(11) Número de Publicação: **PT 103729 A**

(51) Classificação Internacional:
C12Q 1/68 (2006.01)

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

(22) Data de pedido: **2007.05.04**

(30) Prioridade(s):

(43) Data de publicação do pedido: **2008.11.04**

(45) Data e BPI da concessão: /

(73) Titular(es):
STAB VIDA - INVESTIGAÇÃO E SERVIÇOS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, LDA.
APARTADO 89, SANTO ANTÓNIO DE OEIRAS
2781-601 OEIRAS **PT**

(72) Inventor(es):
ISABEL MARIA SPENCER VIEIRA MARTINS **PT**
ALCINO ORFEU DE LEÃO FLORES **PT**
JOÃO INÁCIO **PT**

(74) Mandatário:
MARIA SILVINA VIEIRA PEREIRA FERREIRA
RUA CASTILHO, N.º 50, 5º - ANDAR 1269-163 LISBOA **PT**

(54) Epígrafe: **ESTOJO E PROCESSO PARA A DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS DE INTERESSE CLÍNICO, ATRAVÉS DE UMA AMPLIFICAÇÃO ISOTÉRMICA DE ADN SEGUIDA DE HIBRIDAÇÃO COM OLIGONUCLEÓTIDOS ESPECÍFICOS, E RESPECTIVAS UTILIZAÇÕES.**

(57) Resumo:
A PRESENTE INVENÇÃO RELACIONA-SE COM UM PROCESSO PARA A DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS DE INTERESSE CLÍNICO ATRAVÉS DA UTILIZAÇÃO DE UMA TÉCNICA DE AMPLIFICAÇÃO ISOTÉRMICA DE ADN, QUE UTILIZA OLIGONUCLEÓTIDOS INICIADORES NÃO ESPECÍFICOS PARA AMPLIFICAR UMA REGIÃO DO ADN RIBOSSÓMICO (P.E. DO RADN 265), SEGUIDA DE HIBRIDAÇÃO REVERSA DOS PRODUTOS MARCADOS (P.E. COM DIGOXIGENINA) COM UM PAINEL DE SONDAS DE OLIGONUCLEÓTIDOS (P.E. IMOBILIZADOS NUM SUPORTE SÓLIDO COMO UMA MEMBRANA DE NYLON) ESPECÍFICAS PARA CADA UMA DAS ESPÉCIES. A OCORRÊNCIA DE HIBRIDAÇÃO É SEGUIDAMENTE DETECTADA POR UM MÉTODO COLORIMÉTRICO. A PRESENTE INVENÇÃO RELACIONA-SE IGUALMENTE COM O DESENVOLVIMENTO DE UM ESTOJO, PARA A DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS COM RELEVÂNCIA CLÍNICA, BASEADO NO REFERIDO PROCESSO. DESTA FORMA, O PRESENTE INVENTO É ÚTIL NA DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS RELACIONADAS COM INFECÇÕES COM A VANTAGEM DE SE REVELAR UM MÉTODO SIMPLES, RÁPIDO, FIÁVEL E DE BAIXO CUSTO, PODENDO SER APLICADO NA ÁREA CLÍNICA, FARMACÊUTICA, VETERINÁRIA, ALIMENTAR E BIOTECNOLÓGICA.

RESUMO

"ESTOJO E PROCESSO PARA A DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS DE INTERESSE CLÍNICO, ATRAVÉS DE UMA AMPLIFICAÇÃO ISOTÉRMICA DE ADN SEGUIDA DE HIBRIDAÇÃO COM OLIGONUCLEÓTIDOS ESPECÍFICOS, E RESPECTIVAS UTILIZAÇÕES"

A presente invenção relaciona-se com um processo para a detecção e identificação de leveduras de interesse clínico através da utilização de uma técnica de amplificação isotérmica de ADN, que utiliza oligonucleótidos iniciadores não específicos para amplificar uma região do ADN ribossómico (p.e. do rADN 26S), seguida de hibridação reversa dos produtos marcados (p.e. com digoxigenina) com um painel de sondas de oligonucleótidos (p.e. imobilizados num suporte sólido como uma membrana de nylon) específicas para cada uma das espécies. A ocorrência de hibridação é seguidamente detectada por um método colorimétrico.

A presente invenção relaciona-se igualmente com o desenvolvimento de um estojo, para a detecção e identificação de leveduras com relevância clínica, baseado no referido processo.

Desta forma, o presente invento é útil na detecção e identificação de leveduras relacionadas com infecções com a vantagem de se revelar um método simples, rápido, fiável e de baixo custo, podendo ser aplicado na área clínica, farmacêutica, veterinária, alimentar e biotecnológica.

DESCRIÇÃO

"ESTOJO E PROCESSO PARA A DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS DE INTERESSE CLÍNICO, ATRAVÉS DE UMA AMPLIFICAÇÃO ISOTÉRMICA DE ADN SEGUIDA DE HIBRIDAÇÃO COM OLIGONUCLEÓTIDOS ESPECÍFICOS, E RESPECTIVAS UTILIZAÇÕES"

Domínio técnico da invenção

A presente invenção relaciona-se com um estojo e um processo para a detecção e identificação de leveduras de interesse clínico, mediante a utilização de uma técnica optimizada de amplificação isotérmica de ADN seguida de hibridação reversa com oligonucleótidos específicos e uma detecção colorimétrica da ocorrência de hibridação, tendo assim aplicação nas áreas médica, farmacêutica, veterinária, alimentar e biotecnológica.

Sumário da invenção

A presente invenção relaciona-se com um processo para a detecção e identificação de leveduras de interesse clínico através da utilização de uma técnica de amplificação isotérmica de ADN, preferencialmente baseada na amplificação isotérmica de ADN mediada por estruturas semicirculares (LAMP - "Loop-Mediated Isothermal DNA Amplification").

O processo descrito na invenção utiliza oligonucleótidos iniciadores não específicos para amplificar uma região do ADN ribossómico (p.e. do rADN 26S) de uma gama variada de espécies de leveduras, em que ocorre simultaneamente a marcação dos fragmentos de ADN amplificados com uma molécula marcadora (p.e. digoxigenina), seguida de hibridação reversa dos produtos de amplificação marcados

com um painel de oligonucleótidos específicos para as diferentes espécies, imobilizados numa superfície sólida (p.e. membrana de nylon), e detecção colorimétrica da ocorrência de hibridação.

A presente invenção relaciona-se igualmente com o desenvolvimento de um estojo, para a detecção e identificação de leveduras com relevância clínica, baseado no referido processo.

Desta forma, o presente invento é útil na detecção e identificação de leveduras relacionadas com infecções com a vantagem de se revelar um método simples, rápido e de baixo custo, podendo ser aplicado na área médica e farmacêutica.

Antecedentes da invenção

A ocorrência de micoses nosocomiais invasivas, em doentes imunocomprometidos, tem crescido progressivamente em anos recentes (Martin *et al.* 2003). As leveduras do género *Candida* são os agentes etiológicos mais frequentes deste tipo de infecções, com grande prevalência de *C. albicans*. No entanto, outras leveduras, como por exemplo *C. parapsilosis* e *C. glabrata*, ocorrem como organismos patogénicos oportunistas associados a infecções sistémicas, colocando dificuldades relacionadas com as diferentes susceptibilidades destas leveduras no que respeita às terapias antifúngicas (Hobson 2003).

Desta forma, o desenvolvimento de um sistema fiável e de rápida identificação destas leveduras patogénicas revela-se ser da maior importância, de modo a melhorar a gestão da doença e a selecção do tratamento mais adequado.

A identificação corrente de leveduras, em laboratório, geralmente envolve a análise das suas características fenotípicas, o que se reconhece ser um procedimento trabalhoso, moroso e dispendioso, não fornecendo por vezes, para além disso, resultados fiáveis. Estes microrganismos são ainda difíceis de cultivar a partir de algumas amostras clínicas, como o sangue e a urina, sendo que as metodologias tradicionais e correntemente utilizadas no diagnóstico clínico envolvem o isolamento e a cultura destes organismos. De realçar que o isolamento de *Candida* a partir de amostras de sangue é presuntivo de infecção invasiva, embora em apenas 20% dos doentes com candidémia se conseguem obter hemoculturas destas leveduras.

A presença de anticorpos específicos no soro contra *Candida* é também usado como critério de diagnóstico, mas está associada a estes processos uma baixa sensibilidade, entre outras razões porque os doentes imunocomprometidos apresentam dificuldades em gerar uma resposta imunitária. Os métodos serológicos não têm também permitido a diferenciação entre as várias espécies.

As técnicas de diagnóstico baseadas em PCR (reacção em cadeia de polimerase) têm evoluído mas a sua implementação, ao nível da rotina laboratorial, ainda não se encontra estabelecida. Esta situação deve-se, muito possivelmente, ao facto de que esta técnica requer equipamento dispendioso e sofisticado (p.e. termociclador).

Vários grupos têm desenvolvido tecnologias alternativas de amplificação de ácidos nucleicos como forma de ultrapassar a etapa limitante de PCR. Neste sentido, o desenvolvimento de um processo de amplificação isotérmica revela-se de

particular interesse, uma vez que poderá facilitar a sua integração em estojos de diagnóstico a usar p.e. em ambulatório ou em locais de menores recursos financeiros (estojos POC - "Point Of Care").

Uma destas tecnologias é a amplificação isotérmica de ADN mediada por estruturas semi-circulares (LAMP - *Loop-Mediated Isothermal DNA Amplification*), descrita inicialmente por Notomi *et al.* (2000) (ver também documento EP 1 020 534 A1 - "Process for synthesizing nucleic acid"). Desde então, foram descritos vários desenvolvimentos a esta elegante, robusta e muito promissora técnica de amplificação isotérmica de ADN (Mori *et al.* 2001, 2004, 2006; Nagamine *et al.* 2001, 2002).

A técnica LAMP baseia-se na síntese de ADN usando oligonucleótidos iniciadores que reconhecem pelo menos seis sequências distintas no ADN, e uma polimerase de ADN sem actividade exonucleotídica.

A reacção decorre na presença de ADN molde e dNTPs (desoxirribonucleótidos trifosfatados), usualmente em menos de 90 minutos a uma temperatura constante (ex. entre 60 e 65°C). Os produtos finais de amplificação apresentam repetições invertidas alternadas da sequência-alvo, sendo visualizados como um perfil do tipo marcador de pesos moleculares de ADN quando submetidos a uma electroforese em gel de agarose.

A técnica LAMP proporciona uma elevada eficiência de amplificação, sendo o ADN amplificado cerca de 10^9 a 10^{10} vezes, com um limite de detecção e especificidade comparável à técnica PCR. Para além disso, a sensibilidade

da técnica LAMP não é, aparentemente, afectada pela presença de ADN não-alvo em amostras, sendo este método ainda mais tolerante à presença de reconhecidos inibidores de PCR, como p.e. os presentes no soro sanguíneo (Kaneko *et al.* 2007).

O elevado potencial da tecnologia LAMP para o desenvolvimento de estojos de diagnóstico molecular, pela sua simplicidade e evitando o recurso a equipamento sofisticado, justifica o crescente número de documentos que relatam a utilização desta técnica para a detecção e identificação de organismos com relevância clínica e biotecnológica (Tabela 1). Tem sido enfatizado o diagnóstico de infecções bacterianas e virais. No entanto, também foram objecto de atenção parasitas como por ex. o *Plasmodium falciparum* e *Trypanosoma* spp., bem como fungos filamentosos, tais como *Paracoccidioides brasiliensis* e *Ochroconis gallopava*. Resultados anteriores sobre técnicas isotérmicas de amplificação de ácidos nucleicos em leveduras são baseados na tecnologia NASBA (*Nucleic Acid Sequence-Based*) (Borst *et al.* 2001, 2002; Loeffler *et al.* 2003; Widjojoatmdjo *et al.* 1999) e, muito recentemente, foi também publicada a utilização da tecnologia LAMP para a identificação de leveduras de contaminação alimentar como *Dekkera* (Hayashi *et al.* 2007).

Tabela 1. Exemplos de organismos para os quais têm sido desenvolvidos testes de detecção baseados em LAMP

Organismo	**Referência**
Fungos	
Ochroconis gallopava	Ohori *et al.* (2006)
Paracoccidioides brasiliensis	Endo *et al.* (2004)
Dekkera/Brettanomyces	Hayashi et al. (2007)
Parasitas	
Plasmodium falciparum	Poon *et al.* (2005)
Trypanosoma spp.	Kuboki *et al.* (2003); Thekisoe *et al.* (2005)
Bactérias	
Bordetella pertussis	Kamachi *et al.* (2006)
Clostridium difficile	Kato *et al.* (2005)
Escherichia coli	Maruyama *et al.* (2003); Song *et al.* (2005); Yano *et al.* (2007)
Haemophilus influenzae	Torigoe *et al.* (2007)
Helicobacter pylori	Minami *et al.* (2006)
Legionella spp.	Furuhata *et al.* (2005)
Mycobacterium spp.	Enosawa *et al.* (2003); Mukai *et al.* (2006); Iwamoto *et al.* (2003)
Mycoplasma pneumoniae	Saito *et al.* (2005)
Nitrosomonas europaea	Aoi *et al.* (2006)
Porphyromonas gingivalis	Maeda *et al.* (2005); Yoshida *et al.* (2005)
Salmonella enterica	Hara-Kudo *et al.* (2005); Ohtsuka *et al.* (2005)
Shigella spp.	Song *et al.* (2005)
Streptococcus pneumoniae	Seki *et al.* (2005)
Yersinia pseudotuberculosis	Horisaka *et al.* (2004)
Vírus	
Citomegalovírus	Suzuki *et al.* (2006)
Vírus do Dengue	Parida *et al.* (2005)
Vírus da Gripe Aviaria H5N1	Imai *et al.* (2006)
Vírus da Gripe Humana	Nakagawa e Ito (2006)
Vírus do Herpes Koi	Yoshino *et al.* (2006);

	Gunimaladevi *et al.* (2004)
Vírus do Sarampo	Fujino *et al.* (2005)
Vírus da Papeira	Okafuji *et al.* (2005)
Norovirus	Fukuda *et al.* (2006)
Vírus da Batata Y	Nie (2005)
Coronavírus do Síndroma Respiratório Agudo	Thai *et al.* (2004)
Vírus do Nilo Oeste	Parida *et al.* (2004)

Têm sido desenvolvidos vários métodos para a detecção e/ou identificação de fungos patogénicos, incluindo de leveduras, baseados na amplificação de ácidos nucleicos, principalmente por PCR, seguido de electroforese em gel de agarose, hibridação com sondas de ADN específicas, ou qualquer outro método para a detecção de amplificação e/ou diferenciação dos produtos amplificados. Têm sido descritos oligonucleótidos, universais ou específicos para determinadas espécies, usados em reacções de amplificação e hibridação. Muitos destes oligonucleótidos, e métodos para a sua utilização, têm sido objecto de registo de patentes. Grande parte dos oligonucleótidos desenvolvidos tem como alvo sequências complementares de regiões bastante variáveis do ADN genómico de fungos, como as regiões ITS1 ("Internal Transcribed Spacer" 1) e ITS2 das unidades de rADN (p.e. documentos WO2007038578 - "Compositions and methods for the detection of *Candida* species"; WO2006123295 - DNA fragments, primers and method for amplification of the DNA fragments and kit including the aforementioned primers for the detection and identification of clinically relevant *Candida* species"; US2005260584 - "Nucleic acids for the identification of fungi and methods for using the same"; US2005164243 - "Nucleic acid probes and methods for

detecting clinically important fungal pathogens"; US6017699 - "PCR identification and quantification of important *Candida* species").

Outros métodos descritos desenvolvem oligonucleótidos e sistemas baseados em PCR para a detecção e diferenciação de fungos patogénicos e de genes específicos, como por ex. genes envolvidos na resistência a antibióticos (p.e. documento US2006263810 - "Species-specific, genus-specific and universal DNA probes and amplification primers to rapidly detect and identify common bacterial and fungal pathogens and associated antibiotic resistance genes from clinical specimens for diagnosis in microbiology laboratories")

Um conceito interessante para o desenvolvimento de técnicas de identificação molecular de leveduras, incorporado na presente invenção, consiste na amplificação de um segmento universal de ADN, como por ex. a partir de ADN ribossómico, seguido de hibridação reversa dos produtos com um painel de oligonucleótidos específicos para várias espécies, com uma subsequente detecção colorimétrica da hibridação positiva (p.e. Anthony *et al.* 2000; Martin *et al.* 2000; Playford *et al.* 2006; Posteraro *et al.* 2000).

A presente invenção apresenta a novidade, incorporada no desenvolvimento do conceito anterior, da optimização e utilização de um processo isotérmico de amplificação de ADN, neste caso baseado na tecnologia LAMP, para amplificar e marcar fragmentos de ADN (p.e. com a molécula de digoxigenina) a partir de leveduras patogénicas, fragmentos esses que são usados depois numa hibridação reversa e detecção colorimétrica da ocorrência de hibridação.

O objecto da presente invenção consiste, portanto, no desenvolvimento de um método molecular e estojo para a detecção e identificação de leveduras de relevância clínica, tendo como ponto de partida a simples extracção de ADN genómico ou mesmo directamente a partir de células inteiras. Baseia-se preferencialmente na tecnologia LAMP para a amplificação de ácidos nucleicos, sendo a primeira vez que esta tecnologia é utilizada para amplificar e marcar ADN genómico de leveduras, neste caso com a molécula marcadora digoxigenina.

O conceito utilizado na presente invenção difere dos outros métodos que recorrem à técnica LAMP, e que se encontram actualmente divulgados, uma vez que estes envolvem a utilização de conjuntos de oligonucleótidos iniciadores LAMP específicos para a espécie na detecção e identificação de um único organismo, sendo a presença de produtos de amplificação de ADN indicadora de que a amostra contém esse determinado organismo.

Pelo contrário, na presente invenção considera-se a utilização de um conjunto de oligonucleótidos iniciadores LAMP relativamente conservados, comuns a muitas espécies de fungos, que conduzem à amplificação de um fragmento de ADN comum a uma vasta gama de espécies de leveduras e à sua marcação com uma molécula marcadora (p.e. digoxigenina), usando nucleótidos modificados. Essas espécies, quer de forma individual ou inseridas numa população mista de leveduras, podem ser subsequentemente diferenciadas mediante hibridação reversa dos produtos amplificados com um painel de oligonucleótidos específicos imobilizados num suporte sólido (p.e. membrana de nylon).

Para além disso, as condições de desenvolvimento da reacção LAMP foram optimizadas para este sistema, de forma a permitir uma maior simplicidade de detecção das leveduras em questão.

Descrição geral da invenção

A presente invenção relaciona-se com um processo de detecção e identificação de leveduras de interesse clínico baseado em técnicas de amplificação isotérmica de ADN, em particular da técnica LAMP. O método proporciona uma identificação num período inferior a seis horas e é adaptável a um estojo, desenvolvido a partir deste processo, com aplicação na detecção e identificação de leveduras clinicamente relevantes.

O processo, objecto da presente invenção, compreende a amplificação isotérmica de um fragmento do ADN genómico de leveduras, preferencialmente do gene do ARN ribossómico 26S, que é marcado com uma molécula marcadora durante a reacção de amplificação (p.e. digoxigenina) seguido de hibridação reversa dos produtos com um painel de oligonucleótidos específicos para as várias espécies, com o objectivo de identificar as leveduras ao nível da espécie.

Outro dos aspectos da presente invenção constitui ainda o desenvolvimento de um estojo de diagnóstico molecular para detectar e identificar estes microrganismos a partir de culturas purificadas e, também, directamente a partir de amostras clínicas (ex. amostras de sangue).

Desta forma, pretende-se com a presente invenção, desenvolver ferramentas de rotina, fiáveis, sensíveis, de simples execução e com uma boa relação preço/qualidade,

aplicáveis na área clínica, farmacêutica, veterinária, alimentar e biotecnológica.

Os métodos de diagnóstico molecular, baseados maioritariamente na reacção de PCR, combinam algumas destas características mas implicam a utilização de equipamento e reagentes sofisticados e/ou dispendiosos.

Na presente invenção foi desenvolvida, optimizada e aplicada à detecção e identificação de leveduras a referida metodologia de amplificação isotérmica de ADN, conhecida como LAMP, de forma a ultrapassar as limitações relacionadas com o passo de amplificação através de PCR.

O primeiro, e talvez o passo mais importante na optimização da técnica LAMP, é a concepção do conjunto de oligonucleótidos iniciadores. Em geral, verifica-se pela experiência, que é necessário conceber vários conjuntos de oligonucleótidos iniciadores até que um destes funcione eficientemente na reacção LAMP.

Foram usadas várias espécies de leveduras na optimização da invenção (Tabela 2). Foram seleccionadas oito espécies para estudo sendo o critério de selecção a sua relevância clínica, no que diz respeito a micoses invasivas: *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. lusitaniae*, *C. krusei*, *Pichia anomala* e *Saccharomyces cerevisiae*. As restantes espécies foram usadas como controlo negativo nos testes de detecção e identificação de leveduras.

Tabela 2. Lista das leveduras usadas na presente invenção

Espécie	**Estirpe**	**Origem**
Candida albicans	PYCC 3436^{T}	Pele humana com micose interdigital
	PYCC 2411	Expectoração (Portugal)
	PYCC 2746	Expectoração de doente asmático (Noruega)
	PYCC 4079	Desconhecida
Candida glabrata	PYCC 2418^{T}	Fezes humanas
	PYCC 3109	Tracto digestivo de animal doméstico (Alemanha)
	PYCC 2716	Desconhecido
Candida krusei[a]	PYCC 3341^{T}	Expectoração de doente brônquico (Sri Lanka)
	PYCC 2631	Tracto digestivo de cavalo (Portugal)
	PYCC 4740	Água do mar (Portugal)
Candida lusitaniae[b]	PYCC 2705^{T}	Ceco de porco (Portugal)
	PYCC 4093^{C}	Essência de *Citrus* (Israel)
	PYCC 4175	Desconhecida
Candida maltosa	PYCC 3860^{T}	Tanque de neutralização de glutamato monossódico (Japão)
Candida oleophila	PYCC 4296	Desconhecida
Candida parapsilosis	PYCC 2545^{T}	Caso de psilose (Porto Rico)
	PYCC 5124	Desconhecida
Candida tropicalis	PYCC 3097^{T}	Doente brônquico
	PYCC 4672	Solo próximo de rio poluído (Portugal)
	PYCC 2508	Fígado de elefante (Portugal)
Candida viswanathii	PYCC 2811	Camarão *Peneaus braziliensis* - (Golfo do México)
Kluyveromyces polysporus[d]	PYCC 3887^{T}	Solo (África do Sul)
Lodderomyces	PYCC 4136^{T}	Sumo de laranja concentrado

elongisporus		(EUA)
Pichia anomala	PYCC 4121^{T}	Desconhecida
	PYCC 3294	Pus de pulmão de doente de tuberculose falecido (Itália)
	PYCC 5618	Desconhecida
Saccharomyces bayanus	PYCC 4456^{T}	Cerveja turva
Saccharomyces cerevisiae	PYCC 4455^{T}	Leveduras de produção de cerveja (Holanda)
Saccharomyces exiguus[e]	PYCC 2543^{T}	(Japão)
Saccharomyces paradoxus	PYCC 4570^{T}	Exsudado de árvore
Stephanoascus ciferrii	PYCC 3818	Pescoço de vaca (Holanda)

[a]Sinónimo actual de *Issatchenkia orientalis*; [b]Sinónimo actual de *Clavispora lusitaniae*; [c]T de *Clavispora lusitaniae*; [d]Sinónimo actual de *Vanderwaltozyma polyspora*; [e]Sinónimo actual de *Kazachstania exigua*; PYCC - Colecção Portuguesa de Culturas de Leveduras, Caparica, Portugal; T -estirpe tipo;

Para a extracção do ADN usaram-se células de leveduras cultivadas em meio de cultura MYP (agar, extracto de malte, extracto de levedura e peptona de soja) que foram posteriormente suspendidas em tampão de lise contendo esferas de vidro. Após incubação e ruptura das células, as suspensões foram centrifugadas, sendo o sobrenadante usado para a amplificação do ADN. As soluções de ADN extraído podem ser mantidas durante vários anos, a -20°C, sem degradação aparente.

Os oligonucleótidos iniciadores LAMP, desenvolvidos no âmbito desta invenção, têm como alvo sequências mais ou menos conservadas no interior dos domínios D1/D2 do rARN 26S de fungos. Esta região foi seleccionada devido a ser

frequentemente utilizada em estudos de sistemática e identificação de leveduras, e pela disponibilidade das respectivas sequências em bases de dados de acesso público.

As respectivas sequências são as seguintes:
F3, oligonucleótido iniciador externo directo: Seq. N°1 (5'-GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG-3')
B3, oligonucleótido iniciador externo reverso: Seq. N°2 (5'-CCT TCC CTT TCA ACA ATT TCA C-3');
FIP, oligonucleótido iniciador interno directo: Seq. N°3 (5'-CTG CAT TCC CAA ACA ACT CGA CTC ACA GAG GGT GAG AAT CCC G-3'); e
BIP, oligonucleótido iniciador interno reverso: Seq. N°4 (5'-TAT TGG CGA GAG ACC GAT AGC GTT TCA CTC TCT TTT CAA AGT TC-3').

Os iniciadores foram concebidos de acordo com os procedimentos descritos por Notomi *et al.* (2000).

O conjunto de oligonucleótidos iniciadores LAMP amplificou com sucesso o ADN genómico de todas as leveduras testadas, produzindo os padrões esperados, do tipo marcador de pesos moleculares, em electroforegramas de gel de agarose.

Os oligonucleótidos iniciadores atrás indicados não têm uma sequência-alvo totalmente complementar no rADN de algumas das leveduras clinicamente relevantes testadas (p.e. com *C. krusei*), provocando uma menor sensibilidade da reacção LAMP na amplificação de ADN genómico a partir dessas leveduras. Embora uma menor sensibilidade não constitua um problema na amplificação de ADN a partir de culturas puras, tal como o descrito na presente invenção, isto pode, contudo, criar algumas dificuldades na realização de análises directas a

amostras clínicas, onde podem estar presentes quantidades diminutas de ADN. A utilização de oligonucleótidos iniciadores degenerados ou uma mistura de iniciadores pode constituir uma alternativa viável para ultrapassar este problema.

Os oligonucleótidos específicos (sondas) para as várias espécies foram concebidos tendo como objectivo a identificação de leveduras com interesse clínico, com base na análise comparativa das sequências de rADN 26S recuperadas do GenBank. Este painel de sondas de oligonucleótidos pode ser alargado a espécies adicionais e/ou variantes, eventualmente usando outras regiões do ADN. A Tabela 3 apresenta as sondas usadas no âmbito da presente invenção.

Tabela 3. Sondas de ADN usadas no âmbito da presente invenção

Sonda	**Sequência (5′ → 3′)**	**%GC**[a]	**T_m (°C)**[a]	**Espécies-alvo**
U210	TCG AGT TGT TTG GGA ATG CAG CTC	50.0	65	Panfúngica
Ca170[b]	TGA GAT GAC CCG GGT CTG TGT AAA	50.0	65	*Candida albicans*
Ca176[b]	GAC CCG GGT CTG TGT AAA GTT CC	56.5	66	*C. albicans*
Cg166	GTG GCG AGG GTG TCA GTT CTT TGT	67	54	*C. glabrata*
Cg175	GTG TCA GTT CTT TGT AAA GGG TGC TCG	48.0	68	*C. glabrata*
Cd176[c]	GGC CCG GGT CTA TGT AAA GTT CC	56.5	66	*C. dubliniensis*
Cl180	GAC TCT TTG CAC CGC GGC TCC	66.7	67	*C. lusitaniae*
Ct166	GCG ATG AGA TGA TCC AGG CCT ATG T	67	52	*C. tropicalis*
Ct171[d]	GAG ATG ATC CAG GCC TAT GTA AAG T	44.0	64	*C. tropicalis*

Cp166	GCG ATG AGA TGT CCC AGA CCT ATG	67	54	*C. parapsilosis*
Cp171[e]	GAG ATG TCC CAG ACC TAT GTA AAG TTC	44.4	67	*C. parapsilosis*
Ck175	GGC GGA AGC AGT GAG GCC CTT CT	65.2	70	*C. krusei*
Pa171	GAG ATG CCC ATT CCT ATG TAA GGT GC	68	50	*Pichia anomala*
Pa176[f]	GCC CAT TCC TAT GTA AGG TGC TAT C	48.0	66	*Pichia anomala*
Sc176[g]	GTG CGG TTC TTT GTA AAG TGC CTT CG	50.0	68	*S. cerevisiae*

[a]Dados obtidos com *Oligo Analyzer 1.0.2* (Teemu Kuulasmaa, Universidade de Kuopio, Finlandia); [b]Idêntica em *C. africana* espécie recentemente descrita, e duas discrepâncias com *C. dubliniensis* e *C. viswanathii*; [c]Duas discrepâncias em *C. albicans*; [d]Idêntica em *C. sojae* e uma discrepância em *C. maltosa*; [e]Idêntica em *C. orthopsilosis* e uma discrepância em *C. metapsilosis*, ambas recentemente descritas, e duas discrepâncias com *C. maltosa* e *L. elongisporus*; [f]Idêntica em *P. subpelliculosa*; [g]Duas discrepâncias em *S. bayanus* e *S. paradoxus*.

Adicionalmente, foi concebida uma sonda universal para fungos (U210, Tabela 3). Os alvos para as sondas específicas encontram-se localizados no fragmento amplificado por LAMP.

Todas as sondas foram sintetizadas com seis bases adicionais de timina na extremidade 3', de forma a garantir uma eficiente ligação às membranas de nylon (Brown *et al.* 2000).

Com o objectivo de optimizar a reacção LAMP, para garantir uma elevada sensibilidade e eficácia na detecção de leveduras em amostras clínicas, testou-se diferentes tempos

de incubação, tendo-se obtido melhores resultados usando um período de incubação de 90 minutos, a 64°C, em vez do tradicional período de 60 minutos ou menos.

A mistura de reacção LAMP foi igualmente optimizada para o sistema de identificação da presente invenção e contém os oligonucleótidos iniciadores FIP, BIP, F3 e B3, dNTPs, o ADN molde, betaína, $MgCl_2$ e a polimerase *Bst*. Para a marcação dos produtos de amplificação, 1/40 dos dTTPs encontravam-se na forma de dUTPs marcados com digoxigenina.

Procedeu-se à desnaturação do ADN molde, antes da reacção LAMP. Numa forma preferencial de realização do presente invento, procedeu-se à inactivação térmica da enzima polimerase após a reacção LAMP.

As reacções LAMP foram igualmente realizadas com a adição de suspensões celulares de leveduras directamente à mistura de reacção, sem extracção prévia de ADN genómico.

Para determinação da sensibilidade da reacção LAMP, procedeu-se à quantificação do ADN genómico extraído de *C. albicans* PYCC 3436^T e *C. krusei* PYCC 3341^T, através de electroforese em gel de agarose, com diluições em série usadas como padrão nas reacções LAMP.

O limite de detecção dos produtos da reacção de amplificação isotérmica LAMP foi obtido com cerca de 0,05 e 1 pg de ADN genómico para *C. albicans* e *C. krusei*, respectivamente.

Foi possível confirmar que a reacção LAMP prossegue sem o passo prévio de desnaturação térmica do molde de ADN, o que

torna esta técnica realmente isotérmica. Contudo, verificou-se que a sensibilidade da técnica é significativamente inferior quando se utilizam moldes de ADN não desnaturados comparativamente com os moldes de ADN desnaturados. Este aspecto pode revelar-se crucial na realização de análises directas a partir de amostras clínicas.

Para agilizar o tempo de resposta da identificação, através da eliminação do passo de extracção de ADN, foi testada a utilização de células de leveduras, tratadas termicamente, directamente na mistura reaccional LAMP. Desta forma, foram obtidos produtos de amplificação utilizando 1 a 10 células de levedura na mistura de reacção. A simplicidade destes procedimentos incrementa a potencial importância dos estojos de diagnóstico baseados na técnica LAMP para aplicação em análises clínicas de rotina.

Os produtos de amplificação LAMP marcados com digoxigenina foram hibridados com um painel de sondas de oligonucleótidos específicos para as várias espécies testadas. Assim, as sondas de oligonucleótidos (Tabela 3) foram inicialmente imobilizadas num suporte sólido (como p.e. tiras de membranas de nylon).

Após ligação (*cross-linking*) dos oligonucleótidos às membranas, procedeu-se à sua lavagem para remoção de sondas não ligadas sendo em seguida secas e armazenadas à temperatura ambiente.

Após desnaturação dos fragmentos de ADN amplificados e marcados com digoxigenina, estes foram usados numa reacção

de hibridação com os oligonucleótidos específicos imobilizados nas tiras de nylon, em tampão de hibridação.

A *ocorrência de hibridação foi* detectada mediante a utilização de fosfatase alcalina e de um sistema de detecção colorimétrico.

A hibridação reversa dos fragmentos amplificados por LAMP, marcados com digoxigenina, com as sondas de oligonucleótidos específicas permite a correcta identificação das respectivas espécies de leveduras.

Cada fragmento amplificado por LAMP produziu um sinal visualmente evidente de hibridação com a respectiva sonda específica para a espécie e sonda universal U210 para fungos. Os sinais de hibridação específicos são normalmente fortes embora com diferentes intensidades, dependendo da sonda. Numa forma preferencial de realização do método, é possível estandardizar as intensidades de sinal para todas as sondas, ex. através da modificação da sua concentração e/ou do número de resíduos de timina adicionados na extremidade 3' dos oligonucleótidos específicos.

Uma discrepância interna na sequência da sonda Sc176, em comparação com o alvo complementar, foi suficiente para distinguir espécies muito próximas, tal como o demonstrado pela diferenciação entre *S. cerevisiae* PYCC 4455^T e *S. bayanus* PYCC 4456^T ou *S. paradoxus* PYCC 4570^T, que apenas apresentam sinais fracos de hibridação com essa sonda.

De uma forma geral, os resultados da presente invenção indicam que o desenvolvimento de metodologias de

amplificação isotérmica de ADN, isentas de PCR, terão um enorme impacto na implementação global de estojos de diagnóstico molecular, fiáveis, fáceis de usar e de resposta rápida, para a identificação de microrganismos patogénicos e, em particular, de leveduras infecciosas.

Descrição detalhada da invenção

1. Estirpes de leveduras

As estirpes de leveduras usadas nesta invenção estão listadas na Tabela 2 e encontram-se mantidas na Colecção Portuguesa de Culturas de Leveduras (PYCC), Caparica, Portugal.

Foram seleccionadas oito espécies, sendo o critério de selecção a sua relevância clínica no que diz respeito a micoses invasivas: *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. lusitaniae*, *C. krusei*, *Pichia anomala* e *Saccharomyces cerevisiae*.

As restantes espécies foram utilizadas como controlo negativo nos ensaios de hibridação reversa.

2. Extracção de ADN

As culturas foram cultivadas em agar MYP (0,05% p/v de extracto de levedura, 0,7% de extracto de malte, 0,25% de peptona de soja (*soytone*) e 1,5% de agar) e as células suspendidas em 500 µL de tampão de lise (50 mM Tris, 250 mM NaCl, 50 mM EDTA, 0,3% SDS, pH 8) contendo o equivalente a um volume de 200 µL de esferas de vidro (Ø 425 - 600 µm).

Após agitação em vortex durante 2 minutos, os tubos foram incubados durante 1 hora a 65°C e agitados de novo, em vortex, durante 2 minutos. As suspensões foram então centrifugadas durante 15 minutos a 14.000 rpm, o sobrenadante diluído (1:750) em água esterilizada bi-destilada e a solução final usada directamente para a amplificação de ADN.

As soluções de ADN podem ser mantidas durante vários anos a -20°C, sem degradação aparente.

3. Oligonucleótidos Iniciadores LAMP

Foi concebido um conjunto de oligonucleótidos iniciadores LAMP tendo como alvo sequências relativamente conservadas nos domínios D1/D2 do rARN fúngico 26S, de forma a amplificar um fragmento de 190 pb provenientes de uma vasta gama de espécies de leveduras.

As respectivas sequências são as seguintes:
Seq. 1 - F3, oligonucleótido iniciador externo directo (5'-GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG-3')
Seq. 2 - B3, oligonucleótido iniciador externo reverso (5'-CCT TCC CTT TCA ACA ATT TCA C-3')
Seq.3 - FIP, oligonucleótido iniciador interno directo (5'-CTG CAT TCC CAA ACA ACT CGA CTC ACA GAG GGT GAG AAT CCC G-3'); e
Seq.4 - BIP, oligonucleótido iniciador interno reverso (5'-TAT TGG CGA GAG ACC GAT AGC GTT TCA CTC TCT TTT CAA AGT TC-3').
O conjunto de oligonucleótidos iniciadores é totalmente complementar aos segmentos no interior do rADN 26S de três das espécies em estudo, *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*.

No que diz respeito às outras espécies, o número máximo de substituições nucleotídicas ocorreu para o oligonucleótido iniciador FIP que apresenta cinco substituições, quando comparadas com as sequências de *C. krusei* e *C. lusitaniae*. Os oligonucleótidos iniciadores foram concebidos de acordo com os procedimentos descritos por Notomi *et al.* (2000).

4. Sondas de oligonucleótidos específicas

As sondas de oligonucleótidos específicas para as várias espécies testadas, tendo como objectivo a identificação de leveduras com interesse clínico, foram concebidas com base na análise comparativa das sequências de rADN 26S consultadas no GenBank (Tabela 3).

Adicionalmente, foi concebida uma sonda universal para fungos (U210). Os alvos para as sondas específicas encontram-se localizados no fragmento amplificado por LAMP.

Todas as sondas foram sintetizadas com seis bases de timina adicionais na extremidade 3', de forma a garantir uma eficiente ligação às membranas de nylon.

5. Reacção LAMP

A mistura de reacção LAMP foi optimizada para o sistema de identificação da presente invenção e contém: 1,6 μM de cada oligonucleótido iniciador FIP e BIP; 0,2 μM de cada oligonucleótido iniciador F3 e B3; 900 μM de cada dNTP; 1,4 μl de solução de ADN molde; 0.8 M de betaína; 3 mM de $MgCl_2$; 3,2 U de polimerase *Bst* e respectivo tampão 1× (New England Biolabs).

Para a marcação dos fragmentos de ADN amplificados por LAMP, 1/40 dos dTTPs encontravam-se na forma de dUTPs marcados com digoxigenina.

O ADN molde foi desnaturado a 94°C durante 4 minutos e mantido em gelo antes da reacção LAMP.

A mistura de reacção LAMP foi incubada a 64°C durante 90 minutos num bloco de aquecimento, seguido de um passo opcional que consistiu na manutenção a 80°C, durante 5 minutos, para inactivação da enzima.

Os fragmentos de ADN amplificados foram separados através de electroforese em gel de agarose (1,4%), sendo a detecção efectuada com brometo de etídio.

As reacções LAMP foram igualmente realizadas com a adição de suspensões celulares de leveduras directamente à mistura de reacção (células cultivadas em MYP durante 2 a 5 dias, suspendidas em água e tratadas durante 5 minutos a 99°C).

5. Hibridação reversa

Os fragmentos de ADN amplificados por LAMP e marcados com digoxigenina foram hibridados com um painel de sondas de oligonucleótidos imobilizados numa membrana de nylon. Cada uma das sondas é específica para uma determinada espécie dentre as leveduras com relevância clínica testadas.

As sondas de oligonucleótidos (Tabela 3) foram inicialmente imobilizadas em tiras de nylon (1 × 2 cm; Hybond^{TM}-N, Amersham Pharmacia Biotech) utilizando o procedimento seguinte: 0,3 µl de cada solução aquosa 50 pM da sonda foram colocados numa localização específica da membrana de

nylon, sendo a membrana com as sondas em seguida irradiada com luz UV de ondas curtas durante 2,5 minutos.

Após ligação (*cross-linking*) dos oligonucleótidos às membranas, procedeu-se à sua lavagem em SSC 0,5x (1x SSC corresponde a 1,15 M de NaCl com 0,015 M de citrato de sódio) e 0,1% SDS, durante 2 minutos a 37°C, para remoção de sondas não ligadas.

As tiras foram então secas e armazenadas à temperatura ambiente.

Para a hibridação, cada tira foi colocada num tubo de microcentrífuga de 2 ml, contendo 1 ml de tampão de hibridação pré-aquecido (Dig Easy Hyb; Roche Diagnostics), e incubado com agitação suave a 55°C durante 10 minutos.

Após desnaturação dos fragmentos de ADN amplificados por LAMP e marcados com digoxigenina, a 95°C durante 5 minutos seguidos de arrefecimento em gelo, foram adicionados 4 µl da reacção de mistura ao tubo de microcentrífuga contendo a tira e o tampão de hibridação.

A hibridação foi realizada a 55°C durante 3 horas com agitação suave. A tira foi então removida do tubo e lavada em SSC 0,25× e 0,1% SDS (40 ml para cada conjunto de 30 tiras) a 55°C durante 10 minutos.

A ocorrência de hibridação foi detectada mediante a utilização de fosfatase alcalina e de um sistema de detecção colorimétrico, de acordo com as instruções do fabricante (Dig Labelling and Detection Kit; Roche

Diagnostics). A cor desenvolveu-se entre 5 a 30 minutos a partir do início da reacção.

Bibliografia

Anthony, R. M., T. J. Brown, e G. L. French. 2000. Rapid diagnosis of bacteremia by universal amplification of 23S ribosomal DNA followed by hybridisation to an oligonucleotide array. J. Clin. Microbiol. **38**:781-788.

Aoi, Y., M. Hosogai, e S. Tsuneda. 2006. Real-time quantitative LAMP (loop-mediated isothermal amplification of DNA) as a simple method for monitoring ammonia-oxidizing bacteria. J. Biotechnol. **125**:484-491.

Borst, A., J. Verhoef, E. Boel, e A.C. Fluit. 2002. Clinical evaluation of a NASBA-based assay for detection of *Candida* spp. in blood and blood cultures. Clin. Lab. **48**:487-492.

Borst, A., M. A. Leverstein-Van Hall, J. Verhoef, e A. C. Fluit. 2001. Detection of *Candida* spp. in blood cultures using nucleic acid sequence-based amplification (NASBA). Diagn. Microbiol. Infect. Dis. **39**:155-160.

Brown, T. J., e R. M. Anthony. 2000. The addition of low numbers of 3′ thymine bases can be used to improve the hybridization signal of oligonucleotides for use within arrays on nylon supports. J. Microbiol. Methods **42**:203-207.

Endo, S., T. Komori, G. Ricci, A. Sano, K. Yokoyama, A. Ohori, K. Kamei, M. Franco, M. Miyaji, e K. Nishimura. 2004. Detection of gp43 of *Paracoccidioides brasiliensis* by

the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method. FEMS Microbiol. Lett. **234**:93-97.

Enosawa, M., S. Kageyama, K. Sawai, K. Watanabe, T. Notomi, S. Onoe, Y. Mori, e Y. Yokomizo. 2003. Use of loop-mediated isothermal amplification of the IS900 sequence for rapid detection of cultured *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. J. Clin. Microbiol. **41**:4359-4365.

Fujino, M., N. Yoshida, S. Yamaguchi, N. Hosaka, Y. Ota, T. Notomi, e T. Nakayama. 2005. A simple method for the detection of measles virus genome by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). J. Med. Virol. **76**:406-413.

Fukuda, S., S. Takao, M. Kuwayama, Y. Shimazu, e K. Miyazaki. 2006. Rapid detection of norovirus from fecal specimens by real-time reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay. J. Clin. Microbiol. **44**:1376-1381.

Furuhata K., T. Annaka, M. Ikedo, M. Fukuyama e S.-I. Yoshida. 2005. Comparison of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) and conventional culture for the detection of *Legionella* species in hot spring water samples in Japan. Biocontrol Science **10**:117-120.

Gunimaladevi, I., T. Kono, M. N. Venugopal, e M. Sakai. 2004. Detection of koi herpesvirus in common carp, *Cyprinus carpio* L., by loop-mediated isothermal amplification. J. Fish Dis. **27**:583-589.

Hara-Kudo, Y., M. Yoshino, T. Kojima, e M. Ikedo. 2005. Loop-mediated isothermal amplification for the rapid detection of *Salmonella*. FEMS Microbiol. Lett. **253**:155-161.

Hayashi, N., R. Araib, S. Tadac, H. Taguchic, e Y. Ogawa. 2007. Detection and identification of *Brettanomyces/Dekkera* sp. yeasts with a loop-mediated isothermal amplification method. J. Food Microbiol. doi:10.1016/j.fm.2007.01.007.

Hobson, R. P. 2003. The global epidemiology of invasive *Candida* infections – is the tide turning? J. Hosp. Infect. **55**:159-168.

Horisaka, T., K. Fujita, T. Iwata, A. Nakadai, A. T. Okatani, T. Horikita, T. Taniguchi, E. Honda, Y. Yokomizo, e H. Hayashidani. 2004. Sensitive and specific detection of *Yersinia pseudotuberculosis* by loop-mediated isothermal amplification. J. Clin. Microbiol. **42**:5349-5352.

Imai, M., A. Ninomiya, H. Minekawa, T. Notomi, T. Ishizaki, M. Tashiro, e T. Odagiri. 2006. Development of H5-RT-LAMP (loop-mediated isothermal amplification) system for rapid diagnosis of H5 avian influenza virus infection. Vaccine **24**:6679-6682.

Iwamoto, T., T. Sonobe, e K. Hayashi. 2003. Loop-mediated isothermal amplification for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex, *M. avium*, and *M. intracellulare* in sputum samples. J. Clin. Microbiol. **41**:2616-2622.

Kamachi, K., H. Toyoizumi-Ajisaka, K. Toda, S. C. Soeung, S. Sarath, Y. Nareth, Y. Horiuchi, K. Kojima, M. Takahashi, e Y. Arakawa. 2006. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification method for rapid diagnosis of *Bordetella pertussis* infection. J. Clin. Microbiol. **44**:1899-1902.

Kaneko, H., T. Kawana, E. Fukushima, e T. Suzutani. 2007. Tolerance of loop-mediated isothermal amplification to a culture medium and biological substances. J. Biochem. Biophys. Methods **70**:499-501.

Kato, H., T. Yokoyama, H. Kato, e Y. Arakawa. 2005. Rapid and simple method for detecting the *toxin B* gene of *Clostridium difficile* in stool specimens by loop-mediated isothermal amplification. J. Clin. Microbiol. **43**:6108-6112.

Kuboki, N., N. Inoue, T. Sakurai, F. Di Cello, D. J. Grab, H. Suzuki, C. Sugimoto, e I. Igarashi. 2003. Loop-mediated isothermal amplification for detection of African trypanosomes. J. Clin. Microbiol. **41**:5517-5524.

Loeffler, J., C. Dorn, H. Hebart, P. Cox, S. Magga, e H. Einsele. 2003. Development and evaluation of the Nuclisens Basic Kit NASBA for the detection of RNA from *Candida* species frequently resistant to antifungal drugs. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. **45**:217-220.

Maeda, H., S. Kokeguchi, C. Fujimoto, I. Tanimoto, W. Yoshizumi, F. Nishimura, e S. Takashiba. 2005. Detection of periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis* by loop-mediated isothermal amplification method. FEMS Immunol. Med. Microbiol. **43**:233-239.

Martin, C., D. Roberts, M. van der Weide, R. Rossau, G. Jannes, T. Smith, e M. Maher. 2000. Development of a PCR-based line probe assay for identification of fungal pathogens. J. Clin. Microbiol. **38**:3735-3742.

Martin, G. S., D. M. Mannino, S. Eaton, e M. Moss. 2003. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. N. Engl. J. Med. **348**:1546-1554.

Maruyama, F., T. Kenzaka, N. Yamaguchi, K. Tani, e M. Nasu. 2003. Detection of bacteria carrying the *stx2* gene by in situ loop-mediated isothermal amplification. Appl. Environ. Microbiol. **69**:5023-5028.

Minami, M., M. Ohta, T. Ohkura, T. Ando, K. Torii, T. Hasegawa, e H. Goto. 2007. Use of a combination of brushing technique and the loop-mediated isothermal amplification method as a novel, rapid, and safe system for detection of *Helicobacter pylori*. J. Clin. Microbiol. **44**:4032-4037.

Mori, Y., K. Nagamine, N. Tomita, e T. Notomi. 2001. Detection of loop-mediated isothermal amplification

reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. Biochem. Biophys. Res. Commun. **289**:150-154.

Mori, Y., M. Kitao, N. Tomita, e T. Notomi. 2004. Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA. J. Biochem. Biophys. Methods **59**:145-157.

Mori, Y., T. Hirano, e T. Notomi. 2006. Sequence specific visual detection of LAMP reactions by addition of cationic polymers. BMC Biotechnol. **6**:3.

Mukai, T., Y. Miyamoto, T. Yamazaki, e M. Makino. 2006. Identification of *Mycobacterium* species by comparative analysis of the *dnaA* gene. FEMS Microbiol. Lett. **254**:232-239.

Nagamine, K., K. Watanabe, K. Ohtsuka, T. Hase, e T. Notomi. 2001. Loop-mediated isothermal amplification reaction using a nondenatured template. Clin. Chem. **47**:1742-1743.

Nagamine, K., T. Hase, e T. Notomi. 2002. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. Mol. Cell. Probes **16**:223-229.

Nakagawa, N., e M. Ito. 2006. Rapid subtyping of influenza A virus by loop-mediated isothermal amplification: two cases of influenza patients who returned from Thailand. Jpn. J. Infect. Dis. **59**:200-201.

Nie X. 2005. Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification of DNA for detection of Potato virus Y. Plant Dis. **89**:605-610.

Notomi, T., H. Okayama, H. Masubuchi, T. Yonekawa, K. Watanabe, N. Amino, e T. Hase. 2000. Loop mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acids Res. **28**:e63.

Ohori, A., S. Endo, A. Sano, K. Yokoyama, K. Yarita, M. Yamaguchi, K. Kamei, M. Miyaji, e K. Nishimura. 2006. Rapid identification of *Ochroconis gallopava* by a loop-mediated

isothermal amplification (LAMP) method. Vet. Microbiol. **114**:359-365.

Ohtsuka, K., K. Yanagawa, K. Takatori, e Y. Hara-Kudo. 2005. Detection of *Salmonella enterica* in naturally contaminated liquid eggs by loop-mediated isothermal amplification, and characterization of *Salmonella* Isolates. Appl. Environ. Microbiol. **71**:6730-6735.

Okafuji, T., N. Yoshida, M. Fujino, Y. Motegi, T. Ihara, Y. Ota, T. Notomi, e T. Nakayama. 2005. Rapid diagnostic method for detection of mumps virus genome by loop-mediated isothermal amplification. J. Clin. Microbiol. **43**:1625-1631.

Parida, M., G. Posadas, S. Inoue, F. Hasebe, e K. Morita. 2004. Real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of West Nile Virus. J. Clin. Microbiol. **42**:257-263.

Parida, M., K. Horioke, H. Ishida, P. K. Dash, P. Saxena, A. M. Jana, M. A. Islam, S. Inoue, N. Hosaka, e K. Morita. 2005. Rapid detection and differentiation of dengue virus serotypes by a real-time reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay. J. Clin. Microbiol. **43**:2895-2903.

Playford, E. G., F. Kong, Y. Sun, H. Wang, C. Halliday, e T. C. Sorrell. 2006. Simultaneous detection and identification of *Candida*, *Aspergillus*, and *Cryptococcus* species by reverse line blot hybridization. J. Clin. Microbiol. 44:876-880.

Poon, L. L. M., B. W. Y. Wong, E. H. T. Ma, K. H. Chan, L. M. C. Chow, W. Abeyewickreme, N. Tangpukdee, K. Y. Yuen, Y. Guan, S. Looareesuwan, e J. S. M. Peiris. 2005. Sensitive and inexpensive molecular test for falciparum malaria: detecting *Plasmodium falciparum* DNA directly from heat-treated blood by loop-mediated isothermal amplification. Clin. Chem. **52**:303-306.

Posteraro, B., M. Sanguinetti, L. Masacci, L. Romano, G. Morace, e G. Fadda. 2000. Reverse cross blot hybridization assay for rapid detection of PCR-amplified DNA from *Candida* species, *Cryptococcus neoformans*, and *Saccharomyces cerevisiae* in clinical samples. J. Clin. Microbiol. **38**:1609-1614.

Saito, R., Y. Misawa, K. Moriya, K. Koike, K. Ubukata, e N. Okamura. 2005. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of *Mycoplasma pneumoniae*. J. Med. Microbiol. **54**:1037-1041.

Seki, M., Y. Yamashita, H. Torigoe, H. Tsuda, S. Sato, e M. Maeno. 2005. Loop-mediated isothermal amplification method targeting the *lytA* gene for detection of *Streptococcus pneumoniae*. J. Clin. Microbiol. **43**:1581-1586.

Song, T., C. Toma, N. Nakasone, e M. Iwanaga. 2005. Sensitive and rapid detection of *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* by a loop-mediated isothermal amplification method. FEMS Microbiol. Lett. **243**:259-263.

Suzuki, R., T. Yoshikawa, M. Ihira, Y. Enomoto, S. Inagaki, K. Matsumoto, K. Kato, K. Kudo, S. Kojima, e Y. Asano. 2006. Development of the loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of cytomegalovirus DNA. J. Virol. Methods **132**:216-221.

Thai, H. T. C., M. Q. Le, C. D. Vuong, M. Parida, H. Minekawa, T. Notomi, F. Hasebe, e K. Morita. 2004. Development and evaluation of a novel loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus. J. Clin. Microbiol. **42**:1956-1961.

Thekisoe, O. M. M., N. Inoue, N. Kuboki, D. Tuntasuvan, W. Bunnoy, S. Borisutsuwan, I. Igarashi, e C. Sugimoto. 2005. Evaluation of loop-mediated isothermal amplification

(LAMP), PCR and parasitological tests for detection of *Trypanosoma evansi* in experimentally infected pigs. Vet. Parasitol. **130**:327-330.

Torigoe, H., M. Seki, Y. Yamashita, A. Sugaya, e M. Maeno. 2007. Detection of *Haemophilus influenzae* by Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) of the outer membrane protein *P6* gene. Jpn. J. Infect. Dis. **60**:55-58.

Widjojoatmodjo, M. N., A. Borst, R. A. F. Schukkink, A. T. A. Box, N. M. M. Tacken, B. V. Gemen, J. Verhoef, B. Top, e A. C. Fluit. 1999. Nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) detection of medically important *Candida* species. J. Microbiol. Methods **38**:81-90.

Yano, A., R. Ishimaru, e R. Hujikata. 2007. Rapid and sensitive detection of heat-labile I and heat-stable I enterotoxin genes of enterotoxigenic *Escherichia coli* by Loop-Mediated Isothermal Amplification. J. Microbiol. Methods **68**: 414-420.

Yoshida, A., S. Nagashima, T. Ansai, M. Tachibana, H. Kato, H. Watari, T. Notomi, e T. Takehara. 2005. Loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of the periodontopathic bacteria *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, and *Treponema denticola*. J. Clin. Microbiol. **43**:2418-2424.

Yoshino, M., H. Watari, T. Kojima, e M. Ikedo. 2006. Sensitive and rapid detection of koi herpesvirus by LAMP method. Fish Pathol. **41**:19-27.

Lisboa, 4 de Maio de 2007

REIVINDICAÇÕES

1. Processo para a detecção e identificação de leveduras de interesse clínico, baseado na amplificação isotérmica de uma região do rADN, com posterior discriminação dos fragmentos de ácidos nucleicos amplificados por hibridação com um painel de sondas oligonucleotídicas específicas para as várias espécies, **caracterizado por:**

   a) se proceder à extracção do ADN das leveduras, a partir das culturas purificadas, ou directamente a partir das amostras presumivelmente infectadas;

   b) se utilizar um conjunto de oligonucleótidos iniciadores não específicos, e relativamente conservados em fungos, para amplificar os fragmentos do rADN fúngico a partir de uma gama diversificada de espécies;

   c) se proceder à amplificação isotérmica do rADN fúngico, usando a tecnologia LAMP, e utilizando os oligonucleótidos iniciadores não específicos;

   d) se proceder, durante a reacção de amplificação, à marcação dos fragmentos de ADN com uma molécula marcadora, usando nucleótidos modificados (p.e. com digoxigenina);

   e) se utilizar um conjunto de sondas oligonucleotídicas específicas para as várias espécies de leveduras com relevância clínica, bem como uma sonda oligonucleotídica universal para fungos, imobilizadas num suporte sólido, como por exemplo, uma tira de membrana de nylon;

   f) se realizar uma hibridação reversa dos fragmentos de ADN amplificados e marcados com um painel de sondas oligonucleotídicas, específicas para as

várias espécies, imobilizadas num suporte sólido (p.e. membrana de nylon);

g) se detectar a ocorrência de hibridação entre os fragmentos amplificados e as sondas específicas, mediante revelação do suporte sólido utilizando um método colorimétrico para detecção da molécula marcadora (p.e. sistema de detecção colorimétrico serológico da molécula digoxigenina, com o uso de uma fosfatase alcalina e respectivo substrato).

2. Processo para a detecção e identificação de leveduras, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** as leveduras clinicamente relevantes pertencerem ao seguinte grupo de espécies: *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida lusitaniae*, *Candida krusei*, *Pichia anomala*, *Saccharomyces cerevisiae*.

3. Processo para a detecção e identificação de leveduras, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** os oligonucleótidos iniciadores, usados na amplificação isotérmica de ADN, terem ou serem baseados (p.e. por extensão ou encurtamento das sequências a partir das extremidades, e delecção, troca e adição de nucleótidos *internos à sequência) nas seguintes sequências*, ou das sequências complementares respectivas:

Seq.1: 5'-GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG-3'

Seq.2: 5'-CCT TCC CTT TCA ACA ATT TCA C-3'

Seq.3: 5'-CTG CAT TCC CAA ACA ACT CGA CTC ACA GAG GGT GAG AAT CCC G-3';

Seq.4: 5'-TAT TGG CGA GAG ACC GAT AGC GTT TCA CTC TCT TTT CAA AGT TC-3'.

4. Processo para a detecção e identificação de leveduras, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** as sondas oligonucleotídicas específicas se encontrarem imobilizadas num suporte sólido, como por exemplo uma tira de membrana de nylon.

5. Processo para a detecção e identificação de leveduras, de acordo com a reivindicação anterior, **caracterizado por** as sondas de oligonucleótidos específicos para as várias espécies de leveduras clinicamente relevantes terem como alvo regiões complementares localizadas no interior do fragmento de ADN amplificado.

6. Processo para a detecção e identificação de leveduras, de acordo com a reivindicação anterior, **caracterizado por** as sondas específicas usadas terem ou serem baseadas (p.e. por extensão ou encurtamento das sequências a partir das extremidades, e delecção, troca e adição de nucleótidos internos à sequência) em *qualquer uma das seguintes sequências*, ou das sequências complementares respectivas:

U210: 5'- TCG AGT TGT TTG GGA ATG CAG CTC - 3'
Ca170: 5'- TGA GAT GAC CCG GGT CTG TGT AAA - 3'
Ca176: 5'- GAC CCG GGT CTG TGT AAA GTT CC - 3'
Cg175: 5'- GTG TCA GTT CTT TGT AAA GGG TGC TCG - 3'
Cg166: 5'- GTG GCG AGG GTG TCA GTT CTT TGT - 3'
Cd176: 5'- GGC CCG GGT CTA TGT AAA GTT CC - 3'
Cl180: 5'- GAC TCT TTG CAC CGC GGC TCC - 3'
Ct171: 5'- GAG ATG ATC CAG GCC TAT GTA AAG T - 3'
Ct166: 5'- GCG ATG AGA TGA TCC AGG CCT ATG T - 3'
Cp166: 5'- GCG ATG AGA TGT CCC AGA CCT ATG - 3'
Cp171: 5'- GAG ATG TCC CAG ACC TAT GTA AAG TTC - 3'
Ck175: 5'- GGC GGA AGC AGT GAG GCC CTT CT - 3'
Pa171: 5'- GAG ATG CCC ATT CCT ATG TAA GGT GC - 3'
Pa176: 5'- GCC CAT TCC TAT GTA AGG TGC TAT C - 3'
Sc176: 5'- GTG CGG TTC TTT GTA AAG TGC CTT CG - 3'

7. Processo para a detecção e identificação de leveduras, de acordo com a reivindicação anterior, **caracterizado por** as sondas específicas poderem, ou não, ser adicionadas de uma cauda de nucleótidos de timina na sua extremidade 3'.

8. Processo para a detecção e identificação de leveduras, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** a reacção de amplificação isotérmica LAMP de ADN ser optimizada, mediante a utilização combinada de pelo menos um dos oligonucleótidos iniciadores da reivindicação 3, dos dNTPs, da solução de ADN molde, betaína, $MgCl_2$, polimerase *Bst*, com ou sem desnaturação térmica prévia do ADN molde.

9. Processo para a detecção e identificação de leveduras, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizado por** a reacção LAMP ser realizada entre 55 °C e 70 °C, preferencialmente entre 60 °C e 65 °C, durante mais de 15 minutos, preferencialmente entre 60 e 90 minutos.

10. Processo para a detecção e identificação de leveduras, de acordo com as reivindicações 8 a 9, **caracterizado por** a reacção de amplificação isotérmica LAMP de ADN decorrer com a adição de ADN genómico extraído, ou directamente de suspensões celulares de leveduras, à mistura reaccional de amplificação.

11. Processo para a detecção e identificação de leveduras, de acordo com as reivindicações 8 a 10, **caracterizado por** se utilizarem nucleótidos modificados com uma

molécula marcadora (biotina, digoxigenina, ou outra) na reacção de amplificação isotérmica de ADN.

12. Processo para a detecção e identificação de leveduras, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** a hibridação reversa dos fragmentos de ADN amplificados, marcados com uma molécula marcadora, ser realizada contra um painel de sondas específicas para as várias espécies, previamente imobilizadas num suporte sólido (p.e. tiras de nylon).

13. Utilização do processo para a detecção e identificação de leveduras, de acordo com as reivindicações anteriores, **caracterizado por** se destinar à identificação de leveduras, particularmente à identificação de leveduras de interesse clínico.

14. Utilização do processo para a detecção e identificação de leveduras, de acordo com a reivindicação anterior, **caracterizado por** se aplicar a um estojo de detecção e identificação de leveduras de interesse clínico.

15. Estojo para a detecção e identificação de leveduras **caracterizado por** se basear no processo das reivindicações 1 a 12, contendo pelo menos um dos oligonucleótidos iniciadores da reivindicação 3 e as sondas da reivindicação 4.

16. Utilização do estojo para a detecção e identificação de leveduras, de acordo com a reivindicação anterior, **caracterizado** por se aplicar à detecção e identificação de leveduras clinicamente relevantes, com aplicação em

laboratórios de análises clínicas, hospitais e centros clínicos.

Lisboa, 4 de Maio de 2007