de placa de cultura de filme delgado, adaptado para o crescimento de estafilococos.

Breve Descrição das Figuras

A figura 1 é uma vista em seção transversal de um dispositivo que mostra uma modalidade do artigo da invenção.

10 A figura 2 é uma vista em perspectiva, parcialmente explodida, de um dispositivo que mostra uma modalidade do artigo da invenção.

As figuras 3a-3c ilustram o uso de uma modalidade do artigo da invenção com um dispositivo de placa de cultura de filme-delgado.

Descrição Detalhada da Invenção

15 A invenção fornece um artigo para a detecção de estafilococos positivos à nuclease termoestável em uma amostra. O artigo da invenção permite a análise de TNase rápida, eficiente, e sensível de grandes números de amostras, a proporciona assim vantagens distintas em relação a processos de TNase lentos e embaraçosos correntemente usados para a detecção de estafilococos potencialmente enterotoxigênicos, incluindo S. aureus. O artigo também proporciona vantagem em relação à testagem de coagulase; a testagem de TNase é mais sensível na detecção de estafilococos potencialmente enterotoxigênicos, devido ao fato de que nem todos os estafilococos potencialmente enterotoxigênicos são positivos à coagulase, enquanto que a maior parte dos estafilococos enterotoxigênicos são positivos à TNase. O artigo da invenção é especialmente útil na análise de amostras de alimento quanto à presença de S.aureus.

O artigo da invenção utiliza os princípios de que (1) a

presença de nuclease termoestável (TNase) em uma amostra indica a presença de possíveis estafilococos enterotoxigênicos na amostra, e (2) o corante metacromático azul toluidina O pode ser usado para detectar a atividade de Tnase na presença de um polissacarídeo ácido e de DNA.

5 Azul toluidina O é um corante metacromático. Metacromasia é a propriedade pela qual um corante não manchará de modo exato, devido a complexos formados com algumas substâncias que irão resultar em um espectro de absorção diferente daquele do corante original. O manchamento exato, ou ortocromático, de azul toluidina O é azul enquanto que o
10 manchamento metacromático resulta em uma cor rosa a vermelha ou violeta. Quando azul toluidina O é complexado com DNA ele mancha azul, mas quando complexado com um polissacarídeo ácido tal que agarose, carragenano lambda, heparina ou similares, ocorre metacromasia e o corante mancha de rosa avermelhado para violeta avermelhado.

15 O azul toluidina O possui maior afinidade para DNA do que para um polissacarídeo ácido, e DNA solubiliza o azul toluidina O em seu estado ortocromático de azul. Quando um organismo que produz DNase está presente, entretanto, o DNA é hidrolisado, deixando o azul toluidina O desprotegido do polissacarídeo ácido e o corante se altera para a sua forma
20 metacromática rosa avermelhada ou púrpura avermelhada. Uma alteração de cor de azul para rosa avermelhado ou púrpura avermelhado é uma identificação positiva de uma DNase, por exemplo, uma nuclease termoestável, que produz microorganismo.

Conseqüentemente, a invenção fornece um artigo para
25 detectar estafilococos positivos à nuclease termoestável. O artigo contém nucleotídeos não-hidrolisados, azul toluidina O, e um ligante. O artigo é adaptado para colocação contra uma amostra, usualmente uma amostra cultivada, suspeita de conter estafilococos enterotoxigênicos.

O artigo é relativamente seco, em oposição a líquido ou

fundido, em uma extensão tal que ele possa ser armazenado em condição estável para uso em testagem. Como tal, o artigo é adaptado para colocação contra uma amostra suspeita de conter estafilococos enterotoxigênicos. Em uso, o artigo desta invenção é assim altamente vantajoso, comparado com
5 processos correntemente disponíveis, que requerem a formação de reservatórios em ágar recentemente preparado, ou o uso de ágar fundido.

Os nucleotídeos não-hidrolisados na amostra estão tipicamente sob a forma de DNA, que está prontamente disponível comercialmente (por exemplo, DNA de esperma de salmão, disponível de
10 Difco Laboratories, Detroit, MI), mas podem ser qualquer nucleotídeo de tamanho suficiente para que ele manche azul com azul toluidina O, isto é, estabilize azul toluidina O em seu estado ortocrômico de azul. O termo "nucleotídeos não-hidrolisados" como aqui empregado refere-se a tais ácidos nucléicos. Azul toluidina O está disponível comercialmente (Sigma Chemical
15 Company, St. Louis, MO).

O ligante no artigo pode ser qualquer ligante que cause metacromasia com relação a azul toluidina O, e pode ser misturado com outros constituintes do artigo na solução e, então, revestido e secado sobre um substrato para formar o artigo. Polissacarídeos ácidos são conhecidos
20 como causando metacromasia com relação a azul toluidina O, e são ligantes preferidos. Existem muitos ligantes que seriam adequados para uso no artigo. Exemplos não-limitantes de ligantes adequados incluem agarose, goma de guar, goma de xantano, goma de alfarroba, e outras gomas naturais. Um ligante preferido é goma de guar.

O artigo pode preferivelmente também incluir outros constituintes, tais que cloreto de cálcio (para a atividade de TNase), cloreto de sódio (para proporcionar resistência iônica apropriada), ou um sistema de tampão (para controlar o pH no qual ocorre a reação de TNase) tal que Tris hidrocloreto/Tris base.

O artigo da invenção pode ser preparado a partir de soluções de pH variável. Como tal, o artigo contém reagentes, de tal modo que a hidrólise de nucleotídeo mediada por TNase ocorra em um pH selecionado. Por exemplo, como mostrado abaixo no Exemplo 1, um artigo de acordo com
5 uma modalidade preferida da invenção pode ser produzido a partir de uma solução de pH de 7,3. Alternativamente, como mostrado abaixo no Exemplo 2, um artigo de acordo com outra modalidade preferida da invenção pode ser produzido a partir de uma solução com pH de 9,0.

O pH ótimo para a atividade de TNase é de 8,5-9,0. Se o
10 artigo for preparado de tal modo que a reação de TNase, entre a TNase na amostra e os nucleotídeos não-hidrolisados no artigo, ocorra em um pH nesta faixa ótima, a alteração de cor no artigo é prontamente detectável.

Se o artigo for preparado de tal modo que a reação de TNase ocorra em um pH for a da faixa ótima para a atividade de TNase (por
15 exemplo, abaixo), pode ser vantajoso incluir um agente de intensificação de contraste no artigo. Por exemplo, é conhecido que carragenano lamda melhora o desvio metacromático e, portanto, o contraste observado com azul toluidina O/DNA na presença/ausência de ácidos nucléicos. Vide patente U.S. 4,241,181, cuja exposição é aqui incorporada por referência, por uma
20 descrição do uso de carragenano lambda como um agente de intensificação de contraste. A inclusão de um agente de intensificação de contraste no artigo é assim vantajosa em sistemas em que a reação de TNase pode ocorrer fora da faixa de pH ótima para a atividade de termonuclease.

Condições exemplificativas para a preparação de artigos de
25 acordo com a invenção são ilustradas nos Exemplos que se seguem:

Em geral, a preparação do artigo envolve a preparação de uma solução contendo quantidades apropriadas de ingredientes selecionados para a inclusão no artigo, incluindo nucleotídeos não-hidrolisados, azul toluidina O, e um ligante, resfriamento da solução e, então, revestimento da solução

sobre um suporte sólido. O filme revestido é então secado para solidificar a solução revestida. Para ilustrar uma modalidade preferida, não-limitativa, uma solução contendo 3,6g/l de DNA de esperma de salmão, 0,32 g/l de azul toluidina O, e 1% (p/v) de goma de guar é revestida sobre um suporte sólido de filme de poliéster de 0,18 mm, e então secada por 2-10 minutos a 200°F (93,3°C). O revestimento seco resultante pode ser de qualquer espessura desejada, mas possui preferivelmente uma espessura de cerca de 0,12-0,25 mm. Os ingredientes, e as quantidades dos mesmos, podem ser selecionados de tal modo que o artigo seja rígido ou flexível, dependendo do que seja desejado para uma aplicação particular.

A figura 1 mostra o artigo em uma modalidade preferida. É mostrada uma seção transversal de um composto 1, que inclui um artigo 2, um suporte sólido 3, e um material protetor 4. O artigo 2 contém o ligante, ácido nucléico não-hidrolisado, e azul toluidina O, como acima discutido. Como mostrado na Figura 1, o artigo 2 possui duas superfícies 5 e 6. O suporte sólido está adjacente a uma primeira superfície 5, e o material protetor 4 está adjacente a uma segunda superfície 6.

O suporte sólido 3 pode ser um filme de polímero, tal que um filme de poliéster. O suporte sólido 3 pode ser derivado a partir de moldes para proporcionar artigos moldados após a secagem, ou o suporte sólido 3 pode ser derivado a partir de um material em folha, permitindo o corte, ou puncionamento, de artigos do tamanho ou forma desejados, seguindo-se o revestimento e a secagem. O material usado para o suporte sólido 3 pode ser selecionado para conferir qualquer grau de rigidez ou flexibilidade ao composto de artigo/suporte sólido. Em adição, o artigo e/ou composto de artigo/suporte sólido pode ser preparado em qualquer configuração ou espessura, dependendo do que seja desejado para uma aplicação particular.

O suporte sólido é preferivelmente transparente ou pelo menos translúcido, para permitir a observação de alterações de cor que se

desenvolvem no artigo em uso. O suporte sólido também proporciona estabilidade ao artigo e o protege contra dano.

O suporte sólido pode ser selecionado de tal modo que ele seja destacável do artigo, deixando o artigo livre para uso na testagem, sem o
5 suporte sólido. Por exemplo, quando um filme de poliéster for usado como o suporte sólido, o suporte sólido pode ser destacável a partir do artigo quando o artigo se tornar hidratado durante o uso.

O artigo da invenção pode ainda incluir um material protetor. Na figura 1, um material protetor 4 é mostrado em seção transversal. O
10 material protetor pode ser colocado adjacente a uma superfície exposta do artigo. Por exemplo, quando um suporte sólido está adjacente a uma superfície do artigo, o material protetor pode estar adjacente à superfície oposta. O material protetor pode ser um filme polimérico ou uma grade que proteja o artigo quando do armazenamento e transporte, e pode
15 preferivelmente operar como um espaçador entre artigos, para separar os artigos, que são higroscópicos após a secagem, um do outro, e permitir armazenamento estável e vida em prateleira mais longa. Na figura 1, um material protetor 4 é mostrado como uma grade em seção transversal.

O material protetor é selecionado de tal modo que seja
20 destacável ou removível a partir da superfície do artigo antes do uso. Materiais adequados para uso como o material protetor são conhecidos na arte.

Como acima mencionado, o artigo da invenção pode ser de qualquer espessura, forma, ou rigidez, desejada e, se presente, o suporte
25 sólido pode ser de qualquer espessura desejada e pode ser selecionado para conferir qualquer grau desejado de rigidez ou estabilidade.

Com referência agora à figura 2, um composto 1 contendo um artigo 2 da presente invenção é mostrado em perspectiva parcialmente explodida. O artigo mostrado na figura 2 possui uma configuração genérica

em forma de disco, mas o artigo pode ter qualquer configuração desejada para uma aplicação particular. O composto ilustrado na figura 2 contém um artigo 2, um suporte sólido 3, e, em vista explodida, um material protetor 4, mostrado como uma grade. O artigo 2 possui duas superfícies, 5 e 6. O material protetor 4, aqui mostrado como uma grade em perspectiva explodida pode ser removido para revelar uma superfície 6 do artigo para colocação contra uma amostra.

O artigo da presente invenção é adaptado para colocação contra uma amostra, suspeita de conter estafilococos enterotoxigênicos, tais que Staphylococcus aureus. Como tal, o artigo é capaz de ser pressionado ou aplicado sobre a amostra. O artigo está em forma relativamente seca (em oposição a forma relativamente líquida ou fundida), permitindo a fácil aplicação a, ou colocação contra, a amostra. Quando da aplicação da amostra, o artigo se torna hidratado.

A amostra é tipicamente uma amostra tratada termicamente, cultivada, por exemplo, uma amostra cultivada em um dispositivo de placa de cultura de camada delgada, tal que Petrifilm^{MR} (disponível de 3M^{MR}, St. Paul, MN) ou em um sistema de cultura à base de ágar gel, tal que meio de Baird-Parker. Como a enzima de termonuclease não se difunde a muita distância de uma colônia de estafilococo enterotoxigênico cultivado, a amostra a ser testada deveria ser preparada em um formato que permita com que o artigo da invenção seja colocado próximo a uma colônia de estafilococo enterotoxigênico presumível. Devido a limitações de difusão de nuclease termoestável, um forma de placa de cultura de filme delgado é especialmente preferido, devido ao fato de que uma camada delgada de meio de cultura em um tal dispositivo permite vantajosamente a colocação do artigo em proximidade muito próxima da amostra cultivada contendo colônias de estafilococo enterotoxigênico presumíveis.

Em uso, o artigo é aplicado ou colocado contra uma amostra,

de tal modo que o artigo entre em contato com a amostra. Por exemplo, quando uma amostra suspeita de conter estafilococos enterotoxigênicos tiver crescido em um meio de ágar, tal que ágar de Baird Parker, sobre uma placa ou reservatório, e tratada termicamente (por exemplo a 60°C por 30 minutos) para inativar a atividade de nucelase não-termoestável, o artigo pode ser colocado sobre a placa de ágar e, deste modo, colocado em contato com a amostra. Se TNase estiver presente (correlativamente com a presença de estafilococos enterotoxigênicos) o manchamento vermelho ou rosa característico de azul toluidina O na presença de ácidos nucléicos hidrolisados irá se desenvolver dentro de cerca de uma a quatro horas, sob condições apropriadas. O padrão de manchamento característico está usualmente sob a forma de um "halo" vermelho ou rosa, que circunda a colônia suspeita de conter estafilocos enterotoxigênicos.

Em um formato de placa de cultura de filme delgado, uma amostra de teste, por exemplo, uma amostra de alimento que tenha sido diluída e processada com um dispositivo, tal que um Stomacher, é aplicada a um filme contendo, por exemplo, um agente de gelação e nutrientes para o crescimento de microorganismos. Os nutrientes podem ser seletivos para o crescimento de estafilococos. A amostra de teste pode também ser uma amostra cultivada a partir de um paciente, tal que soro, pele, ou outras fontes, ou similares, em que o artigo é usado para detectar estafilocos positivos à nuclease termoestável na amostra do paciente.

A amostra é então tipicamente coberta com um filme de cobertura e incubada em uma temperatura e por um tempo para permitir com que os microorganismos na amostra se multipliquem a níveis detectáveis. Se microorganismos estiverem presentes na amostra, colônias de microorganismos irão aparecer durante a incubação. Seguindo-se à incubação e tratamento térmico para inativar a atividade de nuclease não-termoestável, o artigo da invenção pode ser então colocado em contato com a amostra.

As patentes US 4,565,783 e 5,232, 838, cujas exposições são aqui incorporadas a título referencial, descrevem, em detalhe, dispositivo de placa de cultura de filme delgado, adequados para uso com o artigo desta invenção.

5 As figuras 3a-3c ilustram o artigo da invenção com um dispositivo de placa de cultura de filme delgado. A figura 3a mostra um exemplo de um dispositivo de placa de cultura de filme delgado 10, adequado para uso com o artigo da invenção. O dispositivo contém um filme de base 11, ao qual um meio de cultura seco 12 é aderido. O meio de cultura pode incluir, 10 por exemplo, um meio adaptado para o crescimento de estafilococos revestido sobre o filme como um caldo seco, ou como nutrientes pulverizados. Um filme de cobertura 13 (mostrado destacado a partir do filme de base 11) cobre o meio de cultura 12 durante o armazenamento e a incubação. O filme de cobertura 13 contém preferivelmente um agente de 15 gelação revestido sobre a superfície 14, que está em contato com o meio de cultura 12. Quando da aplicação de uma amostra de teste ao meio de cultura 12, o filme de cobertura 13 é aplicado sobre o filme de base 11, para colocar em contato o agente de gelação com a amostra e o meio de cultura 13. O dispositivo é então incubado para permitir com que os microorganismos 20 presentes na amostra se multipliquem e formem colônias sobre o meio de cultura gelificado. Após a incubação, a amostra cultivada é então, preferivelmente, aquecida a uma temperatura suficiente para inativar a atividade de nuclease não-termoestável. O filme de cobertura 13 pode ser então destacado a partir do filme de base 11, com o resultado, nesta 25 modalidade, de que o meio de cultura gelificado contendo colônias é aderido ao filme de cobertura da superfície 14.

A figura 3b mostra um dispositivo de placa de cultura de filme delgado 10 destacado, seguindo-se à incubação. O meio de cultura gelificado 20 contendo as colônias 21, é aderido ao filme de cobertura 13. Também é

mostrado na Figura 3 b um composto 1 contendo um artigo 2 da presente invenção e uma camada de suporte 3, a serem usados na detecção de nuclease termoestável. O composto 1 é configurado em disco, mas pode ser de qualquer forma apropriada para o ambiente no qual seja usado. Em uso, o composto 1 contendo o artigo 2 é colocado sobre o dispositivo, de tal modo que uma superfície exposta 6 do artigo 2 esteja em contato com o meio de cultura gelificado 20 e as colônias 21, quando o filme de cobertura 13 for aplicado ao filme de base 11. Por exemplo, na modalidade mostrada na figura 3 b, o composto 1 é simplesmente colocado sobre o filme de base 11, com a superfície exposta 6 do artigo 2 voltada para cima, em direção ao meio de cultura tratado termicamente, gelificado. O filme de cobertura 13 é então aplicado, sobre o artigo 2, em cima do filme de base 11, de tal modo que o composto 1 seja disposto entre o filme de cobertura 13 e o filme de base 11. O dispositivo é então incubado, e observado quanto à alteração de cor, para confirmar a presença ou ausência de estafilococos potencialmente enterotoxigênicos, positivos à nuclease termoestável.

A figura 3c mostra o dispositivo de placa de cultura de filme delgado 10 após a incubação com um artigo 2 de acordo com a invenção. As áreas sombreadas 22, observáveis através do filme de cobertura 13 transparente ou pelo menos translúcido, representam uma alteração de cor que confirma a presença de estafilococos positivos à nuclease termoestável.

O artigo da invenção pode ser usado na testagem qualitativa ou quantitativa para estafilococos potencialmente enterotoxigênicos, positivos à nuclease termoestável. Na testagem qualitativa, a visualização de uma alteração de cor azul para vermelho ou rosa proporciona a confirmação da presença de estafilococos positivos à nuclease termoestável. Na testagem quantitativa, o uso do artigo permite com que o número de colônias de estafilococos (potencialmente enterotoxigênicos) positivos à TNase seja contado, e a quantificação de tais microorganismos usando-se técnicas de

contagem padrão.

Conseqüentemente, a invenção também fornece um processo de detecção de estafilococos, potencialmente enterotoxigênicos, positivos à nuclease termoestável, em uma amostra. O processo inclui os estágios de aplicação de um artigo da invenção para a detecção de estafilococos positivos à nuclease termoestável a uma amostra suspeita de conter estafilococos enterotoxigênicos, e a confirmação da presença ou ausência de estafilococos positivos à nuclease termoestável na amostra.

Antes do estágio de aplicação do artigo à amostra, a amostra é tipicamente preparada para a testagem, primeiramente pela aplicação de uma amostra de teste suspeita de conter estafilococos enterotoxigênicos a um meio de cultura, incubação da amostra de teste no meio de cultura, e aquecimento da amostra a uma temperatura e por um tempo suficiente para inativar a atividade de nuclease não-termoestável. A incubação da amostra de teste é tipicamente efetuada a 30-37 °C por cerca de 18-48 horas, e o aquecimento da amostra para inativar a nuclease não-termoestável é efetuado a pelo menos cerca de 60°C por cerca de 30 minutos.

A amostra, à qual o artigo é aplicado no processo da invenção, pode ser uma cultura à base de ágar, tal que uma cultura de ágar de Baird-Parker, ou um dispositivo de placa de cultura de filme delgado, como aqui descrito. O processo pode ainda incluir o estágio de quantificar estafilococos enterotoxigênicos ou potencialmente enterotoxigênicos na amostra. O estágio de quantificação pode envolver a contagem do número de colônias associado com a alteração de cor no artigo, e a correlação daquele número com uma quantidade de estafilococos enterotoxigênicos na amostra, usando-se técnicas conhecidas na arte.

A invenção fornece ainda um estojo para a detecção de estafilococos, potencialmente enterotoxigênicos, positivos à nuclease termoestável. O estojo pode ser adaptado para qualquer de uma ampla

variedade de formatos para o crescimento de microorganismos, por exemplo, ágar, placa de cultura de filme delgado, e os similares. O estojo da invenção inclui reagentes e nutrientes para o crescimento de microorganismos, preferivelmente sob a forma de uma dispositivo de placa de cultura de filme delgado, e inclui ainda um artigo de acordo com esta invenção para a detecção de estafilococos positivos à nuclease termoestável.

A invenção pode ser ilustrada por meio dos seguintes exemplos.

Exemplo I

Preparação de artigos de pH 7,3

Os seguintes ingredientes foram usados na preparação de artigos para a detecção de Staphylococcus aureus:

| | | |
|----|---|----------|
| | DNA (Difco laboratories, Detroit, MI) | 3,6 g/l |
| | Azul toluidina O (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) | 0,32 g/l |
| 15 | Cloreto de cálcio, anidro (Sigma, St. Louis, MO) | 1,1 mg/l |
| | Cloreto de sódio (Sigma, St. Louis, MO) | 10 g/l |
| | Tris hidrocloreto (Sigma, St. Louis, MO) | 6,85 g/l |
| | Tris base (Sigma, St. Louis, MO) | 0,8 g/l |
| | Carragenano lambda (Sigma, St. Louis, MO) | 0,4 g/l |
| 20 | Goma de guar (Rhone-Poulenc Food Ingredients, Cranbury, NJ) | 10 g/l |
| | | pH 7,3 |

O meio (designado: pH 7,3) foi preparado como se segue: todos os reagentes (com exceção de TBO e goma de guar) foram misturados conjuntamente em 1 litro de água desionizada. A suspensão foi misturada com agitação constante e aquecida até a ebulição. TBO foi adicionado à mistura e removida do calor enquanto a agitação era mantida. A suspensão foi então misturada com um misturador a ar (com vórtice vigoroso) e goma de guar foi adicionada e misturada até a uniformidade. A suspensão foi resfriada durante a noite a 40°C e então revestida com um revestidor de

espátula sobre um filme de poliéster de 0,18 mm. Intervalos de espátula de 12-25 mm foram avaliados (pesos de revestimento de 0,05-0,10 g/153,6 cm²). Os filmes foram aquecidos por 2-10 minutos a 200°F (93,3°C).

Exemplo II

5 Preparação de artigos de pH 9,0

Outro meio foi produzido a partir dos seguintes componentes:

| | | |
|----|-----------------------------------|-----------|
| | DNA (Difco) | 3,6 g/l |
| | Azul toluidina O (Sigma) | 0,32 g/l |
| | Cloreto de cálcio, anidro (Sigma) | 1,1 mg/l |
| 10 | Cloreto de sódio (Sigma) | 10 g/l |
| | Tris hidrocloreto (Sigma) | 0,76 g/l |
| | Tris base (Sigma) | 5,47 g/li |
| | Goma de guar (Rhône-Poulenc) | 10 g/l |
| | | pH 9,0 |

15 Este meio (designado: pH 9) foi preparado de modo idêntico ao meio de pH 7 e revestido de modo similar. As faixas de peso de revestimento foram as mesmas para ambos os meios. Os filmes revestidos foram cortados em quadrados de 12,80 cm² para a avaliação.

Exemplo III

20 Preparação de Ágar TBO/DNA:

Estes meios foram comparados com ágar de DNA/TBO preparado como se segue:

| | | |
|----|-----------------------------------|-----------|
| | DNA (Difco) | 0,3 g/l |
| | Azul toluidina O (Sigma) | 0,082 g/l |
| 25 | Cloreto de cálcio, anidro (Sigma) | 1,1 mg/l |
| | Cloreto de sódio (Sigma) | 10 g/l |
| | Tris hidrocloreto (Sigma) | 0,76 g/l |
| | Tris base (Sigma) | 5,47 g/l |
| | Ágar (Difco) | 10 g/l |

pH 9,0

O meio (designado: ágar de DNA/TBO) foi preparado como se segue: todos os reagentes (exceto o TBO) foram misturados conjuntamente em 1 litro de água desionizada. A suspensão foi misturada com agitação constante e aquecida até a ebulição. O TBO foi adicionado à mistura e a suspensão foi removida do calor enquanto a agitação era mantida. A mistura foi autoclavada (121,11°C/15 atm/15 minutos). O meio foi ajustado a 46°C e então dispensado a placas de Petri de 15 x 100 mm (12-15 milímetros/placa). Após solidificação, as placas foram invertidas e incubadas em temperatura ambiente, de um dia para o outro. As placas foram então mantidas a 4°C, até que usadas.

Exemplo IV

Detecção de Staphylococcus aureus

Culturas de tripticase caldo de soja (37°C) de um dia para o outro (DiMed, St Paul, MN) dos seguintes isolados de estafilococos foram preparadas:

Coleção de Cultura Tipo Americano #; resultado de coagulase

| S.aureus | | S.species | | S. epidermis | | S.simulans | |
|-------------------------|---|----------------------|---|------------------------------|---|-------------------|---|
| 27600 | + | 23235 | + | 35547 | + | 11631 | - |
| 13301 | + | 13566 | + | 14990 | - | | |
| 13565 | + | 13567 | + | 155 | - | | |
| 12600 | + | | | | | | |
| 27659 | + | | | | | | |
| 832 | + | | | | | | |
| 12598 | + | | | | | | |
| 25923 | + | | | | | | |
| 27661 | + | | | | | | |
| S. saprophyticus | | S.intermedius | | Enterococcus faecalis | | | |
| 35552 | - | 29663 | - | 29212 | - | | |

As culturas foram diluídas em tampão de fosfato de Butterfield a aproximadamente 50 cfu/mm. Amostras de 1 mililitro de cada cultura diluída foram colocadas em placas sobre e placas idênticas 3M^{MR} Petrifilm^{MR} Aerobic Count e incubadas a 37°C por 18-24 horas. Os filmes foram pré-incubados a 60°C por 1 hora. Duas placas foram colocadas à parte para avaliar os discos confirmatórios de pH 9 e pH 7,3.

As placas Petrifilm^{MR} para a avaliação de ágar foram separadas de tal modo que o filme com o gel unido fosse separado do outro filme. Estes filmes (com gel) foram sobrepostos sobre a superfície das placas de ágar e então incubados a 37°C para a avaliação.

Os discos confirmatórios foram avaliados pela separação dos filmes da placa Petrifilm^{MR} e então pela colocação dos discos (lado revestido) em contato com o gel. Os filmes da placa Petrifilm^{MR} foram então re-selados e então incubados a 37°C, como foram as placas de ágar.

15

Os resultados são os seguintes:

| <u>Isolado</u> | <u>Coagulase</u> | <u>Ágar DNA/TBO</u> | <u>pH 9,0</u> | <u>pH 7,3</u> |
|----------------|------------------|---------------------|---------------|---------------|
| 27600 | + | + | + | + |
| 13301 | + | + | + | + |
| 13565 | + | + | + | + |
| <u>Isolado</u> | <u>Coagulase</u> | <u>Ágar DNA/TBO</u> | <u>pH 9,0</u> | <u>pH 7,3</u> |
| 12600 | + | + | + | + |
| 27659 | + | + | + | + |
| 832 | + | + | + | + |
| 12598 | + | + | + | + |
| 25923 | + | + | + | + |
| 27661 | + | + | + | + |
| 23235 | + | + | + | + |
| 13566 | + | + | + | + |
| 13567 | + | + | + | + |
| 35547 | - | - | - | - |
| 14990 | - | - | - | - |
| 155 | - | - | - | - |
| 11631 | - | - | - | - |
| 35552 | - | - | - | - |
| 29663 | - | - | - | - |
| 29212 | - | - | - | - |

As placas foram lidas a cada 30 minutos. Todas as colônias foram positivas dentro de 90 minutos de incubação a 37°C. Não foram

observadas diferenças entre os resultados de disco (pH 9 ou pH 7,3) ou resultados de placa de ágar.

Exemplo V

Detecção de Staphylococcus Aureus em Ágar de Baird Parker

- 5 Neste exemplo, culturas de caldo de um dia para o outro foram diluídas em tampão de fosfato de Butterfield a aproximadamente 500 cfu/mililitro. 0, 1 mililitros das culturas diluídas foram colocadas em placas sobre ágar de Baird-Parker (DiMed) e então incubadas a 37°C por 48 horas. Após 48 horas, as placas foram incubadas a 60°C por 2 horas. Ágar de DNA/TBO foi preparado como descrito, exceto que após ajuste de temperatura para 46°C, 12-15 mililitros foram dispensados sobre cambraias de linho de placa de BPA. Os discos de pH 9,0 e pH 7,3 foram colocados sobre a superfície das placas de ágar, de tal modo que o lado revestido estivesse em contato com o ágar. As placas foram incubadas a 37°C e então
- 10
- 15 lidas a cada 30 minutos, com os seguintes resultados:

| <u>Isolado</u> | <u>Coacrulase</u> | <u>Ágar DNA/TBO</u> | <u>pH 9,0</u> | <u>pH 7,3</u> |
|----------------|-------------------|---------------------|---------------|---------------|
| 27600 | + | + | + | + |
| 13301 | + | + | + | + |
| 13565 | + | + | + | + |
| 12600 | + | + | + | + |
| 27659 | + | + | + | + |
| 832 | + | + | + | + |
| 12598 | + | + | + | + |
| 25923 | + | + | + | + |
| 27661 | + | + | + | + |
| 23235 | + | + | + | + |
| 13566 | + | + | + | + |
| 13567 | + | + | + | + |
| 35547 | - | - | - | - |
| 14990 | - | - | - | - |
| 155 | - | - | - | - |
| 11631 | - | - | - | - |
| 35552 | - | - | - | - |
| 29663 | - | - | - | - |
| 29212 | - | - | - | - |

Todas as colônias sobre as placas foram positivas dentro de 2 horas de incubação a 37°C. Não foi observada diferença entre os discos e o

ágar de DNA/TBO.

Exemplo VI

Detecção de *Staphylococcus aureus* usando formato Petrifilm^{MR}

Os discos confirmatórios de pH 7,3 foram avaliados como
5 uma confirmação em formato Petrifilm^{MR} usando o seguinte meio de
crescimento:

| | | |
|----|------------------------------|---------|
| | Triptona (Difco) | 20 g/l |
| | Manitol (Sigma) | 10g/l |
| | Cloreto de lítio (Sigma) | 10g/l |
| 10 | Goma de guar (Rhone-Poulenc) | 10g/l |
| | Vermelho Fenol (Sigma) | 0,4 g/l |
| | | PH 7,5 |

O meio (designado:PSA) foi preparado como se segue: todos
os reagentes foram misturados conjuntamente em 1 litro de água desionizada.
15 A suspensão foi misturada com agitação constante com um misturador aéreo
(com vórtice vigoroso) e aquecida a 80°C. A suspensão foi resfriada de um
dia para o outro a 4°C e então revestida com um revestidor de espátula sobre
um filme de poliéster de 0,18 mm. Intervalos de espátula de
aproximadamente 31 mm foram avaliados (pesos de revestimento de 0,22-
20 0,25 g/153,6 cm²). Os filmes foram secados por 2-10 minutos a
200°F(93,3°C).

Espuma de poliestireno de 0,05 cm foi laminada sobre o filme
revestido com PSA usando um adesivo à base de ácido acrílico. Um círculo
de 5 cm de diâmetro foi removido a partir do centro aproximado de cada
25 placa de poliestireno para fornecer um reservatório. Na parte superior da
espuma (cobrindo toda a superfície) foi unida (por uma peça de fita
dobradiça) uma peça de filme de polipropileno (0, 1mm). Sobre um lado
deste filme foi revestido um adesivo de ácido acrílico contendo 0, 15 g/l de
cloreto de trifenil tetrazólio. Goma de guar foi revestida em forma

pulverizada sobre este adesivo em aproximadamente 0,4 g/153, 6 cm².

Culturas de tripticase caldo de soja (DiMed, St. Paul, MN)(37°C) de um dia para o outro dos seguintes isolados de estafilococos foram preparadas:

5

Coleção de Cultura Tipo Americano #; resultado coagulase

| S.aureus | | S.species | | S. epidermidis | | S. simulans | |
|-------------------------|---|-----------------------|---|------------------------------|---|--------------------|---|
| 27600 | + | 23235 | + | 35547 | - | 11631 | - |
| 13301 | + | 13566 | + | 14990 | - | | |
| 13565 | + | 13567 | + | 155 | - | | |
| 12600 | + | | | | | | |
| 27659 | + | | | | | | |
| 832 | + | | | | | | |
| 12598 | + | | | | | | |
| 25923 | + | | | | | | |
| 27661 | + | | | | | | |
| S. saprophyticus | | S. intermedius | | Enterococcus faecalis | | | |
| 35552 | - | 29663 | - | 29212 | - | | |

10 As culturas foram diluídas em tampão de fosfato de Butterfield a aproximadamente 50 cfu/milímetro. Amostras de 1 mililitro de cada cultura diluída foram colocadas em placas sobre cada uma de duas placas de PSA e incubadas a 37°C por 24 horas. Os filmes foram então pré-incubados a 60°C por 1 hora. Duas placas foram colocadas à parte para avaliar (discos) de solução revestidos de pH 7,3 e de ágar de DNA/TBO.

15 As placas de Petrifilm^{MR} para a avaliação de ágar foram separadas, de tal modo que I filme com gel unido fosse separado do outro filme. Estes filmes (com gel) foram sobrepostos sobre a superfície das placas de ágar e então incubados a 37°C para a avaliação.

Os discos confirmatórios de pH 7,3 foram avaliados pela separação dos filmes da placa Petrifilm^{MR} e então colocação dos discos (lado revestido) em contato com o gel. Os filmes da placa Petrifilm^{MR} foram então re-selados e então incubados a 37°C como foram as placas de ágar.

Os resultados são os que se seguem:

| Isolado | Coacrulase | Ágar DNA/TBO | pH 7,3 |
|----------------|-------------------|---------------------|---------------|
| 27600 | + | + | + |
| 13301 | + | + | + |
| 13565 | + | + | + |
| 12600 | + | + | + |
| 27659 | + | + | + |
| 832 | + | + | + |
| 12598 | + | + | + |
| 25923 | + | + | + |
| 27661 | + | + | + |
| 23235 | + | + | + |
| 13566 | + | + | + |
| 13567 | + | + | + |
| 35547 | - | - | - |
| 14990 | - | - | - |
| 155 | - | - | - |
| Isolado | Coacrulase | Ágar DNA/TBO | pH 7,3 |
| 11631 | - | - | - |
| 35552 | - | - | - |
| 29663 | - | - | - |
| 29212 | - | - | - |

As placas foram lidas a cada 30 minutos. Todas as colônias foram positivas dentro de 90 minutos de incubação a 37°C. Não foram observadas diferenças entre o resultado do disco (pH 7,3) ou o resultado da placa de ágar.

5

Outras modalidades estão dentro do escopo da invenção reivindicada.

REIVINDICAÇÕES

1. Processo para determinar estafilococos positivos à nuclease termoestável em uma amostra *in vitro*, caracterizado pelo fato de compreender as etapas de:

5 i) cultivar uma amostra suspeita de conter estafilococos enterotoxigênicos, em que a dita amostra compreende um meio de nutrientes seletivo ao crescimento de estafilococos;

 ii) tratar por aquecimento a amostra para inativar a atividade da nuclease não-termoestável;

10 iii) colocar em contato um artigo seco com a referida amostra; em que o referido artigo compreende nucleotídeos não-hidrolisados, azul toluidina O, e um ligante, compreendendo ainda pelo menos duas superfícies, e é adaptado para colocação da referida amostra, e em que a referida amostra compreende um meio nutriente seletivo para o
15 crescimento de estafilococos e que já foi tratado por aquecimento para inativar a atividade da nuclease não-termoestável; e

 iv) confirmar a presença ou ausência de estafilococos positivos à nuclease termoestável na referida amostra pela detecção da presença ou ausência de uma alteração de cor de azul para vermelho ou rosa no referido
20 artigo, em que o número de estafilococos positivos à nuclease termoestável na dita amostra é quantificada;

 o dito artigo compreendendo um DNA não hidrolisado de tamanho suficiente tal que o DNA estabiliza a azul toluidina O em seu estado azul; azul toluidina O, e um ligante que causa metacromasia com relação à
25 azul toluidina O, e ainda compreende pelo menos duas superfícies, em que o artigo é adaptado para colocação de uma amostra suspeita de conter estafilococos positivos à nuclease termoestável; o dito artigo sendo preparado por: formulação de uma solução, contendo quantidades apropriadas de ingredientes selecionados para inclusão no artigo, incluindo DNA não

hidrolisado, azul toluidina O, e um ligante; revestimento da solução sobre um suporte sólido, e secagem do filme revestido para solidificar a solução revestida.

5 2. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a referida amostra compreende uma amostra cultivada em um dispositivo de placa de cultura de filme delgado, adaptada para o crescimento de estafilococos.

10 3. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a referida amostra compreende uma amostra cultivada à base de ágar.

15 4. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a referida quantificação compreende contar o número de colônias na referida amostra associadas com uma alteração de cor no referido artigo, e correlacionar o referido número com uma quantidade de estafilococos potencialmente enterotoxigênicos na referida amostra.

5. Estojo para a detecção de estafilococos positivos à nuclease termoestável em uma amostra, caracterizado pelo fato de compreender reagentes e nutrientes para o crescimento de microorganismos a partir da referida amostra, e um artigo compreendendo:

20 um DNA não hidrolisado de um tamanho suficiente tal que o DNA estabiliza a azul toluidina O em seu estado ortocrômico azul, azul toluidina O, e um ligante que causa a metacromasia em relação à azul toluidina O,

25 e ainda compreendendo pelo menos duas superfícies, em que o artigo é adaptado para colocação de uma amostra suspeita de conter estafilococos positivos à nuclease termoestável;

dito artigo é preparado por:

formulação de uma solução, contendo quantidades apropriadas de ingredientes selecionados para inclusão no artigo, incluindo DNA não

hidrolisado, azul toluidina O, e um ligante;

revestimento da solução sobre um suporte sólido; e

secagem do filme revestido para solidificar a solução revestida.

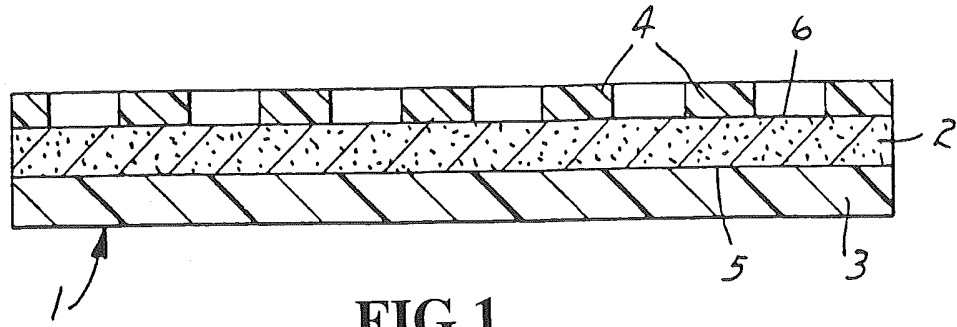


FIG.1

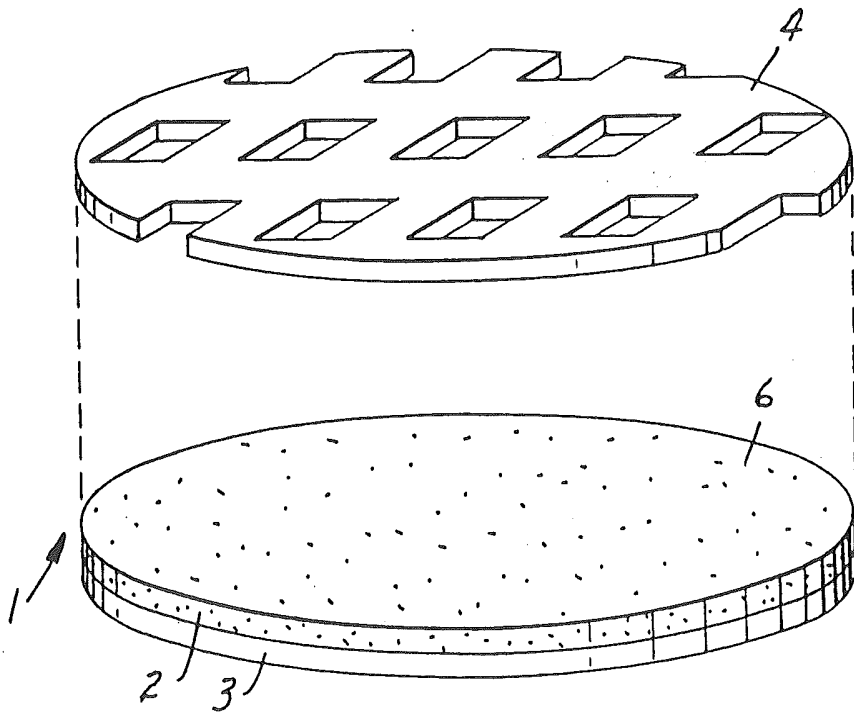
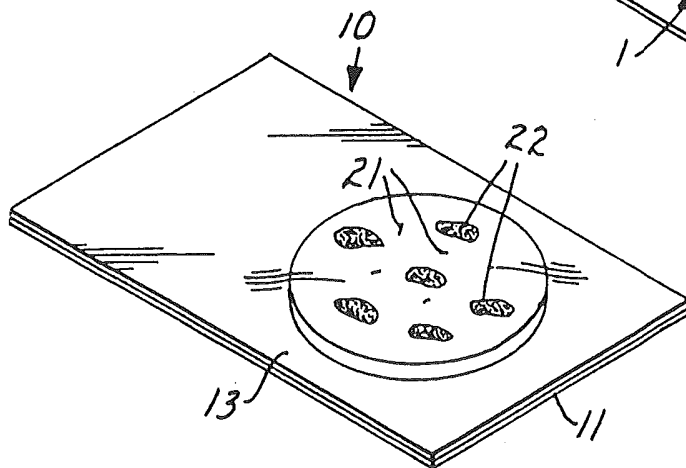
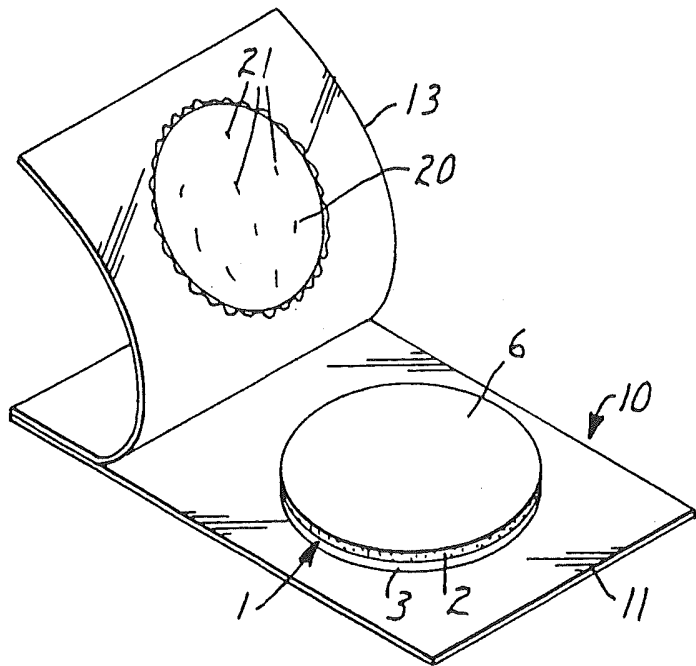
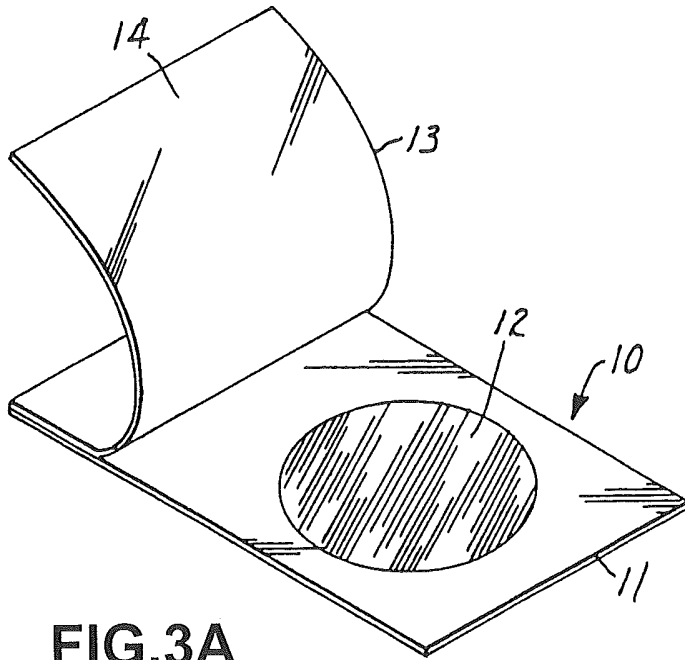


FIG.2



RESUMO

“PROCESSO PARA DETERMINAR ESTAFILOCOCOS POSITIVOS À
NUCLEASE TERMOESTÁVEL EM UMA AMOSTRA *IN VITRO*, E,
ESTOJO PARA A DETECÇÃO DE ESTAFILOCOCOS POSITIVOS À
5 NUCLEASE TERMOESTÁVEL EM UMA AMOSTRA”

Um artigo para a detecção de estafilococos potencialmente
enterotoxigênicos, positivos à nuclease termoestável, contendo nucleotídeos
não-hidrolisados, azul toluidina O, e um ligante, em que o artigo é adaptado
para a colocação de uma amostra suspeita de conter estafilococos
10 enterotoxigênicos. Um processo de detecção de estafilococos positivos à
nuclease termoestável em uma amostra utilizando o artigo, e um estojo para a
detecção de estafilococos positivos à nuclease termoestável contendo o artigo
são também descritos.