

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

(11) **PI9203161-7 B1**

(22) Data de Depósito: 14/08/1992  
(45) Data da Concessão: 30/11/2010  
(RPI 2082)



**(51) Int.Cl.:**  
C12Q 1/68  
C12Q 1/18  
C12N 1/06  
G01N 33/58

---

(54) Título: **PROCESSOS PARA DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO OPCIONAL DE ÁCIDO NUCLÉICO MICOBACTÉRIANO E DE MICOBACTÉRIA.**

(30) Prioridade Unionista: 15/08/1991 US 746.704

(73) Titular(es): F. Hoffmann-La Roche AG

(72) Inventor(es): Karen K. Y. Young

Relatório Descritivo da Patente de Invenção  
para **"PROCESSOS PARA DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO  
OPCIONAL DE ÁCIDO NUCLÉICO MICOBACTERIANO E DE MICO-  
BACTÉRIA"**.

5 A presente invenção refere-se a reagentes e a  
métodos para a detecção da presença de ácido nucléico  
micobacteriano e identificação da espécie micobacteriana  
da qual se origina o ácido nucléico micobacteriano em  
uma amostra. Especificamente, a presente invenção refe-  
10 re-se a um ativador oligonucleotídico que se hibridiza a  
uma região alvo do gene RNA ribossômico 16S ou ao RNA  
correspondente de uma espécie micobacteriana, em que o  
dito ativador contém a seqüência 5'CACATGCAAGTCGAA  
CGGAAAGG3' (KY18) ou 5'GCCCGTATCGCCCGCACGCTCACA3'  
15 (KY75) como seqüência de hibridização. Além disso, a  
presente invenção refere-se a uma sonda oligonucleotí-  
dica contendo uma seqüência oligonucleotídica capaz de  
se hibridizar à região alvo do gene RNA ribossômico 16S  
ou ao RNA correspondente de uma espécie micobacteriana  
20 obténível por amplificação com um par de ativadores, em  
que o primeiro ativador contém a seqüência KY18 e o se-  
gundo ativador contém a seqüência KY75 como seqüên-  
cia de hibridização. Mais especificamente a presente

invenção se refere a métodos para a detecção ou identificação de um ácido nucléico micobacteriano em uma amostra por amplificação de uma região alvo do gene RNA ribossômico 16S ou do RNA correspondente de uma espécie micobacteriana, misturação do ácido nucléico amplificado com uma sonda e detecção ou identificação de híbridos formados entre o dito ácido nucléico e a dita sonda, em que sondas específicas estão presentes. Além do mais, a invenção se refere a kits para realização dos métodos.

Micobactérias são bacilos aeróbicos de crescimento lento e ácido resistentes. Pelo menos dezenove espécies de Micobactérias já foram até agora associadas a doenças em seres humanos, mais particularmente *M. tuberculosis*, *M. bovis* e *M. leprae*. Algumas espécies, como a *M. avium*, *M. intracellulare* e *M. kansasii*, embora normalmente não patogênicas a indivíduos sadios, podem causar doenças em indivíduos imunocomprometidos, como aqueles infectados com o vírus da AIDS. Além disso, várias espécies raramente causam doença em seres humanos, mas podem ocorrer em espécimes clínicos como saprófitas. Métodos para a detecção e identificação de espécies de Micobactérias incluem a cultura bacteriana, detecção de anticorpos e, mais recentemente, detecção de rRNA por hibridização com uma sonda de ácido nucléico marcada radioativamente. Cada um desses métodos tem problemas consideráveis.

A detecção por cultivo dos bacilos é lenta, requerendo até dois meses, e tipicamente requer testes bioquímicos adicionais para a identificação da espécie. A

detecção de anticorpos não dispõe de especificidade por causa da reatividade cruzada entre espécies de micobactérias e também não dispõe de sensibilidade. Além disso, a diferenciação entre infecções atuais e passadas é difícil.

5 A detecção usando fragmentos de DNA radioativamente marcado como sondas que se hibridizam à pequena subunidade de RNA ribossômico (RNA 16S) não dispõe de sensibilidade e ainda requer pelo menos um período de cultura de vários dias (veja PCT/WO 84/02721).

10 A invenção da reação em cadeia de polimerase (PCR), um método para amplificar seqüências específicas de ácidos nucléicos, torna possível a rápida detecção de ácidos nucléicos presentes em uma célula no que era previamente uma quantidade baixa demais para ser detectada. Com o uso da amplificação por PCR, pode-se detectar mesmo uma única cópia do ácido nucléico alvo. A detecção direta por hibridização com uma sonda oligonucleotídica específica para seqüência de uma seqüência de ácido nucléico amplificada a um nível detectável torna possíveis testes

20 diagnósticos que são suficientemente específicos para detectar alterações nucleotídicas únicas na seqüência. Entretanto, nem todos os pares de ativadores e sondas são utilizáveis. A escolha de ativadores e, portanto, a região a ser amplificada, juntamente com a escolha das sondas,

25 determina grandemente a especificidade e a sensibilidade obteníveis.

A amplificação por PCR tem sido usada no seqüenciamento de ácido nucléico micobacteriano, detecção de

ácidos nucleicos micobacterianos em uma amostra e identificação de espécies de micobactérias. Várias regiões do genoma bacteriano foram usadas para detectar e identificar ácidos nucleicos micobacterianos em amostras. A maioria dos testes diagnósticos foram projetados para detectar apenas uma ou um pequeno número de espécies e especificações de especificidade limitadas, se alguma, foram efetuadas contra DNA não micobacteriano.

A detecção de uma região do gene que codifica o antígeno de 65 quilodaltons foi descrita em Chia et al., 1990, J. Clin. Microbiol. 28(9):1877-1880; Brisson-Noel et al., 1989, Lancet 334:1069-1071; Hackel et al., 1990, Molecular and Cellular Probes 4:205-210; Woods and Cole, 1989, FEMS Microbiology Letters 65:305-310; e Hance et al., 1989, Molecular Microbiology 3(7):843-849. Não mais do que três conjuntos de espécies de micobactérias foram distinguidas em qualquer um dos testes baseados no gene do antígeno de 65 quilodaltons.

A amplificação do elemento de DNA repetitivo, IS6110, foi relatada em Thierry et al., 1990, J. Clin. Microbiol. 28(12):2668-2673, e Eisenach et al., 1990, J. Infectious Disease 161:977-981. A amplificação do IS6110 basicamente serve apenas para testar a presença de espécies particulares de micobactérias, embora a *M. tuberculosis* e a *M. bovis* possam ser distinguidas pelo número de cópias (Plikaytis et al., 1991, Molecular and Cellular Probes 5:215-219).

O antígeno de 36 quilodaltons da *M. leprae* foi

usado em um teste diagnóstico em Hartskeerl et al., 1989, J. Gen. Microbiol. 135:2357-2364. Embora o teste se destinasse a ser específico para *M. leprae*, observou-se uma hibridização fraca a moderada ao DNA de outras micobactérias.

A seqüência de gene que codifica o antígeno de proteína b foi usado em Sjobring et al., 1990, J. Clin. Microbiol. 28(10):2200-2204, para produzir um teste para *M. tuberculosis/bovis* baseado na presença ou ausência de um produto amplificado.

Um teste unicamente para a presença de *M. tuberculosis* baseado na seqüência do gene que codifica a proteína MPB 64 foi descrito em Shankar et al., 1990, Lancet 335:423.

Sondas construídas com fragmentos de DNA clonados foram descritas em Patel et al., 1990, J. Clin. Microbiol. 28(3):513-518, e Fries et al., 1990, Molecular and Cellular Probes 4:87-105. A especificidade de sonda foi obtida através de um processo de seleção, em vez de análise de seqüência durante o projeto da sonda.

Uma das regiões do genoma micobacteriano que foi analisada e tomada como alvo para uso em um teste diagnóstico é a pequena subunidade de RNA ribossômico (rRNA 16S). Em Bottger, 1989, FEMS Microbiology Letters 65:171-176, os genes rRNA 16S de vários organismos foram amplificados usando-se ativadores "universais" destinados a amplificar o ácido nucléico de uma ampla gama de organismos e, então, diretamente seqüenciados. A relação filoge-

nética de espécies de micobactérias foi estudada comparando-se seqüências do gene rRNA 16S em Rogall et al. 1990, J. Gen. Micro. 136:1915-1920. Em Boddington et al., 1990, J. Clin. Microbiol. 28(8):1751-1759, havia a presença de evidências referentes a determinações que podem ser feitas usando-se oligonucleotídios específicos para seqüências para a amplificação e hibridização a regiões da seqüência rRNA 16S. Uma região altamente variável da seqüência rRNA 16S foi estudada com relação a três espécies de micobactérias. Ativadores específicos para gênero foram usados para amplificar uma região contendo a região variável usada para hibridização de sonda específica para espécies.

A pequena subunidade rRNA de um grande número de organismos, tanto íntima, quanto distantemente relacionados a micobactérias, foi estudada e seqüenciada. Uma compilação das seqüências de pequena subunidade rRNA de um grande número de organismos é apresentada por Neefs et al., 1990, Nuc. Acids Res. Supplement 18:2237-2317.

Ainda há necessidade de um teste rápido e sensível para identificar a presença de DNA micobacteriano e a espécie da qual o DNA se origina.

A presente invenção apresenta um ensaio baseado em PCR rápido e sensível para a detecção e identificação de espécie de micobactérias. Apresenta-se ativadores e sondas específicos para o gene RNA ribossômico 16S. A detecção de micobactérias é realizada por amplificação com sondas específicas para gênero, seguido por triagem com

sondas específicas para gênero em um ensaio de hibridização com manchas em pontos. Se forem detectadas micobactérias, a identificação de espécie é determinada a partir do DNA amplificado, normalmente da mesma reação de amplificação, usando-se as sondas específicas para espécies em um ensaio reverso de manchas em pontos.

A amplificação de seqüências que codificam o RNA ribossômico 16S (RNA) tem várias vantagens. A presente invenção pode ser usada para detectar e distinguir entre mais de 30 espécies micobacterianas e inúmeros outros organismos que poderiam estar presentes em uma amostra clínica. A sondas e ativadores da presente invenção proporcionam a máxima especificidade possível, minimizando, dessa forma, a probabilidade de um falso positivo causado pela presença de um organismo relacionado com uma seqüência similar. O gene RNA 16S contém regiões altamente conservadas. Os ativadores e sondas específicos para gênero da presente invenção se hibridizam a essas regiões conservadas e são capazes de se hibridizarem a seqüências de quase todas as espécies do gênero; os ativadores amplificam ácido nucléico de 14 das 15 espécies micobacterianas testadas e dessas 14 seqüências de DNA micobacteriano amplificadas, as sondas específicas para gênero se hibridizaram a 12. O rRNA 16S também contém regiões altamente variáveis dentro da região amplificada. As sondas específicas para espécie da presente invenção se hibridizam em uma região variável onde cada espécie de interesse tem uma seqüência única.

Uma vantagem adicional da escolha de ativadores e sondas do rRNA 16S é que o RNA está presente em uma célula em crescimento em grande número de cópias ( $10^3$  a  $10^4$ ). O número de seqüências de gene na forma de RNA em uma dada amostra clínica seria, portanto, até  $10^4$  vezes maior que o número de seqüências de DNA correspondentes. Se for desejada uma sensibilidade de detecção adicional, o próprio RNA pode ser usado como alvo de amplificação.

Em outro aspecto da invenção, realiza-se uma segunda reação de amplificação como um teste confirmatório. A segunda reação de amplificação se baseia na presença de seqüências alvos não diretamente relacionadas ao primeiro alvo, isto é, os ácidos nucleicos de RNA ribossômico 16S. Seqüências alvos adequadas são, de preferência, conservadas entre espécies de Micobactérias e não se relacionam a espécies não Micobactérias. Um gene alvo adequado pode ser, por exemplo, o gene que codifica o gene da proteína de 65 kDa. Pao et al., 1989, FEMS Micro. Letters 65:305-310; Hartskeerl et al., 1989, J. Gen. Micro. 135:2357-2364; e Hackel et al., 1990, Mol. Cel. Probes 4:205-210. Embora útil para confirmar os resultados de uma primeira reação de amplificação, a amplificação de uma segunda seqüência alvo é particularmente significativa para resolver resultados discordantes que possam surgir dos estudos comparativos, particularmente a comparação dos métodos de PCR e cultura.

Um aspecto adicional da presente invenção se refere a novas composições para uso como controles posi-

tivos para a detecção de Micobactérias. A invenção apresenta uma nova composição para confirmar os resultados de um ensaio usando sondas específicas para gênero, assim como sondas de Micobactéria específicas para espécie.

5 Um aspecto da invenção se refere a sondas capazes de detectar a presença de ácido nucléico de Micobactéria (sondas específicas para gênero) e determinar a identidade da espécie da qual se origina o ácido nucléico (sondas específicas para espécie).

10 Outro aspecto da invenção se refere a sondas de consenso. Na modalidade preferida, a invenção apresenta oligonucleotídios de consenso para a amplificação e detecção de espécies distintas de isolados de Micobactéria. As sondas de oligonucleotídio de consenso não se hibridizam a espécies não Micobactéria intimamente relacionadas a micobactérias.

15 As sondas de consenso são adequadas para uma ampla gama de detecção específica para alvo usando uma única sonda oligonucleotídica. Uma sonda de consenso, conforme aqui usada, é uma sonda oligonucleotídica que não é de seqüência idêntica a nenhuma das seqüências de ácido nucléico micobacteriano a ser detectada. As sondas de consenso são composições oligonucleotídicas híbridas compreendendo seqüências de ácido nucléico não nativo. Sondas

20 de consenso, conforme descritas na presente invenção, podem ser usadas para excluir, assim como incluir, espécies selecionadas em um ensaio de detecção. Em uma modalidade, a invenção apresenta sondas oligonucleotídicas compreen-

25

dendo novas seqüências. Embora essas sondas detectem genericamente espécies micobacterianas, não detectam espécies não micobacterianas intimamente relacionadas, por exemplo, *Corynebacter*.

5            Outro aspecto da invenção se refere a ativadores para amplificar uma região específica do ácido nucléico de micobactérias. Essa região contém tanto uma região conservada entre espécies de Micobactérias, quanto uma região variável com suficiente heterogeneidade entre espécies  
10 para permitir que a origem do ácido nucléico alvo seja determinada usando-se sondas oligonucleotídicas específicas para seqüência.

           Outro aspecto da invenção se refere a métodos de detecção e identificação de espécies. A amplificação do  
15 ácido nucléico alvo por PCR, usando os ativadores da invenção, permite detectar a presença de ácido nucléico micobacteriano por misturação do ácido nucléico amplificado com as sondas específicas para gênero e detecção se ocorre hibridização, ao passo que a identificação de espécie é  
20 realizada determinando-se o padrão de hibridização a sondas específicas para espécie.

           Um aspecto adicional da invenção se refere a kits. Esses kits têm várias formas e compreendem uma ou mais sondas e, em uma modalidade, compreendem um painel de  
25 sondas suficiente para determinar a identidade de uma Micobactéria infectante no nível de espécie e instruções para uso dos ingredientes do kit. Os kits também podem compreender um ou mais reagentes de amplificação, por

exemplo, ativadores específicos para gênero, polimerase, tampões e trifosfatos de nucleosídios.

Em ainda uma modalidade adicional, o kit também pode compreender controles positivos e negativos. Um controle positivo preferido é aqui descrito.

Para auxiliar no entendimento da invenção, vários termos são definidos abaixo.

O termo "oligonucleotídio" se refere a uma molécula composta por dois ou normalmente mais desoxirribonucleotídios ou ribonucleotídios, como ativadores, sondas, fragmentos de ácido nucléico a serem detectados e controles de ácido nucléico. O tamanho exato de um oligonucleotídio depende de muitos fatores e da função última ou uso do oligonucleotídio. Oligonucleotídios podem ser preparados por qualquer método adequado, incluindo, por exemplo, clonagem e restrição de seqüências apropriadas e síntese química direta por um método como o método de fosfotriéster de Narang et al., 1979, Meth. Enzymol. 68:90-99; o método de fosfodiéster de Brown et al., 1979, Meth. Enzymol. 68:109-151; o método de dietilfosforamida de Beaucage et al., 1981, Tetrahedron Lett. 22:1859-1862; e o método de suporte sólido da Patente U.S. Nº 4.458.066.

O termo "ativador" se refere a um oligonucleotídio, natural ou sintético, capaz de agir como ponto de iniciação da síntese de DNA sob condições em que a síntese de um produto de extensão de ativador complementar a uma fita de ácido nucléico seja induzida, isto é, na presença

de quatro trifosfatos de desoxirribonucleosídios diferentes e um agente para polimerização (isto é, DNA polimerase ou transcriptase reversa) em um tampão apropriado e a uma temperatura adequada. Um ativador é, de preferência, um oligodesoxirribonucleotídeo de fita simples. O comprimento apropriado de um ativador depende do uso desejado do ativador, mas tipicamente varia de 15 a 25 nucleotídios. Moléculas ativadoras curtas geralmente requerem temperaturas mais frias para formarem complexos híbridos suficientemente estáveis com o modelo. Um ativador não precisa refletir a seqüência exata do modelo, mas tem de ser suficientemente complementar para se hibridizar com um modelo e servir para iniciar a síntese de DNA.

Nas modalidades apresentadas da invenção, apresenta-se ativadores e sondas de seqüências específicas. Ficaré aparente para aqueles versados na técnica que, de acordo com essas modalidades, ativadores e sondas de seqüências específicas podem ser modificados, por exemplo, pela adição de nucleotídios à extremidade 5' ou 3', esses nucleotídios sendo complementares à seqüência alvo ou sendo não complementares à seqüência alvo. Contanto que as composições de ativador sirvam como ponto de iniciação para a extensão das seqüências alvos e os ativadores e sondas compreendam pelo menos 14 nucleotídios consecutivos contidos dentro dessas modalidades exemplificadas, essas composições estão dentro do âmbito da invenção.

O termo "ativador" pode se referir a mais de um ativador, particularmente no caso em que há alguma ambi-

güidade na informação referente a uma ou a ambas as extremidades da região alvo a ser amplificada. Se uma região "conservada" mostrar níveis significativos de polimorfismo em uma população, podem-se preparar misturas de ativadores que amplifiquem essas seqüências ou os ativadores podem ser projetados para amplificar mesmo seqüências não correspondentes. Um ativador pode ser marcado, caso desejado, por incorporação de um marcador detectável por meios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, imunológicos ou químicos. Por exemplo, marcadores utilizáveis incluem  $^{32}\text{P}$ , corantes fluorescentes, reagentes eletrodensos, enzimas (como as comumente usadas em ELISAs), biotina ou haptenos e proteínas para os quais haja antissoros ou anticorpos monoclonais disponíveis. Um marcador também pode ser usado para "capturar" o ativador, a fim de facilitar a imobilização do ativador ou de um produto de extensão de ativador, como DNA amplificado, sobre um suporte sólido.

Os termos "oligonucleotídio específico para seqüência" e "SSO" se referem a oligonucleotídios que têm uma seqüência, chamada de "região de hibridização", complementar à seqüência a ser detectada, que, sob "condições de hibridização rigorosas, específicas para seqüência", se hibridizará apenas à seqüência alvo exatamente complementar. O relaxamento do rigor das condições de hibridização permitirá que não correspondências de seqüência sejam toleradas; o grau de não correspondência tolerado pode ser controlado por ajuste adequado das condições de hibridi-

zação. Os termos "sonda" e "sonda SSO" são usados intercambiavelmente com SSO.

O termo "região alvo" se refere a uma região de um ácido nucléico a ser analisada.

5 O termo "enzima polimerase termoestável" se refere a uma enzima que é relativamente estável ao calor e que catalisa a polimerização de trifosfatos de nucleosídeos para formar produtos de extensão de ativador que são complementares a uma das fitas de ácido nucléico da sequência alvo. A enzima inicia a síntese na extremidade 3' do ativador e prossegue na direção da extremidade 5' do modelo até a síntese terminar. Uma enzima polimerase termoestável purificada é descrita mais detalhadamente na  
10 Patente U.S. Nº 4.889.818.

15 O termo "transcriptase reversa" se refere a uma enzima que catalisa a polimerização de trifosfatos de nucleosídeos para formar produtos de extensão de ativador que são complementares a um modelo de ácido ribonucléico. A enzima inicia a síntese na extremidade 3' do ativador e  
20 prossegue na direção da extremidade 5' do modelo até a síntese terminar. Exemplos de agentes de polimerização adequados que convertem a sequência alvo de RNA em uma sequência de DNA de cópia (cDNA) complementar são a transcriptase reversa do vírus da mieloblastose aviária e a DNA  
25 polimerase de *Thermus thermophilus*, uma DNA polimerase termoestável com atividade de transcriptase reversa.

A Figura 1 mostra os resultados dos testes de hibridização usando tanto sondas específicas para gênero,

quanto específicas para espécie da invenção. A especificidade das sondas foi testada com DNA de treze espécies diferentes de Micobactérias.

5 A presente invenção apresenta um ensaio à base de PCR rápido e sensível para a detecção e identificação de espécie de Micobactérias. Apresenta-se ativadores e sondas específicos para seqüências do gene RNA ribossômico 16S micobacteriano. A detecção de micobactérias é realizada por amplificação com ativadores específicos para 10 gênero, seguida por triagem com sondas específicas para gênero em um ensaio de hibridização com manchas em ponto. Se forem detectadas micobactérias, a identificação de espécie é determinada a partir do DNA da mesma reação de amplificação usando-se as sondas específicas para espécie 15 em um ensaio reverso de manchas em ponto. Tanto o ensaio de manchas em ponto direto, quanto o reverso podem ser realizados muito convenientemente em uma placa de microtitulação.

20 Os ativadores e as sondas específicos para gênero se hibridizam a regiões conservadas do gene rRNA 16S e as sondas específicas para espécie se hibridizam a regiões variáveis do gene rRNA 16S. Como a síntese começa na extremidade 3' do ativador, não correspondências na extremidade 3' são mais críticas. A timidina é mais to- 25 lerante que outras bases para uma não correspondência; assim, os ativadores foram projetados para evitar a base timidina na extremidade 3'. O teor de base de um oligonucleotídeo afeta a temperatura de desnaturação. O rigor

e a especificidade da ligação de ativador ou sonda aumenta com o aumento de temperatura. Entretanto, como todas as sondas são simultaneamente hibridizadas no formato de manchas em ponto reverso, condições de hibridização de sonda ótimas são similares para todas as sondas.

Os pares de ativadores da invenção funcionam eficientemente na amplificação de uma seqüência do gene rRNA 16S de todas as espécies de Micobactérias de interesse, mas não amplificam o DNA correspondente da maioria das outras fontes. Além disso, as condições de amplificação e eficiência para esses ativadores são razoavelmente uniformes entre as espécies, de modo que quase todas as espécies de Micobactérias são detectáveis usando-se um único teste. A Tabela 1 mostra as seqüências de hibridização dos ativadores da presente invenção.

Tabela 1

<u>Ativador</u>	<u>Listagem de Seqüência</u>	<u>Seqüência de Hibridização</u>
KY18	SEQ ID NO: 1	5' CACATGCAAGTCGAACGGAAAGG 3'
KY75	SEQ ID NO: 2	5' GCCCGTATCGCCCGCACGCTCACA 3'

Usando-se o sistema de numeração de E. coli, o ativador a montante KY18, se estende pelas bases 52-74 e o ativador a jusante, KY75, se estende pelas bases 624-647 do gene rRNA 16S. Juntos, esses ativadores especificam a síntese de um produto de aproximadamente 583 pares de bases de comprimento; o tamanho exato depende da espécie.

A triagem inicial para a presença de DNA micobacteriano é realizada com duas sondas específicas para gênero, que são usadas simultaneamente como uma mistura.

Tabela 2

<u>Ativador</u>	<u>Listagem de Seqüência</u>	<u>Seqüência de Hibridização</u>
KY101	SEQ ID NO: 3	5' TCGCGTTGTTTCGTGAAATCTCACgGCTTAA 3'
KY102	SEQ ID NO: 4	5' TCGCGTTGTTTCGTGAAAaCTCACAGCTTAA 3'
KY165	SEQ ID NO. 13	5' TCGCGTTGTTTCGTGAAATCTCACAGCTTAA 3'
KY166	SEQ ID NO. 14	5' TCGCGTTGTTTCGTGgAATCTCACAGCTTAA 3'
M. xenopi	SEQ ID NO. 15	5' TCGCGTTGTTTCGTGgAATgcCACAGCTTAA 3'

A razão para as sondas mistas é que a maioria das espécies de micobactérias podem ser divididas em dois grupos com relação às seqüências na região de KY101 (SEQ ID NO. 3) e KY102 (SEQ ID NO. 4). Essas duas sondas detectam DNA de 12 das 14 espécies do gênero Micobactéria testado.

Em uma modalidade alternativa, KY165 (SEQ ID NO. 13) substitui as sondas KY101 (SEQ ID NO. 3) e KY102 (SEQ ID NO. 4). As seqüências das sondas KY101 (SEQ ID NO. 3), KY102 (SEQ ID NO. 4), KY165 (SEQ ID NO. 13) e KY166 (SEQ ID NO. 14) são dadas na Tabela 2. A KY165 (SEQ ID NO. 13) é uma sonda de consenso englobando as seqüências tanto de KY101 (SEQ ID NO. 3), quanto KY102 (SEQ ID NO. 4). KY101 (SEQ ID NO. 3) e KY102 (SEQ ID NO. 4) diferem entre si por duas bases. KY165 (SEQ ID NO. 13) não é idêntica a KY101 (SEQ ID NO. 3) ou KY102 (SEQ ID NO. 4), mas difere de cada uma por uma única base. Esse consenso foi conseguido "favorecendo-se" KY101 (SEQ ID NO. 3) em uma das posições não correspondentes e KY102 (SEQ ID NO. 4) na outra das posições não correspondentes. KY165 (SEQ ID NO. 13) é capaz de se hibridizar suficientemente a todas as espécies micobacterianas específicas para KY101 (SEQ ID NO.3) e KY102 (SEQ ID NO. 4). KY165 (SEQ ID NO. 13) não se hibridiza a M.

xenopi (SEQ ID NO. 15) sob condições altamente rigorosas devido à presença de não correspondências adicionais.

5 KY166 (SEQ ID NO. 14) é uma sonda de consenso mais ampla para a detecção de espécies micobacterianas incluindo a *M. xenopi* (SEQ ID NO. 15). A seqüência de KY166 (SEQ ID NO. 14), como a seqüência de KY165 (SEQ ID NO.13), não corresponde a nenhuma espécie não micobacteriana. A sonda é projetada para ser igualmente diferente de KY101 (SEQ ID NO. 3), KY102 (SEQ ID NO. 4) e da seqüência correspondente em *M. xenopi* (SEQ ID NO. 15) (GenBank n<sup>o</sup> de acesso X52929, disponível através de Intelligenetics). KY166 (SEQ ID NO. 14) difere de KY101 (SEQ ID NO. 3), KY102 (SEQ ID NO. 4) e *M. xenopi* (SEQ ID NO. 15) por duas bases cada. KY166 (SEQ ID NO. 14) se hibridiza eficientemente a todas  
10 as espécies específicas KY101 (SEQ ID NO. 3) e KY102 (SEQ ID NO. 4) e *M. xenopi* (SEQ ID NO. 15). Além disso, a KY166 (SEQ ID NO. 14) não se hibridiza a *Corynebacter pseudodiphtheriticum* ou *C. diphtheriae*, duas espécies não micobacterianas que são intimamente relacionadas a Micobactérias. A seqüência correspondente de *M. xenopi* (SEQ ID NO. 15) é incluída na Tabela 2. Na Tabela, as não correspondências relativas a KY166 (SEQ ID NO. 14) estão sublinhadas. As não correspondências relativas a KY165 (SEQ ID NO. 13) estão em letras minúsculas.

25 Se o ácido nucléico micobacteriano estiver presente na amostra, a espécie da qual se origina o ácido nucléico pode ser determinada por hibridização a um painel de sondas específicas para espécie. As sondas usadas na

etapa de identificação de espécie são mostradas na Tabela 3.

Tabela 3

	<u>Ativador</u>	<u>Listagem de Seqüência</u>	<u>Especificidade</u>
5	KY21	SEQ ID NO: 5 5' ACGGGATGCATGTCTTGTGGTGGAAAGCGCTTTAGC 3'	M. tuberculosis/bovis/tb
	KY25	SEQ ID NO: 6 5' ACTTGGCGCATGCCTTGTGGTGGAAAGCTT 3'	M. kansasii/gastri/scrofulaceum
	KY26	SEQ ID NO: 7 5' TTTAGGCGCATGTCTTTAGGTGGAAAGCTT	M. intracellulare
10	KY63	SEQ ID NO: 8 5' TCAAGACGCATGTCTTCTGGTGGAAAGCTTTTGC 3'	M. avium/marinum/microti
	KY151	SEQ ID NO: 9 5' TCCCGAAGTGCAGGCCAGATTGCCACGTG 3'	M. marinum/M. microti
	KY106	SEQ ID NO: 10 5' GAAGGCTCACTTTGTGGGTTGACGGTAGGT 3'	M. scrofulaceum
	KY126	SEQ ID NO: 11 5' GCAATCTGCCTGCACACCGGGATAAGCCTG 3'	M. kansasii/gastri
15	KY139	SEQ ID NO: 12 5' GGGTCTAATACCGAATAGGACCACAGGACACATG 3'	M. gordonae
	KY157	SEQ ID NO: 16 5' ATAGGACCATTCTGCGCATGTGGTGTGGTG 3'	M. xenopi
	KY167	SEQ ID NO: 17 5' ACCTCAAGACGCATGTCTTCTGGT 3'	M. avium/marinum/microti
20	KY168	SEQ ID NO: 18 5' CCGAATAGGACCACAGGACACATG 3'	M. gordonae
	KY169	SEQ ID NO: 19 5' ACCTTTAGGCGCATGTCTTTAGGT 3'	M. intracellulare
	KY170	SEQ ID NO: 20 5' AACACTTGGCGCATGCCTTGTGGT 3'	M. kansasii/gastri/scrofulaceum
25	KY171	SEQ ID NO: 21 5' GAAGGCTCACTTTGTGGGTTGACG 3'	M. scrofulaceum
	KY172	SEQ ID NO: 22 5' TGTGGTGGAAAGCGCTTTAGCGGT 3'	M. bovis/tb
	KY173	SEQ ID NO: 23 5' AGGACCATTCTGCGCATGTGGTGT 3'	M. xenopi

As espécies de maior interesse clínico são a *M. tuberculosis*, *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. intracellulare* e *M. avium*. *M. gordonae* não é comumente associada a doenças, mas freqüentemente ocorre em amostras humanas. Conseqüentemente, freqüentemente se espera que a detecção de ácido nucléico micobacteriano pelas sondas específicas para gênero seja devida à *M. gordonae* clinicamente sem importância. O Exemplo 6 contém informações adicionais referentes à especificidade das sondas específicas para espécies.

Um importante aspecto da presente invenção é a amplificação de uma região do gene rRNA 16S. Aqueles que praticarem a presente invenção devem notar que, embora a reação em cadeia de polimerase seja o método de amplificação preferido, a amplificação das seqüências alvos em uma amostra pode ser realizada por qualquer método conhecido, como reação em cadeia de ligase (LCR), amplificação por transcrição e replicação de seqüência auto-sustentável, cada uma proporcionando uma amplificação suficiente para que a seqüência alvo possa ser detectada por hibridização de ácido nucléico a uma sonda SSO. Alternativamente, podem-se usar métodos que amplificam a sonda a níveis detectáveis, como amplificação por  $\Phi$ -replicase. O termo "sonda" engloba os oligonucleotídios específicos para seqüência usados nos procedimentos acima; por exemplo, os dois ou mais oligonucleotídios usados em LCR são "sondas" para fins da presente invenção, mesmo que o LCR requiera apenas a ligação das sondas para indicar a pre-

sença da seqüência.

Embora o processo PCR seja bem conhecido na técnica (veja as Patentes U.S. N<sup>OS</sup> 4.683.195, 4.683.202 e 4.965.188), alguma informação genérica sobre a PCR é fornecida abaixo para fins de clareza e completo entendimento da invenção para aqueles não familiarizados com o processo PCR.

Para amplificar uma seqüência de ácido nucléico alvo em uma amostra por PCR, a seqüência tem de ser acessível aos componentes do sistema de amplificação. Em geral, essa acessibilidade é assegurada isolando-se os ácidos nucléicos da amostra. Várias técnicas para extrair ácidos nucléicos de amostras biológicas são conhecidas na técnica. Por exemplo, veja aquelas descritas em Higuchi et al., 1989, em PCR Technology (Erlich ed. Stockton Press, New York). Alternativamente, se a amostra for rompível de maneira razoavelmente rápida, o ácido nucléico não precisa ser purificado antes da amplificação pela técnica PCR, isto é, se a amostra for composta por células, particularmente linfócitos ou amniócitos de sangue periférico, a lise e dispersão dos componentes intracelulares pode ser realizada simplesmente por suspensão das células em tampão hipotônico.

Cada ciclo da PCR envolve a separação do duplex de ácido nucléico formado por extensão de ativador. Em uma modalidade preferida do processo PCR, a separação de fita é conseguida aquecendo-se a reação a uma temperatura suficientemente alta e durante um tempo eficaz para causar

a desnaturação do duplex, mas não para causar uma desnaturação irreversível da polimerase (veja Patente U.S. Nº 4.965.188). A desnaturação térmica típica envolve temperaturas que variam de cerca de 80°C a 105°C, durante tempos que variam de segundos a minutos. A separação da fita, entretanto, pode ser realizada por qualquer método de desnaturação adequado, incluindo meios físicos, químicos ou enzimáticos. A separação da fita pode ser induzida por uma helicase, por exemplo, ou uma enzima capaz de exibir atividade helicase. Por exemplo, a enzima RecA tem atividade helicase na presença de ATP. As condições de reação adequadas para a separação de fita por helicases são conhecidas na técnica (veja Kuhn Hoffman-Berling, 1978, CSH-Quantitative Biology 43:63-67; e Radding, 1982, Ann. Rev. Genetics 16:405-436).

Não importa como a separação da fita é conseguida, entretanto, uma vez que as fitas estejam separadas, a próxima etapa na PCR envolve a hibridização das fitas separadas com ativadores que flanqueiam a seqüência alvo. Os ativadores são, então, estendidos para formar cópias complementares das fitas alvo. Para uma amplificação por PCR bem sucedida, os ativadores são projetados para que a posição em que cada ativador se hibridiza ao longo de uma seqüência duplex seja suficiente para que um produto de extensão sintetizado a partir de um ativador, quando separado do modelo (complemento), sirva como modelo para a extensão do outro ativador. O ciclo de desnaturação, hibridização e extensão é repetido tantas vezes quanto ne-

cessário para se obter a quantidade desejada de ácido nucléico amplificado.

A extensão dependente de modelo de ativadores na PCR é catalisada por um agente de polimerização na presença de quantidades adequadas de quatro trifosfatos de desoxirribonucleosídios (dATP, dGTP, dCTP e dTTP; dUTP é usado em vez ou além do dTTP se o sistema de esterilização UNG descrito abaixo for incorporado), em uma meio de reação composto pelos sais, cátions metálicos e sistema de tampão de pH apropriados. Agentes de polimerização adequados são enzimas que sabidamente catalisam a síntese de DNA dependente de modelo. Exemplos de polimerases adequadas para uso com um modelo de DNA incluem a DNA polimerase I de *E. coli* ou o fragmento Klenow dessa enzima, DNA polimerase de *T<sub>4</sub>* e polimerase Taq, uma DNA polimerase estável ao calor isolada do *Thermus aquaticus*. Essa última enzima é amplamente usada na amplificação e seqüenciamento de ácidos nucléicos. As condições de reação para uso de polimerases Taq são conhecidas na técnica e são descritas em Gelfand, 1989, em *PCR Technology*, supra. Agentes de polimerização adequados para a síntese de uma seqüência de DNA de cópia (cDNA) complementar a partir do modelo RNA são a transcriptase reversa (RT), como a RT de vírus da mieloblastose aviária, ou DNA polimerase de *Thermus thermophilus*, uma DNA polimerase termoestável com atividade de transcriptase reversa. Tipicamente, o modelo RNA é degradado pelo calor durante a primeira etapa de desnaturação após a etapa de transcrição reversa inicial, deixando a-

penas o modelo DNA para a amplificação subsequente.

Se o rRNA 16S tiver de ser amplificado, realiza-se uma etapa de transcrição reversa (RT) inicial para criar uma cópia de DNA (cDNA) do RNA. A publicação de patente PCT N<sup>o</sup> WO 91/09944 descreve a transcrição reversa a alta temperatura por uma polimerase termoestável que também funciona na amplificação por PCR. A RT a alta temperatura proporciona uma maior especificidade para o ativador e melhor eficiência. Os mesmos ativadores e polimerase podem bastar tanto para a etapa de transcrição reversa, quanto de amplificação por PCR e as condições de reação são otimizadas para que ambas as reações ocorram sem troca de reagentes. A DNA polimerase de *Thermus thermophilus*, uma DNA polimerase termoestável que pode funcionar como transcriptase reversa, é usada para todas as etapas de extensão de ativador, a despeito do modelo. Ambos os processos podem ser feitos sem que se tenha de abrir o tubo ou trocar ou adicionar reagentes; apenas o perfil de temperatura é ajustado entre o primeiro ciclo (modelo RNA) e o restante dos ciclos de amplificação (modelo DNA).

O método PCR pode ser efetuado por etapas, em que após cada etapa novos reagentes são adicionados, ou de maneira em que todos os reagentes sejam adicionados simultaneamente, ou por etapas parciais, em que reagentes frescos ou diferentes sejam adicionados após um dado número de etapas. Por exemplo, se a separação de fita for induzida por calor, e a polimerase for sensível ao calor,

então, a polimerase tem de ser adicionada após cada rodada de separação de fita. Entretanto, se, por exemplo, for usada uma helicase para a desnaturação ou se for usada uma polimerase termoestável para a extensão, então, todos os reagentes podem ser adicionados inicialmente ou, alternativamente, se as razões molares dos reagentes forem de conseqüências para a reação, os reagentes podem ser periodicamente reabastecidos ao serem depletados pela reação sintética.

10           Aqueles versados na técnica saberão que o processo PCR é mais comumente realizado como um processo automatizado com uma enzima termoestável. Nesse processo, a temperatura da mistura de reação é ciclada através de uma região de desnaturação, de uma região de recozimento de 15           ativador e de uma região de reação. Uma máquina especificamente adaptada para uso com uma enzima termoestável é comercialmente disponível pela Perkin Elmer.

          Aqueles versados na técnica também estarão 20           cientes do problema de contaminação de uma PCR pelo ácido nucléico amplificado de reações anteriores. Métodos para reduzir esse problema permitem a degradação enzimática de qualquer DNA amplificado de reações anteriores. A amplificação por PCR é realizada na presença de dUTP, em vez de dTTP. O produto contendo uracila de fita dupla resultante 25           é submetido a uma degradação por uracil N-glicosilase (UNG), ao passo que o DNA contendo timina normal não é degradado pela UNG. A adição de UNG à mistura de reação de amplificação antes da amplificação ser iniciada degrada

todo o DNA contendo uracila que poderia servir de alvo. Como a única fonte de DNA contendo uracila é o produto amplificado de uma reação anterior, esse método esteriliza eficazmente a mistura de reação, eliminando o problema de contaminação de reações anteriores (transporte). A UNG é tornada temporariamente inativa pelo calor, de modo que as etapas de desnaturação no procedimento de amplificação também servem para desativar a UNG. Conseqüentemente, novos produtos de amplificação, embora incorporando uracila, são formados em um ambiente livre de UNG e não são degradados.

A hibridização de sonda específica para seqüência é uma importante etapa no desempenho bem sucedido dos presentes métodos. As sondas oligonucleotídicas específicas para seqüência da presente invenção se hibridizam especificamente com um segmento particular do genôma micobacteriano e têm não correspondências desestabilizantes com seqüências de outros organismos no caso de sondas específicas para gênero e de outras espécies micobacterianas, no caso de sondas específicas para espécie. Condições de hibridização rigorosas podem ser escolhidas para que as sondas só se hibridizem especificamente a seqüências exatamente complementares. A detecção do produto amplificado utiliza essa hibridização específica para seqüência para assegurar que apenas o alvo amplificado correto seja detectado, diminuindo as chances de um falso positivo causado pela presença de seqüências homólogas de organismos relacionados.

Os métodos de ensaio para a detecção de híbridos formados entre sondas SSO e seqüências de ácido nucléico podem requerer que as sondas contenham características adicionais além da região de hibridização. No formato de manchas em ponto, por exemplo, as sondas são tipicamente marcadas. Se a sonda for primeiro imobilizada, como no formato de mancha em ponto "reverso" descrito abaixo, a sonda também pode conter longos trechos de poli-dT que podem ser fixados a um suporte de náilon por irradiação, uma técnica descrita em maiores detalhes na Publicação de Patente PCT N<sup>o</sup> 89/11548.

As sondas da invenção podem ser sintetizadas e marcadas usando-se técnicas descritas acima para a síntese de oligonucleotídios. Por exemplo, a sonda pode ser marcada na extremidade 5' com <sup>32</sup>P por incubação da sonda com <sup>32</sup>P-ATP e cinase. Um marcador não radioativo adequado para sondas SSO é a peroxidase de rábano-picante (HRP). Métodos para a preparação e detecção de sondas contendo esse marcador são descritos nas Patentes U.S. N<sup>os</sup> 4.914.210 e 4.962.02. Para informações adicionais sobre o uso dessas sondas marcadas, veja a Patente U.S. N<sup>o</sup> 4.789.630; Saiki et al., 1988, N. Eng. J. Med. 319:537-541; e Bugawan et al., 1988, Bio/Technology 6:943-947. Cromógenos utilizáveis incluem o corante vermelho leuco e 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB). Helmuth, PCR Protocols, San Diego, Califórnia, Academic Press, Inc., 1990, págs. 119-128, descreve procedimentos para a detecção não isotópica de produtos de PCR.

As sondas da invenção podem ser usadas para determinar se há seqüências de ácido nucléico presentes em uma amostra por determinação de se as sondas se ligam às seqüências presentes na amostra. Métodos de ensaio adequados para fins da presente invenção para detectar híbridos formados entre sondas e seqüências de ácido nucléico em uma amostra são conhecidos na técnica. Por exemplo, a detecção pode ser realizada usando-se um formato de mancha em ponto, conforme descrito no Exemplo 4. No formato de mancha em ponto, a amostra amplificada não marcada é ligada a um suporte sólido, como uma membrana, a membrana é incubada com sonda marcada sob condições de hibridização adequadas, a sonda não hibridizada é removida por lavagem e o filtro monitorizado quanto à presença de sonda ligada. Quando se analisam múltiplas amostras com poucas sondas, como no caso das amostras serem triadas quanto à presença de ácido nucléico micobacteriano usando-se sondas específicas para gênero, o formato de mancha em ponto é muito útil.

Um método alternativo é muito útil quando se devem usar grandes números de diferentes sondas. Esse método é uma mancha em ponto "reversa", em que a seqüência amplificada contém um marcador e a sonda é ligada ao suporte sólido. Nesse formato, as sondas não marcadas são ligadas à membrana e expostas à amostra marcada sob condições de hibridização apropriadamente rigorosas. A amostra marcada não hibridizada é, então, removida por lavagem sob condições adequadamente rigorosas e o filtro é,

então, monitorizado quanto à presença de seqüências ligadas. Como a determinação de espécie requer o uso de múltiplas sondas específicas para espécie para cada amostra amplificada, o formato de mancha em ponto reverso é o formato de teste preferido para essa etapa.

Alternativamente, pode ser desejável usar um método de detecção com uma pluralidade de sítios ou poços de hibridização de sonda. Por exemplo, um suporte sólido como uma placa de microtitulação é particularmente útil em aplicações clínicas em grande escala dos presentes métodos. Métodos para a hibridização/captura de DNA amplificado por PCR ou suportes sólidos são conhecidos. Em uma modalidade desses métodos, o DNA alvo amplificado é marcado (por exemplo, com biotina) durante a amplificação na reação PCR. O DNA marcado é especificamente capturado por hibridização do produto de PCR a uma sonda de captura de oligonucleotídeo específica para o alvo, que tenha sido ligada ao poço da placa de microtitulação. O produto ligado é adequadamente detectado de acordo com o tipo de marcador usado. Por exemplo, se a biotina for usada como marcador, adiciona-se complexo de avidina HRP e se reage com (a) substrato de peróxido de hidrogênio e cromógeno O-fenileno diamina (OPD) ou (b) substrato de peróxido de hidrogênio e cromógeno tetrametilbenzidina (TMB). Um sinal métrico de cor se desenvolve, permitindo a detecção quantitativa do DNA amplificado por PCR.

Conforme praticado em laboratórios biomédicos clínicos, procedimentos de detecção usando ensaios de

placa de microtitulação podem ser padronizados para uma ampla gama de alvos. Pode ser preferível ter sondas de detecção com menos de 25 nucleotídios de comprimento. Sondas mais curtas minimizam a oportunidade de reatividade cruzada e são particularmente úteis em procedimentos de triagem em grande escala. Portanto, o Exemplo 8 descreve um método preferido para a detecção de espécies de Mico-

5 bactérias em um formato de placa de microtitulação. Aqueles versados na técnica reconhecerão que sondas com mais de 25 nucleotídios são igualmente adequadas para es-

10 quemas de detecção em placas de microtitulação; entretanto, pode ser necessário determinar individualmente as condições de hibridização e rigor apropriadas para assegurar a máxima especificidade.

15 Em outro sistema de ensaio adequado, adiciona-se uma sonda marcada durante o processo de amplificação por PCR. Qualquer sonda que se hibridize ao DNA alvo durante cada etapa de síntese é degradada pela atividade exonuclease 5' a 3' da polimerase usada para catalisar a ex-

20 tensão do ativador. O produto de degradação da sonda é, então, detectado. Assim, a presença do produto de degradação indica que ocorreu a hibridização entre a sonda e o DNA alvo.

25 A presente invenção também se refere a kits, unidades de multirrecipientes compreendendo os ativadores e sondas da invenção. Um kit utilizável pode conter sondas SSO para a detecção de ácido nucléico micobacteriano. Em alguns casos, as sondas SSO podem ser fixadas a uma mem-

brana de suporte apropriada. O kit também pode conter a-  
tivadores para amplificação por PCR. Outros componentes  
opcionais do kit incluem, por exemplo, transcriptase re-  
versa ou polimerase, os trifosfatos de nucleosídeos de  
5 substrato, meios usados para marcar (por exemplo, um con-  
jugado de avidina-enzima e substrato de enzima e cromógeno  
se o marcador for biotina) ou detectar o marcador e os  
tampões apropriados para as reações de PCR, transcrição  
reversa ou hibridização. Além dos componentes acima, o  
10 kit também pode conter instruções para a realização dos  
métodos de amplificação e detecção da invenção.

Em uma modalidade preferida da invenção, os kits  
para detecção de micobactérias também podem incluir con-  
trolés positivos e negativos. De preferência, um controle  
15 positivo inclui uma seqüência de ácido nucléico que é  
amplificável usando-se o mesmo par ativador usado para  
amplificar ácidos nucléicos micobacterianos em uma amostra  
de teste. Conhecem-se métodos para usar um controle po-  
sitivo em que tanto o alvo que pode ou não estar presente,  
20 quanto o controle positivo usam o mesmo par ativador. De  
preferência, o controle positivo é projetado para que o  
produto de DNA seja de um tamanho distinto, prontamente  
distinguível do tamanho do alvo.

Em outro aspecto, a presente invenção apresenta  
25 um controle positivo que é capaz de se hibridizar a sondas  
para a detecção de sondas de micobactéria específicas para  
gênero, assim como sondas de micobactéria específicas para  
espécie. O Exemplo 9 descreve a construção de um ácido

nucléico de controle positivo.

Conforme aqui descrito, pode ser desejável utilizar um segundo alvo de amplificação, particularmente para resolver dados discordantes de PCR e cultura. Dados os ensinamentos da presente invenção para proporcionar um vetor de controle positivo interno, aqueles versados na técnica notariam prontamente que controles positivos internos adicionais poderiam ser construídos. Por exemplo, um controle positivo poderia incorporar sítios de ativador tanto para o alvo primário (rRNA 16S), quanto secundário (por exemplo, gene da proteína de 65 kDa), para hibridizar e subsequente amplificar um segmento distinto de DNA de controle positivo.

Os exemplos da presente invenção apresentados abaixo são apenas para fins ilustrativos e não para limitar o âmbito da invenção.

#### Exemplo 1

##### Preparação da Amostra

Isolam-se ácidos nucleicos de amostras de escarro usando-se o sistema IsoQuick<sup>TM</sup> comercialmente disponível pela MicroProbe. Cerca de 10 ml de uma amostra de escarro são liquefeitos/desinfetados, peletizados por centrifugação e ressuspensos em cerca de 1 ml de tampão com BSA. Dessa amostra, 200 a 500  $\mu$ l são centrifugados para peletizar as bactérias. As pelotas são ressuspensas em 100  $\mu$ l de tampão de amostra A, então, lisadas com 100  $\mu$ l de Reagente de lise 1. Os lisados são, então, extraídos com 7 volumes de Reagentes 2 e 4 volumes de Rea-

gente 3 (Reagentes 1, 2 e 3, juntamente com o tampão de amostra A são supridos com o sistema IsoQuick<sup>TM</sup>). A amostra é centrifugada e, depois disso, 1/3 de volume de NH<sub>4</sub>Ac 10 M é adicionado à fase aquosa e o DNA precipitado com um volume igual de isopropanol. O DNA peletizado é lavado com EtOH a 70%, secado ao ar e ressuscitado em 100 µl de TE, pH 8,0. Um volume de 50 µl de cada preparação de DNA é usado na reação de amplificação.

#### Exemplo 2

##### Amplificação de DNA Micobacteriano

Prepara-se uma mistura reagente mestra para que cada reação contenha os seguintes reagentes: 25 pmoles de cada ativador, 10 nmoles de cada dNTP, tampão PCR a 2X (10X tampão = 500 mM de KCl, 500 mM de Tris-HCl, pH 8,9, 20 mM de MgCl<sub>2</sub>), 3 unidades de polimerase Taq, 2 unidades de UNG e H<sub>2</sub>O para completar 50 µl de mistura de reação por reação. Essa mistura mestra é recoberta com 50 µl de óleo mineral e a amostra de DNA é adicionada à mistura de reação sob a camada de óleo. Quando necessário, adiciona-se H<sub>2</sub>O para completar um volume de reação total de 100 µl.

O DNA é amplificado em um Aparelho de Ciclos Térmicos Perkin Elmer. O Aparelho de Ciclos Térmicos é programado para atravessar 37 ciclos de desnaturação, re-cozimento de ativador e extensão de ativador; dois ciclos de 98°C, 62°C e 72°C durante um minuto cada, seguidos por 35 ciclos de 94°C, 62°C e 72°C durante um minuto cada. O Aparelho de Ciclos Térmicos Perkin Elmer é programado para

encharcar as amostras a 72°C durante um tempo indeterminado após o último ciclo, para assegurar que a extensão final esteja completa e para manter a enzima UNG inativa, se for usado o sistema de esterilização UNG. Os produtos de amplificação podem ser, então, analisados por eletroforese em gel e/ou hibridização com manchas em ponto. Se a análise for eletroforese em gel tiver de ser feita, cerca de 10 µl de 10X tampão de amostra (0,25% de xileno cianol, 0,25% de bromofenol azul, 25% de Ficoll) são adicionados e o óleo mineral é extraído, e a polimerase Taq é desativada com 100 µl de clorofórmio.

### Exemplo 3

#### Formato de Mancha em Ponto

A triagem inicial da amostra amplificada detecta a presença de ácido nucléico de Micobactéria. No formato de mancha em ponto, uma pequena parte do DNA amplificado é desnaturada, aplicada a um filtro de náilon e imobilizada conforme descrito abaixo. O filtro é, então, mergulhado em uma solução de sonda para permitir a hibridização a uma das sondas marcadas. Cada uma das sondas pode ser radioativamente marcada, mas sondas covalentemente conjugadas a peroxidase de rábano-picante (HRP) também podem ser usadas para fornecer um meio de detecção não isotópica na presença de um substrato cromogênico ou quimioluminescente. DNA alvo imobilizado é hibridizado a uma mistura das duas sondas específicas para gênero KY101 e KY102. Como se espera que o número de amostras examinadas exceda grandemente o número de sondas (uma mistura

de duas sondas), o formato de mancha em ponto é mais conveniente para essa triagem inicial. Um grande número de diferentes amostras pode ser hibridizado sobre locais distintos de um único suporte sólido e exposto às sondas marcadas simultaneamente por imersão do suporte em uma solução de sonda.

A amplificação é realizada como no Exemplo 2. O produto de PCR é, então, desnaturado por tratamento com álcali. A 5  $\mu$ l de produto de PCR, adicionam-se 5  $\mu$ l de EDTA 0,5M, pH 8,0, 8  $\mu$ l de NaOH 5N e 82  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O. A mistura é deixada em repouso à temperatura ambiente durante 10 minutos para completar a desnaturação.

Filtros de náilon BioDyne<sup>TM</sup> B (Pall Corp., Glen Cove, NY) são preparados por encharcamento em H<sub>2</sub>O durante 5 a 10 minutos e, depois, enxaguadura com 200  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O depois do distribuidor de mancha em ponto (Bio-Dot<sup>TM</sup> da BioRad, Richmond, CA) ter sido preparado. Após a desnaturação, 100  $\mu$ l da mistura de amostra são aplicados sob vácuo à membrana de náilon usando-se o aparelho de mancha em ponto. Cada poço é, então, enxaguado com 200  $\mu$ l de NaOH 0,4N, então, enxaguado brevemente com 2X SSC e secado ao ar até que nenhuma poça de líquido tenha sido deixada. O DNA é imobilizado e reticulado ao filtro de náilon por irradiação ultravioleta a um fluxo de 1200 mJ/cm<sup>2</sup> com uma caixa de luz UV Stratalinker<sup>TM</sup> (Stratagene, La Jolla, CA) (na posição de "autorreticulação").

Os filtros são "pré-hibridizados" por encharcamento no tampão de hibridização (0,5X SSC, 5X solução de

Denhardt, 0,1% de SDS, 50  $\mu\text{g/ml}$  de DNA de esperma de arenque) em sacos termicamente vedáveis a  $60^{\circ}\text{C}$  (agitador a ar) durante pelo menos 30 minutos. Se forem usadas sondas radioativamente marcadas, o tampão é, então, substituído por uma quantidade igual da mesma solução contendo  $1 \times 10^6$  cpm de sonda e o filtro é deixado hibridizar entre 2 horas e uma noite a  $60^{\circ}\text{C}$ .

Após a hibridização, os filtros são lavados três vezes em  $2X \text{ SSC}/0,1\%$  de SDS; duas vezes durante 20 minutos à temperatura ambiente e, então, uma vez durante vinte minutos à temperatura de alto rigor de  $71^{\circ}\text{C}$  em um banho de água sob agitação. Os filtros são, então, secados em pontos, enrolados em um invólucro de plástico e expostos a filme de raios X a  $-70^{\circ}\text{C}$  com uma ou duas telas de intensificação.

Um método alternativo de visualização é hibridizar com sondas oligonucleotídicas conjugadas a peroxidase de rábano-picante, preparadas conforme descrito por Levenson e Chang, 1989, em PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Innis et al., eds., Academic Press, San Diego), páginas 92-112, e Saiki et al., 1988, N. Eng. J. Med. 319:537-541. A hibridização é realizada com 2 pmoles de sonda HRP-SSO por 5 ml de solução de hibridização.

Após lavagem, os filtros a serem revelados com um substrato de corante cromogênico são enxaguados em citrato de sódio 100 mM, pH 5,0, então, colocados em citrato de sódio 100 mM, pH 5,0, contendo 0,1 mg/ml de

3,3',5,5'-tetrametilbenzidina por mililitro (Fluka) e 0,0015 por cento de peróxido de hidrogênio, e incubados com agitação suave durante 10 a 30 minutos à temperatura ambiente. Os filtros revelados são enxaguados em água e imediatamente fotografados. O sistema de detecção TMB é preparado e usado substancialmente conforme descrito no kit de tipagem de DNA AmpliType<sup>(R)</sup> DQalpha desenvolvido e produzido pela Hoffmann-La Roche e disponível através da Perkin Elmer. Em outra modalidade, revelam-se os filtros com o sistema de detecção quimioluminescente (ECL; Amersham, Arlington Heights, IL). Os filtros são enxaguados em PBS durante 5 minutos e colocados na solução ECL durante 1 minuto com agitação suave. Os filtros são, então, expostos a um filme de raios X à temperatura ambiente durante 1 a 5 minutos.

#### Exemplo 4

##### Formato de Mancha em Ponto Reverso

A identificação de espécie requer que cada amostra seja exposta a várias sondas específicas para espécie; a identidade é indicada por quais das sondas se ligam ao DNA da amostra. Como cada amostra é exposta a múltiplas sondas, o formato de mancha em ponto reverso é mais conveniente. As sondas são fixadas a locais distintos em uma membrana e, então, toda a membrana é mergulhada em uma solução contendo o DNA alvo amplificado para permitir a hibridização às sondas ligadas à membrana. O processo de mancha em ponto reverso é descrito nos pedidos copendentes N<sup>OS</sup> de Série 197.000 e 347.495; em Saiki et

al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. 86:6230-6234; e no kit de tipagem de DNA AmpliType<sup>(R)</sup> DQalpha desenvolvido e produzido pela Hoffmann-La Roche e disponível através da Perkin Elmer. Os ativadores de amplificação são biotilados, conforme descrito em Levenson e Chang, 1989, supra, de modo que qualquer DNA amplificado que se hibridize às sondas ligadas à membrana possa ser facilmente detectado.

Em uma modalidade, a detecção é realizada por reação de peroxidase de rábano-picante conjugada com estreptavidina (SA-HRP) com qualquer DNA amplificado biotilado (através dos ativadores) hibridizado à sonda ligada à membrana. A HRP se torna, portanto, ligada, através da interação SA-biotina, ao DNA amplificado e pode ser usada para gerar um sinal por vários meios bem conhecidos, como a geração de um composto colorido, por exemplo, pela oxidação da tetrametilbenzidina (veja Patente U.S. N<sup>o</sup> 4.789.630).

Embora a sonda possa ser fixada à membrana por qualquer meio, um método preferido envolve a ligação de uma "cauda" à região de hibridização da sonda oligonucleotídica com uma seqüência muito mais longa de poli-dT. A "cauda" de poli-dT resultante pode ser, então, reagida com grupos amina em uma membrana de náilon para fixar a sonda covalentemente à membrana. Essa reação pode ser facilitada por irradiação UV.

A desoxirribonucleotidil transferase terminal (TdT, Ratliff Biochemicals; para as reações abaixo, con-

siderar uma concentração de cerca de 120 Unidades/ $\mu$ l, que é de 100 pmoles/ $\mu$ l) pode ser usada para criar uma cauda de poli-dT em uma sonda, embora também se possa sintetizar a sonda com cauda em um sintetizador de DNA comercialmente disponível. Quando se usa um sintetizador de DNA para formar a sonda com cauda, entretanto, deve-se colocar a cauda na extremidade 5' da sonda, de modo que a terminação de cadeia prematura indesejável ocorra principalmente na região de cauda.

As reações TdT devem ser realizadas em um volume de cerca de 100  $\mu$ l contendo 1X sais TdT, 200 pmoles de oligonucleotídeo, 800  $\mu$ M de DTT e 60 unidades de TdT. 10X sais TdT são cacodilato de K 1.000 mM,  $\text{CoCl}_2$  10 mM, ditiotretitol 2 mM, Tris-Cl 250 mM, pH 7,6, preparado conforme descrito por Roychoudhury e Wu, Meth. Enzymol. 65:43-64, aqui incorporado por referência. Uma solução de estoque 10X de dTTP 8 mM pode ser preparada (neutralizada a pH 7 com NaOH) por razões de conveniência.

A reação TdT deve ser realizada a 37°C durante duas horas e, então, parada pela adição de 100  $\mu$ l de EDTA 10 mM, pH 8. A concentração final de oligonucleotídeo com cauda é de 1  $\mu$ M (1 pmol/ $\mu$ l) e o comprimento da cauda homopolimérica é de cerca de 400 resíduos. O comprimento da cauda pode ser alterado ajustando-se a razão molar de dTTP para oligonucleotídeo. As sondas com cauda podem ser armazenadas a -20°C até o uso.

A membrana de náilon preferida para o formato de mancha em ponto reverso é a membrana de náilon Biodyne<sup>TM</sup>

B, com um tamanho de poro de 0,45 micron, produzida por Pall e também comercializada pela ICN como a membrana de náilon BioTrans<sup>TM</sup>. As sondas podem ser assinaladas sobre a membrana muito convenientemente com o aparelho de mancha em ponto Bio-Dot<sup>TM</sup> produzido pela BioRad. Cada sonda é assinalada em um único local distinto sobre a membrana. Cerca de 2 a 10 picomoles de cada sonda com cauda são pré-misturados com 50 a 100  $\mu$ l de tampão TE antes da aplicação ao aparelho de mancha em ponto. Após a manchação em ponto, a membrana é brevemente colocada sobre papel absorvente para remover o excesso de líquido. A membrana é, então, colocada dentro de uma caixa de luz UV, como a caixa de luz Stratalinker<sup>TM</sup> produzida pela Stratagene, e exposta a 50 a 60 milijoules/cm<sup>2</sup> de fluxo a 254 nm para fixar a sonda com cauda à membrana de náilon. Após uma breve enxaguadura (durante cerca de 15 minutos na solução de hibridização) para remover a sonda não ligada, a membrana, então, está pronta para hibridização com produto de PCR biotinilado.

Produtos de PCR amplificados são desnaturados por aquecimento a 95°C durante 3 a 10 minutos e 40  $\mu$ l de produto de PCR desnaturado são adicionados a cada painel de sonda para hibridização. A hibridização é realizada a 57°C durante 20 minutos em um banho de água sob agitação em um tampão de hibridização composto por 0,5X SSC, 0,25% de SDS e 5X solução de Denhardt. O tampão de hibridização é substituído por 3 ml de uma solução consistindo em 25  $\mu$ l de SA-HRP, comercialmente disponível pela Perkin Elmer, em

3,1 ml de tampão de hibridização, e incubado durante 20 minutos a 57°C em um banho de lavagem sob agitação.

A lavagem é realizada em um tampão de lavagem de 2X SSC e 0,1% de SDS. Após uma breve enxaguadura da membrana em 10 ml de tampão de lavagem, faz-se uma lavagem rigorosa de 12 minutos em 10 ml de tampão a 57°C. Realiza-se, então, outra lavagem à temperatura ambiente durante 5 minutos, seguida por uma lavagem de 5 minutos com 10 ml de citrato de sódio 0,1 M, pH 5,0.

A ligação de cromógeno é realizada em 5 ml de solução de cromógeno consistindo em 5 ml de citrato de sódio 0,1 M, 5 µl de peróxido de hidrogênio a 3% e 0,25 ml de cromógeno (TMB da Perkin Elmer) durante 25-30 minutos à temperatura ambiente. Três lavagens de 10 minutos em água destilada são realizadas à temperatura ambiente. Uma pós-lavagem de 1X PBS à temperatura ambiente durante 30 minutos pode intensificar a qualidade do sinal. Durante as etapas em que o cromógeno está presente, a membrana deve ser protegida contra a luz por uma cobertura de folha de alumínio. A membrana revelada deve ser fotografada para um registro permanente.

#### Exemplo 5

##### Deteccção de DNA Micobacteriano

A deteccção de DNA micobacteriano foi realizada por amplificação com formas biotiniladas dos ativadores específicos para gênero KY18 (SEQ ID NO: 1) e KY75 (SEQ ID NO: 2), usando-se o protocolo descrito no Exemplo 2, acima, seguido por hibridização às sondas específicas para

gênero KY101 (SEQ ID NO: 3) e KY102 (SEQ ID NO: 4), usando-se o ensaio de mancha em ponto descrito no Exemplo 3, acima. As seqüências das regiões de hibridização do ativador a montante KY18 (SEQ ID NO: 1) e do ativador a jusante KY75 (SEQ ID NO: 2) são dadas na Tabela 1, acima. As seqüências das regiões de hibridização das sondas específicas para gênero KY101 (SEQ ID NO: 3) e KY102 (SEQ ID NO: 4) são dadas na Tabela 2, acima.

Os ativadores específicos para gênero KY18 (SEQ ID NO: 1) e KY75 (SEQ ID NO: 2) foram usados nas amplificações por reação em cadeia de polimerase (PCR) para amplificar o ácido nucléico de 15 espécies de Micobactérias. Os resultados são mostrados na Tabela 4. Conforme esperado, KY18(SEQ ID NO: 1)/KY75(SEQ ID NO: 2) amplificaram DNA de todas espécies de Micobactérias, exceto *M. simiae*. A amplificação de DNA de *M. simiae* ou *M. chitae* não era esperada, porque o KY75 (SEQ ID NO: 2) difere em quatro das cinco bases 3' terminais do *M. simiae* e em duas das bases 3' terminais da *M. chitae*. Entretanto, como a associação de *M. simiae* com doença humana raramente foi relatada, a detecção não é clinicamente importante. Com exceção do DNA de *M. xenopi* e *M. terrae*, todo o DNA micobacteriano amplificado hibridizado foi detectado por hibridização às sondas específicas para gênero K101 (SEQ ID NO: 3) e KY102 (SEQ ID NO: 4).

Tabela 4

Amplificação de DNA de Diferentes Espécies Micobacterianas  
e Hibridização a Sondas Específicas para Gênero

	<u>Micobactéria</u>	<u>Amplificação</u>	<u>Hibridização</u>
5	M. tuberculosis	+	+
	M. scrofulaceum	+	+
	M. fortuitum	+	+
	M. avium	+	+
	M. kansasii	+	+
	M. intracellulare	+	+
10	M. phlei	+	+
	M. smegmatis	+	+
	M. marinum	+	+
	M. favescens	+	+
	M. xenopi	+	-
	M. simiae	-	-
	M. chelonae	+	+
15	M. gordonae	+	+
	M. terrae	+	-

A especificidade desses ativadores foi testada tentando-se amplificar DNA de 22 espécies não micobactéria diferentes. Os produtos de amplificação resultaram apenas do DNA de *Corynebacter diphtheriae* e *Corynebacter xerosis*, *Nisseria sicca* e *Propionibacterium acnes*. Entretanto, esses produtos de amplificação falharam na hibridização com sondas específicas para gênero, assim não resultou nenhum falso positivo. Os organismos testados estão relacionados na Tabela 5, abaixo.

Tabela 5Amplificação de DNA de Organismos Não Micobacterianos

	<u>Organismo</u>	<u>Amplificação</u>	<u>Hibridização</u>
	Bordatella pertussis	-	-
5	Borrelia burgdorferi	-	-
	Corynebacter diphtheriae	+	-
	Corynebacter xerosis +	-	-
	Enterobacter aerogenes	-	-
	Escherichia coli	-	-
	Haemophilus influenzae	-	-
	Klebsiella pneumoniae	-	-
10	Legionella pneumophila	-	-
	Neisseria gonorrhoea	-	-
	Neisseria meningitidis	-	-
	Neisseria sicca	+	-
	Propionibacterium acnes	+	-
	Pseudomonas aeruginosa	-	-
	Salmonella typhimurium	-	-
15	Serratia marcescens	-	-
	Staphylococcus aureus	-	-
	Streptococcus agalactiae	-	-
	Streptococcus pyogenes	-	-
	Streptomyces hygroscopicus	-	-
	Streptomyces rubiginosus	-	-
20	Treponema pallidum	-	-

Exemplo 6Identificação de Espécie

25 Uma vez que o ácido nucléico micobacteriano tenha sido detectado em uma amostra clínica, a espécie da qual se origina o ácido nucléico pode ser determinada pelo padrão de hibridização com as sondas específicas para espécie usando o formato de mancha em ponto reverso do Exemplo 4. As espécies de interesse clínico a serem

detectadas pelo presente sistema são a *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii* e *M. tuberculosis*. Além disso, a detecção de *M. gordonae* é desejada porque esse organismo é freqüentemente encontrado em amostras clínicas.

5           A Figura 1 mostra os resultados de um teste da especificidade de sondas específicas para espécie selecionadas dentre as sondas relacionadas na Tabela 3. A seqüência da região de hibridização de cada sonda, juntamente com a especificidade esperada, é mostrada na Tabela  
10 3, acima. Produtos amplificados de DNA purificado de treze espécies diferentes de Micobactérias foram usados para testar a especificidade tanto das sondas específicas para gênero, quanto específicas para espécie. Para cada espécie, 1 pg de DNA purificado de bactérias cultivadas (o  
15 equivalente a cerca de 300 genomas bacterianos) foi amplificado como no Exemplo 2, usando-se ativadores biotilados. A detecção da hibridização de sonda foi feita usando-se o formato de mancha em ponto reverso do Exemplo  
20 4. Como controle positivo para a presença de DNA amplificado, as sondas específicas para gênero foram incluídas nas tiras de teste juntamente com as sondas específicas para espécie.

#### Exemplo 7

##### Amplificação de rRNA 16S Micobacteriano

25           O rRNA 16S pode ser amplificado criando-se, em primeiro lugar, cDNA por transcrição reversa e amplificando-se o cDNA. Usam-se os mesmos ativadores do Exemplo 2, acima. Neste exemplo, tanto a transcrição reversa à

alta temperatura, quanto a amplificação por PCR são realizadas com a polimerase Tth termoestável.

A transcrição reversa é realizada em um volume de 20  $\mu$ l contendo os seguintes componentes: 8  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O, 2  $\mu$ l de 10X tampão de reação RT (Tris-HCl 100 mM, pH 8,3, KCl 900 mM), 2  $\mu$ l de MnCl<sub>2</sub> 10 mM, 2  $\mu$ l de solução de dNTP (2 mM cada de dATP, dCTP, dGTP e dTTP em H<sub>2</sub>O, pH 7,0), 2  $\mu$ l de ativador "a justante" (7,5 mM em H<sub>2</sub>O), 2  $\mu$ l de polimerase Tth 0,18  $\mu$ M em 1X tampão de armazenamento (Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, KCl 100 mM, EDTA 0,1 mM, DTT 1 mM, 0,2% de Tween 20 (Pierce Surfactants), 50% (volume/volume) de glicerol) e 2  $\mu$ l de solução de RNA de modelo (<250 ng em Tris-HCl 10 mM e EDTA 1 mM). Todas as soluções não contendo Tris são tratadas com dietilpirocarbonato (DEPC) para remover qualquer ribonuclease contaminante, conforme descrito na página 190 de Maniatus et al., 1982, Molecular Cloning, a Laboratory Manual (Cold Springs Harbor Laboratory, New York). A transcrição reversa é realizada a 72°C durante 5 minutos em um aparelho de termociclagem. A reação é parada por resfriamento da reação a 4°C com gelo.

A amplificação por PCR é efetuada com os seguintes reagentes adicionados: 2  $\mu$ l do ativador restante (7,5 mM em H<sub>2</sub>O), 2  $\mu$ l de solução de dNTP (10 mM cada de dATP, dCTP, dGTP e dTTP em H<sub>2</sub>O, pH 7,0), 8  $\mu$ l de 10X tampão de reação PCR (Tris-HCl 100 mM, pH 8,3, KCl 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 18,75, EGTA 7,5 mM e 50% (volume/volume) de glicerol) e 68  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O tratada com DEPC. O ácido nucléico

é amplificado em um Aparelho de Ciclos Térmicos Perkin Elmer com o mesmo perfil térmico do Exemplo 2. O produto amplificado é analisado como nos exemplos anteriores.

#### Exemplo 8

#### 5        Ensaio de Placa de Microtitulação Para a Detecção de Mycobacterium

10        Nesta modalidade da invenção, a sonda é fixada a um poço de uma placa de microtitulação. O DNA alvo amplificado é hibridizado à sonda ligada conforme acima descrito. Como no exemplo anterior, os ativadores de amplificação são biotinilados para permitir a detecção de DNA amplificado que se hibridiza às sondas ligadas.

15        As sondas desejadas, conjugadas a BSA, foram primeiro deixadas adsorver à superfície de plástico dos poços individuais. Os poços foram, então, bloqueados com proteína, como albumina sérica bovina. De preferência, usam-se placas de 96 poços disponíveis pela Corning.

20        Uma vez que a amplificação tenha sido completada, os tubos de PCR foram removidos do aparelho de termociclagem (Perkin Elmer). Cem microlitros de solução de desnaturação foram adicionados a cada tubo de PCR. Usa-se uma nova ponta de pipeta para cada tubo. Em uma modalidade, a detecção pode não ser efetuada imediatamente. Nesse caso, os tubos de PCR foram armazenados durante uma  
25        noite de 2°C a 8°C. As reações de amplificação desnaturadas se tornaram viscosas por armazenamento de 2°C a 8°C. Os tubos foram brevemente aquecidos de 25°C a 30°C antes da abertura dos tubos para dar caminho à pipeta.

O número apropriado de tiras de placa de microtitulação de oito poços (no mínimo, 2 tiras) foi removido e colocado na armação de placa de microtitulação. Cem microlitros de tampão de hibridização foram pipetados em cada poço da placa de microtitulação.

A solução de desnaturação contém NaOH 0,4M, EDTA 80 mM e 0,005% de Thymol azul. O tampão de hibridização/neutralização contém: NaSCN 3M, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 80 mM; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM e 0,125% de Tween 20. Antes do uso, o pH é verificado em 5,0 +/- 0,2.

Usando-se pontas tampadas com uma pipetadora de multicanais, 25 µl da reação de amplificação desnaturada de cada tubo de PCR na bandeja foram pipetados na posição de poço correspondente na placa de microtitulação. A placa foi coberta com a tampa de placa de microtitulação e suavemente batida do lado 10 a 15 vezes. Os poços nos quais a pipetagem de reagente apropriada foi feita se tornarão de cor amarelo claro. Se nenhuma cor ou apenas uma leve mudança do azul for notada, adicionou-se excesso de amplicons. O teste continua quando os valores OD positivos aumentam, mas os valores OD negativos não são afetados. A placa foi incubada durante 60 minutos a 37°C. Após a hibridização inicial a 37°C durante uma hora, o tampão de hibridização/neutralização foi removido e substituído pelo mesmo tampão e a placa foi incubada durante mais 15 minutos a 37°C.

Após a incubação, a placa foi lavada cinco vezes com solução de lavagem. A lavagem da placa pode ser efe-

tuada manualmente ou com um lavador de placa de microtitulação automatizado, programado apropriadamente. Para a lavagem, usou-se um tampão de lavagem 1X PCR. Um concentrado 10X de tampão lavado de PCR foi preparado da seguinte maneira: 9,94 gramas por litro de fosfato de sódio dibásico; 4,41 gramas por litro de fosfato de sódio (monobásico); 3,722 gramas por litros de EDTA; 87,66 gramas por litro de cloreto de sódio; 13,7 gramas por litro de Tween 20; e 10 gramas por litro de Pro Clin 300 (Rohm and Haas, Philadelphia, PA). A solução é ajustada em pH com ácido fosfórico (pH 6,5-7,1 é preferido).

Para a lavagem manual, o conteúdo da placa foi esvaziado e drenado até secar. Trezentos microlitros de solução de lavagem foram adicionados a cada poço na placa sob teste e a placa foi deixada secar durante 15 a 30 segundos. A placa foi novamente esvaziada e drenada até secar. Esse processo de lavagem foi repetido durante mais quatro vezes.

Para um lavador de microplata automatizado, usou-se o seguinte procedimento. O conteúdo dos poços foi aspirado. O lavador foi programado para adicionar 350 microlitros de solução de lavagem de trabalho a cada poço na placa sob teste e encharcou durante 30 segundos e aspirou. As etapas foram repetidas mais quatro vezes. A placa foi, então, drenada até secar.

Cem microlitros de conjugado foram adicionados a cada poço na placa sob teste. O conjugado de avidina-HRP foi preparado da seguinte maneira. O diluente contém 0,1

molar; 0,25% de Emulsit 25 (DKS International, Inc., Tóquio, Japão); 1,0% de Kathon CG (Rohm and Haas, Philadelphia, PA); 0,1% de fenol; 1,0% de gamaglobulina bovina. A solução foi ajustada em pH a 7,3 com HCl concentrado. A esse diluente, adicionaram-se 10 nM de avidina conjugada (Vector Labs. Burlingame, CA). A placa foi, então, recoberta e, então, incubada durante 50 minutos a 37°C e novamente lavada conforme acima descrito. O substrato de trabalho foi preparado misturando-se 2,0 ml de Substrato A e 0,5 ml de Substrato B para cada múltiplo de duas tiras de placas de microtitulação de 8 poços (16 testes). O Substrato A contém 3 mM de peróxido de hidrogênio, 6,5 mM de citrato e 0,1% de Kathon CG. O Substrato B contém 4,2 mM de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina e 40% de dimetilformamida. O substrato de trabalho foi preparado no máximo três horas antes do uso e foi armazenado longe da luz solar direta.

Cem microlitros de substrato de trabalho (mistura de substratos A e B) foram adicionados a cada poço da placa sob teste. A placa foi, então, recoberta e incubada no escuro durante 10 minutos à temperatura ambiente (20°C a 25°C). Cem microlitros de Reagente de Parada (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 5%) foram adicionados a cada poço sob teste. A absorbância de cada poço de 450 nM foi lida em uma hora de adição de Reagente de Parada. O valor de absorbância foi registrado quanto ao espécime e controle.

#### Exemplo 9

Construção de um Vetor de Controle Positivo Utilizável em

Métodos Para a Amplificação e Detecção de Ácidos NucléicosMicrobacterianos

Oligonucleotídeos que contêm as seqüências de ligação de sonda específica para espécie, assim como seus complementos (KY178(SEQ ID NO. 24)-KY181(SEQ ID NO. 27) abaixo) foram sintetizados. (Esses óligos contêm sítios de reconhecimento para enzimas de restrição nas duas terminações para facilitar a clonagem). Um micrograma de cada KY178 (SEQ ID NO. 24) e KY179 (SEQ ID NO. 25) ou KY180 (SEQ ID NO. 26) e KY181 (SEQ ID NO. 27) foram combinados, aquecidos durante 5 minutos a 98°C, então, incubados durante uma hora a 75°C para permitir o recozimento das fitas complementares. Os produtos recozidos foram separados dos óligos de fita simples residuais por eletroforese através de 3% de Nusieve (FMC Products)/1% de gel de agarose. As bandas de produtos de fita dupla são cortadas e o DNA é eluído. Os fragmentos de DNA são, então, cortados com as enzimas de restrição apropriadas e ligados entre si. Os produtos de ligação são isolados do Nusieve/gel de agarose como acima.

Preparou-se o vetor recipiente. O vetor recipiente era um plasmídio no qual um fragmento do gene rRNA 16S de M. tb contendo os sítios de ligação de ativador e de sonda haviam sido inseridos e foi preparado da seguinte maneira.

Cinquente picogramas de DNA de M. tuberculosis foram amplificados usando-se os ativadores KY70 (SEQ ID NO. 28) e CR01 (SEQ ID NO. 29), na presença de 50 pmoles

de CR01 (SEQ ID NO. 29), 80 pmoles de KY70 (SEQ ID NO. 28), 20 nmoles de cada dNTP, 2,5 unidades de polimerase Taq e 1X tampão PCR (Tris-HCl 50 mM, pH 8,9; KCl 50 mM; MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM) em um volume de reação total de 100 microlitros. As condições de ciclos térmicos são como as delineadas no Exemplo 2. Os produtos de amplificação foram extraídos com 100 microlitros de clorofórmio.

Os produtos de amplificação e o vetor pBS(+) foram ambos digeridos com a endonuclease de restrição PstI, extraídos uma vez com fenol/clorofórmio e, então, precipitados com etanol. (CR01 contém um sítio PstI na extremidade 5' e o produto de amplificação contém um sítio PstI interno a jusante dos sítios de ligação para os ativadores e sondas específicos para micobactérias.) O vetor cortado com PstI foi desfosforilado por tratamento com fosfatase de intestino de bezerro (Maniatis), extraído com fenol/clorofórmio e precipitado com etanol. Os produtos de amplificação preparados foram ligados ao vetor sob condições padronizadas (Maniatis).

O DNA ligado foi transformado em *E. coli* competente. Colônias portadoras de plasmídios que contêm o enxerto desejado foram identificadas por hibridização em mancha de colônias à sonda específica para tb KY 21 (SEQ ID NO. 5) da seguinte maneira. As bactérias foram espalhadas sobre um disco de filtro de nitrocelulose superposto sobre uma placa de ágar nutriente e deixadas crescer durante uma noite. O filtro foi removido e sucessivamente superposto (bactérias para cima) sobre papéis de filtro

3MM encharcados com 10% de SDS (3 minutos), NaOH 0,5M/NaCl 1,5 M (5 minutos), Tris-HCl 0,5M, pH 8/NaCl 1,5M (5 minutos) e 2X SSC (5 minutos). Os filtros foram secados ao ar. O DNA foi reticulado sobre o filtro por irradiação UV e, então, hibridizado a KY21 (SEQ ID NO. 5) e lavado conforme delineado no Exemplo 3.

#### Seqüências de Oligonucleotídios

##### KY70 - SEQ ID NO. 28

5' GCGGTACCTG            CACACAGGCC            ACAAGGGAA

10 CR01 - SEQ ID NO. 29

5' CGCCTGCAGT            TAACACATGC            AAGTCGAACGG

Esse vetor, designado com pKY5, foi cortado com as enzimas de restrição Sty I e Xho I, para remover um fragmento de 174 pb contendo o sítio de ligação a sonda específica para espécie, mas deixando intactos os sítios de ligação de ativador e sonda específica para gênero. O plasmídeo cortado foi separado do fragmento de 174 pb por eletroforese através de um gel de agarose de fusão a baixa temperatura a 1,5%. A banda contendo o vetor foi cortada do gel e purificada por cromatografia através de uma coluna de NACS (Bethesda Research Lab) e precipitação com etanol. O fragmento de enxerto contendo sítios de reconhecimento para as sondas específicas para espécie é ligado ao vetor preparado. Os produtos de ligação são transformados em bactérias hospedeiras competentes.

Transformantes contendo os enxertos apropriados são identificados por amplificação por PCR. As colônias bacterianas transformantes são ressuspensas em 0,5 ml de

tampão TE. Cinquenta microlitros da suspensão bacteriana são colocados em tubos de reação PCR contendo componentes necessários para a amplificação de DNA micobacteriano e a amplificação é realizada conforme acima discutido. Bactérias que portam plasmídios contendo o enxerto desejado geram produtos de PCR de 640 pb usando o par ativador KY18 (SEQ ID NO. 1) e KY75 (SEQ ID NO. 2). A amplificação de bactérias contendo o plasmídio pKY5 original gera produtos de PCR de 584 pb.

Os amplicons assim gerados podem ser hibridizados a sondas específicas para gênero e específicas para espécies micobacterianas por hibridização de mancha em ponto reversa, conforme delineado no Exemplo 4, para confirmar a presença dos sítios de hibridização para as sondas específicas para gênero e específicas para espécie descritas nos Exemplos. Um plasmídio de controle positivo pode ser similarmente preparado para hibridização a sondas de gênero e um subconjunto selecionado de sondas específicas para espécie. Em formato de kit, por exemplo, pode ser desejável incluir um plasmídio de controle positivo para distinguir entre tuberculose de outra espécie, além de incluir um plasmídio de controle positivo contendo as seqüências KY178-KY181 (SEQ ID NOS. 24-27).

#### Seqüências Oligonucleotídicas

##### KY178 - SEQ. ID NO. 24

5'	CCATCGATAG	GACCATTCTG	CGCATGTGGT
	TAGGACCACA	GGACACATGA	AGGCTCACTT
	CACTTGGCGC	ATGCCTTGTG	GTGGAAAGCT

KY179 - SEQ. ID NO. 25

5'	TGCCTTGGAA	GCTTTCACC	ACAAGGCATG
	CAACCCACAA	AGTGAGCCTT	CATGTGTCCT
	ACCCACCACA	CCACATGCGC	AGAATGGTCC

KY180 - SEQ. ID NO. 26

5	5'	CCGCTCGAGA	CGGGATGCAT	GTCTTGTTGGT
		CTTTAGGCGC	ATGTCTTTAG	GTGGAAAGCT
		CTGGTGGAAA	GCTTTTGCAT	CGATGG 3'

KY181 - SEQ. ID NO. 27

10	5'	CCATCGATGC	AAAAGCTTTC	CACCAGAAGA
		TCCACCTAA	AGACATGCGC	CTAAAGTTAC
		CAAGACATGC	ATCCCGTCTC	GAGCGG 3'

Exemplo 10Uso do Plasmídio de Controle Positivo

Um uso do plasmídio de controle positivo é para monitorizar a eficiência da amplificação em qualquer experimento específico. Nessas aplicações, fazem-se diluições seriadas do plasmídio de controle positivo. Podem-se usar números conhecidos de cópias do plasmídio como modelos em reações de amplificação. O menor número de moléculas de DNA de plasmídio que pode ser amplificado dá uma medida da eficiência da reação de amplificação. Outro uso do plasmídio de controle positivo é gerar produtos que possam ser usados para monitorizar a eficiência com que as sondas específicas para gênero e espécie detectam DNA micobacteriano. Os produtos de amplificação gerados como acima podem servir como substrato na reação de hibridização. A geração dos sinais de hibridização apropriados permite uma verificação de como as sondas são capazes de

detectar DNA micobacteriano.

LISTAGEM DE SEQÜÊNCIA

- INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:1:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SEQÜÊNCIA:

5 (A) COMPRIMENTO: 23 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucléico

(C) TIPO DE FITA: simples

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genômico)

10 (xi) DESCRIÇÃO DE SEQÜÊNCIA: SEQ ID NO:1:

CACATGCAAG TCGAACGGAA AGG 23

- FORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:2:

15 (i) CARACTERÍSTICAS DE SEQÜÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucléico

(C) TIPO DE FITA: simples

(D) TOPOLOGIA: linear

20 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genômico)

(xi) DESCRIÇÃO DE SEQÜÊNCIA: SEQ ID NO:2:

GCCCGTATCG CCCGCACGCT CACA 24

25 - INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:3:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SEQÜÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 30 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucléico

(C) TIPO DE FITA: simples

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genômico)

(xi) DESCRIÇÃO DE SEQÜÊNCIA: SEQ ID NO:3:

5

TCGCGTTGTT CGTGAAATCT CACGGCTTAA 30

- INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:4:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SEQÜÊNCIA:

10

(A) COMPRIMENTO: 30 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucléico

(C) TIPO DE FITA: simples

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genômico)

15

(xi) DESCRIÇÃO DE SEQÜÊNCIA: SEQ ID NO:4:

TCGCGTTGTT CGTGAAAAC TACAGCTTAA 30

- INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:5:

20

(i) CARACTERÍSTICAS DE SEQÜÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 36 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucléico

(C) TIPO DE FITA: simples

(D) TOPOLOGIA: linear

25

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genômico)

(xi) DESCRIÇÃO DE SEQÜÊNCIA: SEQ ID NO:5:

ACGGGATGCA TGTCTTGTGG TGGAAAGCGC TTTAGC 36

- INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:6:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SEQÜÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 30 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucléico

5 (C) TIPO DE FITA: simples

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genômico)

(xi) DESCRIÇÃO DE SEQÜÊNCIA: SEQ ID NO:6:

10 ACTTGGCGCA TGCCTTGTGG TGGAAAGCTT 30

- INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:7:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SEQÜÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 30 pares de bases

15 (B) TIPO: ácido nucléico

(C) TIPO DE FITA: simples

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genômico)

(xi) DESCRIÇÃO DE SEQÜÊNCIA: SEQ ID NO:7:

20 TTTAGGCGCA TGTCTTTAGG TGGAAAGCTT 30

- INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:8:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SEQÜÊNCIA:

25 (A) COMPRIMENTO: 34 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucléico

(C) TIPO DE FITA: simples

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genômico)

(xi) DESCRIÇÃO DE SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:8:

TCAAGACGCA TGTCTTCTGG TGGAAAGCTT TTGC 34

5

- INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:9:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 30 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucléico

10 (C) TIPO DE FITA: simples

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genômico)

(xi) DESCRIÇÃO DE SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:9:

15

TCCCGAAGTC CAGGCCAGAT TGCCCACGTG 30

- INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:10:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 30 pares de bases

20 (B) TIPO: ácido nucléico

(C) TIPO DE FITA: simples

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genômico)

(xi) DESCRIÇÃO DE SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:10:

25

GAAGGCTCAC TTTGTGGGTT GACGGTAGGT 30

- INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:11:

## (i) CARACTERÍSTICAS DE SEQÜÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 30 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucléico

(C) TIPO DE FITA: simples

5 (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genômico)

(xi) DESCRIÇÃO DE SEQÜÊNCIA: SEQ ID NO:11:

GCAATCTGCC TGCACACCGG GATAAGCCTG 30

10

## - INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:12:

## (i) CARACTERÍSTICAS DE SEQÜÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 34 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucléico

15 (C) TIPO DE FITA: simples

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genômico)

(xi) DESCRIÇÃO DE SEQÜÊNCIA: SEQ ID NO:12:

20 GGGTCTAATA CCGAATAGGA CCACAGGACA CATG 34

## - INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:13:

## (i) CARACTERÍSTICAS DE SEQÜÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 30 pares de bases

25 (B) TIPO: ácido nucléico

(C) TIPO DE FITA: simples

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genômico)

(xi) DESCRIÇÃO DE SEQÜÊNCIA: SEQ ID NO:13:

TCGCGTTGTT CGTGAAATCT CACAGCTTAA 30

5 - INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:14:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SEQÜÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 30 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucléico

(C) TIPO DE FITA: simples

10 (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genômico)

(xi) DESCRIÇÃO DE SEQÜÊNCIA: SEQ ID NO:14:

TCGCGTTGTT CGTGGAATCT CACAGCTTAA 30

15

- INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:15:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SEQÜÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 30 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucléico

20 (C) TIPO DE FITA: simples

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genômico)

(xi) DESCRIÇÃO DE SEQÜÊNCIA: SEQ ID NO:15:

25

TCGCGTTGTT CGTGGAATGC CACAGCTTAA 30

- INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:16:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SEQÜÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 30 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucléico
- (C) TIPO DE FITA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

- 5 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genômico)
- (xi) DESCRIÇÃO DE SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:16:

ATAGGACCAT TCTGCGCATG TGGTGTGGTG 30

- 10 - INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:17:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 24 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucléico
- (C) TIPO DE FITA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

- 15 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genômico)

- (xi) DESCRIÇÃO DE SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:17:

ACCTCAAGAC GCATGTCTTC TGGT 24

- 20 - INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:18:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 24 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucléico
- (C) TIPO DE FITA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

- 25 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genômico)

- (xi) DESCRIÇÃO DE SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:18:

CCGAATAGGA CCACAGGACA CATG 24

- INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:19:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SEQÜÊNCIA:

5 (A) COMPRIMENTO: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucléico

(C) TIPO DE FITA: simples

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genômico)

10 (xi) DESCRIÇÃO DE SEQÜÊNCIA: SEQ ID NO:19:

ACCTTTAGGC GCATGTCTTT AGGT 24

- INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:20:

15 (i) CARACTERÍSTICAS DE SEQÜÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 30 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucléico

(C) TIPO DE FITA: simples

(D) TOPOLOGIA: linear

20 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genômico)

(xi) DESCRIÇÃO DE SEQÜÊNCIA: SEQ ID NO:20:

AACACTTGGC GCATGCCTTG TGGT 24

25 - INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:21:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SEQÜÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucléico

(C) TIPO DE FITA: simples

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genômico)

(xi) DESCRIÇÃO DE SEQÜÊNCIA: SEQ ID NO:21:

5

GAAGGCTCAC TTTGTGGGTT GACG 24

- INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:22:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SEQÜÊNCIA:

10

(A) COMPRIMENTO: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucléico

(C) TIPO DE FITA: simples

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genômico)

15

(xi) DESCRIÇÃO DE SEQÜÊNCIA: SEQ ID NO:22:

TGTGGTGGAA AGCGCTTTAG CGGT 24

- INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:23:

20

(i) CARACTERÍSTICAS DE SEQÜÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucléico

(C) TIPO DE FITA: simples

(D) TOPOLOGIA: linear

25

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genômico)

(xi) DESCRIÇÃO DE SEQÜÊNCIA: SEQ ID NO:23:

AGGACCATTC TGCGCATGTG GTGT 24

## - INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:24:

## (i) CARACTERÍSTICAS DE SEQÜÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 139 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucléico

5 (C) TIPO DE FITA: simples

(D) TOPOLOGIA: linear

## (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genômico)

## (xi) DESCRIÇÃO DE SEQÜÊNCIA: SEQ ID NO:24:

10 CCATCGATAG GACCATTCTG CGCATGTGGT GTGGTGGGTC TAATACCGAA  
 TAGGACCACA 60  
 GGACACATGA AGGCTCACTT TGTGGGTTGA CGGTAGGTAA CACTTGGCGC  
 ATGCCTTGTG 120  
 GTGGAAAGCT TCCAAGGCA 139

15

## - INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:25:

## (i) CARACTERÍSTICAS DE SEQÜÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 139 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucléico

20 (C) TIPO DE FITA: simples

(D) TOPOLOGIA: linear

## (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genômico)

## (xi) DESCRIÇÃO DE SEQÜÊNCIA: SEQ ID NO:25:

25 TGCCTTGGA GCTTTCCACC ACAAGGCATG CGCCAAGTGT TACCTACCGT  
 CAACCCACAA 60  
 AGTGAGCCTT CATGTGTCCT GTGGTCCTAT TCGGTATTAG ACCCACCACA  
 CCACATGCGC 120

AGAATGGTCC TATCGATGG 139

- INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:26:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SEQÜÊNCIA:

- 5 (A) COMPRIMENTO: 126 pares de bases  
 (B) TIPO: ácido nucléico  
 (C) TIPO DE FITA: simples  
 (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genômico)

10 (xi) DESCRIÇÃO DE SEQÜÊNCIA: SEQ ID NO:26:

CCGCTCGAGA CGGGATGCAT GTCTTGTGGT GGAAAGCGCT TTAGCGGTAA

CTTTAGGCGC 60

ATGTCTTTAG GTGGAAAGCT TAACTCAAGA CGCATGTCTT CTGGTGGAAA

15 GCTTTTGCAT 120

CGATGG 126

- INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:27:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SEQÜÊNCIA:

- 20 (A) COMPRIMENTO: 126 pares de bases  
 (B) TIPO: ácido nucléico  
 (C) TIPO DE FITA: simples  
 (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genômico)

25 (xi) DESCRIÇÃO DE SEQÜÊNCIA: SEQ ID NO:27:

CCATCGATGC AAAAGCTTTC CACCAGAAGA CATGCGTCTT GAGTTAAGCT

TTCCACCTAA 60

AGACATGCGC CTAAAGTTAC CGCTAAAGCG CTTTCCACCA CAAGACATGC  
ATCCCGTCTC 120  
GAGCGG 126

5 - INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:28:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SEQÜÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 29 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucléico

(C) TIPO DE FITA: simples

10 (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genômico)

(xi) DESCRIÇÃO DE SEQÜÊNCIA: SEQ ID NO:28:

GCGGTACCTG CACACAGGCC ACAAGGGAA 29

15

- INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:29:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SEQÜÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 31 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucléico

20 (C) TIPO DE FITA: simples

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genômico)

(xi) DESCRIÇÃO DE SEQÜÊNCIA: SEQ ID NO:29:

25

CGCCTGCAGT TAACACATGC AAGTCGAACG 31

## REIVINDICAÇÕES

1. Processo para a detecção e identificação opcional de ácido nucléico micobacteriano contido em uma amostra, caracterizado pelo fato de compreender:

5           (a) amplificação de uma região do dito ácido nucléico de um gene RNA ribossômico 16S, ou o correspondente RNA de uma espécie micobacteriana, utilizando o par de iniciadores KY18 (SEQ ID N° 1) e KY75 (SEQ ID N° 2) como seqüência de hibridização;

10           (b) mistura do dito ácido nucléico amplificado na etapa (a) com pelo menos uma sonda oligonucleotídica capaz de hibridizar na região alvo do gene RNA ribossômico 16S ou o correspondente RNA de uma espécie micobacteriana amplificada na etapa (a); e

15           (c) detecção de híbridos formados entre o dito ácido nucléico e a dita sonda.

2. Processo para detecção e identificação opcional de uma micobactéria contida em uma amostra, caracterizado pelo fato de compreender:

20           (a) amplificação de uma região de ácido nucléico de um gene RNA ribossômico 16S da dita micobactéria, ou o correspondente RNA de uma espécie micobacteriana, em que o primeiro oligonucleotídico iniciador consiste na se-

seqüência KY18 (SEQ ID Nº 1) e o segundo oligonucleotídico iniciador } [consiste] da seqüência KY75 (SEQ ID Nº 2) como seqüência de hibridização;

(b) mistura do dito ácido nucléico amplificado na  
5 etapa (a) com uma amostra oligonucleotídica capaz de hibridização na região alvo do gene RNA ribossômico 16S ou o correspondente RNA de uma espécie micobacteriana amplificada na etapa (a); e

(c) detecção de híbridos formados entre o dito ácido  
10 nucléico e as ditas sondas.

3. Processo de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que a amplificação é conseguida por uma reação em cadeia de polimerase.

4. Processo de acordo com a reivindicação 1 ou  
15 2, caracterizado pelo fato de que a dita amostra oligonucleotídica é capaz de hibridizar em uma região que é conservada na região alvo.

5. Processo de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que a dita sonda oligonucleotídica contém a seqüência KY101 (SEQ ID Nº 3).  
20

6. Processo de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que a dita sonda oligonucleotídica contém a seqüência KY102 (SEQ ID Nº 4).

7. Processo de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que a seqüência de hibridização  
25 da dita sonda oligonucleotídica não é idêntica à de seqüência de gene RNA ribossômico 16S da espécie micobacteriana a ser detectada em que a dita seqüência hibridizan-

te é capaz de hibridizar a dita seqüência de gene não idêntica.

8. Processo de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que a sonda da seqüência hibridizante contém a seqüência KY165 (SEQ ID N° 13).

9. Processo de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que a dita sonda da seqüência hibridizante contém a seqüência KY166 (SEQ ID N° 14).

10. Processo de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que a seqüência hibridizante da dita sonda oligonucleotídica é capaz de hibridizar a uma região que é variável com a região alvo.

11. Processo de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que a dita sonda de seqüência hibridizante contém uma seqüência KY21 (SEQ ID NO. 5), KY25 (SEQ ID NO. 6), KY26 (SEQ ID NO. 7), KY63 (SEQ ID NO. 8), KY151 (SEQ ID NO. 9), KY106 (SEQ ID NO. 10), KY126 (SEQ ID NO. 11), KY139 (SEQ ID NO. 12), KY157 (SEQ ID NO. 16), KY167 (SEQ ID NO. 17), KY168 (SEQ ID NO. 18), KY169 (SEQ ID NO. 19), KY170 (SEQ ID NO. 20), KY171 (SEQ ID NO. 21), KY172 (SEQ ID NO. 22) e KY173 (SEQ ID NO. 23).

12. Processo de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que um painel de sondas oligonucleotídicas é usado compreendendo pelo menos duas sondas oligonucleotídicas contendo uma seqüência selecionada do grupo que consiste nas seqüências KY21 (SEQ ID NO. 5), KY25 (SEQ ID NO. 6), KY26 (SEQ ID NO. 7), KY63 (SEQ ID

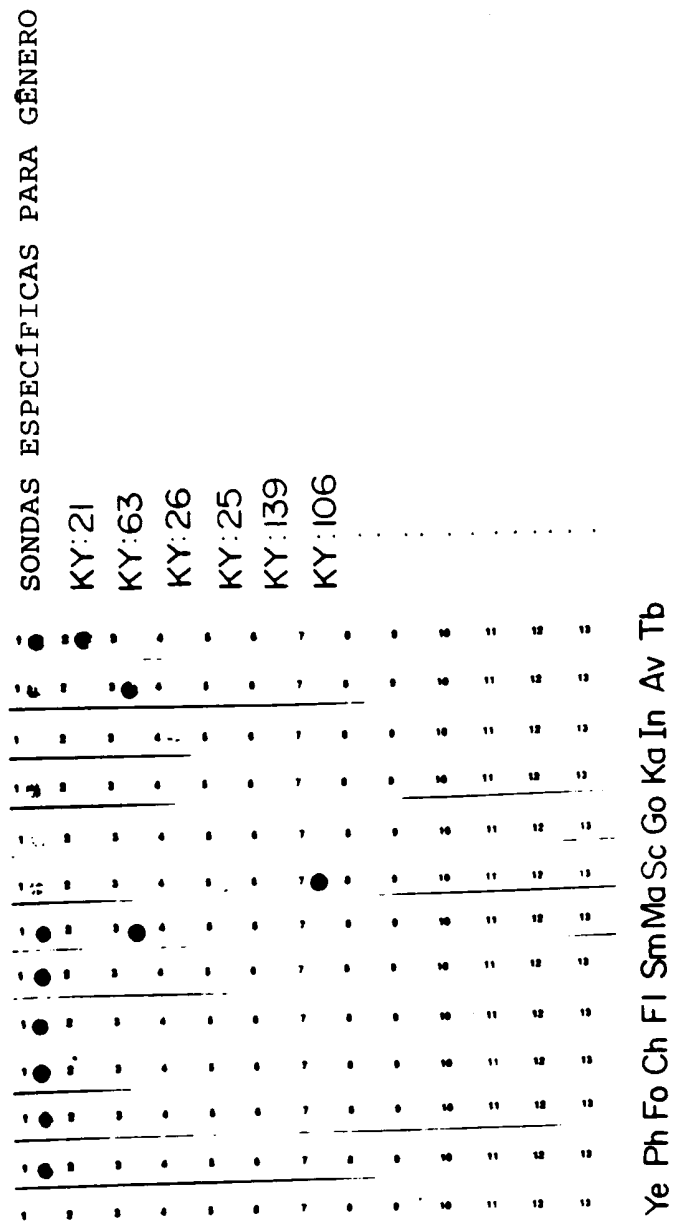
NO. 8), KY151 (SEQ ID NO. 9), KY106 (SEQ ID NO. 10),  
KY126 (SEQ ID NO. 11), KY139 (SEQ ID NO. 12), KY157 (SEQ  
ID NO. 16), KY167 (SEQ ID NO. 17), KY168 (SEQ ID NO. 18),  
KY169 (SEQ ID NO. 19), KY170 (SEQ ID NO. 20), KY171 (SEQ  
5 ID NO. 21), KY172 (SEQ ID NO. 22) e KY173 (SEQ ID NO.  
23).

13. Processo de acordo com a reivindicação 1 ou  
2, caracterizado pelo fato de que durante a amplificação  
está presente um controle interno positivo oligonucleotí-  
10 dico, cujas seqüências compreendem uma seqüência oligonu-  
cleotídica não natural flanqueada por uma seqüência de  
ácido nucléico selecionada do grupo que consiste em  
KY18 (SEQ ID N° 1) e KY75 (SEQ ID N° 2).

14. Processo de acordo com a reivindicação 13,  
15 caracterizado pelo fato de que a dita seqüência de con-  
trole positivo oligonucleotídico compreende ainda uma das  
seqüências KY101 (SEQ ID N° 3), KY102 (SEQ ID N° 4), KY165  
(SEQ ID N° 13) e KY166 (SEQ ID N° 14).

15. Processo de acordo com a reivindicação 14,  
20 caracterizado pelo fato de que a dita seqüência positiva  
de controle oligonucleotídico compreende ainda uma das  
seqüências KY21 (SEQ ID NO. 5), KY25 (SEQ ID NO. 6), KY26  
(SEQ ID NO. 7), KY63 (SEQ ID NO. 8), KY151 (SEQ ID NO.  
9), KY106 (SEQ ID NO. 10), KY126 (SEQ ID NO. 11), KY139  
25 (SEQ ID NO. 12), KY157 (SEQ ID NO. 16), KY167 (SEQ ID NO.  
17), KY168 (SEQ ID NO. 18), KY169 (SEQ ID NO. 19), KY170  
(SEQ ID NO. 20), KY171 (SEQ ID NO. 21), KY172 (SEQ ID NO.  
22) e KY173 (SEQ ID NO. 23).

FIG. 1



## RESUMO

Patente de Invenção: **"PROCESSOS PARA DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO OPCIONAL DE ÁCIDO NUCLÉICO MICOBACTERIANO E DE MICOBACTÉRIA"**.

5           Ativadores e sondas podem ser usados para detectar ácido nucléico de micobactérias em uma amostra e determinar a espécie da qual se origina o ácido nucléico. Os ativadores amplificam regiões do gene RNA ribossômico 16S e se hibridizam a regiões conservadas entre espécies.

10   Sondas específicas para gênero se hibridizam a seqüências dentro da região amplificada conservada entre espécies micobacterianas, ao passo que as sondas específicas para espécie se hibridizam a uma região variável, de modo que a identidade da espécie pode ser determinada de maneira

15   única. Sondas de consenso para a detecção de ácidos nucléicos micobacterianos são fornecidas, essas sondas não sendo idênticas a nenhuma das seqüências das espécies micobacterianas.