



(11) *Número de Publicação:* PT 630971 E

(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 6)
C12Q001/68 A

(12) *FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO*

<p>(22) <i>Data de depósito:</i> 1994.06.13</p> <p>(30) <i>Prioridade:</i> 1993.06.23 US 82851 1994.03.17 US 214861</p> <p>(43) <i>Data de publicação do pedido:</i> 1994.12.28</p> <p>(45) <i>Data e BPI da concessão:</i> 2001.04.18</p>	<p>(73) <i>Titular(es):</i> F. HOFFMANN-LA ROCHE AG 124, GRENZACHERSTRASSE, CH-4002 BASEL (SUISSE) CH</p> <p>(72) <i>Inventor(es):</i> ASHOK PURUSHOTTM PUROHIT US SHERYL BETH SILVER US</p> <p>(74) <i>Mandatário(s):</i> JOSÉ EDUARDO LOPES VIEIRA DE SAMPAIO RUA DO SALITRE, 195 R/C DTO 1250 LISBOA PT</p>
--	--

(54) *Epígrafe:* MÉTODOS REAGENTES E ESTOJOS PARA A DETECÇÃO DE NEISSERIA GONORRHOEAE E CHAMYDIA TRACHOMATIS

(57) *Resumo:*

MÉTODOS REAGENTES E ESTOJOS PARA A DETECÇÃO DE NEISSERIA GONORRHOEAE E CHLAMYDIA TRACHOMATIS



Campo das Cebolas - 1149 - 035 LISBOA
Telefs.: 01 888 51 51 / 2 / 3
Linha azul: 01 888 10 78
Fax: 01 887 53 08 - 886 00 66
E-mail: inpi @ mail. telepac. pt

REF.: 5094/OA/EP-Kn



INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
MINISTÉRIO DA ECONOMIA

FOLHA DO RESUMO

PAT. INV. <input checked="" type="checkbox"/>	MOD. UTIL. <input type="checkbox"/>	MOD. IND. <input type="checkbox"/>	DES. IND. <input type="checkbox"/>	TOP. SEMIC. <input type="checkbox"/>	CLASSIFICAÇÃO INTERNACIONAL (51)
N.º 630.971 (11)		N.º Objectos <input type="checkbox"/>		N.º Desenhos <input type="checkbox"/>	
DATA DO PEDIDO ___/___/___ (22)					
REQUERENTE (71) F. HOFFMANN-LA ROCHE AG, suíça, industrial, com sede em (NOME E MORADA) Grenzacherstrasse 124, 4002 Basel, Suíça CÓDIGO POSTAL _____					
INVENTOR(ES) / AUTOR(ES) (72) PUROHIT, ASHOK PURUSHOTTM e SILVER, SHERYL BETH					
REIVINDICAÇÃO DE PRIORIDADE(S) (30)			FIGURA (para interpretação do resumo)		
DATA DO PEDIDO	PAÍS DE ORIGEM	N.º DO PEDIDO			
EPIGRAFE (54) "MÉTODOS, REAGENTES E ESTOJOS PARA A DETECÇÃO DE NEISSERIA GONORRHOEA e CHLAMYDIA TRACHOMATIS"					
RESUMO (max. 150 palavras) (57) <p>A invenção descreve métodos, reagentes e estojos para a detecção de <i>Neisseria gonorrhoea</i> e descreve também métodos, reagentes e estojos para a detecção de <i>Neisseria gonorrhoea</i> e/ou <i>Chlamydia trachomatis</i>, em amostras de fluídos, utilizando sondas e iniciadores específicos para cada uma das espécies bacterianas.</p>					

NÃO ESCREVER NAS ZONAS SOMBREADAS

INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
MINISTÉRIO DA ECONOMIA

Descrição

“Métodos, reagentes e estojos para a detecção de *Neisseria gonorrhoeae* e *Chlamydia trachomatis*”

A presente invenção diz respeito genericamente métodos e a reagentes para identificar e co-detectar a bactéria *Neisseria gonorrhoeae* (“*N. gonorrhoeae*”, o agente causador da gonorreia) e a bactéria *Chlamydia trachomatis*.

A gonorreia é uma das infecções bacterianas mais vulgares nos Estados Unidos da América do Norte. São diagnosticados anualmente mais de 3 milhões de casos. Ver Morello *et al.*, “*Neisseria and Branhamella*”, *Manual of Clinical Microbiology* (5ª Ed. 1991), págs. 258-176.

Para se tratar com sucesso uma doença provocada por uma bactéria, por exemplo, a *Neisseria gonorrhoeae*, é necessária uma rápida e rigorosa detecção e identificação da bactéria causadora da doença. A detecção e a identificação têm sido feitas tradicionalmente por procedimentos de isolamento e de determinação em cultura pura em que é necessário conhecer a fonte do espécime, as necessidades de crescimento, as particularidades visíveis de crescimento (colónias), a morfologia microscópica, as reacções ao contraste e as características bioquímicas.

Os métodos convencionais para detectar e identificar o agente causador da gonorreia, a *N. gonorrhoeae*, consistem em criar em cultura em meio de gelose selectivo para reacções de contraste de tipo Gram e ainda os testes com utilização da oxidase citocrómica e hidratos de carbono. Para a detecção de *N. Gonorrhoeae* também foram já descritos ensaios serológicos, incluindo a co-aglutinação e a contrastação com anticorpos fluorescentes. Ver Morello *et al.*,

supra. Recentemente também foi descrita por Morello *et al.*, *supra*, a utilização das ondas de ADN para o diagnóstico de *N. Gonorrhoeae*. As reacções de contraste de tipo Gram e os testes à base de anticorpos são rápidos (inferiores a 1 hora), mas são de sensibilidade diminuta (são necessárias pelo menos 10^4 UFC (unidades formadoras de colónias) de bactérias por mL). Os métodos em cultura, embora sendo sensíveis aproximadamente a 2 UFC por mL, exigem a incubação de um dia para o outro.

A utilização de sequências polinucleotídicas específicas, como sondas para o reconhecimento de agentes infecciosos, está a transformar-se numa alternativa valiosa para os ensaios problemáticos de identificação imunológica. Por exemplo, a publicação PCT com o nº WO 84/02721, publicada a 19 de Julho de 1984, descreve a utilização de sondas de ácidos nucleicos complementares para as sequências de ácidos nucleicos destinatárias, constituídas por ARN ribossómico, ARN de transferência ou qualquer outro ARN, em procedimentos de hibridação para a detecção da sequência de ácido nucleico destinatária. De forma análoga, Miyada, C.G. e Born, T.L. (1991), 'Molecular and Cellular Probes' 5:327-35, utilizaram sondas para detectar *N. Gonorrhoeae*. Embora o ensaio possa proporcionar uma maior sensibilidade e uma maior especificidade do que os ensaios conhecidos de hibridação de ADN, os procedimentos de hibridação que exigem a utilização de uma sonda complementar dependem geralmente de uma preparação em cultura e/ou do enriquecimento de um organismo testado e por tal motivo são inadequados para um diagnóstico rápido. As sondas podem ser utilizadas directamente em espécimes clínicos se houver disponível um sistema para amplificar o ADN ou o ARN destinatários.

Continua a ser cada vez mais necessário que haja uma técnica de diagnóstico que seja simples, rápida, sensível e específica para a detecção de *N. Gonorrhoeae* em amostras clínicas.

Além disso, os pacientes infectados com *N. gonorrhoeae* também estão frequentemente infectados com *Chlamydia trachomatis*. O documento EP-A- 420 260 descreve iniciadores e sondas que permitem a detecção de *Chlamydia trachomatis*. Para se minimizar o número de procedimentos de diagnóstico a que é necessário submeter um paciente e também para se minimizar os custos gerais de diagnóstico, seria altamente desejável dispor de uma técnica de diagnóstico que fosse simples, rápida e sensível para a detecção e para a identificação simultâneas de *N. gonorrhoeae* e de *C. Trachomatis* num único procedimento experimental. As novas sondas e as novas técnicas da presente invenção, que permitem detectar simultaneamente *N. gonorrhoeae* e de *C. Trachomatis*, constituem uma particularidade adicional da presente invenção.

O recurso à reacção em cadeia com polimerase ("RCP") veio revolucionar a detecção de uma grande variedade de agentes patogénicos bacterianos, fúngicos, virais e parasíticos. Não é necessário aumentar o número de agentes patogénicos nem é necessário criá-los em cultura *in vitro* e um espécime clínico relativamente impuro pode constituir a fonte de ácido nucleico para efeitos de detecção e diagnóstico. Por RCP consegue-se a desejada amplificação de uma sequência específica de ácido nucleico, aumentando extraordinariamente o número de cópias para a detecção e assim se reduzindo concomitantemente a complexidade do ácido nucleico que se pretenda analisar.

A sequência publicada de um fragmento de 1044 pares de bases (ORF 1) de ADN de *N. gonorrhoeae* foi já publicada por Myiada e Born, *supra*. Demonstrou-se que as sondas que têm por base esta sequência de ORF 1 hibridam com 105 das 106 estirpes de *N. gonorrhoeae* testadas utilizando um método cromossómico autorradiográfico. A interreactividade com outras espécies de *Neisseria* apenas foi observada com a *N. Mucosa*; no entanto, esta

interreactividade foi eliminada com uma lavagem bastante rigorosa. Concluiu-se que a proteína codificada pelo fragmento ORF 1 possui uma homologia significativa com a sequência de ADN do gene da citosina-metil-transferase de *N. gonorrhoeae* (M. Ngo PII). Nos textos do 91º 'General Meeting of the ASM (1991), no. C-115' está descrita a detecção de *N. gonorrhoeae* e de *C. trachomatis* por RCP.

A presente invenção diz respeito a métodos e a reagentes para a rápida detecção e identificação da bactéria *N. gonorrhoeae*, os quais são compatíveis com a detecção simultânea de *C. trachomatis* num único ensaio. A detecção tem por base a hibridação de sondas nucleotídicas com as sequências nucleotídicas presentes numa espécie definida, mas não em outras.

Na presente invenção desenvolveu-se um protocolo de ensaio utilizando o processo de RCP para a detecção da presença de ADN de *N. gonorrhoeae* em espécimes biológicos e testou-se tal processo utilizando como alvo a sequência do gene da citosina-metil-transferase (CMT) de *N. Gonorrhoeae*. Além disso, os reagentes necessários para a detecção de *N. gonorrhoeae* foram combinados com os reagentes necessários para a detecção de *C. trachomatis* para assim se obter uma única mistura de reacção que permitiu amplificar e detectar independente, simultânea e especificamente os dois organismos. Foram definidas a sensibilidade e a especificidade do ensaio logo que foram determinadas as condições para a optimização do processo de RCP e para a amplificação e para a detecção simultâneas dos dois organismos. A partir de diferentes locais geográficos foram obtidas e analisadas amostras de *N. gonorrhoeae* e também amostras combinadas de *N. gonorrhoeae* e *C. trachomatis*. Além disso, a presente invenção permite a amplificação e a detecção simultâneas dos dois organismos *C. trachomatis* e *N. Gonorrhoeae* nos mesmos espécimes biológicos, sem necessidade de se enriquecer a cultura e/ou sem necessidade de avaliação microscópica dos espécimes. Os testes serológicos

actuais apenas medem a resposta dos anticorpos à infecção e por tal motivo não são bons indicadores para tirar conclusões sobre a terapia ou sobre a recorrência da doença.

Além disso, são aqui descritas as sequências únicas de iniciadores que irão ser utilizados na RCP e também as condições para o efeito.

A invenção proporciona métodos de co-amplificação dos dois microrganismos *N. gonorrhoeae* e *C. Trachomatis* e também proporciona os reagentes convenientes para o efeito e ainda os estojos que contêm os iniciadores para a co-amplificação de ambos os ADN dos dois organismos *N. gonorrhoeae* e *C. trachomatis* e ainda as sondas que hibridam especificamente com as regiões destinatárias amplificadas das duas espécies.

A figura 1 ilustra os dados das sequências nucleotídicas para os iniciadores SS01 e SS02, que foram utilizados para a amplificação de uma região destinatária da sequência de ADN do gene da citosina-metil-transferase (CMT) da *N. gonorrhoeae* por RCP. A sonda SS06-T5 é específica para uma região com uma sequência amplificada de 201 pares de bases.

A figura 2 ilustra os dados da sequência nucleotídica para os iniciadores CP24 e CP27 que foram utilizados para a amplificação de uma região destinatária no ADN do plasmídeo críptico de *C. trachomatis* por RCP. A sonda CP35 é específica para uma região dentro da sequência amplificada de 207 pares de bases.

A figura 3 ilustra a sequência nucleotídica para a região destinatária de 201 pares de bases no gene de CMT da *N. gonorrhoeae* para a qual são específicos os iniciadores referidos antes (figura 1).

A invenção proporciona um método para a determinação da presença dos dois organismos *N. gonorrhoeae* e *C. trachomatis* a partir de uma amostra única por co-amplificação.

Definições

Seguidamente são apresentadas as definições de determinados termos utilizados na memória descritiva e nas reivindicações.

Co-amplificação. É o processo de síntese iniciada pelo iniciador a partir de mais do que uma região destinatária. São combinados vários conjuntos de iniciadores em condições favoráveis para a síntese dos produtos de prolongamento dos iniciadores a partir de todas as sequências destinatárias potenciais (por vezes designado por sistema “multiplex”).

Complementar. Este termo significa que as sequências de base de um par de moléculas de ARN ou de ADN de cadeia simples permitem que essas cadeias simples formem um híbrido ou uma cadeia dupla de ADN:ADN, ARN:ARN ou ADN:ARN através de pontes hidrogénio entre os pares de bases de Watson-Crick nas respectivas cadeias. A adenina (A) complementa normalmente a timina (T) ou o uracilo (U), ao passo que a guanina (G) complementa normalmente a citosina (C).

Híbrido. É o complexo formado entre duas sequências de ácidos nucleicos de cadeias simples mediante os emparelhamentos das bases de Watson-Crick ou mediante os emparelhamentos de bases não canónicas entre as bases complementares.

Hibridação. É o processo segundo o qual duas cadeias complementares de ácidos nucleicos se combinam para formarem moléculas de cadeia dupla (híbridos).

Sonda de ácido nucleico (ou apenas sonda). É uma sequência de ácido nucleico de cadeia singular que irá combinar-se com uma sequência de ácido nucleico destinatária de cadeia singular e complementar para assim se formar uma molécula de cadeia dupla (híbrido). Uma sonda de ácido nucleico pode ser um oligonucleótido ou um polímero polinucleotídico.

Nucleótido. É uma subunidade de um ácido nucleico constituída por um grupo fosfato, um açúcar de carbono em 5' e uma base que contenha azoto. No ARN, o açúcar de carbono é a

28
7

ribose. No ADN é uma 2-desoxirribose. O termo identifica também os análogos de tais subunidades.

Oligonucleótido. É um polímero nucleotídico com um comprimento compreendido geralmente entre cerca de 10 e cerca de 100 nucleótidos, mas podendo esse comprimento ser superior a 100 nucleótidos.

Iniciador. É uma sequência de ácido nucleico de cadeia singular, quer ocorra naturalmente numa digestão de restrição purificada quer seja obtida por via sintética, capaz de actuar como ponto de início da síntese quando colocada em condições em que seja produzido um produto de prolongamento do iniciador que seja complementar para uma cadeia de ácido nucleico, isto é, na presença de nucleótidos e de um agente para a polimerização, tal como a polimerase do ADN, e a uma temperatura e a valores de pH adequados. De preferência, o iniciador é de cadeia singular para que a eficiência seja máxima na amplificação, mas em alternativa também pode ser de cadeia dupla. Se for de cadeia dupla, o iniciador é tratado em primeiro lugar para se efectuar a separação das cadeias antes de ser utilizado para a preparação dos produtos de prolongamento. De preferência, o iniciador é um oligodesoxirribonucleótido. O iniciador pode ter modificações na extremidade 5' da molécula, por exemplo, uma biotinylação.

Rigor. Este termo qualifica as condições utilizadas para se favorecer a hibridação de ácidos nucleicos de cadeia singular (e também as condições utilizadas para a lavagem dos híbridos formados). O grau de rigor determina quão complementares devem ser as sequências dos dois ácidos nucleicos de cadeia singular para que tenha lugar a formação de um híbrido estável. No caso de serem praticadas condições altamente rigorosas, apenas os ácidos nucleicos estreitamente afins (isto é, ácidos nucleicos de cadeias singulares cujas sequências sejam quase perfeitamente complementares) formam híbridos estáveis. As condições de hibridação

menos rigorosas permitem a formação de híbridos entre ácidos nucleicos mais distantemente relacionados entre si (isto é, ácidos nucleicos de cadeias singulares cujas sequências sejam apenas parcialmente complementares).

De acordo com a presente invenção, determinou-se a região relevante de *N. gonorrhoeae* através de uma análise comparativa das sequências de ADN de diversas estirpes diferentes de *N. gonorrhoeae*, publicadas na literatura. Em consequência desta análise concluiu-se que as sequências relevantes correspondem a uma região de 201 pares de bases dentro do fragmento ORF 1 de 144 pares de bases descrito por Myiada e Born, *supra*. A sequência relevante está ilustrada na figura 3.

Ainda de acordo com a presente invenção, concebemos iniciadores oligonucleotídicos suficientemente complementares para uma parte da sequência relevante (ver a figura 3) e do seu complemento, de modo a que fosse possível efectuar a hibridação com uma parte desta sequência relevante. De acordo com a presente invenção, os iniciadores são concebidos quer para as sequências relevantes quer para as suas sequências complementares. Deste modo, estes iniciadores são suficientemente complementares para a separação de cadeias de ADN de *N. Gonorrhoeae*, de modo a que tenha lugar a hibridação com uma dessas cadeias. Cada um dos referidos iniciadores é concebido de modo a hibridar com uma cadeia independente de ADN. Deste modo, através da identificação da sequência nucleotídica relevante do ADN das diversas estirpes de *N. Gonorrhoeae*, é possível utilizar esses iniciadores numa reacção em cadeia com polimerase (RCP) para se amplificar a sequência de ácido nucleico relevante do ADN de *N. gonorrhoeae* em amostras sobre as quais se presume que contêm *N. gonorrhoeae*. De acordo com a presente invenção, descobrimos que os iniciadores oligonucleotídicos que

possuam pelo menos 10 nucleótidos podem ser utilizados para a realização desta reacção. De um modo geral, os iniciadores nucleotídicos contêm aproximadamente entre 10 e 30 nucleótidos.

De acordo com a presente invenção, o iniciador é suficientemente complementar para hibridar com uma cadeia independente do ADN de *N. gonorrhoeae* com que ele hibrida e vai formar, quando amplificado por meio da referida reacção em cadeia com polimerase, um produto de prolongamento que contém a sequência de ADN relevante. A sequência de ADN relevante pode ser detectada por hibridação com sondas oligonucleotídicas adequadas que possuam pelo menos 14 nucleótidos e que sejam bastante complementares de uma sequência polinucleotídica da referida região relevante. De um modo geral, estas sondas oligonucleotídicas contêm entre cerca de 14 e cerca de 30 nucleótidos.

De acordo com a presente invenção, foram preparados os oligonucleótidos que contêm as sequências SS01 (SEQ ID NO:1), SS02 (SEQ ID NO:2) e SS06-T5 (SEQ ID NO:3), conforme ilustrado na figura 1. Estes oligonucleótidos foram utilizados para a concepção de iniciadores e de sondas em conformidade com a presente invenção.

Uma particularidade importante da presente invenção é o facto de os oligonucleótidos que servem de iniciadores para a invenção serem não só selectivos de forma específica para a *N. gonorrhoeae* como possuírem além disso propriedades físicas, tais como as temperaturas de fusão, que são compatíveis com os iniciadores utilizados num protocolo de ensaio com *C. trachomatis* tendo por base uma RCP. Assim sendo, os oligonucleótidos de *N. gonorrhoeae* concebidos pelos requerentes são específicos para *N. gonorrhoeae*, não interactivam nem interferem de nenhum outro modo com *C. trachomatis* e são compatíveis com os oligonucleótidos dos iniciadores de *C. trachomatis* de forma a permitir a amplificação simultânea de *N. gonorrhoeae* e de *C. trachomatis* numa única RCP.

De acordo com a presente invenção, o teste para a pesquisa da presença de *N. gonorrhoeae* em amostras efectua-se tratando essas amostras com uma solução aquosa que contenha os iniciadores oligonucleotídicos que sejam suficientemente complementares para que com eles hibridem as cadeias separadas do ADN de *N. Gonorrhoeae*. A solução que se utiliza para tratar a amostra poderia conter como co-solvente um solvente polar orgânico inerte. É possível utilizar qualquer solvente polar orgânico inerte convencional como componente da solução aquosa. De acordo com o caso preferido da presente invenção, o solvente polar que se utiliza como co-solvente pode ser seleccionado entre glicerol, dimetilsulfóxido ou formamida ou uma sua mistura. Além do mais, de acordo com o caso preferido da presente invenção, o co-solvente deve constituir entre cerca de 1% e cerca de 20% em volume da solução que se utiliza para tratar a amostra que se pretenda testar.

As sequências exclusivas dos iniciadores utilizados na invenção são descritas a seguir e são descritas também as condições preferidas ou essenciais para a RCP.

A reacção em cadeia com polimerase (RCP) é uma técnica poderosa que pode ser utilizada para a detecção de quantidades diminutas de agentes patogénicos cuja cultura *in vitro* seja difícil ou morosa ou pode ser utilizada como técnica substitua para outros métodos em que seja necessária a presença de espécimes vivos para a detecção. Na sua forma mais simples, uma RCP é um método realizado *in vitro* para a síntese enzimática de sequências específicas de ADN utilizando dois iniciadores oligonucleotídicos que hibridam com cadeias opostas e que flanqueiam a região com interesse do ADN destinatário. Uma série repetitiva de ciclos envolvendo a desnaturação da matriz, a recombinação dos iniciadores e o prolongamento dos iniciadores recombinados pela polimerase do ADN tem como consequência a acumulação exponencial de um fragmento específico cujas pontas são definidas pelas extremidades 5' dos

iniciadores. Uma RCP permite de uma forma bem clara produzir um enriquecimento selectivo de uma sequência específica de ADN por um factor de 10^{12} . O método da RCP foi descrito por Saiki *et al.*, 'Science' 230:1350 (1985), e é abordado, *inter alia*, nas publicações das patentes de invenção norte-americanas n.^{os} 4 683 195, 4 683 202, 4 800 159 e 4 965 188. Este método tem sido utilizado para se detectar a presença da sequência aberrante no gene da β -globina que está relacionado a anemia das células falciformes e com o ARN do vírus da imunodeficiência humana (VIH) (Byrne *et al.*, Nucl. Acids Res. 16:4165 (1988)).

A invenção proporciona métodos para a determinação da presença ou da ausência de *N. gonorrhoeae* e/ou *C. trachomatis* numa amostra de fluído sobre a qual se suspeita que possa conter um ou ambos os microrganismos *N. gonorrhoeae* e *C. trachomatis*, os quais compreendem os passos seguintes:

(a) tratar a referida amostra com uma solução aquosa que contém 4 iniciadores: dois desses iniciadores são capazes de hibridar com *N. gonorrhoeae* e possuem as sequências nucleotídicas designadas por SEQ ID NO:1 e SEQ ID NO:2; os outros dois iniciadores são capazes de hibridar exclusivamente com *C. trachomatis* e possuem as sequências designadas por SEQ ID NO:4 e SEQ ID NO:5, em que a referida solução aquosa contém como co-solvente um solvente polar orgânico inerte;

(b) sintetizar um produto de prolongamento de cada um dos referidos iniciadores, em que qualquer desses produtos de prolongamento possui as sequências de ADN relevantes, e amplificar essas sequências relevantes se estiverem presentes;

(c) tratar a referida amostra, depois das amplificações pretendidas, com duas sondas oligonucleotídicas em que cada uma delas contém pelo menos 14 nucleótidos: uma sonda que contém uma sequência exclusivamente complementar de uma sequência na região amplificada de

N. gonorrhoeae e uma segunda sonda que contém uma sequência exclusivamente complementar de uma sequência na região amplificada de *C. trachomatis*;

(d) incubar a(s) região(ões) destinatária(s) amplificada(s), se as houver, com cada uma das sondas nucleotídicas, em condições rigorosas, e permitir que tenha lugar a hibridação entre cada uma dessas sondas e a região destinatária para essas sondas; e

(e) detectar os híbridos formados entre a(s) região(ões) destinatária(s) amplificada(s), se as houver, e a(s) sonda(s) oligonucleotídica(s).

Os solventes polares orgânicos preferidos são seleccionados entre glicerol, dimetil-sulfóxido ou formamida e mais preferencialmente o glicerol. O referido co-solvente encontra-se presente tipicamente na referida solução numa quantidade compreendida entre cerca de 1% e cerca de 20% em volume.

De preferência, quando utilizada num método de diagnóstico, no passo (d) enumerado *supra*, a sonda híbrida de forma específica com uma região destinatária em condições fortemente rigorosas. Além disso, os iniciadores específicos para o organismo *N. gonorrhoeae* também são exclusivamente selectivos para a amplificação de *N. gonorrhoeae* e *C. trachomatis* em condições de amplificação seleccionadas.

De preferência, quando praticado como ensaio de diagnóstico, o passo (d) descrito *supra* é executado em condições fortemente rigorosas para se eliminar a formação de híbridos entre a sonda e as sequências relevantes que sejam apenas parcialmente complementares.

Assim, os métodos da presente invenção permitem determinar a presença de organismos relevantes suspeitos, mais rapidamente do que aquilo que até agora era conseguido com os métodos de detecção da técnica anterior. O processo básico da RCP é executado conforme a seguir se descreve.

Arranja-se uma amostra suspeita de conter uma sequência relevante de um ácido nucleico particular, a “sequência relevante”. O ácido nucleico contido na amostra pode ser desnaturado recorrendo à prática de qualquer método adequado de desnaturação, incluindo meios físicos, químicos ou enzimáticos conhecidos pelos especialistas na matéria. Um processo físico preferido para a separação de cadeias consiste em aquecer o ácido nucleico até ficar completamente (mais de 99%) desnaturado. Uma desnaturação térmica típica envolve temperaturas compreendidas entre cerca de 80°C e cerca de 150°C, variando por vezes entre cerca de 5 segundos e 10 minutos com utilização de tecnologia actual.

As cadeias de ADN desnaturado são então incubadas com iniciadores oligonucleotídicos escolhidos, em condições de hibridação, condições essas que facilitam a ligação dos iniciadores a cadeias singulares de ácidos nucleicos. Como se sabe na especialidade, os iniciadores são seleccionados de modo a que as suas posições relativas ao longo de uma sequência dúplice sejam tais que um produto de prolongamento sintetizado a partir de um iniciador, quando estiver separado do seu complemento, sirva de matriz para o prolongamento do outro iniciador para assim se obter uma cadeia replicada de comprimento definido.

O iniciador deve ser suficientemente comprido para desencadear a síntese de produtos de prolongamento na presença do agente para a polimerização. O comprimento exacto dos iniciadores irá depender de inúmeros factores, incluindo a temperatura, a fonte do iniciador e a utilização do método. Por exemplo, consoante a complexidade da sequência relevante, assim o iniciador oligonucleotídico conterá tipicamente entre cerca de 15 e 30 nucleótidos, embora possa conter mais ou menos nucleótidos. As moléculas iniciadoras curtas requerem geralmente temperaturas mais baixas para formarem com a matriz complexos híbridos suficientemente estáveis. Os iniciadores têm de ser suficientemente complementares para hibridarem de forma selectiva com as suas respectivas cadeias.

Os iniciadores aqui utilizados são seleccionados de modo a serem “praticamente” complementares com as diferentes cadeias de cada sequência específica que se pretenda amplificar. Significa isto que não é necessário que os iniciadores reflectam a sequência exacta da matriz, mas têm de ser suficientemente complementares para hibridarem de forma selectiva com as suas receptivas cadeias, isto é, com as cadeias de ADN de *N. gonorrhoeae* e não com as cadeias de outros ADN de outras espécies de *Neisseria*, nas condições de amplificação dadas. Esta propriedade é designada por “especificidade” dos iniciadores. É possível intercalar no iniciador bases não complementares ou sequências mais compridas, desde que o iniciador seja suficientemente complementar para a sequência de uma das cadeias com que hibrida de forma específica e para assim formar uma estrutura dúplice que pode ser prolongada por mecanismos de polimerização. As sequências nucleotídicas não complementares dos iniciadores podem conter locais de enzimas de restrição. A anexação de um local de enzima de restrição às extremidades da sequência relevante é particularmente útil para a subsequente clonagem da sequência relevante.

Os iniciadores da presente invenção são exclusivos na medida em que não só são “bastante” complementares de uma parte de uma sequência destinatária que seja específica para o microrganismo *N. gonorrhoeae* e não para nenhuma outra espécie de *Neisseria*, como possuem também características físicas que lhes permitem ser compatíveis (isto é, não interferem nem são interferidos) com um conjunto diferente de iniciadores utilizados para a amplificação e/ou detecção simultâneas do microrganismo *C. trachomatis* num único ensaio (isto é, amplificação de duas espécies diferentes num só tubo de ensaio). Os iniciadores escolhidos para esta co-amplificação são específicos exclusivamente para cada espécie, possuem temperaturas

de fusão semelhantes, não são complementares uns dos outros e dão origem a produtos amplificados de dimensões idênticas.

As sondas e os iniciadores oligonucleotídicos da presente invenção podem ser preparados por qualquer método conveniente. Os métodos para a preparação de oligonucleótidos de sequências específicas são conhecidos na especialidade e compreendem, por exemplo, a clonagem e a digestão de restrição de sequências adequadas e ainda a síntese química directa. Por razões de facilidade de detecção, as sondas ou os iniciadores podem ser marcados, se desejado, incorporando-lhes compostos detectáveis por meios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, imunológicos ou químicos.

O prolongamento dos iniciadores nucleotídicos, dependente da matriz, é então catalisado por um agente polimerizante na presença de quantidades adequadas dos quatro desoxirribonucleósido-trifosfatos (dATP, dGTP, dCTP e dTTP) ou seus análogos, num meio de reacção que contenha sais e catiões metálicos adequados e um sistema conveniente de tamponamento do pH. Os agentes polimerizantes adequados são as enzimas sobre as quais se sabe que catalisam a síntese de ADN dependente do iniciador e dependente da matriz. Como exemplos de polimerases de ADN conhecidas refere-se as seleccionadas entre polimerase I de ADN de *E. coli* ou o seu fragmento de Klenow, a polimerase de ADN das T4, a polimerase de ADN de Taq, a polimerase de ADN de Tth, obtida a partir de *Thermus thermophilus*, e a polimerase de ADN obtida a partir de *Thermococcus litoralis*. As condições de reacção para catalisar a síntese de ADN com estas polimerases de ADN são perfeitamente conhecidas na especialidade.

Os produtos da síntese são moléculas dúplices constituídas por cadeias de matrizes e por cadeias de prolongamento do iniciador, as quais contêm a sequência relevante. Estes produtos, por sua vez, servem de matrizes para outro ciclo de replicação. No segundo ciclo de

replicação, a cadeia de prolongamento do iniciador do primeiro ciclo é recombinada com o seu iniciador complementar; a síntese gera um produto “curto” que é ligado em ambas as extremidades 5’ e 3’ por sequências de iniciadores dos seus complementos. A repetição dos ciclos de desnaturação, recombinação dos iniciadores e prolongamento tem como consequência a acumulação exponencial da região relevante definida pelos iniciadores. Executa-se um número suficiente de ciclos para se conseguir a quantidade desejada de polinucleótido que contém a região relevante de ácido nucleico. A quantidade desejável pode variar e é determinada em função daquilo a que se destina o polinucleótido produzido.

O método da RCP pode ser executado em diversas sequências temporais. Por exemplo, pode ser executado de forma progressiva, em que a seguir a cada passo são acrescentados novos reagentes, ou pode ser executado de uma forma em que todos os reagentes são acrescentados simultaneamente, ou ainda de uma forma parcialmente progressiva em que novos reagentes são acrescentados ao fim de um dado número de passos.

Segundo um método preferido, executa-se uma RCP enquanto processo automatizado em que se utiliza uma enzima termostável. Neste processo, a mistura de reacção passa por ciclos envolvendo um passo de desnaturação, um passo de recombinação do iniciador e um passo de síntese. É possível utilizar um dispositivo de execução dos ciclos térmicos do ADN especificamente adaptado para ser utilizado com uma enzima termostável, caso em que são praticados ciclos variáveis de temperatura com um sistema de manuseamento em meio líquido que permite assim eliminar a necessidade de se acrescentar enzima em cada ciclo.

Após a amplificação por RCP é possível detectar os polinucleótidos relevantes directamente por análise em gel desde que o ADN relevante tenha sido suficientemente amplificado e os iniciadores sejam fortemente específicos para a região relevante que se pretende

amplificar. Para se garantir a eficiência da RCP é possível utilizar glicerol e outros solventes congêneres, tais como o dimetilsulfóxido, para aumentar a sensibilidade da RCP ao nível de amplificação e para se superar os problemas associados às regiões do ADN que tenham uma estrutura secundária forte. Estes problemas podem compreender (1) uma exígua eficiência da RCP devido a uma alta frequência das matrizes que não tenham sido totalmente amplificadas pelo agente polimerizante ou (2) uma desnaturação incompleta do ADN de cadeia dupla a uma alta temperatura, devido a um elevado conteúdo de GC. A utilização de tais solventes pode aumentar a sensibilidade do ensaio ao nível de amplificação até aproximadamente vários femtogramas de ADN (o que se pressupõe que corresponda a uma única célula bacteriana).

Em alternativa, é possível detectar os polinucleótidos relevantes por hibridação com uma sonda polinucleotídica que forme um híbrido estável com o da sequência relevante em condições de hibridação variáveis entre rigorosas e pouco rigorosas e nas condições de lavagem. Na hipótese de se prever que as sondas sejam completamente complementares (isto é, cerca de 99% ou superior) para a sequência relevante, serão utilizadas condições rigorosas. Na hipótese de haver uma certa incompatibilidade, por exemplo, se estiverem previstas estirpes variantes, numa situação em que a sonda não seja completamente complementar, pode eventualmente diminuir o rigor da hibridação. No entanto, no contexto de uma aplicação de diagnóstico são escolhidas condições suficientemente rigorosas para por de parte a hibridação da sonda com alvos que sejam apenas parcialmente complementares (v.g. uma sequência de ADN congénere de uma espécie diferente).

As condições que afectam a hibridação e que permitem uma selecção perante a hibridação com sequências parcialmente complementares são conhecidas na especialidade. Por exemplo, sabe-se que o rigor é uma função da temperatura, da concentração salina, do

comprimento da sonda, do teor da sonda em GC e da concentração de agentes caotrópicos nos tampões de hibridação. Para uma dada sonda, partindo de um conjunto particular de condições, uma diminuição da concentração salina, um aumento da temperatura ou um aumento da concentração de agentes caotrópicos tem como consequência um aumento do rigor.

De acordo com uma variante preferida da presente invenção, os polinucleótidos relevantes são incubados com uma sonda oligonucleotídica na presença de um tampão em que a concentração do isotiocianato de sódio varia entre cerca de 2,5M e cerca de 4,5M, de preferência entre cerca de 3,8M e cerca de 4,2M e mais preferencialmente é de 4,0M, a uma temperatura compreendida entre cerca de 35°C e cerca de 40°C e de preferência entre cerca de 37°C e cerca de 39°C, o que proporciona consequentemente um rigor elevado durante a hibridação.

As sondas para as sequências relevantes podem ser obtidas a partir de qualquer das cadeias da hélice dupla amplificada. As sondas podem ser constituídas pelas bases A, G, C ou T ou seus análogos (incluindo a inosina e a 5-metil-citosina). As sondas podem ter qualquer comprimento adequado que abranja uma parte da região relevante, mas que exclua os iniciadores, e que permita uma hibridação específica com a região relevante. De um modo geral, as sondas irão ter pelo menos 14 nucleótidos, de preferência irão ter pelo menos 18 nucleótidos e mais preferencialmente irão ter pelo menos 20 a 30 nucleótidos de qualquer das cadeias de ADN complementar. As sondas são escolhidas preferencialmente de modo a possuírem pelo menos 75% de complementaridade com uma parte da região relevante. Se tiver de haver uma complementaridade completa, isto é, se a estirpe contiver uma sequência idêntica à da sonda, a hélice dupla irá ser relativamente estável mesmo em condições rigorosas e as sondas podem ser curtas, isto é, podem variar entre cerca de 10 a 30 pares de bases. No caso de se prever um certo grau de incompatibilidade ou de inexactidão com a

sonda, isto é, se se suspeitar que a sonda irá hibridar com uma região variante, a sonda pode então ter um comprimento maior, uma vez que se presume que o comprimento compensa uma parte do efeito das inexactidões. A sonda pode ser feita a partir de um subconjunto da região relevante e por tal motivo não é necessário que abranja toda a região relevante. Qualquer subconjunto da região relevante tem o potencial para identificar de forma específica a região relevante.

Se desejado, a sonda também pode ser marcada. Há inúmeros marcadores adequados e também métodos para a sua inclusão nas sondas que são conhecidos na especialidade, salientando-se, por exemplo, os átomos radioactivos, tais como o ^{32}P , ou outras funcionalidades reconhecíveis, v.g. a biotina (utilizando de preferência um braço separador), corantes fluorescentes, reagentes densos em electrões, enzimas capazes de formarem facilmente produtos de reacção detectáveis (v.g., a fosfatase alcalina e a peroxidase de *Azorella rusticana*), ou os antigénios para os quais há anticorpos monoclonais ou anti-soros específicos.

A sonda também pode ser acoplada de forma covalente a uma proteína, por exemplo, a ASB, para que assim a sonda fique ligada a uma superfície, tal como uma placa de microcavidades, feita de plástico, uma membrana de 'nylon' ou microsferas magnéticas.

Para a obtenção de sondas utilizáveis nos ensaios de RCP aqui descritos, tem de se conhecer suficientemente a sequência nucleotídica da região destinatária. A análise da sequência nucleotídica da região destinatária pode ser uma análise directa dos produtos amplificados por RCP, conforme descrito por Gyllensten e Erlich em 'Proc. Natl. Acad. Sci. USA', 85:7652 (1988). Há uma modificação deste procedimento que consiste em efectuar a separação das cadeias da hélice dupla do ADN da região destinatária para se gerar uma matriz de ADN de cadeia singular utilizável nas reacções de sequenciação. Em alternativa, os fragmentos de

ADN isolados e amplificados por RCP podem ser clonados dentro de vectores e o ADN resultante obtido a partir das bactérias é então sequenciado com o fragmento intercalar que contém o ADN vectorial.

Na presente invenção, recorre-se à RCP para a detecção da bactéria *N. gonorrhoeae* por amplificação *in vitro* de uma parte do gene putativo da CMT. O sistema possui uma elevada sensibilidade analítica; o limite de detecção, utilizando ácido nucleico purificado, é de 1 equivalente de ADN do organismo. A hibridação com uma sonda oligonucleotídica constitui um ensaio com um nível adicional de especificidade para a bactéria *N. gonorrhoeae*.

Um ensaio de diagnóstico para a bactéria *N. gonorrhoeae* consiste no seguinte:

- 1) amplificação de uma amostra clínica tratada com iniciadores marcados com biotina, específicos para o gene putativo da CMT de *N. gonorrhoeae*; os iniciadores SS01 e SS02 correspondem a uma região altamente conservada do gene da CMT; o produto amplificado resultante possui 201 pares de bases, correspondentes aos pares de bases 773-974 do gene de 1044 pares de bases (ver Myiada e Born, *supra*); e
- 2) submeter a amostra amplificada a uma hibridação rigorosa com uma sonda oligonucleotídica ligada a um suporte sólido; a sonda preferida, que é uma sonda de 20 pares de bases (SS06-T5), é específica para uma região dentro da sequência relevante de 201 pares de bases e foi seleccionada para se eliminar a interreactividade com a bactéria *N. mucosa* que foi observada ao ser utilizada cada uma das sequências hibridantes testadas por Myiada e Born, *supra*.

De acordo com a presente invenção, realiza-se um único ensaio de RCP em que são utilizados os dois iniciadores específicos para a bactéria *N. gonorrhoeae* e mais dois iniciadores

específicos para a bactéria *C. trachomatis*, os quais possuem respectivamente as sequências identificadas pelas designações SEQ ID NO: 4 e 5. Estes dois conjuntos de iniciadores não interferem (não interactuam) entre si. A seguir à amplificação, a amostra relevante é hibridada separadamente com duas sondas diferentes ligadas a dois suportes sólidos diferentes. Uma sonda é específica para a sequência relevante amplificada de *N. gonorrhoeae* e a outra sonda é específica para a sequência relevante amplificada de *C. trachomatis*.

A eficiência de amplificação, e conseqüentemente a sensibilidade global, do ensaio de RCP descrito antes para *N. gonorrhoeae/C. trachomatis* depende de forma crítica da compatibilidade dos dois conjuntos de iniciadores. Os iniciadores concebidos para a presente invenção, para além do facto de serem exclusivamente específicos para cada uma das espécies referidas *supra*, satisfazem mais quatro critérios fundamentais (ver as figuras 1 e 2): (1) os iniciadores têm um comprimento e um teor em GC semelhantes e por tal motivo possuem temperaturas de fusão semelhantes; (2) as amplificações comandadas pelos iniciadores têm um óptimo semelhante de MgCl₂; (3) não há complementaridade entre os iniciadores; e (4) os iniciadores dão origem a produtos de amplificação de tamanhos semelhantes.

Detecta-se a presença da sequência relevante numa amostra biológica determinando se se formou um híbrido entre a sonda e o ácido nucleico sujeito às técnicas de amplificação por RCP. Os métodos para a detecção dos híbridos formados entre uma sonda e uma sequência de ácido nucleico são conhecidos na especialidade. Por exemplo, uma amostra não marcada pode ser transferida para uma matriz sólida à qual se vai ligar e essa amostra ligada é sujeita a condições que permitam a hibridação específica com uma sonda marcada; a matriz sólida é depois examinada para se pesquisar a presença da sonda marcada. Em alternativa, se a amostra for marcada, liga-se uma sonda não marcada à matriz e depois da exposição a condições

adequadas de hibridação examina-se a matriz para se pesquisar a presença de um marcador. Saiki *et al.* em Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:6230-6234 (1989) descrevem métodos para imobilizar sondas múltiplas sobre um suporte sólido e para se utilizar a hibridação para a detecção de polinucleótidos destinatários amplificados relevantes. Os dois últimos procedimentos adequam-se bem à utilização de um painel de sondas hibridantes que permitam a identificação simultânea de mais do que um agente patogénico numa única amostra clínica. Segundo outro procedimento alternativo, é possível recorrer a um ensaio em sanduíche em fase líquida (solução) com sondas polinucleotídicas marcadas, estando os métodos para a preparação de tais sondas descritos na publicação da patente de invenção norte-americana nº 4 820 630.

As sondas aqui descritas são aplicadas preferencialmente à detecção de *N. gonorrhoeae* e *C. trachomatis*. Todas as sondas adiante descritas, e também mais algumas outras sondas, podem ser fixadas a uma superfície de uma placa de microcavidades. Imobiliza-se cada uma das sondas numa cavidade individualizada de uma placa de microtitulação. O ADN amplificado e marcado é hibridado com cada uma das sondas em solução aquosa. O padrão dos sinais de cada cavidade (isto é, das sondas) indica a identidade do ADN relevante. Sendo assim, após a amplificação da região relevante, (v.g., por RCP) e após a aplicação das sondas aqui descritas, a hibridação com uma ou com as duas sondas irá dar origem a um sinal positivo e à identificação positiva de *N. gonorrhoeae* e/ou *C. trachomatis*.

Também estão contemplados no âmbito da presente invenção os estojos de RCP utilizáveis para a prática dos processos de amplificação e/ou detecção por RCP, anteriormente referidos. Os estojos de diagnóstico contêm as sondas oligonucleotídicas e os iniciadores descritos na presente memória descritiva. Os iniciadores e as sondas podem ser marcados, por exemplo, com biotina. Se os iniciadores forem marcados, as sondas podem ser fixadas a

uma placa de microcavidades. O estojo também pode conter outros reagentes adequadamente acondicionados e outros materiais necessários para o protocolo de ensaio particular, por exemplo, substâncias de contraprova, agentes polimerizantes e ainda as instruções para a execução do teste.

Na prática, os componentes do estojo de RCP, quando aplicados a uma amostra de ácido nucleico, criam uma mistura reagente que permite a amplificação e a detecção da sequência de ácido nucleico relevante. Assim, a mistura reagente contém os componentes do estojo e também uma amostra de ácido nucleico que possua a cadeia polinucleotídica relevante.

Uma variação desta forma de resolver o problema consiste em utilizar um método alternativo para a produção da região relevante amplificada. Por exemplo, o sistema de amplificação TAS (Kwoh *et al.*, sistema de amplificação à base de transcrição e subsequente detecção do vírus amplificado de tipo 1 da imunodeficiência humana com uma metodologia de hibridação em sanduíche com base em esférulas (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173-1177 (1989)) e a sua modificação SSSR (Guatelli *et al.*, "Isothermal, *in vitro* Amplification of Nucleic Acids by a Multi-Enzyme Reaction Modeled After Retroviral Replication", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874-1878 (1990)) constituem um método para amplificar ARN ou ADN utilizando ciclos em que se recorre a um passo em que se utiliza ADNc para a produção de uma cópia de ADNc da matriz e um passo de transcrição de ARN para aumentar o número de cópias da matriz do ADNc. Este método, tal como a RCP, consiste em utilizar dois iniciadores oligonucleotídicos que hibridam com cadeias opostas da região relevante e flanqueiam a região relevante. Os iniciadores aqui descritos, com modificações secundárias (a adição de sequências do promotor da polimerase de ARN à extremidade 5' de um dos iniciadores) podem ser utilizados num sistema de amplificação TAS ou SSSR. No passo subsequente do

ensaio é possível realizar a detecção por meio das sondas oligonucleotídicas aqui descritas, essencialmente conforme descrito antes a propósito do ensaio à base de RCP, ou pode ser praticado recorrendo a um sistema de hibridação em sanduíche à base de esférulas (Kwoh *et al.*, *supra*).

De acordo com outro exemplo, poder-se-ia utilizar as sondas aqui descritas como um componente das sondas num sistema de amplificação do sinal, tal como o sistema 'Q-beta-replicase' (Kramer e Lizardi, "Replicatable RNA Reporters", *Nature* 339:401-402 (1989) e Lomeli *et al.*, "Quantitative Assays Based on the Use of Replicatable Hybridization Probes", *Clin. Chem.* 35:1826-1831 (1989)). Este sistema necessita de uma sonda de ARN que contém uma sequência hibridante específica inserida na variante MDV-1 do genoma de ARN de Q-beta. A sonda hibridante de ARN é replicada utilizando a Q-beta-replicase, produzindo até 10^{12} moléculas por reacção, após a hibridação da sonda com a amostra que se pretende analisar.

Para se dispor de maior especificidade, indica-se a seguir as sequências nucleotídicas de sondas e iniciadores:

o iniciador SS01 (SEQ ID NO:1) (FIG. 1) corresponde aos números de bases nucleotídicas 773-796 de M. NgO PII de *N. Gonorrhoeae*, o gene do ADN da citosina-metil-transferase, conforme especificado por Myiada e Born na obra *supra*;

o iniciador SS01 (SEQ ID NO:2) (FIG. 1) corresponde ao complemento dos números de bases nucleotídicas 952-974 de M. NgO PII de *N. Gonorrhoeae*, o gene do ADN da citosina-metil-transferase, conforme especificado por Myiada e Born na obra *supra*;

a sonda SS06-T5 (SEQ ID NO:3) (FIG. 1) corresponde ao complemento do número de bases nucleotídicas 851-870 de M. NgO PII de *N. Gonorrhoeae*, o gene do ADN da citosina-metil-transferase, conforme especificado por Myiada e Born na obra *supra* (correspondendo aos números de bases 79-98 da figura 3 dos requerentes).

Exemplo 1

Avaliação dos resultados e da sensibilidade do ensaio

O ensaio de co-amplificação concebido para a detecção de *N. gonorrhoeae* e *C. trachomatis* necessita de dois conjuntos de iniciadores: 1) SS01, SS02 para *N. gonorrhoeae* e 2) CP24, CP27 para *C. trachomatis*. Efectua-se a marcação da totalidade dos quatro iniciadores com biotina (bio) nas suas extremidades 5' para facilitar a detecção dos produtos amplificados a seguir à RCP. Para se determinar os resultados e a sensibilidade do ensaio foi executada a experiência a seguir descrita.

A. Amplificação por RCP do ADN purificado

Foram utilizados extractos purificados de ADN cromossómico de *N. gonorrhoeae* e de ADN plasmídico de *C. trachomatis*, diluídos sequencialmente numa solução contendo 0,2% de DSS, 10% de Tween 20, Tris 10 mM (pH 8,5), MgCl₂ 3 mM e 0,05% de NaN₃ (STM + Diluente da Amostra, ver o exemplo 3). As amostras de ADN foram diluídas, para se fornecer qualquer número desejado de cópias, em 50 µL de diluente. Efectuou-se a mistura de aliquotas, variando desde os valores exíguos da ordem de 2 cópias/50 µL até 100 cópias/50 µL, com 50 µL de mistura de RCP 2X. A concentração final dos componentes da reacção era a seguinte:

Tris 10 mM a pH 8,5

KCl 50 mM

MgCl₂ 3 mM

EDTA 50 µM

10% de glicerol

0,05% de NaN₃

dGTP 50 μ M, dCTP 50 μ M, dATP 50 μ M, dUTP 50 μ M

bio-SS01 0,25 μ M, bio-SS02 0,25 μ M

bio-CP24 0,25 μ M, bio-CP27 0,25 μ M

5 unidades de polimerase Taq por cada reacção

2 unidades de 'AMPERASE™' por cada reacção (uma enzima esterilizante fornecida por Roche, Basileia, Suíça).

Introduziu-se num tubo de RCP de modelo 'PCR MicroAmp' cada uma das aliquotas de 100 μ L da mistura de reacção, transferiu-se para um tabuleiro de amostras e colocou-se num aparelho de execução dos ciclos térmicos (TC-9600 Perkin-Elmer, Norwalk, Conn, E.U.A.).

Foram utilizados os seguintes parâmetros de amplificação:

Ciclo 1:	2 minutos, 50°C	1 ciclo
Ciclo 2:	5 minutos, 95°C	1 ciclo
Ciclos 3-37:	20 segundos, 95°C	35 ciclos
	20 segundos, 62°C	
	20 segundos, 72°C	
Ciclo 38:	Mantido a 72°C durante 10 minutos	1 ciclo
	(pode ser interrompido por opção discricionária do utilizador)	

B. Detecção dos produtos amplificados

Uma vez que os iniciadores para os dois alvos estavam biotinizados, foi possível consequentemente realizar um ensaio de hibridação de captura para a detecção colorimétrica dos produtos amplificados marcados.

A sonda de captura SC35 (em inglês, CP35), específica para *C. trachomatis*, foi fixada ao fundo das cavidades de uma placa de microtitulação por meio de uma ponte tioéter de

união à albumina do soro de bovino (Barone *et al.*, 'Microtiter plate detection of *Chlamydia trachomatis* employing PCR. Abstracts for the general meeting of the American Society of Microbiology', 1991, pág. 361). A sonda de captura para *N. gonorrhoeae*, designada por SS06-T5, foi igualmente fixada às cavidades de uma outra placa.

A seguir à co-amplificação desnaturou-se cada produto de reacção com 100 μL de NaOH 0,4 M e EDTA 80 mM. Acrescentou-se uma aliquota de 25 μL a uma cavidade na placa da SC35. acrescentou-se uma segunda aliquota de 25 μL a uma cavidade na placa de SS06-T5. cada cavidade continha 100 μL de uma solução de hibridação/neutralização constituída por NaSCN 2,5 M, NaH_2PO_4 80 mM, Na_2HPO_4 10 mM e 0,125% de Tween 20.

As placas foram incubadas durante 1 hora a 37°C. A seguir efectuou-se a lavagem das cavidades 5 vezes com 350 μL de NaCl 150 mM, NaH_2PO_4 7 mM, Na_2HPO_4 3 mM, 0,125% de Tween 20, 0,05% de Proclin 300 (Rohm & Haas, Pa, E.U.A.) e EDTA 1 mM a pH 7,5.

Acrescentou-se a cada cavidade 100 μL de conjugado de avidina-PAR (peroxidase de *Ammannia rusticana*) e manteve-se a incubar durante 15 minutos a 37°C. Efectuou-se a lavagem das cavidades 5 vezes de um modo idêntico ao descrito antes. Acrescentou-se a cada cavidade 100 μL de um substrato de 3,3',5,5'-tetrametil-benzidina ("TMB") e de peróxido de hidrogénio e esperou-se que tivesse lugar a reacção de revelação de cor durante 10 minutos ao abrigo da luz. Interrompeu-se a reacção introduzindo em cada cavidade 100 μL de um reagente de paragem H_2SO_4 . Efectuou-se a leitura das placas a 450 nm numa leitora de placas de microcavidades. Considerou-se positivas as leituras superiores a 0,25.

Os dados gerados pela amplificação desta titulação de ADN purificado proporcionaram sinais bem acima dos limites lineares (0-3,0 unidades de DO) da leitora de placas de microcavidades, pelo que não estão representados. Ao fim de 38 ciclos de amplificação, o valor

diminuto de duas cópias de entrada de ADN “relevante limpo” permitiu gerar mais produto amplificado do que aquele que poderia ser avaliado linearmente pelo ensaio de hibridação de captura das placas. Estes valores significam um nível muito elevado de resultados e de sensibilidade para o ensaio.

Exemplo 2

Determinação da especificidade da sonda e do iniciador de *Neisseria gonorrhoeae*

A. Amplificação por RCP

Efectuou-se a amplificação por RCP com 15 estirpes de *N. gonorrhoeae*, 32 estirpes de outras espécies de *Neisseria* e mais outros 13 organismos relevantes. As estirpes e os organismos específicos estão indicados no quadro 1 subsequente. Misturou-se conjuntamente 50 µL de cada extracto de ADN (em STM + Diluente da Amostra, ver o exemplo 3) conjuntamente com 50 µL de mistura de RCP 2X e amplificou-se conforme descrito no exemplo 1.

B. Detecção dos produtos amplificados

Depois de completadas as reacções de amplificação aplicou-se 5 µL de cada reacção de 100 µL sobre um gel de agarose a 2% em TBE 1X (Tris 45 mM-borato, EDTA 1 mM) e brometo de etídio na concentração de 5 µg/mL. Depois da experiência fotografou-se o gel sob a acção de uma luz UV. Os resultados, expressos em termos de presença (+) ou ausência (-) de uma banda com o tamanho adequado (201 pb) estão indicados no quadro 1.

C. Transferência dos ADN amplificados para uma membrana de ‘nylon’

A seguir à fotografia feita ao gel, embebeu-se o gel em HCl 0,25N durante 10 minutos à temperatura ambiente. Depois embebeu-se o gel numa solução de NaOH 0,5M e NaCl 1,5 M

durante 30 minutos, a que se seguiu o embebimento numa solução de Tris 1 M (pH 7,5) e NaCl 1,5 M durante 30 minutos.

Transferiu-se o ADN para uma membrana de 'nylon' por um processo de electro-transferência durante 1 hora a 40°C em TBE 1X. A seguir enxaguou-se o filtro em TBE 1X, secou-se ao ar e efectuou-se a reticulação do ADN utilizando uma luz UV num aparelho 'Stratalinker' da "Stratagene".

D. Marcação radioactiva da sonda oligonucleotídica SS06-T5

Marcou-se a sonda SS06-T5 (icosâmero) utilizando a cinase dos polinucleótidos das T4, conforme a seguir se indica:

$^{32}\text{P-}\gamma\text{-ATP}$	6,0 μL
Tampão de cinase 10X	2,5 μL
10 pmoles de SS06-T5	1,0 μL
Cinase dos polinucleótidos das T4	1,0 μL
dH ₂ O	14,5 μL
Total	25,0 μL

Tampão de cinase 10X: Tris 500 mM a pH 8,0
MgCl₂ 100 mM
DTT 50 mM.

A reacção com a cinase ficou a incubar durante 30 minutos a 37°C. Para interromper a reacção adicionou-se 4,0 μL de EDTA 0,5 M e 70 μL de dH₂O. Aplicou-se 2 vezes a mistura de reacção sobre uma coluna P4 com 1,0 mL de 'Biogel' a trabalhar a 1200 r.p.m.

para se efectuar a separação entre o oligonucleótido marcado e o marcador radioactivo não incorporado. Com 1 μ L de produto eluído efectuou-se uma contagem num contador de cintilação para se determinar o nível de incorporação de radioactividade. Na hibridação subsequente utilizou-se para cada borrão o valor de 200000 cpm.

E. Hibridação de SS06-T5 com os ADN transferidos

Efectuou-se a pré-hibridação de seis borrões (6) de ADN numa mistura de SSPE 5X, 0,5% de DSS a 55°C durante 30 minutos (SSPE 1X = NaCl 0,18 M, NaPO₄ 10 mM, pH 7,4, EDTA 1 mM). Acrescentou-se a sonda oligonucleotídica marcada a 10 mL (por borrão) de SSPE 5X e 0,5% de DSS. Acrescentou-se a solução ao saco de plástico que continha o borrão pré-embebido. A hibridação decorreu durante 1 hora a 55°C.

Retirou-se o borrão do saco de plástico e enxaguou-se 1 vez com uma solução de SSPE 5X e 0,5% de DSS. Depois lavou-se o borrão durante 10 minutos com uma solução de SSPE 2X e 0,1% de DSS.

Os borrões foram envolvidos em mortalha de Saran e colocados num suporte de película sensível aos raios X com uma folha Kodak de película sensível aos raios X, XAR-5 da com uma grelha intensificadora, tendo a exposição decorrido durante 16 horas a -70°C.

Os resultados das reacções de hibridação estão interpretados no quadro 1 subsequente. Conforme se pode observar no quadro 1, um total de 10 estirpes testadas de 5 espécies diferentes de *Neisseria* de tipo não gonorreico revelaram uma amplificação positiva com os iniciadores de *N. gonorrhoeae* (v.g. ATCC 14685 e ATCC 25296). No entanto, com estes produtos não houve nenhuma hibridação com a sonda SS06-T5 específica de *N. gonorrhoeae*. Por tal motivo, a sonda proporciona a necessária especificidade a este sistema que de outro modo não a teria utilizando apenas a RCP.

Exemplo 3

Avaliação das amostras clínicas

Utilizando uma variante preferida da invenção, efectuou-se o teste de 960 amostras clínicas recorrendo à co-amplificação de *N. gonorrhoeae* e *C. trachomatis*.

A. Recolha das amostras

1) Esfregaços endocervicais

Os esfregaços endocervicais foram colocados em 1,0 mL de meio de transporte das amostras (MTA) (o qual contém 0,4% de DSS; Tris 10 mM a pH 8,0) para o transporte para um laboratório para análise.

2) Urina

Recolheu-se 8,0 mL de urina de homem e centrifugou-se a 3000 r.p.m.. Com a massa obtida preparou-se nova suspensão em 2,0 mL de DSS a 0,4% e Tris 190 mM a pH 8,5.

B. Co-amplificação de amostras

Antes da amplificação todas as amostras receberam igual volume (1,0 mL no caso dos esfregaços endocervicais, 2,0 mL no caso das massas urinárias) de Diluente de Amostras (20% de Tween 20, MgCl₂ 6 mM, 0,05% de NaN₃, Tris 10 mM a pH 8,5). Acrescentou-se 50 µL de cada amostra a 50 µL de uma mistura de RCP 2X. As condições de reacção e os parâmetros de execução dos ciclos são os descritos no exemplo 1A.

C. Deteccção dos produtos amplificados

Efectuou-se a deteccção dos produtos exemplificados conforme descrito no exemplo 1B. Os resultados estão ilustrados no quadro 2 no caso das amostras endocervicais e no quadro 3 no caso das amostras urinárias.

Tanto para as amostras endocervicais como urinárias, o elevado número de amostras de culturas (-) e de RCP (+) nos casos de *N. gonorrhoeae* e de *C. trachomatis* não foi surpreendente devido à maior sensibilidade de detecção por RCP comparativamente com os métodos convencionais de cultura.

Exemplo 4

Optimização das formulações de tampão de hibridação para uma especificidade máxima

O sistema descrito nos exemplos 1 e 2, quando implementado num ensaio de diagnóstico, tem uma taxa de exactidão da ordem de 99%. Ocasionalmente, se a co-amplificação for efectuada na presença de oligonucleótidos iniciadores de *C. trachomatis* e de *N. gonorrhoeae*, mas na ausência de qualquer amostra acrescentada de ADN, são obtidos sinais não específicos para a *N. gonorrhoeae* (mas não para a *C. trachomatis*). Estes sinais raros não específicos ($A_{450} > 0,25$) foram observados na presença e na ausência de 'AMPERASE™' e não foram provocados pela contaminação com ADN contendo dUTP e previamente amplificado. Investigou-se a hipótese destes sinais não específicos poderem ser eliminados aumentando o rigor do tampão de hibridação. Aumentou-se o rigor aumentando a concentração do agente caotrópico NaSCN no tampão.

Para se determinar se o aumento do rigor do tampão de hibridação poderia reduzir e/ou eliminar os sinais não específicos de *N. gonorrhoeae*, foram realizadas 5 experiências independentes de co-amplificação (consistindo cada uma delas de várias centenas de reacções de amplificação). Testou-se os produtos de cada reacção de amplificação para pesquisa da hibridação com uma sonda imobilizada específica de *N. gonorrhoeae*, utilizando tampões de hibridação de baixa concentração (NaSCN 2,5 M) e de elevada concentração (NaSCN 4,0M). Após a hibridação, os produtos ligados foram detectados utilizando um conjugado de avidina-

peroxidase de *Armoracia rusticana* (que se liga aos resíduos de biotina que foram incorporados nos produtos amplificados). Estes dados estão agrupados resumidamente no quadro 4. A frequência dos sinais não específicos foi reduzida quando os produtos foram testados utilizando o tampão de hibridação de elevado rigor. Além do mais, os sinais das leituras restantes não específicas foram bastante reduzidos; muitos sinais que eram $A_{450} > 1,0$ utilizando o tampão de menor rigor foram reduzidos para $A_{450} < 0,6$ utilizando o tampão de maior rigor (resultados marcados com um * no quadro 4). Houve um subconjunto de leituras não específicas que gerou sinais fortes utilizando os dois tampões (resultados marcados com dois ** no quadro 4). Presume-se que estas leituras não específicas tenham sido produzidas pela contaminação com ADN de *N. gonorrhoeae* genuína do meio ambiente. Ao contrário dos outros sinais positivos, estes hibridam com uma segunda sonda (SS08) específica de *N. gonorrhoeae*. Esta segunda sonda e a sonda original (SS06T5) são complementares das sequências não sobrepostas contidas no segmento de ADN amplificado pelos iniciadores específicos de *N. gonorrhoeae*. Assim, os sinais positivos cujo sinal é reduzido aumentando o rigor da hibridação partilham uma sequência limitada com o ADN genuíno de *N. gonorrhoeae* (isto é, parcialmente complementar para a sonda SS06T5). Pelo contrário, os sinais não específicos que não são afectados pelo aumento do rigor contêm duas sequências diferentes específicas de *N. gonorrhoeae* isto é, uma sequência é complementar de SS06T5 e uma sequência é complementar de SS08), conforme seria de prever se ocorresse contaminação com o ADN de *N. gonorrhoeae*.

Quadro 1

Análise da especificidade da sonda e dos iniciadores de *N. gonorrhoeae* no ensaio de co-amplificação por RCP

<u>Organismo</u>		<u>Hib. das autorradiografias</u>	
		<u>Fotografia do gel</u>	<u>SS06-T5</u>
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	25-20	+	+
	CMCC 2779	+	+
	CMCC 2783	+	+
	CMCC 2852	+	+
	CMCC 2860	+	+
	A 10	+	+
	AL03418	+	+
	K3	+	+
	IL4	+	+
	IL22	+	+
	IL36	+	+
	R56	+	+
	R180	+	+
	SF3B	+	+
	TX7	+	+
<i>Neisseria cinerea</i>	ATCC 14685	+	-
	CMCC 2791	-	-
<i>Neisseria elongata</i>	ATCC 25296	+	-
	STA1	+	-
<i>Neisseria flavescens</i>	CMCC 2790	-	-
<i>Neisseria lactamica</i>	ATCC 23970	-	-
	CMCC 2792	-	-
	STA32	-	-
	STA177	-	-

Quadro 1 (continuação)

<u>Organismo</u>		Hib. das autorradiografias	
		<u>Fotografia do gel</u>	<u>SS06-T5</u>
<i>Neisseria meningitidis</i>	CMCC 2801	-	-
	STA5	-	-
	A	-	-
	B	-	-
	C	-	-
	W135	-	-
	Y	-	-
<i>Neisseria mucosa</i>	ATCC 19693	+	-
	ATCC 19694	-	-
	ATCC 19697	-	-
	ATCC 25996	-	-
	ATCC 25997	-	-
	CMCC 2794	-	-
	STA37	+	-
	STA45	+	-
	STA47	+	-
<i>Neisseria perflava</i>	CMCC 2796	-	-
<i>Neisseria sicca</i>	ATCC 9913	-	-
	ATCC 29256	+	-
	ATCC 29259	+	-
	CMCC 2797	-	-
<i>Neisseria subflava</i>	ATCC 14799	+	-
	CMCC 2793	-	-
<i>Branhamella catarrhalis</i>	ATCC 8176	-	-
	CMCC	-	-
<i>Chlamydia trachomatis</i>	CMCC	-	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	CMCC	-	-

Quadro 1 (continuação)

<u>Organismo</u>		<u>Hib. das autorradiografias</u>	
		<u>Fotografia do gel</u>	<u>SS06-T5</u>
<i>Escherichia coli</i>	CMCC	-	-
<i>Gardnerella vaginalis</i>	CMCC	-	-
<i>Hemophilus influenzae</i>	CMCC	-	-
<i>Kingella kingae</i>	Fair Lawn	-	-
<i>Klebsiella pneumonias</i>	CMCC	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CMCC	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	CMCC	-	-
<i>Serratia marcescens</i>	CMCC	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	CMCC	-	-
<i>Streptococcus pyogenes</i>	CMCC	-	-

Quadro 2

Esfregaços endocervicais

<i>N. gonorrhoeae</i>	Cultura	
	+	-
CoAmp +	30	26
CoAmp -	7	404
<i>C. trachomatis</i>	Cultura	
	+	-
CoAmp +	22	44
CoAmp -	12	391

288
37

Quadro 3

Amostras urinárias

<i>N. gonorrhoeae</i>	Cultura	
	+	-
CoAmp +	124	50
CoAmp -	35	284

<i>C. trachomatis</i>	Cultura	
	+	-
CoAmp +	32	49
CoAmp -	14	395

QUADRO 4

Nº de experiências de RCP	Nº total das RCP	Reacções positivas com a sonda SS06-T5 utilizando o tampão de hibridação				Ensaio de hibridação com a sonda alternativa SS08 A450
		Contendo NaSCN 0,25 M		Contendo NaSCN 4,0 M		
		Nº de reacções + (Frequência)	A450 (nm)	Nº de reacções + (Frequência)	A450 (nm)	
1	285	2 (0,70%)	2,421*	0 (<0,3%)	0,229	Não efectuada
			2,416*		0,246	Não efectuada
2	285	5 (1,75%)	0,541	4 (1,40%)	0,307	0,075
			0,571		0,060	0,086
			0,366		0,350	0,059
			0,726		0,365	0,134
			0,432		0,414	0,063
3	940	13 (1,38%)	1,495**	9 (0,96%)	0,970	0,281
			1,219**		0,915	0,156
			3,727**		3,253	1,026
			0,330		0,130	0,048
			1,578**		1,381	0,340
			0,266		0,068	0,048
			2,491**	2,179	0,613	

QUADRO 4 (continuação)

Nº de experiências de RCP	Nº total das RCP	Reacções positivas com a sonda SS06-T5 utilizando o tampão de hibridação				Ensaio de hibridação com a sonda alternativa SS08 A450
		Contendo NaSCN 0,25 M		Contendo NaSCN 4,0 M		
		Nº de reacções + (Frequência)	A450 (nm)	Nº de reacções + (Frequência)	A450 (nm)	
			2,257*		0,326	0,065
			3,406**		3,542	1,939
			3,157**		2,308	0,307
			3,242*		0,463	0,083
			0,598		0,101	0,051
			2,294*		0,249	0,063
4	940	11 (1,17%)	2,173**	5 (0,53%)	1,940	0,214
			0,893*		0,178	0,052
			0,740		0,538	0,083
			2,452**		2,782	0,386
			0,506		0,502	0,094
			0,329		0,054	0,054
			0,267		0,089	0,052
			0,357		0,166	0,051
			0,379		0,074	0,083
			0,349		0,056	0,065
			1,256**		1,270	0,098
5	644	7 (1,08%)	1,954*	5 (0,77%)	0,335	Não efectuado
			0,551		0,503	Não efectuado
			2,759*		0,508	0,061
			2,601*		0,555	Não efectuado
			3,510*		0,591	0,065
			2,389*		0,219	Não efectuado
			0,964		0,158	Não efectuado

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

(1) INFORMAÇÃO GERAL:

(i) REQUERENTE:

(A) NOME: F. Hoffmann-La Roche AG

(B) RUA: Grenzacherstr. 124

(C) CIDADE: Basileia

(D) ESTADO: Basileia

(E) PAÍS: Suíça

(F) CÓDIGO POSTAL: 4002

(G) TELEFONE: 061 688 27 08

(H) TELEFAX: 061 688 13 95

(ii) TÍTULO DA INVENÇÃO: "Métodos, reagentes e estojos para a detecção de *Neisseria gonorrhoeae* e *Chlamydia trachomatis*"

(iii) NÚMERO DE SEQUÊNCIAS: 7

(iv) FORMA LEGÍVEL POR COMPUTADOR:

(A) SUPORTE: disquete

(B) COMPUTADOR: CP compatível com IBM

(C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS

(D) PROGRAMA INFORMÁTICO: PatentIn Release #1.0, Versão #1.25 (EPO)

(vi) DADOS ANTERIORES DO PEDIDO:

- (A) NÚMERO DO PEDIDO: US 08/082 851 e 08/214 861
(B) DATA DE DEPÓSITO: 23-JUN-1993 e 17-MAR-1994

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

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 23 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CORDÃO: simples
(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: Não

(iv) ANTI-SENTIDO: Não

(v) TIPO DE FRAGMENTO: terminal N

(vi) FONTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: *Neisseria gonorrhoeae*

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:1:

TAGCCACGTT TATCGTCGTA TGC

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

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 23 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CORDÃO: simples

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: Não

(iv) ANTI-SENTIDO: Não

(v) TIPO DE FRAGMENTO: terminal N

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

AACAGCATT A CCAATCTGGC GAC

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

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 20 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CORDÃO: simples

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: Não

(iv) ANTI-SENTIDO: Não

(v) TIPO DE FRAGMENTO: terminal N

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:3:

GCGGTTTCAGG GAAGTGATAG

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

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 25 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CORDÃO: simples

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: Não

(iv) ANTI-SENTIDO: Não

(v) TIPO DE FRAGMENTO: terminal N

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

GGGATTCCCTG TAACAACAAG TCAGG

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

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 26 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CORDÃO: simples

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: Não

(iv) ANTI-SENTIDO: Não

(v) TIPO DE FRAGMENTO: terminal N

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:5:

CCTCTTCCCC AGAACAATAA GAACAC

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:6:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 26 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CORDÃO: simples

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: Não

(iv) ANTI-SENTIDO: Não

(v) TIPO DE FRAGMENTO: terminal N

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:6:

CATAGCACTA TAGAACTCTG CAAGC

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:7:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 202 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CORDÃO: simples

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: Não

(iv) ANTI-SENTIDO: Não

(v) TIPO DE FRAGMENTO: terminal N

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:7:

TAGCCACGTT TATCGTCGTA TGCATCGGAA CGAGCCATCA AAAACAATTA TTGCAGCAGG	60
TGGCGGTGGT ACTTGGGGCT ATCACTTCCC TGAACCGCGT GCTTTTACTA ATAGAGAACG	120
AGCAAGGCTT CAAAGTTTTTCTGATGATTT TGAGTTTGTC GGATCAACAA CTGAAGTACG	180
TCGCCAGATT GGTAATGCTG TT	202

Fig. 1

N. gonorrhoeae

Iniciadores e Sonda

Iniciador SS01

5' TAG CCA CGT TTA TCG TCG TAT GC 3'

(SEQ ID NO:1)

Iniciador SS02

5' AAC AGC ATT ACC AAT CTG GCG AC 3'

(SEQ ID NO:2)

Sonda SS06-T5

5' GCG GTT CAG GGA AGT GAT AG 3'

(SEQ ID NO:3)

Sequência relevante amplificada = 201 pb

Fig. 2*C. trachomatis*

Iniciadores e Sonda

Iniciador CP24

5' GGG ATT CCT GTA ACA ACA AGT CAG G 3'

(SEQ ID NO:4)

Iniciador CP27

5' CCT CTT CCC CAG AAC AAT AAG AAC AC 3'

(SEQ ID NO:5)

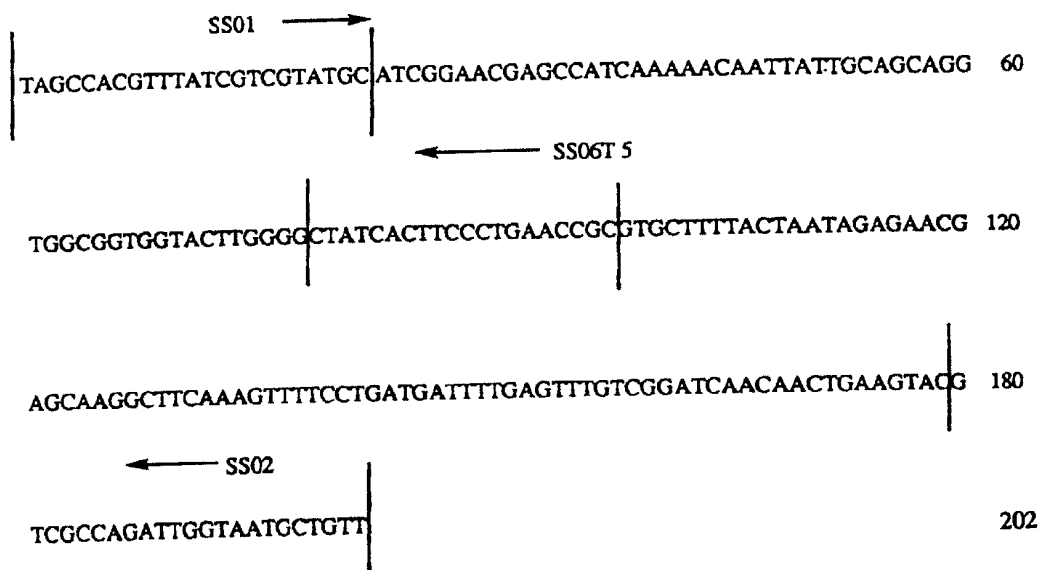
Sonda CP35

5' CAT AGC ACT ATA GAA CTC TGC AAG CC 3'

(SEQ ID NO:6)


Sequência relevante amplificada = 207 pb

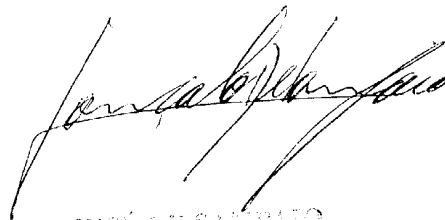
Fig. 3

Sequência alvo para o gene CMT de *N. gonorrhoea*

(SEQ ID NO:7)

Lisboa, 31 de Maio de 2001


 O Agente Oficial de Propriedade Industrial



JOSÉ LUÍS CAMPAÇO
 Agente Oficial
 Rua do Carmo, 110, 1200-001 Lisboa
 Tel: 213 631 100

288
1

Reivindicações


1. Método para a determinação da presença ou da ausência de *N. gonorrhoea* e/ou *C. trachomatis* numa amostra de fluido sobre a qual se suspeita que possa conter um ou ambos os microrganismos *N. gonorrhoea* e *C. trachomatis*, o que compreende os passos seguintes:
 - (a) tratar a referida amostra com uma solução aquosa que contém 4 iniciadores: dois desses iniciadores são capazes de hibridar com *N. gonorrhoea* e possuem as sequências nucleotídicas designadas por SEQ ID NO:1 e SEQ ID NO:2; os outros dois iniciadores são capazes de hibridar exclusivamente com *C. trachomatis* e possuem as sequências designadas por SEQ ID NO:4 e SEQ ID NO:5, em que a referida solução aquosa contém como co-solvente um solvente polar orgânico inerte;
 - (b) sintetizar um produto de prolongamento de cada um dos referidos iniciadores, em que qualquer desses produtos de prolongamento possui as sequências de ADN relevantes, e amplificar essas sequências relevantes se estiverem presentes;
 - (c) tratar a referida amostra, depois das amplificações pretendidas, com duas sondas oligonucleotídicas em que cada uma delas contém pelo menos 14 nucleótidos: uma sonda que contém uma sequência exclusivamente complementar de uma sequência na região amplificada de *N. gonorrhoea* e uma segunda sonda que contém uma sequência exclusivamente complementar de uma sequência na região amplificada de *C. trachomatis*;
 - (d) incubar a(s) região(ões) destinatária(s) amplificada(s), se as houver, com cada uma das sondas nucleotídicas, em condições rigorosas, e permitir que tenha lugar a hibridação entre cada uma dessas sondas e a região destinatária para essas sondas; e

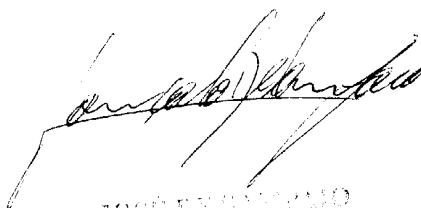
- (e) detectar os híbridos formados entre a(s) região(ões) destinatária(s) amplificada(s), se as houver, e a(s) sonda(s) oligonucleotídica(s).
2. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o passo (d) é efectuado na presença de um tampão.
 3. Método de acordo com a reivindicação 2, em que o tampão compreende NaSCN com uma concentração de cerca de 4,0 M.
 4. Composição para a co-amplificação de sequências de *N. gonorrhoea* e *C. trachomatis* numa amostra biológica constituída por uma solução aquosa que contém os iniciadores específicos para *N. gonorrhoea*, possuidores das sequências designadas por SEQ ID NO:1 e SEQ ID NO:2, e os iniciadores específicos para *C. trachomatis*, possuidores das sequências designadas por SEQ ID NO:4 e SEQ ID NO:5, e em que a referida solução contém como co-solvente um solvente polar orgânico inerte.
 5. Composição de acordo com a reivindicação 4, em que a solução contém entre 1% e 20% em volume do referido co-solvente.
 6. Estojo de RCP para detectar quer um quer os dois organismos *N. gonorrhoea* e *C. trachomatis*, o qual compreende um reservatório onde há uma solução aquosa que contém os iniciadores oligonucleotídicos possuidores das sequências designadas por SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 e SEQ ID NO:5, contendo ainda essa solução aquosa como co-solvente um solvente polar orgânico; e separadamente do referido recipiente, o

estoujo contém uma sonda oligonucleotídica para o organismo *N. gonorrhoea*, possuidora da sequência designada por SEQ ID NO:3, e uma sonda para o organismo *C. trachomatis*, possuidora da sequência designada por SEQ ID NO:6.

7. Estojo de acordo com a reivindicação 6, em que as sondas são imobilizadas sobre uma placa de microtitulação.
8. Estojo de acordo com uma qualquer das reivindicações 6 ou 7, em que os iniciadores oligonucleotídicos são marcados.
9. Estojo de acordo com a reivindicação 8, em que os iniciadores são marcados com biotina.

Lisboa, 31 de Maio de 2001

 Agente Oficial de Propriedade Industrial




JOSÉ DE MENEZES
12711
Rua do Sina, 111 - 1.º andar
1250-001 LISBOA

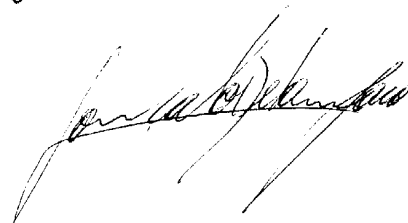
Resumo

“Métodos, reagentes e estojos para a detecção de *Neisseria gonorrhoea* e *Chlamydia trachomatis*”

A invenção descreve métodos, reagentes e estojos para a detecção de *Neisseria gonorrhoea* e descreve também métodos, reagentes e estojos para a detecção de *Neisseria gonorrhoea* e/ou *Chlamydia trachomatis*, em amostras de fluídos, utilizando sondas e iniciadores específicos para cada uma das espécies bacterianas.

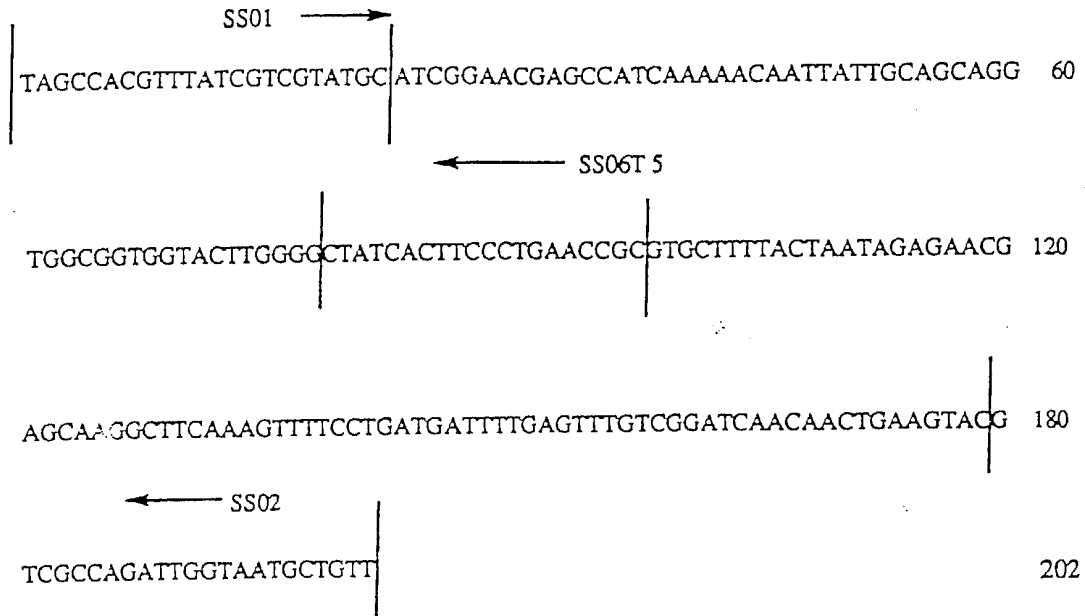
Lisboa, 31 de Maio de 2001

 O Agente Oficial da Propriedade Industrial



JOSÉ DE SAMPAIO
A.G.P.
Rua do Saldre, 101 - 1.º Andar
1000-021 Lisboa

78

Seqüência Relevante para o Gene CMTN, gonorrhoeae

(SEQ ID NO:7)