

(12) PEDIDO INTERNACIONAL PUBLICADO SOB O TRATADO DE COOPERAÇÃO EM MATÉRIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organização Mundial da Propriedade Intelectual  
Secretaria Internacional



(10) Número de Publicação Internacional  
**WO 2014/178741 A2**

(43) Data de Publicação Internacional  
6 de Novembro de 2014 (06.11.2014) **WIPO | PCT**

- (51) Classificação Internacional de Patentes : Sem classificação
- (21) Número do Pedido Internacional : PCT/PT2014/000023
- (22) Data do Depósito Internacional : 30 de Abril de 2014 (30.04.2014)
- (25) Língua de Depósito Internacional : Português
- (26) Língua de Publicação : Português
- (30) Dados Relativos à Prioridade : 106916 30 de Abril de 2013 (30.04.2013) PT
- (71) Requerentes : **UNIVERSIDADE DO MINHO** [PT/PT]; Largo do Paço, P-4704-553 Braga (PT). **UNIVERSIDADE DO PORTO** [PT/PT]; Praça Gomes Teixeira, S/N 4º, S.419, P-4099-002 Porto (PT). **BIOMODE - BIOMOLECULAR DETERMINATION, S.A.** [PT/PT]; Spinpark - Centro de Incubação de base Tecnológica, Avepark - Zona Industrial da Gandra, Caldas das Taipas, P-4806-909 Guimarães (PT).
- (72) Inventores : **FERNANDES ALMEIDA, Carina Manuela**; Travessa 2 da Seixosa, N.º 7, Vila Verde, Moure Moure (PT). **DE SOUSA, José Mário**; Largo do Souto, N.º 28, P-4905-043 Barcelos (PT). **ALVES ROCHA, Rui Jorge**; Rua de Romãos, Cooperativa Vimaranes Casa 3, Ronfe, P-4805-373 Guimarães (PT). **MACIEIRA**

**CERQUEIRA, Laura Isabel**; Rua Cónego Rafael Álvares da Costa, N.º 120 - 1º Dto., P-4715-288 Braga (PT). **DA COSTA VIEIRA, Maria João Lopes**; Rua Bernardo Sequeira, N.º 204 - 7º Dto, P-4710-358 Braga (PT). **DE OLIVEIRA AZEVEDO, Nuno Filipe Ribeiro Pinto**; Rua Dr. José Maria Brandão, N.º 30 - 4º Esq., P-4710-504 Braga (PT).

(74) Mandatário : **BAIRRÃO, Isabel Maria**; Av. da República, 25 - 1º, P-1050-186 Lisboa (PT).

(81) Estados Designados (sem indicação contrária, para todos os tipos de proteção nacional existentes) : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados Designados (sem indicação contrária, para todos os tipos de proteção regional existentes) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasiático (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), Europeu (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ,

(Continua na página seguinte)

(54) Title : PEPTIDE NUCLEIC ACID PROBE, KIT AND METHOD FOR DETECTING AND/OR QUANTIFYING *ESCHERICHIA COLI* O157:H7 AND RESPECTIVE USES

(54) Título : SONDA DE ÁCIDO PÉPTIDO NUCLEICO, ESTOJO E MÉTODO PARA DETECTAR E / OU QUANTIFICAR *ESCHERICHIA COLI* O157 : H7 E RESPECTIVAS APLICAÇÕES

```
3' - CTGTGA, CACACAAC - 5' EcoPNA1169
AP010960_Escherichia_coli_0111 CACCGAAGCTGCGGCAGCGACTGATGCGTTGTTGGGTAGGGGAGCGTT 1201
AP010958_Escherichia_coli_0103 CACCGAAGCTGCGGCAGCGACTGATGCGTTGTTGGGTAGGGGAGCGTT 1201
AP010953_Escherichia_coli_026_ CACCGAAGCTGCGGCAGCGACTGATGCGTTGTTGGGTAGGGGAGCGTT 1199
NC_004337_Shigella_flexneri_2a CACCGAAGCTGCGGCAGCGACTGATGCGTTGTTGGGTAGGGGAGCGTT 1199
AE014073_Shigella_flexneri_2a CACCGAAGCTGCGGCAGCGACTGATGCGTTGTTGGGTAGGGGAGCGTT 1199
AE014075_Escherichia_coli_GFT0 CACCGAAGCTGCGGCAGCGACTGATGCGTTGTTGGGTAGGGGAGCGTT 1199
CP001368_Escherichia_coli_O157 CACCGAAGCTGCGGCAGCGACTGATGCGTTGTTGGGTAGGGGAGCGTT 1200
CP001164_Escherichia_coli_O157 CACCGAAGCTGCGGCAGCGACTGATGCGTTGTTGGGTAGGGGAGCGTT 1200
NC_002695_Escherichia_coli_O15 CACCGAAGCTGCGGCAGCGACTGATGCGTTGTTGGGTAGGGGAGCGTT 1198
AB035926_Escherichia_coli_O157 CACCGAAGCTGCGGCAGCGACTGATGCGTTGTTGGGTAGGGGAGCGTT 1198
NC_002655_Escherichia_coli_O15 CACCGAAGCTGCGGCAGCGACTGATGCGTTGTTGGGTAGGGGAGCGTT 1198
AE005174_Escherichia_coli_O157 CACCGAAGCTGCGGCAGCGACTGATGCGTTGTTGGGTAGGGGAGCGTT 1198
CP001855_Escherichia_coli_O83_ CACCGAAGCTGCGGCAGCGACTGATGCGTTGTTGGGTAGGGGAGCGTT 1197
AE014613_Salmonella_enterica_9 CACCGAAGCTGCGGCAGCGACTGATGCGTTGTTGGGTAGGGGAGCGTT 1299
NC_005910_Yersinia_pesicis_str. CACCGAAGCTGCGGCAGCGACTGATGCGTTGTTGGGTAGGGGAGCGTT 1198
```

Fig. 1

(57) Abstract : The present invention relates to the development of a peptide nucleic acid (PNA) probe for detecting *Escherichia coli*, O157:H7 serotype, in various types of samples. PNA is a synthetic molecule analogous to the DNA molecule which, owing to its physico-chemical properties, allows for faster and more sensitive analysis than DNA probes. These probes are combined with fluorescence *in situ* hybridisation (FISH), a molecular biology technique that allows microorganisms to be viewed directly in the sample. The combination of these two techniques allowed a faster, simpler and more efficient FISH process to be developed. This test can be applied to a large variety of samples, such as foodstuffs, blood, biopsies, faeces, water and other clinical samples, and samples from the environment, the agricultural and foodstuff industries. The present invention also includes the development of the detection kit and corresponding method for identifying *E. coli* O157:H7 using the above-mentioned types of samples.

(57) Resumo :

(Continua na página seguinte)



WO 2014/178741 A2

DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Publicado:**

— *sem relatório de pesquisa internacional; será republicado após recepção do mesmo (Regra 48.2(g))*

**Declarações sob a Regra 4.17 :**

— *relativa à autoria da invenção (Regra 4.17(iv))*

---

A presente invenção refere-se ao desenvolvimento de uma sonda de ácido péptido nucleico (PNA) para a detecção de *Escherichia coli serotipo* O157: H7 em diferentes tipos de amostras. PNA é uma molécula sintética análoga à molécula de DNA que, devido às suas propriedades físico-químicas, permite uma análise mais rápida e mais sensível do que as sondas de ADN. Estas sondas são combinadas com hibridação in situ fluorescente (FISH), uma técnica de biologia molecular, que permite a visualização direta do microrganismo na amostra. A combinação destas duas tecnologias permitiu o desenvolvimento de um procedimento de FISH mais rápido, mais simples e mais eficiente. Este teste pode ser aplicado a uma grande variedade de amostras, tais como alimentos, sangue, biopsias, fezes, água e outras amostras clínicas, ambientais ou da indústria agrícola e alimentar. A presente invenção também inclui o desenvolvimento do kit de detecção e respetivo processo para a identificação de *E. coli* O157: H7 utilizando os tipos de amostras acima mencionadas.

**DESCRIÇÃO****SONDA DE ÁCIDO PÉPTIDO NUCLEICO, ESTOJO E MÉTODO PARA  
DETECTAR E / OU QUANTIFICAR ESCHERICHIA COLI O157:H7 E  
RESPECTIVAS APLICAÇÕES****Campo da invenção:**

Esta invenção diz respeito a um processo para a deteção de microrganismos relevantes quer na área clínica quer para a segurança alimentar. Para esse efeito, uma sonda de PNA para a deteção de estirpes de *Escherichia coli* O157:H7, foi desenvolvida.

Para além da sonda, a presente invenção inclui o procedimento de PNA FISH e sua aplicação a um kit para a deteção e/ou quantificação de *Escherichia coli* O157: H7, que pode ser usado quer na área clínica quer na área alimentar.

**Antecedentes da invenção:**

A espécie *Escherichia coli* inclui um grupo heterogéneo de bactérias que fazem parte da microflora normal do trato intestinal de seres humanos e animais (Gyles, 2007). Estas bactérias são tipicamente inócuas, mas um número considerável de estirpes são patogénicas. As estirpes patogénicas de *E. coli* são classificadas de acordo com os seus fatores de virulência, a sua patogenicidade e o seu serotipo. Existem seis classes de *E. coli* patogénicas, *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteropatogénica (EPEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* aderente difusa (DAEC) e a *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) (Sheibani, 2007). Entre as *E. coli* patogénicas, as estirpes de EHEC são, talvez, a mais

importantes devido à sua elevada virulência e sua associação com complicações potencialmente fatais (Sheibani, 2007). Dentro do grupo de EHEC, a *E. coli* serotipo O157: H7 (serótipo baseia-se no O [Ohne] antigénio - determinado pelo lipopolissacárido da parede celular - e o H [Haunch] antigénio devido à proteína flagelar) é a mais comumente isolada (Gyles, 2007).

A dose infecciosa de *E. coli* O157: H7 está descrita como sendo muito baixa - cerca de 1-100 CFU / mL - mais baixa do que a maioria dos agentes patogénicos entéricos (Robinson e McKillip, 2010). A virulência deste microrganismo deve-se maioritariamente a três fatores. O primeiro, e o mais importante, é a produção de toxinas do tipo Shiga (Stxs), chamadas Stx1 e Stx2. Estas toxinas estão atualmente entre as citotoxinas mais potentes capazes de afetarem células eucarióticas (Robinson e McKillip, 2010). Embora o tipo de Stx produzida influencie diretamente a gravidade da doença, a produção de Stxs por si só é insuficiente para a *E. coli* O157:H7 se tornar patogénica. O apoio do locus *enterocyte effacement* (uma ilha de patogenicidade que codifica uma bateria de fatores de virulência especializados) e a presença do plasmídeo pO157 (codifica um sistema de secreção de tipo II, uma enterohemolisina, um inibidor de linfócitos e potenciais adesinas, entre outros) são também necessários (Robinson e McKillip, 2010).

Os sintomas da infeção por EHEC são muito diversos, podendo a infeção originar desde casos assintomáticos até casos letais. Os sintomas da doença geralmente desaparecem uma semana depois. Em casos graves os pacientes podem desenvolver o síndrome hemolítico-urémico (HUS), Púrpura Trombocitopenica Trombótica (TTP), ou até mesmo morrer (Robinson e McKillip, 2010). O HUS atinge as células endoteliais renais e pode levar à insuficiência renal aguda (Robinson e McKillip, 2010). O HUS tem taxa de mortalidade significativamente mais elevada e, no caso de sobrevivência, os pacientes geralmente ficam com sequelas renais permanentes. Para além dos sintomas típicos de HUS, a TTP

está associada a sintomas neurológicos como dores de cabeça, convulsões, letargia e encefalopatia (Robinson e McKillip, 2010). Para os surtos de *E. coli* O157:H7 detetados nos EUA, 25% das pessoas afetadas foram hospitalizados, 5-10% desenvolveram SHU ou TTP e 1% morreram (Pennington, 2010).

Em relação aos reservatórios ambientais, geralmente o gado bovino serve de reservatório primário e natural de *E. coli* O157:H7 e estima-se que 10 - 80% de todos os animais são colonizados por esta bactéria (Yoon e Hovde, 2008). Outros animais, como cabras, ovelhas e porcos podem também ser portadores. Resultados de um estudo que inclui 90 surtos confirmados microbiologicamente (ocorridos entre 1982 e 2006), mostram que as fontes de transmissão para os seres humanos foram alimentos em 42,2% dos casos; produtos lácteos em 12,2%; contato com animais em 7,8%; água em 6,7%, ambiente em 2,2% e desconhecidas em 28,9% dos surtos (Pennington, 2010).

Antes dos produtos alimentares serem libertados para o consumidor, estes devem passar por um controlo de qualidade que permite avaliar a existência de contaminações. A importância do controlo de qualidade, leva à necessidade de implementar métodos de deteção rápidos, sensíveis e fiáveis, bem como versáteis, de forma a adaptar-se facilmente às necessidades das diferentes linhas de produção e de processamento de alimentos. Estes métodos podem reduzir substancialmente o tempo, o trabalho e custo global do processo de deteção.

O teste para a fermentação de sorbitol tem sido sugerido como método mais simples de deteção de *E. coli* O157: H7, pois esta bactéria não possui a enzima  $\beta$ -glucuronidase. A maioria dos métodos de cultura existentes foram desenvolvidos com base nesta característica. No entanto outras propriedades desta bactéria, tais como a incapacidade de fermentar rhamanose e tolerância ao telurito, têm sido também exploradas (Raji et al., 2003). Estas técnicas de cultura continuam a ser um aspeto integral de controlo de qualidade durante o processamento de alimentos por

serem relativamente baratos, tecnicamente simples e apresentarem elevada especificidade e sensibilidade. No entanto, estes métodos são também muito demorados, laboriosos e incapazes de detetar estirpes de *E. coli* O157: H7, que fermentam o sorbitol e são suscetíveis ao telurito (Raji et al, 2003.). Falham também na deteção de patógenos em números mais baixos (<200 amostra CFU / g). Adicionalmente, os métodos de cultura, tais como a norma ISO 16654, incluem geralmente um ensaio de aglutinação (deteção de antígeno O157 ou H7) pouco específico, uma vez que os antigénios O157 e H7 estão presentes em outras espécies de *Escherichia coli*. Estes anticorpos também podem reagir de forma cruzada com outros serotipos de *E. coli*, outras *Escherichias* e de outros membros da família *Enterobacteriaceae* (Raji et al., 2003).

FISH é um método molecular amplamente aplicado para a identificação de microrganismos. Este método baseia-se na ligação específica de oligonucleótidos pequenos (sondas) em regiões específicas do RNA ribossomal (rRNA), devido à sua distribuição celular elevada abundância, universal e utilização como um marcador filogenético. A sonda está ligada a um fluorocromo e, após uma etapa de hibridização, a fluorescência pode ser detetada devido ao número elevado de cópias de rRNA dentro da célula. Mais recentemente, as sondas de ácido péptido nucleico (PNA) têm sido aplicadas na deteção microbiana (Cerqueira et al., 2008). Estas moléculas que mimetizam o DNA são capazes de hibridar especificamente com ácidos nucleicos complementares obedecendo às regras de Watson-Crick. A ligação destas moléculas à sequência alvo é mais forte uma vez que o PNA tem uma unidade repetida neutra de N-(2-aminoetil) glicina em vez da carga negativa do grupo açúcar-fosfato. O uso adequado dessa molécula na tecnologia de FISH tornou o procedimento mais robusto, mais rápido e mais eficiente, e permitiu o desenvolvimento de vários métodos de PNA FISH para a deteção de organismo patogénico (Cerqueira et al., 2008).

Neste documento apresenta-se o desenvolvimento de um novo método de PNA FISH para a deteção específica de *E. coli* O157 em alimentos e amostras clínicas. Este é o primeiro método de PNA FISH desenvolvido para detetar um sorotipo específico.

### **Sumário da Invenção**

O presente invento refere-se a uma sonda de ácido péptido nucleico (PNA) e método associado, para detetar o serótipo O157 da espécie *E. coli* (isto é identificar ou quantificar).

A sonda descrita na presente invenção reconhece o 23S rRNA do microrganismo em questão ou as sequências genómicas correspondentes ao rRNA mencionado. As sondas de PNA têm características físico-químicas inerentes à sua estrutura que, quando aplicadas a um método baseado na tecnologia FISH, permitem uma análise mais rápida, robusta e específica do que usando uma sonda de DNA.

Uma das vantagens deste método é o facto de a sonda funcionar de forma robusta numa grande variedade de amostras biológicas, o que geralmente não acontece para os outros métodos moleculares de deteção.

Outro aspeto relevante é o tempo necessário à deteção. O método desenvolvido consegue igualar os melhores tempos descritos para os restantes métodos moleculares, mesmo quando o tipo de amostra exige um passo de enriquecimento anterior à análise. A rapidez, aliada à fiabilidade do método, poderá determinar o tratamento atempado e adequado da contaminação e/ou infeção quer numa perspetiva clínica quer de segurança alimentar.

Outro dos aspetos da presente invenção relaciona-se com o desenvolvimento de um estojo, baseado na aplicação desta sonda à técnica de hibridação fluorescente *in situ* (FISH), que permite a deteção da *E. coli* O157 num variado conjunto de amostras biológicas, de uma forma simples e rápida.

A sonda de PNA, que permite detetar a presença de *E. coli* O157, poderá numa realização preferencial, detetar a sequência alvo no rRNA, no rDNA ou nas sequências complementares do rRNA de *E. coli* O157.

Um das realizações da presente invenção é a descrição de uma sonda de PNA de deteção e/ou quantificação de *E. coli* O157 caracterizada por ter pelo menos 86% de semelhança com à sequência SEG ID No. 1 -5'- CAA CAC ACA GTG TC -3, de preferência 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100% de semelhança com à sequência SEG ID No. 1 -5'- CAA CAC ACA GTG TC -3.

Numa realização ainda mais preferencial, as sequências anteriormente descritas encontra-se ligada a pelo menos um tipo de fração detetável. Sendo que, o tipo de fração detetável a utilizar poderá ser selecionado a partir de um dos seguintes grupos: um conjugado, um sistema de deteção ramificado, um cromóforo, um fluoróforo, radioisótopo, uma enzima, um hapteno ou um composto luminescente, entre outros.

Numa realização ainda mais preferencial o grupo fluoróforo poderá ser pelo menos um dos seguintes: fluoróforos de Alexa series, cianinas, 5-(e -6) Carboxi-2',7'-diclorofluoresceína, o 5-ROX (5-carboxi-X-rodamina, sal trietilamónio), entre outros.

É ainda objeto da presente invenção um estojo de deteção da presença ou ausência e/ou quantificação *E. coli* O157 em amostras biológicas.

Sendo que numa realização mais preferencial o estojo poderá ainda apresentar pelo menos uma das seguintes soluções: uma solução de fixação, uma solução de hibridação e uma solução de lavagem.

Ora numa realização ainda mais preferencial a solução de fixação poderá compreender paraformaldeído e etanol, nomeadamente 2-8%

(peso/vol) de paraformaldeído e 25-90% (vol/vol) de etanol e/ou a solução de hibridação poderá compreender formamida.

É também objeto da presente invenção a descrição de um método de deteção de *E. coli* O157 ou de deteção da *E. coli* O157 em amostras biológicas, que utiliza a sonda de PNA anteriormente mencionada e que compreende os seguintes passos:

- contacto da sonda de PNA com amostras biológicas;
- hibridação da sonda de PNA com a sequência alvo dos microrganismos presentes nas amostras biológicas;
- deteção da hibridação como indicativo da referida deteção e quantificação nas amostras biológicas, a hibridação poderá ser feita de preferência por fluorescência.

Ora, as referidas amostras biológicas podem ser proveniente de sangue, ar, alimentos, água, biopsias ou fezes, entre outras.

É ainda objeto da presente invenção a utilização das sondas de PNA anteriormente descritas, a utilização dos estojos anteriormente descritos e da metodologia para serem aplicadas numa metodologia de deteção de *E. coli* O157, ou de deteção de *E. coli* O157 a em amostras biológicas.

### **Descrição geral da invenção**

A presente invenção engloba a sonda de PNA, reagentes, métodos e estojo destinados à deteção ou quantificação de estirpes de *E. coli* O157.

A sonda aqui descrita permite a deteção específica de *E. coli* O157 através da ligação ao rRNA, sequências genómicas correspondentes ao rRNA (r), ou ainda sequências complementares às mesmas.

A maior especificidade das sondas de PNA (relativamente às sondas de DNA) permite uma melhor discriminação de sequências de nucleótidos relacionadas. Isto tem particular importância para esta sonda uma vez que existem alguns microrganismos filogeneticamente relacionados com *E. coli* O157 que apresentam apenas um nucleótido de diferença (nucleótido na posição 8 da sonda descrita nesta invenção) na região alvo selecciona. São exemplos desta situação outras estirpes de *Escherichia coli* não-O157:H7.

A sonda de PNA descrita nesta invenção tem 14 nucleótidos com a seguinte sequência nucleotídica:

SEQ ID No. 1 - 5'- CAA CAC ACA GTG TC -3'.

No entanto, a sonda a usar na deteção por ser até 86% idêntica à sequência acima mencionada.

Esta sonda é aplicada à análise por hibridação *in situ* fluorescente (FISH), que, no caso de amostras positivas para *E. coli* O157, resulta na emissão de um sinal fluorescente detectável quer através de microscopia de fluorescência quer através de citometria de fluxo.

O desenvolvimento da nova sonda de PNA-FISH foi realizado de forma empírica com recurso a softwares específicos. A seleção da sequência da sonda foi feita inicialmente através do alinhamento de sequências de rDNA do microrganismo alvo, com sequências de microrganismos muito relacionados. Isto permitiu identificar as regiões potencialmente úteis que depois serão avaliadas com base em outros parâmetros como: especificidade, temperatura de hibridação, percentagem de guanina/citosina, energia livre de ligação e estrutura secundária.

Após o desenho e síntese da sonda, as 3 etapas do procedimento de FISH, fixação/permeabilização, hibridação e lavagem, têm que ser desenvolvidos e otimizados para a sonda seleccionada. Este processo geralmente envolve os seguintes parâmetros:

temperatura, concentração de formamida e etanol, e tempo de hibridação e lavagem. De referir que, devido à complexidade do processo e ao grande número de variáveis existentes, nem sempre é possível desenvolver um método para cada sequência e como tal, muitas vezes várias alternativas e sequências são testadas.

Uma hibridação bem sucedida permite depois aferir da presença/ausência e mesmo concentração de um microrganismo, por microscopiã de fluorescência, citometria de fluxo ou PCR em tempo real. O sinal fluorescente detetado é geralmente o resultado da ligação específica das pequenas sondas às dezenas ou centenas de cópias de rRNA existentes no citoplasma da bactéria. Essa fração detetável da sonda, que reporta a existência de um complexo estável formado pela sonda e o alvo, é selecionada a partir de um dos seguintes grupos: um conjugado, um sistema de deteção ramificado, um cromóforo, um fluoróforo, radioisótopo, uma enzima, um hapteno ou um composto luminescente.

O método descrito na presente invenção compreende o contacto de uma amostra com pelo menos uma sonda de PNA com sequência semelhante à anteriormente descrita. Consequentemente, a análise é baseada num único ensaio com um parecer definitivo contrariamente aos métodos convencionais de deteção de *E. coli* 0157 que se baseiam em características fenotípicas e requerem vários dias a fornecer o resultado.

É ainda objeto da presente invenção um estojo adequado à execução do ensaio para detetar, isto é encontrar, identificar ou quantificar, *E. coli* 0157 presente em amostras biológicas. O estojo da invenção inclui a sonda de PNA e outros reagentes ou compostos selecionados para a realização dos ensaios de hibridação *in situ*.

Numa realização ainda mais preferencial, o de um estojo adequado à execução do ensaio para detetar, identificar ou quantificar *E.*

*coli* O157 contém ainda uma solução de fixação, hibridação e lavagem.

Preferivelmente, o método pretende ser um meio de diagnóstico coadjuvante para a decisão terapêutica e controlo de qualidade. A implementação deste método na identificação de *E. coli* O157 permitirá deste modo, adequar o tratamento clínico à bactéria em causa e identificar prematuramente focos de contaminação.

As sondas de PNA podem ser aplicadas diretamente na amostra preparada em lâmina, já que a aplicação destas sondas não envolve o uso de reagentes ou enzimas para a permeabilização das membranas celulares antes da hibridação. No entanto, necessita de alguns dos compostos mais utilizados nas hibridações. Assim, as sondas são normalmente incluídas em estojos que permitam um mais fácil manuseamento por parte dos utilizadores. Se a abordagem pretendida envolver a análise do PNA-FISH por citometria de fluxo, a sonda poderá ser aplicada na amostra em suspensão, utilizando os mesmos compostos para a hibridação.

## **Descrição detalhada da invenção**

### **I - Definições**

a) Como usado neste documento, termo "nucleótido" inclui moléculas naturais e não naturais normalmente conhecidas por quem utiliza tecnologia relacionada com ácidos nucleicos, para desse modo gerar polímeros que se ligam especificamente a ácidos nucleicos.

b) Quando usado o termo "sequência de nucleótidos", é o mesmo que referir um segmento de um polímero que contém subunidades, neste caso os nucleótidos.

c) O termo "sequência alvo" significa uma sequência de nucleótidos de *E. coli* O157 que se pretende que seja detetada no ensaio, onde a porção de nucleótidos da sonda é desenhada para hibridar.

d) O termo "sonda de PNA" significa um polímero de subunidades de PNA que apresenta uma sequência de nucleótidos e é específica para hibridar com uma sequência alvo do microrganismo de interesse. As moléculas de PNA são mímicas das de DNA, na qual a estrutura carregada negativamente de açúcar-fosfato é substituída por uma aquiral e eletricamente neutra formada por unidades repetidas de N -(2-aminoetil) glicina.

e) Quando é usado o termo "fração detetável", este refere-se a moléculas que podem ser ligadas à sonda, para, assim, tornar a sonda detetável por um instrumento ou método.

f) O termo "amostra" refere-se a qualquer amostra biológica que pode conter o microrganismo ou sequência alvo para a deteção. As amostras poderão ser clínicas (por exemplo: sangue, urina, fezes, etc...), alimentares (carne, ovos, formulas infantis, leite, etc...) ou ambientais (por exemplo: água).

## II - Breve Descrição das figuras

A figura 1 apresenta o alinhamento parcial das sequências de rDNA 23S para seleção da sonda. A sequência complementar anti-paralela da sonda EcoPNA1169 é apresentada por cima do alinhamento e sequencias completamente complementares à sonda encontram-se salientadas.

### III - Descrição

#### Concepção da sonda de PNA:

Para identificar oligonucleótidos potencialmente úteis para usar como sonda, foram escolhidas 16S and 23S rDNA sequências disponíveis no sítio do National Centre for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Esta seleção contemplou 6 sequências de *E. coli* O157:H7, 6 *E. coli* não-O157:H7 e estirpes de espécies relacionadas pertencentes à família *Enterobacteriaceae* (Figura 1). As sequências de interesse foram alinhadas usando o programa ClustalW disponível no European Bioinformatics Institute (EBI, [www.ebi.ac.uk/clustalw/](http://www.ebi.ac.uk/clustalw/)). Foi identificada uma região conservada no rRNA 23S de todas as estirpes de *E. coli* O157:H7 (Figura 1). Os critérios para seleção da sequência final da sonda incluíram: a percentagem de Guanina/Citosina; o tipo de estruturas secundárias e a temperatura de hibridação. Após a avaliação destes parâmetros, foi escolhida a seguinte sequência: 5'-CAA CAC ACA GTG TC-3'. Esta sequência híbrida nas posições 1169 a 1183 da estirpe TW14359 *E. coli* O157:H7 (número de acesso: CP\_001368). A sonda foi chamada de EcoPNA1169 devido à posição inicial da sequência. Posteriormente, a sequência selecionada foi sintetizada e os oligonucleótidos acoplados, no terminal amina, ao fluorocromo Alexa Fluor 594.

#### Avaliação teórica do desempenho da sonda de PNA:

Após a concepção da sonda, o seu desempenho foi avaliado através da determinação dos valores teóricos da sensibilidade e da especificidade. Estes parâmetros foram avaliados com recursos ao programa acima mencionado, ProbeCheck disponíveis na base de dados SILVA de rRNA. Para esta estimativa teórica apenas sequências de boa qualidade com pelo menos 1900 pb foram consideradas, assim como estirpes de *E. coli* com serótipo atribuído. A sonda foi alinhado com um total de 180.344

sequências presentes na base de dados para a subunidade grande do RNA (23S/28S; LSU). Também foi testado contra a base de dados para a subunidade pequena (16S/18S, SSU) para avaliar a existência de uma possível hibridação com as sequências de 16S rRNA. A especificidade foi calculada como nECs/TnECs x 100, onde nECs representa o número de estirpes não-*E. coli* O157:H7 que não reagiu com a sonda e TnECs o número total de estirpes não-*E. coli* O157:H7 examinadas. A sensibilidade foi calculada como ECs/TECs x 100, onde o ECs é o número de estirpes de *E. coli* O157:H7 detectados pela sonda e TECs é o número total de estirpes de *E. coli* O157:H7 existentes na base de dados.

Através do programa probeCheck, foi possível verificar que a sonda EcoPNA1169 detecta todas as 80 sequências de *E. coli* O157:H7, mas também 11 outras sequências, num total de 91 sequências detetadas (último acesso, Julho de 2012). Assim, os valores teóricos de especificidade de sensibilidade foram de 88 e 100%, respetivamente. As 11 estirpes não *E. coli* O157:H7 detetadas pela sonda EcoPNA1169, incluíram 3 *E. coli* não-O157, 7 *Salmonella* spp. e 1 estirpe de *Cronobacter*.

A sonda de PNA desta invenção contém preferencialmente 14 nucleótidos e poderá ser pelo menos 86% idêntica à sequência SEQ ID No. 1 - 5'- CAA CAC ACA GTG TC -3', de preferência 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100% de semelhança com à sequência SEQ ID No. 1 -5'- CAA CAC ACA GTG TC -3.

Alternativamente, esta invenção contempla também variações nas sequências nucleotídicas das sondas. Tais variações podem incluir deleções, inserções entre outras. Como por exemplo uma das seguintes sequências:

- SEQ ID No. 2 - 5'- AAC AAC ACA CAG TG -3';
- SEQ ID No. 3 - 5'- AAC ACA CAG TGT CG -3';
- SEQ ID No. 4 - 5'- AAC AAC ACA CAG TGT C -3';
- SEQ ID No. 5 - 5'- CAA CAC ATA GTG TC -3'.

**Fração detetável da sonda de PNA:**

Não limitado aos seguintes exemplos, a fração detetável da sonda de PNA pode incluir diferentes tipos de moléculas, como conjugados de dextrano, cromóforos, fluoróforos, radioisótopos, enzimas, hapteno, composto quimioluminescente entre outros.

Como exemplo, entre a classe dos fluoróforos são preferíveis para utilização (mas não limitados a): fluoróforos de Alexa series, Alexa Fluor series, cianinas, 5-(e -6) Carboxi-2',7'-diclorofluoresceína, o 5-ROX (5-carboxi-X-rodamina, sal trietilamónio).

**Método:**

A presente invenção apresenta um método para a determinação da presença de *E. coli* O157 usando uma sequência de nucleótidos com pelo menos 86% de homologia com a região de 14 nucleótidos aqui descrita - SEQ ID No. 1.

O método pode contemplar o contacto de uma amostra com a sonda de PNA descrita neste documento com a sequência alvo da bactéria sob condições de hibridação adequadas ou condições de hibridação *in situ* adequadas (como apresentado no EXEMPLO 1).

O método pode ser dividido em: preparação das amostras (que contempla o passo enriquecimento, quando necessário), fixação, hibridação, lavagem e visualização dos resultados (ver EXEMPLO 1).

O método pode ser realizado em células aderidas ou em suspensão.

**Optimização do protocolo:**

O procedimento de PNA FISH envolve 4 etapas: fixação e permeabilização da amostra; hibridação da sonda; lavagem da sonda não-ligada e observação ao microscópio de fluorescência.

Os seguintes passos é uma otimização possível das condições de otimização, sem ter a intenção de ser limitativo:

Existem vários fatores que influenciam a hibridação da sonda de PNA e a sequência alvo. Estes incluem a percentagem de formamida (ou outro reagente químico desnaturante), a concentração salina e conseqüentemente a força iónica, a percentagem de etanol, a temperatura de hibridação e lavagem, a concentração de detergente, o pH entre outros.

Para identificar as condições óptimas de hibridação, pode ser necessário fixar os diferentes fatores e variar cada fator isoladamente até se encontrar um grau de discriminação desejado.

Quanto mais próxima se encontra uma sequência alvo de outra não-alvo na amostra, maior terá que ser o grau de rigor na definição dos diferentes fatores que influenciam a hibridação. Nesta invenção sequências não-alvo (isto é, sequências não- *E. coli* O157:H7), podem ter apenas um nucleótido de diferença em relação às sequências alvo, sendo necessário um elevado nível de discriminação de forma a evitar hibridações não específicas.

Para melhor compreender o comportamento da sonda EcoPNA1169 e assim determinar as melhores condições de hibridação, as temperaturas de hibridação e lavagem foram variadas entre 53 e 61°C; a concentração de etanol foi variada entre 50 e 80% e diferentes tempos de hibridação foram também testados (30, 45, 60 e 90 minutos).

Após a otimização de todos os parâmetros referidos anteriormente, a sondas descrita neste documento apresentou os melhores resultados nas seguintes condições:

Foram preparados esfregaços de cada cultura bacteriana (cerca de 20 µL) em lâminas adequadas à visualização em microscópio de fluorescência. Os esfregaços foram imersos em 4% (peso/vol) paraformaldeído (Sigma) durante 10 minutos, seguido por 50% (vol/vol) etanol, também durante 10 minutos. Depois de secas ao ar,

as amostras foram então cobertas com 20 µl de solução de hibridação contendo: 10% (peso/vol) de sulfato dextran (Sigma); 10 mM de NaCl (Sigma); 30% (vol/vol) de formamida (Sigma); 0,1% (peso/vol) pirofosfato de sódio (Sigma); 0,2% (peso/vol) polivinilpirrolidona (Sigma); 0,2% (peso/vol) Ficol (Sigma), 5 mM de EDTA dissódico (Sigma); 0,1% (vol/vol) Triton X-100 (Sigma); 50 mM Tris-HCl (pH 7,5; Sigma) e 200nM de sonda PNA. As amostras foram cobertas com lamelas, colocados em pequenas caixas húmida protegidas da luz e incubadas por 45 minutos a 59°C. Posteriormente, as lamelas foram retiradas e as lâminas foram submersas numa solução de lavagem previamente aquecida (59°C) durante 30 minutos, contendo 5 mM Tris Base (Sigma), 15 mM de NaCl (Sigma) e 1% (vol/vol) de Triton X (pH 10; Sigma). Posteriormente, as lâminas foram removidas da solução de lavagem e secas a 59°C na mesma incubadora durante aproximadamente 5 minutos. Antes da visualização ao microscópio, foi colocada uma gota de óleo de imersão não-fluorescente (Merck) e lamela. As lâminas foram armazenadas no escuro por um período máximo de 24 horas antes da microscopia.

#### **Avaliação da especificidade e sensibilidade experimentais da sonda:**

Para testar a especificidade e sensibilidade experimentais da sonda de PNA, o protocolo acima descrito foi aplicado a 53 estirpes. Foram incluídas 18 estirpes *E. coli* O157:H7 e 25 estirpes não-*E. coli* O157:H7. As duas estirpes de *E. coli* O157 (CCC-18-12 e CCC-26-12) com "H" antígeno não caracterizado, foram excluídas dos cálculos. Adicionalmente, foram incluídas 8 estirpes pertencentes ao mesmo género e família (*Escherichia*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Shigella* and *Klebsiella*). Os resultados mostram que a hibridação ocorre apenas com estirpes de *E. coli* O157:H7 e, portanto, os valores de especificidade e sensibilidade obtidos foram ambos de 100%.

**Tabela 1** - Resultados do teste de especificidade de sensibilidade da sonda EcoPNA1169.

Strain	Serotype	Isolation origin	Verotoxin production	PNA outcome	FISH
<i>E. coli</i> CECT 4267	O157:H7	Human stool from outbreak of hemorrhagic colitis	stx1, stx2		+
<i>E. coli</i> CECT 4782	O157:H7	Human stool from outbreak of hemorrhagic colitis	stx1, stx2		+
<i>E. coli</i> CECT 4783	O157:H7	Raw hamburger meat implicated in hemorrhagic colitis outbreak	stx1, stx2		+
<i>E. coli</i> CECT 5947	O157:H7	-	Gene stx2 has been replaced		+
<i>E. coli</i> NCTC 12900	O157:H7	-	NT		+
<i>E. coli</i> CCC-1-12*	O157:H7	Faecal swab	stx2		+
<i>E. coli</i> CCC-5-12*	O157:H7	Faecal swab	stx2		+
<i>E. coli</i> CCC-7-12*	O157:H7	Faecal swab	stx2		+
<i>E. coli</i> CCC-10-12*	O157:H7	Faecal swab	stx2		+
<i>E. coli</i> CCC-11-12*	O157:H7	Milk filter	stx2		+
<i>E. coli</i> CCC-12-12*	O157:H7	Milk filter	stx2		+
<i>E. coli</i> CCC-13-12*	O157:H7	Milk filter	stx2		+
<i>E. coli</i> CCC-14-12*	O157:H7	Bovine milk filter	stx2		+
<i>E. coli</i> CCC-15-12*	O157:H7	Bovine milk filter	stx2		+
<i>E. coli</i> CCC-16-12*	O157:H7	Caprine milk filter	stx2		+
<i>E. coli</i> CCC-18-12*	O157	Bovine milk filter	stx2		+
<i>E. coli</i> CCC-23-12*	O157:H7	Milk filter	NT		+
<i>E. coli</i> CCC-24-12*	O157:H7	Milk filter	NT		+
<i>E. coli</i>	O157:H7	Milk filter	NT		+

CCC-25-12*				
<i>E. coli</i>	O157	Milk filter	NT	+
CCC-26-12*				
<i>E. coli</i>	O127a:K63(B8):H-	-	EPEC	-
CECT 352				
<i>E. coli</i>	O141:K85(B):H4	Swine	ND	-
CECT 504				
<i>E. coli</i>	O1:K1(L1):H7	Human urine	ND	-
CECT 515T				
<i>E. coli</i>	O103:K-:H-	-	ND	-
CECT 533				
<i>E. coli</i>	O111:K58(B4):H-	Infantile	EPEC	-
CECT 727				
<i>E. coli</i>	O55:K59(B5):H-	-	ND	-
CECT 730				
<i>E. coli</i>	O28a,28c:K73(B18	Faeces	ND	-
CECT 736 ) :H-				
<i>E. coli</i>	O125a,125b:K70(B	Gastroenter	ND	-
CECT 740 15):H19				
<i>E. coli</i>	O158:K-:h23	Faeces of	ND	-
CECT 744				
<i>E. coli</i>	O111:K58(B4):H-	Infantile	ND	-
CECT 832				
<i>E. coli</i>	O10:K5(L5):H4	Human	ND	-
CECT 4537				
<i>E. coli</i>	O97:K-:H-	-	ND	-
CECT 4555				
<i>E. coli</i>	O103	Faecal swab	NT	-
CCC-2-12*				
<i>E. coli</i>	O26	Faecal swab	stx1, stx2	-
CCC-3-12*				
<i>E. coli</i>	O26	Faecal swab	NT	-
CCC-4-12*				
<i>E. coli</i>	O26	Faecal swab	NT	-
CCC-8-12*				
<i>E. coli</i>	O26	Faecal swab	NT	-
CCC-9-12*				
<i>E. coli</i>	O26	Caprine	stx1	-
CCC-19-12*				
<i>E. coli</i>	O26	Caprine	stx1	-
CCC-20-12*				
<i>E. coli</i>	O26	Bovine milk	stx1	-
CCC-21-12*				
<i>E. coli</i>	O26	Bovine milk	stx1	-
CCC-22-12*				
<i>Escherichia</i>	O6	Clinical	ND	-
<i>acoli</i> CECT				
434				
<i>Escherichia</i>	ND	Porcine	ND	-
<i>a coli</i> N9*				
<i>Escherichia</i>	ND	Bovine	ND	-
<i>a coli</i> N5*				
<i>Escherichia</i>	OR:H48:K-	-	ND	-
<i>acoli</i> ATCC				

<i>a hermanii</i> ATCC 33650		isolate		
<i>Escherichi a vulneris</i> ATCC 29943	NR	Human wound	-	-
<i>Shigella boydii</i> ATCC 9207	NR		ND	-
<i>Salmonella enterica</i> oroovar Typhimuriu m NCTC 12416	NR		-	-
<i>Salmonella enterica</i> oroovar Typhi 3036	NR		-	-
<i>Salmonella entritidis</i> SGSC 2476	NR		-	-
<i>Enterobacter sakasaki</i> CECT 858	NR	Child's throat	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 11296	NR		-	-

NT - non-toxigeninc *E. coli*; EPEC - enteropathogenic *E. coli* (epidemiologically implicated as pathogens, but virulence mechanism is not related to the excretion of enterotoxins); ND - Not determined; NR - non-relevant information for the present study; \* - Isolates; SGSC - Salmonella Genetic Stock Centre; ATCC - American Type Culture Collection; NCTC - National Collection of Type Cultures; CECT - Spanish Type Culture Collection.

**Enriquecimento:**

As amostras a analisar podem ser provenientes de alimentos, biopsias, sangue, água, fezes entre outros.

As amostras contendo *E. coli* O157:H7 apresentam geralmente baixos níveis de contaminação. Por este motivo é recomendado um

passo de enriquecimento da amostra que facilita o processo de detecção. Este passo de enriquecimento pode ser feito em vários tipos de meio de cultura, desde meios ricos complexos (tais como a água tamponada peptonada e o trypticase soy broth) até meios selectivos tais como: GN (Gram Negative) broth, R & F® Enrichment Broth (R&F=EB) ou *E. coli* (EC) broth (Vimont et al., 2006).

Trypticase Soy Broth (TSB) é o meio de enriquecimento mais frequentemente utilizado. Antibióticos tais como a novobiocina (o mais comum), cefixima, cefsulodina ou a vancomicina, e outros compostos selectivos (ex. sais biliares - inibir as estirpes não-Enterobacteriaceae); são frequentemente adicionados a este meio para promover um enriquecimento selectivo. Estes meios são, em seguida, incubados durante um período que varia geralmente entre 16 e 24 horas (*overnight growth*) a 35 até 42 ° C. No entanto, os dados relativos à eficácia dos protocolos de enriquecimento são muito poucos e diferem de estudo para estudo.

A temperatura de incubação, não parece estar relacionada com o tipo de serotipo procurado (Vimont et al, 2006.), mas alguns autores demonstraram que as estirpes de O157:H7 apresentam geralmente uma temperatura óptima média de cerca de 40 ° C. Na verdade, a ISO recomendada para a detecção de O157 em amostras alimentares (ISO 16654:2001 - Microbiology de alimentos para consumo humano e animal - Método horizontal para a detecção de *Escherichia coli* O157) inclui um pré-enriquecimento no meio mTSB a 41,5 ° C.

Para avaliar a influência do meio de enriquecimento e da temperatura de incubação no limite de detecção do método de PNA FISH, foram usados dois meios diferentes a 37 e 41,5 ° C. Foi selecionados o meio seletivo mTSB com novobiocina (MTSB + N), que é atualmente recomendado pela International Organization for Standardization (ISO 16654:2001) e o BPW (*buffered peptonated water*), um meio não seletivo amplamente utilizados nos

protocolos de enriquecimento de vários agentes patogénicos, que também tem sido aplicada na deteção de *E. coli* O157:H7.

O método de PNA FISH descrito neste documento foi testado em dois tipos diferentes de amostras de alimentos: carne moída, leite não pasteurizado (duas matrizes comumente associado a infeções por *E. coli* O157:H7) artificialmente contaminados com concentrações de que variam de 0,01 a 100 CFU / g ou 25 ml de amostra de alimento. Duas estirpes de *E. coli* O157:H7 foram utilizados (CCC-5-12 e CECT 4267) para inoculação e as amostras foram analisadas simultaneamente pela ISO 16654:2001. Como se observa no quadro 2, o mTSB permitiu obter o melhor limite de deteção, enquanto o uso de temperaturas mais elevadas (41,5 ° C) não pareceu melhorar a taxa de deteção da *E. coli* O157. O bom desempenho do mTSB pode estar relacionado com a natureza seletiva deste meio, que inclui novobiocina e sais biliares que inibem parcialmente o crescimento da microflora existente nos alimentos. No entanto, após a determinação da taxa de crescimento de ambas as estirpes de *E. coli* em BPW e mTSB, foi possível observar que a composição do meio (e não os fatores seletivos) é o factor determinante para o crescimento desta bactéria. Foram observadas taxas de crescimento de ~ 0,5 h<sup>-1</sup> (a 41,5 ° C) e de 0,4 h<sup>-1</sup> para as estirpes cultivadas em mTSB, enquanto que as cultivadas em BPW apresentaram valores de 0,07 h<sup>-1</sup> para ambas as temperaturas. Para melhor quantificar o desempenho de cada um dos métodos de enriquecimento, os valores de sensibilidade e de especificidade para ambos os meios, mTSB e BPW a 37 ° C, foram determinadas com base nos resultados presentes na Tabela 3. Os valores de especificidade obtidos foram ambos de 100% (intervalo de confiança [IC] de 95%, 69,87 - 100), enquanto os valores sensíveis foram de 94,44% (IC 95%, 70,63 - 99,71) para mTSB e 55, 55% (IC 95%, 31,35 - 77,59) para BPW. Embora o melhor desempenho se tenha verificado para mTSB + N, deverá ser possível padronizar a etapa de enriquecimento de forma a permitir a deteção simultânea de diferentes patogénicos alimentares.

Outra característica importante a ter em conta ao otimizar protocolos de FISH é que alguns componentes alimentares podem apresentar um forte sinal de autofluorescência, e assim interferir com a deteção da bactéria. Para eliminar/reduzir este fenómeno, podem ser adicionado uma etapa adicional antes do processo de hibridação. Foram testadas duas abordagens diferentes: um paço de centrifugação (para remover partículas de alimentos) e o uso de um detergente (Triton X-100, 1%) para emulsionar os compostos lipídicos. Ambos os paços diminuíram o sinal de autofluorescência, mas o detergente apresentou uma redução mais significativa e também pareceu melhorar o sinal de fluorescência. Isto pode acontecer porque o detergente poderá também ajudar na permeabilização celular.

Em relação ao tempo de deteção do ensaio, a implementação do método de FISH PNA pode poupar pelo menos 2 dias na deteção de *E. coli* O157: H7 relativamente ao protocolo tradicional.

Em conclusão, observou-se que o método de PNA FISH aqui descrito apresenta um limite de deteção de 1 CFU por 25 g de alimento, depois de uma etapa de enriquecimento *overnight* em mTSB. A comparação com o método de cultura tradicional evidenciou um valor de especificidade de 100% e sensibilidade de 94%. Finalmente observou-se também que o uso de compostos seletivos e temperatura mais elevada representa apenas uma melhoria limitada no limite de deteção do método.

**Tabela 2** - Resultados de PNA FISH obtidos na deteção de *E. coli* O157:H7 em diferentes matrizes alimentares inoculadas com concentrações bacterianas entre 0,01 e 100 CFU por 25g ou ml de alimento. Os resultados apresentados incluem 3 ensaios independentes.

Concentration CFU/25g or ml)	Ground beef				Unpasteurized milk	
	37°C		41,5°C		37°C	41,5°C
	mTSB+N	BPW	mTBS+N	BPW	mTBS+N	mTBS+N
100	+	+	+	+	+	+
	(6/6) <sup>a</sup>	(6/6) <sup>a</sup>	(6/6) <sup>a</sup>	(6/6) <sup>a</sup>	(6/6) <sup>a</sup>	(6/6) <sup>a</sup>
10	+	+	+	+	+	+
	(6/6) <sup>a</sup>	(4/6) <sup>a</sup>	(6/6) <sup>a</sup>	(2/6) <sup>a</sup>	(6/6) <sup>a</sup>	(6/6) <sup>a</sup>
1	+	-	+	-	+	+
	(5/6) <sup>a</sup>	(0/6) <sup>a</sup>	(5/6) <sup>a</sup>	(0/6) <sup>a</sup>	(6/6) <sup>a</sup>	(6/6) <sup>a</sup>
0.1	-	-	-	-	-	-
	(6/6) <sup>b</sup>	(6/6) <sup>b</sup>	(6/6) <sup>b</sup>	(6/6) <sup>b</sup>	(6/6) <sup>b</sup>	(6/6) <sup>b</sup>
0.01	-	-	-	-	-	-
	(6/6) <sup>b</sup>	(6/6) <sup>b</sup>	(6/6) <sup>b</sup>	(6/6) <sup>b</sup>	(6/6) <sup>b</sup>	(6/6) <sup>b</sup>

a - Samples that tested positive by PNA FISH/Total positive samples determined by culture method; b - samples that tested negative by PNA FISH/Total negative samples determined by culture.

**Tabela 3** - Comparação entre os resultados de cultura (ISO 16654:2001, considerada o gold standard) e os resultados de PNA FISH relativamente à detecção de *E. coli* O157:H7 em 30 amostras de carne picada após uma pré-enriquecimento em mTSB e BPW a 37°C.

			ISO 16654:2001 result		
			Present	Abse nt	Total
PNA FISH outcome	mTSB	Test positive	17	0	17
		Test negative	1	12	13
		Total	18	12	30
	BPW	Test positive	10	0	10
		Test negative	8	12	20
		Total	18	12	30

#### Visualização dos resultados:

Esta etapa pode ser realizada em qualquer microscópio de epifluorescência com um filtro sensível ao fluoróforo em questão. Outros filtros presentes no microscópio, que não são

capazes de detetar o sinal fluorescente da sonda, foram utilizados a fim de confirmar a inexistência de autofluorescência.

**Estojo:**

A presente invenção contempla ainda um estojo que permite a realização do ensaio que determina a presença de *E. coli* O157:H7.

O estojo nesta invenção compreende uma sonda PNA semelhante pelo menos 86% à sequência SEQ ID No 1 e outros reagentes ou composições que são selecionados para a realização do ensaio.

As sondas de PNA, as suas características, os métodos e estojo desta invenção são apropriados à análise de ácidos nucleicos presentes, ou não, internamente no organismo de interesse. Assim, esta invenção pode ser usada para ambas, análise do organismo ou análise dos ácidos nucleicos extraídos ou derivados do organismo de interesse, fazendo com que a fonte da sequência alvo não seja uma limitação nesta invenção.

Os seguintes exemplos ilustram diferentes situações e diversos passos de aplicação da invenção, são realizações preferências da presente invenção, sem ter a intenção de ser limitativo em qualquer um dos deles:

**EXEMPLO 1: Detecção de *E. coli* serotipo O157:H7 em diferentes tipos de amostras (clínicas, alimentares ou ambientais)**

**Sequência:**

SEQ ID No. 1 - 5'- CAA CAC ACA GTG TC -3 (acoplada ao Alexa Fluor 594)

**Preparação das amostras:**

As amostras clínicas, alimentares ou ambientais, foram submetidas a um passo de enriquecimento antes da aplicação da sonda de PNA. Isto deve-se ao facto de a *E. coli* O157:H7 apresentar geralmente baixos níveis de contaminação. Este passo de enriquecimento pode ser feito no meio recomendado pelo método convencional de análise para cada amostra. No caso de alimentos, rações animais e fezes, foi utilizada o mTSB. As amostras foram depois incubadas por um período de 18 a 22h a 37°C, a 120 rpm. Após o enriquecimento, 15 µl da cultura foram misturados com 15 de Triton X-100 (1%) diretamente numa lâmina adequada para fluorescência. A lâmina foi colocada cerca de 5 minutos na estufa a 59°C ou deixada ao ar para secar.

**Fixação:**

Com o objectivo de prevenir a perda de 23S rRNA durante o processo de hibridação, a amostra foi imersa numa solução de 4% (peso/vol) de paraformaldeído e de 50% (vol/vol) etanol durante dez minutos cada.

**Hibridação:**

Após a fixação, as amostras foram então cobertas com uma gota de solução de hibridização contendo: 10% (peso/vol) de sulfato dextran (Sigma); 10mM de NaCl (Sigma); 30% (vol/vol) de formamida (Sigma); 0,1% (peso/vol) pirofosfato de sódio (Sigma); 0,2% (peso/vol) polivinilpirrolidona (Sigma); 0,2% (peso/vol) Ficoll (Sigma), 5 mM de EDTA dissódico (Sigma); 0,1% (vol/vol) Triton X-100 (Sigma); 50 mM Tris-HCl (pH 7,5; Sigma) e 200nM de sonda PNA. As amostras foram cobertas com lamelas (para garantir o espalhamento uniforme da sonda), colocados em pequenas caixas húmida (para impedir a evaporação da solução de hibridação) protegidas da luz e incubadas por 45 minutos a 59°C.

**Lavagem:**

Após o tempo de hibridação as lamelas foram removidas e as lâminas imersas numa solução de lavagem pré-aquecida a 59°C contendo 5mM de Tris Base, 15mM de NaCl e 1% (vol/vol) de Triton X (pH 10). As amostras foram então colocadas na estufa à temperatura de hibridação durante 30 minutos. Posteriormente, as lâminas foram removidas da solução de lavagem e secas a 57°C, na mesma incubadora, durante aproximadamente 5 minutos. Antes da visualização ao microscópio, foi colocada uma gota de óleo de imersão não-fluorescente (Merck) e lamela. As lâminas foram armazenadas no escuro por um período máximo de 24 horas antes da microscopia.

**Resultados:**

Os resultados são obtidos através de observação ao microscópio de fluorescência com filtro adequado à detecção do fluorocromo Alexa Fluor 594 ligado à sonda de PNA.

**EXEMPLO 2: Detecção de *Salmonella* e *E. coli* O157:H7 em fezes.**

Este exemplo pretende ilustrar a possibilidade de utilizar a sonda de *E. coli* O157:H7 em conjunto com a sonda de *Salmonella* spp. previamente desenvolvida no trabalho de Almeida et al., 2010. Estas duas bactérias são causas comuns de gastroenterites e, como tal, a sua rápida detecção de fezes é de extrema importância. O uso de uma abordagem "multiplex" (utilização simultânea de várias sondas) pode simplificar o procedimento e acelerar a detecção. Estas duas sondas têm temperaturas de hibridação muito próximas e podem portanto ser usadas facilmente num ensaio "multiplex".

**Sequências:**

SEQ ID No. 1 - 5'- CAA CAC ACA GTG TC -3 (acoplada ao Alexa Fluor 594)

Sequencia do artigo de Almeida et al., 2010: 5'- AGG AGC TTC GCT TGC -3' (acoplada ao Alexa Fluor 488)

**Preparação das amostras:**

25g de fezes foram misturadas com 225 ml de mTSB. Podem ser usadas diferentes quantidades de amostra, mas mantendo a razão de 1/10 (peso/vol). Seguidamente, as amostras foram incubadas *overnight* (18 a 22h) a 37°C e 120 rpm. Após o enriquecimento, 15 µl de amostra foram colocadas numa lâmina adequada e misturas com 15 µl de 1% Triton X-100 para minimizar a intrefrência de partículas autofluorescentes. Finalmente a amostra foi secar ao ar ou na estufa a 59°C durante cerca de 5 minutos.

**Hibridação:**

A hibridação foi realizada como descrito anteriormente no Exemplo 1 com uma pequena diferença. A solução de hibridação continha duas sondas: sonda de PNA para detectar *Salmonella* e sonda de PNA para detectar *E. coli* O157:H7, cada uma na concentração de 200nM.

**Lavagem:**

A lavagem foi realizada de acordo com o procedimento descrito no Exemplo 1.

**Resultados:**

Os resultados foram obtidos através da observação ao microscópio de fluorescência com filtro adequados à detecção do fluorocromos Alexa Fluor 594 e 488 ligados às sondas de PNA.

Lisboa, 28 de Abril de 2014.

**Referências:**

Gyles CL: Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. *J Anim Sci* 2007, 85(13 Suppl):E45-62.

Pennington H: *Escherichia coli* O157. *Lancet* 2010, 376(9750):1428-1435.

Robinson AL, McKillip J: Biology of *Escherichia coli* O157:H7 in human health and food safety with emphasis on sublethal injury and detection. In: *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*. Edited by Mendez-Vilas A: Formatex; 2010: 1096-1105.

Raji MA, Jiwa SF, Minga MU, Gwakisa PS: *Escherichia coli* O157:H7 reservoir, transmission, diagnosis and the African situation: a review. *East Afr Med J* 2003, 80(5):271-276.

Cerqueira L, Azevedo NF, Almeida C, Jardim T, Keevil CW, Vieira MJ: DNA mimics for the rapid identification of microorganisms by fluorescence in situ hybridization (FISH). *Int J Mol Sci* 2008, 9(10):1944-1960.

Almeida C, Azevedo NF, Fernandes RM, Keevil CW, Vieira MJ: Fluorescence in situ hybridization method using a peptide nucleic acid probe for identification of *Salmonella* spp. in a broad spectrum of samples. *Appl Environ Microbiol* 2010, 76(13):4476-4485.

Vimont A, Vernozy-Rozand C, Delignette-Muller ML: Isolation of *E. coli* O157:H7 and non-O157 STEC in different matrices: review of the most commonly used enrichment protocols. *Lett Appl Microbiol* 2006, 42(2):102-108.

**REIVINDICAÇÕES**

1. Sonda de PNA para a detecção e/ou quantificação de *E. coli* serotipo 0157:H7 **caracterizada por** compreender pelo menos uma sequência com 86% de semelhança com a sequência SEQ ID No. 1.
2. Sonda de PNA, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada por** compreender pelo menos uma sequência SEQ ID No. 1 e contemplando variações nas sequências nucleóticas das sondas como por exemplo nas seguintes sequências SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 5.
3. Sonda de PNA, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada por** detetar a sequência alvo no rRNA, no rDNA ou nas sequências complementares do rRNA de *E. coli* 0157:H7.
4. Sonda de PNA de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada por** conter ainda uma sequência com 14 nucleótidos e ter 86% de semelhança com a sequência SEQ ID No 5.
5. Sonda de PNA, de acordo com as reivindicações 1 - 4, **caracterizada por** se encontrar ligada a pelo menos um tipo de fração detetável.
6. Sonda de PNA, de acordo com a reivindicação 5, **caracterizada por** o tipo de fração detetável da sonda ser selecionado a partir de um dos seguintes grupos: um conjugado, um sistema de detecção ramificado, um cromóforo, um fluoróforo, radioisótopo, uma enzima, um hapteno ou um composto luminescente.

7. Sonda de PNA, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizada por** o grupo flurofo ser pelo menos um dos seguintes: fluoróforos de Alexa series, Alexa Fluor series, cianinas, 5-(e -6) Carboxi-2',7'-diclorofluoresceína, o 5-ROX (5-carboxi-X-rodamina, sal trietilamónio).

8. Estojo para a deteção de *E. coli* O157:H7 **caracterizado por** compreender pelo menos uma das sondas descritas em qualquer uma das reivindicações de 1 a 7.

9. Estojo de acordo com a reivindicação 8, **caracterizado por** compreender ainda pelo menos uma das seguintes soluções: uma solução de fixação, uma solução de hibridação e uma solução de lavagem.

10. Estojo de acordo com a reivindicação 8, **caracterizado por** a solução de fixação compreender paraformaldeído e etanol, nomeadamente 2-8% (peso/vol) de paraformaldeído e 25-90% (vol/vol) de etanol.

11. Estojo de acordo com a reivindicação 8, **caracterizado por** a solução de hibridação compreender formamida.

12. Método de deteção de *E. coli* O157:H7 **caracterizado por** utilizar as sondas de PNA descritas na reivindicação 1 a 7 e por compreender os seguintes passos:

a. contacto da sonda de PNA com nas referidas amostras;

- b. hibridação da sonda de PNA com a sequência alvo dos microrganismos presentes nas referidas amostras;
- c. deteção da hibridação como indicativo da referida deteção e quantificação nas referidas amostras.
13. Método de acordo com a reivindicação 12, **caracterizado por** a referida amostra biológica ser proveniente de alimentos, sangue, ar, água, biopsias ou biopsias.
14. Método de acordo com a reivindicação 12, **caracterizado por** a hibridação ser por fluorescência.
15. Utilização das sondas de PNA como descritas em qualquer uma das reivindicações de 1 a 7, **caracterizada por** ser aplicada numa metodologia de deteção de *E. coli* O157:H7 em amostras biológicas.
16. Utilização do estojo descrito em qualquer uma das reivindicações de 8 a 11, **caracterizado por** ser aplicado na deteção de *E. coli* O157:H7 em amostras biológicas.

Lisboa, 28 de Abril de 2014.

```

3' - CTGTGA-CACACAAC - 5' EcoPNA1169
AP010960_Escherichia_coli_O111 CACCGAAGCTGCCGCAGCGACGCTGATGCGTTGTTGGGTAGGGGAGCGTT 1201
AP010958_Escherichia_coli_O103 CACCGAAGCTGCCGCAGCGACGCTGATGCGTTGTTGGGTAGGGGAGCGTT 1201
AP010953_Escherichia_coli_O26_ CACCGAAGCTGCCGCAGCGACGCTGATGCGTTGTTGGGTAGGGGAGCGTT 1199
NC_004337_Shigella_flexneri_2a CACCGAAGCTGCCGCAGCGACGCTTATGCGTTGTTGGGTAGGGGAGCGTT 1199
AE014073_Shigella_flexneri_2a_ CACCGAAGCTGCCGCAGCGACGCTTATGCGTTGTTGGGTAGGGGAGCGTT 1199
AE014075_Escherichia_coli_CFT0 CACCGAAGCTGCCGCAGCGACGCTTATGCGTTGTTGGGTAGGGGAGCGTT 1199
CP001368_Escherichia_coli_O157 CACCGAAGCTGCCGCAGCGACACT-GTGTGTTGTTGGGTAGGGGAGCGTT 1200
CP001164_Escherichia_coli_O157 CACCGAAGCTGCCGCAGCGACACT-GTGTGTTGTTGGGTAGGGGAGCGTT 1200
NC_002695_Escherichia_coli_O15 CACCGAAGCTGCCGCAGCGACACT-GTGTGTTGTTGGGTAGGGGAGCGTT 1198
AB035926_Escherichia_coli_O157 CACCGAAGCTGCCGCAGCGACACT-GTGTGTTGTTGGGTAGGGGAGCGTT 1198
NC_002655_Escherichia_coli_O15 CACCGAAGCTGCCGCAGCGACACT-GTGTGTTGTTGGGTAGGGGAGCGTT 1198
AE005174_Escherichia_coli_O157 CACCGAAGCTGCCGCAGCGACACT-GTGTGTTGTTGGGTAGGGGAGCGTT 1198
CP001855_Escherichia_coli_O83_ CACCGAAGCTGCCGCAGCGACACT-ATGTGTTGTTGGGTAGGGGAGCGTT 1197
AE014613_Salmonella_enterica_s CACCGAAGCTGCCGCAGCGACACC-GTGTGTTGTTGGGTAGGGGAGCGTT 1299
NC_005810_Yersinia_pestis_str. CACCGAAGCTGCCGCAGCGACACTAGGTGTTGTTGGGTAGGGGAGCGTT 1198
***** *

```

Fig.1